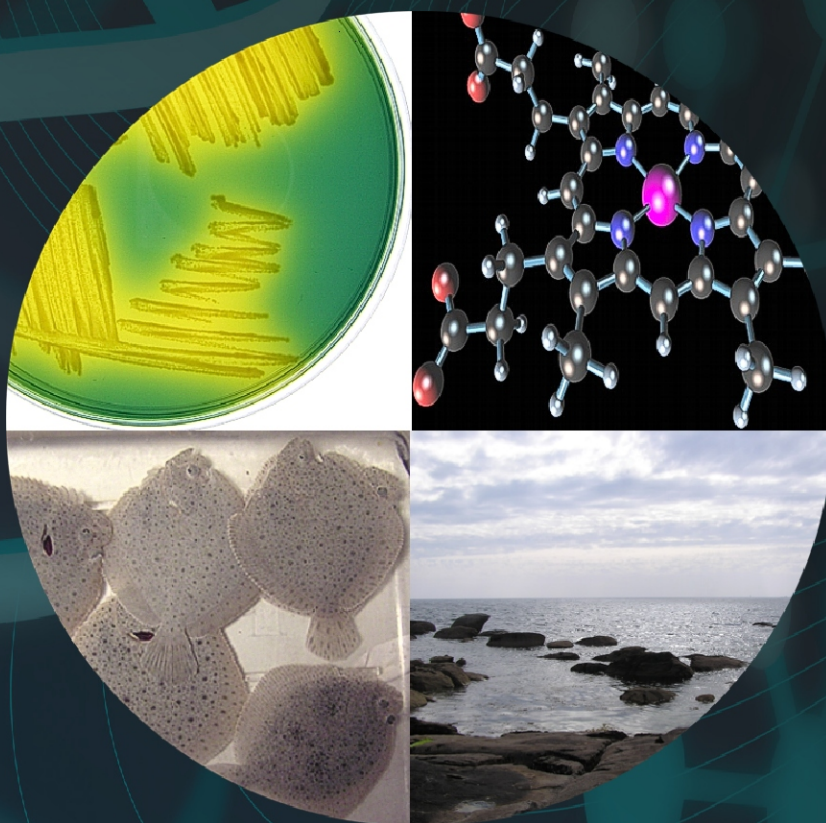


Análisis genético del sistema de captación de hemo en *Vibrio anguillarum*: Caracterización estructural y funcional



Susana Mouriño López
Tesis Doctoral 2006



**Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Biología ~ Instituto de Acuicultura
Universidad de Santiago de Compostela**

**Análisis genético del sistema de captación de
hemo en *Vibrio anguillarum*:
Caracterización estructural y funcional**

Memoria que presenta
Susana Mouriño López
para optar al Grado de Doctor en
Ciencias Biológicas

Santiago de Compostela 2006

El trabajo descrito en la presente memoria ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyectos AGL2000-0492 y AGL2003-00086) y la Xunta de Galicia (Proyectos PGIDT01PXI26202PN y PGIDIT04PXIC23501PN).

Durante su realización se ha disfrutado de una Beca Predoctoral, así como ayudas para una estancia en la Oregon Health Science University (Portland, OR – USA), concedida por la Consellería de Innovación, Industria e Comercio de la Xunta de Galicia.

RESUMEN

Vibrio anguillarum está considerado como uno de los patógenos bacterianos más importantes dentro de la acuicultura marina, siendo responsable de numerosos brotes de vibriosis en especies de gran valor comercial. Uno de sus principales factores de virulencia reside en la capacidad para obtener hierro del hospedador, pudiendo utilizar distintos compuestos de hemo como fuentes de hierro. Debido a su abundancia en el organismo hospedador, la existencia de mecanismos específicos para la captación y utilización de hemo, posiblemente, juegan un papel relevante en la supervivencia y multiplicación de este microorganismo durante el proceso infeccioso.

En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización de un *cluster* génico que codifica la captación y transporte de la molécula de hemo hasta el interior celular. Dicho sistema incluye genes homólogos a sistemas similares caracterizados en otras especies bacterianas. Los genes identificados codifican un receptor de membrana externa, HuvA, una proteína de transporte periplásmica, HuvB, y un sistema de transporte ABC formado por la proteína canal, HuvC, y una proteína con actividad ATPasa, HuvD. El proceso de transporte activo desde el medio extracelular hasta el espacio periplásmico depende de un sistema TonB de transducción de energía codificado por los genes *tonB1*, *exbB1* y *exbD1*, los cuales se transcriben como un único operón junto con los genes *huvB*, *huvC* y *huvD*. Finalmente, el sistema se completa con un operón formado por los genes *huvX* y *huvZ*, cuyos productos, posiblemente citoplasmáticos, carecen hasta el momento de una función conocida. Todos estos genes, a excepción de *huvX*, resultaron esenciales para la utilización de compuestos de hemo como fuentes de hierro. La expresión de todo este sistema está regulada, al nivel transcripcional, por la concentración de hierro intracelular a través de la intervención del regulador negativo Fur.

La organización espacial del sistema posee características únicas que lo diferencian de sistemas homólogos descritos en otras especies de la familia *Vibrionaceae* y constituye una posible evidencia de los reordenamientos genéticos derivados de procesos de evolución y diferenciación entre especies. Asimismo, la detección de los determinantes genéticos del *cluster* génico descrito en distintas cepas de *V. anguillarum* pertenecientes a los serotipos O1 al O10, confirma que la capacidad de utilización de hemo es una característica propia de la especie. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto una notable variabilidad genética intraespecífica en el sistema de utilización de hemo, ya que únicamente los genes *tonB1*, *exbB1* y *exbD1* están presentes en todas las cepas estudiadas. La identificación de un segundo receptor de membrana externa, HuvS, con una baja similitud en la secuencia aminoacídica, aunque funcionalmente intercambiable con HuvA, sugiere también la posible existencia de dos líneas filogenéticas dentro de *V. anguillarum*, o bien la aparición de eventos de transferencia génica horizontal. La presencia universal del sistema TonB1 en todas las cepas y la identificación de secuencias nucleotídicas específicas de *V. anguillarum* sugiere su posible utilidad en el diseño de métodos de diagnóstico basados en la PCR.

Los resultados obtenidos demuestran la existencia en *V. anguillarum* de dos complejos TonB denominados sistemas TonB1 y TonB2. A través del análisis de dos cepas pertenecientes al serotipo O1 y O2, respectivamente, se confirmó la participación de ambos sistemas en distintos mecanismos de obtención de hierro, siendo funcionalmente intercambiables en lo referente a la utilización de la molécula de hemo y ferricromo. Sin embargo el sistema TonB2 participa específicamente en el transporte de determinados complejos Fe-sideróforo y su mutación influye en el tiempo necesario para el completo desarrollo de la infección poniendo de manifiesto el papel que el mecanismo de captación y transporte de hemo juega en la evolución de la infección causada por *V. anguillarum*.

[...] Mi lucha es dura y vuelvo
con los ojos cansados
a veces de haber visto
la tierra que no cambia
pero al entrar tu risa
sube al cielo buscándome
y abre para mí todas
las puertas de la vida.

Pablo Neruda

*A mis padres, mi abuela,
mis hermanos y Rafa*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, debo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, el Dr. Manuel L. Lemos Ramos y el Dr. Carlos Rodríguez Osorio, por la confianza que depositaron en mí en el momento de iniciar este largo viaje y por toda la ayuda prestada durante estos años. Gracias por todo lo que he aprendido, tanto a nivel personal como profesional y, sobre todo, muchísimas gracias por darme la oportunidad de alcanzar mi sueño.

Gracias a Rafa, por aguantarme y apoyarme en todo momento. Lo máximo que puedo decir es que nunca hubiera llegado hasta aquí de no ser por ti.

Gracias a Sandra (¡hola rubia!), no por ser mi compañera de laboratorio sino por ser mi amiga y compartir conmigo cada minuto que he pasado entre pipetas y bichos. Por las muchísimas cosas buenas (unas pocas malas) que hemos vivido, por los congresos, los viajes en avión, tu gran corazón y tu amistad. Al final hemos sobrevivido. A Tere por haberme apoyado en los momentos de crisis y por estar siempre disponible para escucharme. A Óscar porque, aunque llegó casi al final de este trabajo, el tiempo que trabajamos juntos fue cuando más disfruté del laboratorio (gracias por tu orden, tú sí que me entiendes). Gracias a Sol, Nuria, Bea, Celsa y Manuel, por sus consejos, ánimos, paciencia y, sobre todo, por todo el material que he cogido “prestado”.

Gracias a mis amigos, especialmente a Mari, Michel, Javi, María, Berto, David, Rosa, Paqui y Sonia, por estar siempre ahí y por ayudarme a desconectar entre risas y grandes momentos. Si me olvido de alguno no me lo tengáis en cuenta. Gracias a Ale, Clau y toda la gente maravillosa de Portland. Por enseñarme a confiar en mí misma y por dejarme entrar en vuestras vidas (¡viva el Trapiche y el Rock Bottom!). Este trabajo tiene un poco de cada uno de vosotros y nunca hubiera sido igual sin vuestro apoyo. Gracias a Luís, por darme ideas para la portada (al final ha quedado muy bien).

A mis compañeros de laboratorio por aguantar mis manías (sé que son muchas) y por echarme una mano siempre que lo he necesitado. Al resto de la gente de la Facultad de Biología y a todos los que han ido pasando por el Instituto de Acuicultura (Carmen, Placeres, Inés, ...). Gracias especialmente a la Dra. Alicia Estévez Toranzo y al Dr. Juan L. Barja, así como al Dr. Jorge H. Crosa por todos sus sabios consejos y su dirección durante mi estancia en su laboratorio. También debo agradecer este trabajo al Dr. Jaime Gómez Márquez por darme la primera oportunidad en el mundo de la investigación y por enseñarme el significado de la constancia y la rigurosidad en el trabajo. Gracias especialmente a la Dra. María Isabel

Cadavid Torres, por darme siempre su sincera opinión y no dejarme nunca tirar la toalla. Sin su ayuda quizás hoy no estaría aquí.

Finalmente le agradezco a mis padrinos, Toñuco y María, a mis padres y a mis hermanos, Pepe y Yago, el haberme mostrado todo su cariño siempre que lo he necesitado. Ha sido un camino muy largo y difícil pero al final ha valido la pena.

ABREVIATURAS

ALA: Ácido δ -Aminolevulínico

Amp: Ampicilina

CAS: Cromo Azurol S

Cm: Cloranfenicol

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

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

ddNTP: 2'-3'-dideoxiribonucleósidos 5'-trifosfato

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DO: Densidad Óptica

EDDA: Ácido etilen-diamino-di-(o-hidroxifenilacético)

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

FAC: Citrato férrico amónico

Gm: Gentamicina

Hb: Hemoglobina

HDMTA: Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio

Hm: Hemina

IPTG: Isopropil- β -D-galactósido

Kan: Kanamicina

LB: Caldo Luria-Bertani

LBA: Agar Luria-Bertani

LD₅₀: Dosis Letal 50

NB: Medio Nutritivo

PPIX: Protoporfirina IX

PSA: Persulfato de amonio

p/v: Peso/Volumen

Rif: Rifampicina

SDS: Dodecil Sulfato Sódico

SSC: Tampón Citrato/Cloruro Sódico

Te: Tetraciclina

TE: Tampón Tris-EDTA

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

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

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

Vol: Volumen

v/v: Volumen/Volumen

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido

ÍNDICE

	Página
I-INTRODUCCIÓN	
1. <i>V. anguillarum</i> como agente causal de vibriosis	3
1.1 La vibriosis en la acuicultura	3
1.2 Sintomatología y epidemiología	4
1.3 Características generales de <i>V. anguillarum</i>	5
1.4 Diagnóstico del agente causal de la vibriosis	6
1.5 Prevención y tratamiento de la vibriosis causada por <i>V. anguillarum</i>	8
1.6 Factores de virulencia de <i>V. anguillarum</i>	11
2. Importancia del hierro en los procariotas	18
2.1 Disponibilidad de hierro	18
2.2 Fuentes de hierro y mecanismos bacterianos de captación	19
2.2.1 Captación de hierro mediada por sideróforos	20
2.2.2 Sistemas independientes de sideróforos	24
3. El hemo como fuente de hierro para los microorganismos	25
3.1 El hemo en el metabolismo bacteriano	25
3.2 El hemo como fuente de hierro	28
3.2.1 Utilización de hemóforos	29
3.2.2 Sistemas de transporte asociados a la membrana externa	30
3.2.2.1 Receptores específicos de membrana externa	31
3.2.2.2 Sistemas TonB	33
3.2.2.3 Transportadores periplásmicos y sistemas ABC	37
3.3 Utilización del grupo hemo en el citoplasma bacteriano	42
4. Regulación de la expresión génica de los sistemas de captación de hierro	44
4.1 Regulación Fe ⁺² -Fur	45
4.2 Reguladores LysR	49
4.3 Factores sigma (σ) ECF	51
4.4 Mecanismos de control de la expresión génica a través de la acción conjunta de factores activadores y represores de la transcripción	52

5. Estado actual del conocimiento sobre la captación de hemo en <i>V. anguillarum</i>	54
II- OBJETIVOS	59
III-MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Cepas bacterianas, cultivo y conservación	63
1.1 Medios de cultivo	63
1.2 Suplementos	64
2. Purificación de ácidos nucleicos	65
2.1 DNA plasmídico y fragmentos de DNA	65
2.1.1 Purificación a pequeña escala	65
2.1.2 Purificación a gran escala	65
2.2 DNA cromosómico	66
2.3 RNA	66
2.4 Purificación de DNA a partir de cultivos bacterianos puros y mixtos	67
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	68
3.1 PCR-Inversa	68
4. Clonación de fragmentos de DNA	70
5. Transformación de plásmidos	73
5.1 Cepas de <i>E. coli</i>	73
5.2 Cepas de <i>V. anguillarum</i>	74
6. Hibridación DNA-DNA	75
7. Secuenciación y análisis de datos	76
8. Obtención de mutantes cromosómicos	78
8.1 Mutagénesis por intercambio alélico	78
8.2 Mutagénesis por <i>Lambda-Red</i> del sistema TonB1	81
9. Reverso Transcripción (RT)-PCR	83
10. Primer Extension	84

11. Fusiones transcripcionales y ensayos de actividad β-galactosidasa	86
12. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de quelantes de hierro	88
13. Ensayos de utilización de hemina y hemoglobina	89
14. Ensayos de complementación	89
15. Purificación y análisis de proteínas de membrana	90
16. Ensayos de virulencia	91

IV-RESULTADOS

1. Caracterización estructural del sistema de captación y transporte de hemo en <i>V. anguillarum</i>	95
1.1 Secuenciación y análisis de los genes asociados a la utilización de hemo.....	95
1.2 Similitud con otros sistemas de captación de hemo	109
2. Análisis funcional de los genes relacionados con la captación de hemo en <i>V. anguillarum</i>	112
2.1 Análisis de los genes <i>huvA</i> , <i>huvZ</i> , <i>huvX</i> , <i>huvB</i> , <i>huvC</i> y <i>huvD</i>	112
2.1.1 Construcción de mutantes cromosómicos	112
2.1.2 Utilización de compuestos de hemo como fuentes de hierro	115
2.1.2.1 Utilización de Hemina	117
2.1.2.2 Utilización de Hemoglobina	118
2.2 Análisis funcional del sistema de utilización de hemo de <i>V. anguillarum</i> en <i>Escherichia coli</i>	119
2.2.1 Construcción de los plásmidos de complementación	120
2.2.2 Utilización de compuestos de hemo como fuente de porfirinas:	
Complementación de la cepa EB53 de <i>E. coli</i>	123
2.2.3 Utilización de hemo como fuente de hierro: Complementación de la cepa 101ESD de <i>E. coli</i>	124
2.3 Análisis de proteínas de membrana	127
2.4 Análisis funcional del complejo TonB-ExbB-ExbD y su relación con los mecanismos de captación de hierro en <i>V. anguillarum</i>	129

2.4.1 Efecto de la mutación del gen <i>tonB1</i> sobre la capacidad de utilización de distintas fuentes de hierro por <i>V. anguillarum</i>	130
2.4.2 Caracterización y análisis funcional de un segundo sistema TonB en la cepa 775 de <i>V. anguillarum</i>	131
2.4.3 Análisis funcional de los sistemas TonB1 y TonB2 en <i>E. coli</i> y <i>V. cholerae</i>	134
2.4.4 Análisis funcional del complejo TonB-ExbB-ExbD en el serotipo O2 de <i>V. anguillarum</i>	136
2.4.4.1 Aislamiento y Secuenciación de los sistemas TonB1 y TonB2 en la cepa RV22	137
2.4.4.2 Papel del sistema TonB1 y TonB2 en la captación de distintas fuentes de hierro en la cepa RV22	143
2.4.4.3 Contribución del sistema TonB1 y TonB2 a la virulencia de <i>V. anguillarum</i> RV22	145
3. Organización transcripcional y regulación de los genes asociados a la captación y transporte de hemo	148
3.1 Determinación del número de unidades transcripcionales	148
3.1.1 Operón <i>huvXZ</i>	149
3.1.2 Operón <i>tonB1exbB1D1-huvBCD</i>	150
3.1.3 Transcripción de los operones <i>huvXZ</i> y <i>tonB1exbB1D1-huvBCD</i> en los mutantes cromosómicos B106 (Δ <i>huvX</i>) y B128 (Δ <i>huvB</i>).....	151
3.1.4 Operón <i>exbB2exbD2tonB2</i>	152
3.2 Caracterización de los promotores del <i>cluster</i> de captación y transporte de hemo	153
3.2.1 Promotor de <i>huvA</i>	153
3.2.2 Promotores divergentes de los operones <i>huvXZ</i> y <i>tonB1exbB1D1-huvBCD</i>	155
3.2.3 Región <i>exbD1-huvB</i>	157
3.3 Análisis transcripcional y regulación del sistema de transporte de hemo	158
3.3.1 Análisis de la expresión dependiente de hierro	158
3.3.2 Análisis de la actividad promotora regulada por la proteína Fur	160
3.3.3 HuvX como posible regulador del operón <i>tonB1exbB1D1-huvBCD</i>	163

3.3.4 Grupo hemo como regulador transcripcional.....	164
3.3.5 Análisis de la actividad promotora de la región <i>exbD1-huvB</i>	166
3.4 Caracterización de un regulador transcripcional de la familia LysR.....	167
3.4.1 Clonaje y análisis de la secuencia del gen <i>huvR</i>	168
3.4.2 Análisis de la expresión de <i>huvR</i>	172
3.4.3 Análisis de la influencia de HuvR sobre la expresión del receptor de grupos hemo HuvA	173
4. Variabilidad genética de la especie <i>V. anguillarum</i> en los sistemas de captación y transporte de hemo	177
4.1 Detección del <i>cluster</i> génico caracterizado en la cepa 775 en cepas incluidas en los serotipos O1 a O10	178
4.2 Presencia del sistema TonB1 y TonB2 en cepas de <i>V. anguillarum</i> , pertenecientes a serotipos O1 a O10	182
4.3 Identificación de un nuevo receptor de membrana externa.....	185
4.3.1 Caracterización de la secuencia del gen <i>huvS</i>	185
4.3.2 HuvS como receptor de membrana externa para el grupo hemo.....	193
4.3.2.1 Complementación de la cepa 101ESD ($\Delta(entC-entA)$) de <i>Escherichia coli</i>	194
4.3.2.2 Complementación del mutante de <i>V. anguillarum</i> B146 ($\Delta huvA$).....	194
5. El sistema de captación y transporte de hemo en el diagnóstico específico de <i>V. anguillarum</i>.....	197

V-DISCUSIÓN

1. Caracterización del sistema de captación y transporte de hemo de <i>V.</i> <i>anguillarum</i>	207
1.1 Receptor de membrana externa HuvA	208
1.2 Proteína periplásmica (HuvB) y sistema de transporte ABC (HuvC y HuvD).....	211
1.3 Proteínas HuvX y HuvZ	212

1.4 Sistemas TonB y su papel en los mecanismos de captación de hierro en <i>V. anguillarum</i>	214
1.4.1 Sistemas TonB y virulencia.....	218
2. Regulación del sistema de captación y transporte de hemo en <i>V. anguillarum</i>	219
2.1 Análisis de las regiones promotoras: Identificación de <i>Fur-boxes</i>	221
2.2 Regulación de la expresión génica dependiente de Fur.....	224
2.3 Otras posibilidades de regulación a nivel transcripcional	226
2.3.1 El hemo como posible factor de regulación	226
2.3.2 ¿Existen otros mecanismos adicionales de regulación?	227
3. Variabilidad genética intraespecífica del sistema de captación de hemo en <i>V. anguillarum</i>	231
4. Utilidad del sistema de captación de hemo en el diagnóstico y prevención de la vibriosis.....	235
 VI- CONCLUSIONES.....	 239
 VII- BIBLIOGRAFÍA.....	 245
 VIII-ANEXOS	
Anexo I.....	277
Anexo II	283
Anexo III.....	289
Anexo IV	303

I. INTRODUCCIÓN

1. *Vibrio anguillarum* COMO AGENTE CAUSAL DE VIBRIOSIS

La acuicultura se ha desarrollado considerablemente durante las últimas décadas y hoy en día representa cerca del 20% del total mundial de pescado consumido. En el sector de la acuicultura marina, su valor comercial y las elevadas inversiones en infraestructuras, hacen que sean de especial interés todas las investigaciones relacionadas con las posibles enfermedades asociadas a este tipo de cultivo. Los patógenos microbianos, dentro de los que se incluyen virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos, son los más importantes en términos de su impacto en la producción y supervivencia de las poblaciones, así como en sus posibles consecuencias económicas. En muchos casos estos microorganismos no son sólo patógenos de sus hospedadores marinos, sino que también pueden afectar a otras especies e incluso a los humanos llegando a ser un verdadero problema de salud pública.

1.1 La vibriosis en la acuicultura

El término vibriosis define infecciones sistémicas primarias causadas por una especie de *Vibrio* patógena y que no incluyen aquellas infecciones no específicas en las que pueden estar involucrados un gran número de *Vibrio* spp como agentes oportunistas secundarios. Respecto al agente causal de la infección, ésta puede desarrollarse a partir de distintas especies pertenecientes al género *Vibrio*, como son *V. anguillarum*, *V. tubiashii*, *V. ordalii*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* biotipo 2, *V. parahaemolyticus* y *V. salmonicida*.

Sin duda la vibriosis es la infección bacteriana más grave que pueden padecer los peces marinos, tanto en estado libre como criados en cautividad, siendo la especie *V. anguillarum* la principal responsable de epizootias en una gran variedad de peces, crustáceos y moluscos (Myhr *et al.*, 1991; Toranzo y Barja, 1990). Así, en 1817, se describieron los primeros brotes de vibriosis en la especie *Anguilla vulgaris* y que, inicialmente, se asociaron a la bacteria *Bacillus anguillarum*. Posteriormente, en 1909 se describió por primera vez el microorganismo *V. anguillarum* considerado responsable de la infección denominada “peste roja de las anguilas”. Al comparar la patología descrita en ambos casos, así como las características bioquímicas de ambas bacterias, se puso de manifiesto que el agente etiológico en ambos brotes era el mismo. Pese a todo, en los últimos años la especie *V. anguillarum* ha sufrido continuas revisiones. Así, por ejemplo, el antiguamente denominado *V. anguillarum*

biotipo II constituye actualmente la especie *V. ordalii* (Schiewe *et al.*, 1981). *V. anguillarum* fue reclasificado como *Listonella anguillarum*, género al que fue adscrito en base a análisis de las secuencias de rRNA 5S y en el cual estarían incluidos *V. damsela* y *V. pelagius* (Macdonell y Colwell, 1985). Sin embargo en el presente trabajo se recoge la nomenclatura, más ampliamente aceptada, de *V. anguillarum* para denominar a este agente bacteriano causante de vibriosis.

Se trata de un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo el responsable de provocar septicemias hemorrágicas características en una amplia variedad de especies de peces de gran importancia económica, como son el salmón del Pacífico y del Atlántico (*Oncorhynchus* spp. y *Salmo salar*), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*), lubina estriada (*Morone saxatilis*), bacalao (*Gadus morhua*) y anguila Japonesa y Europea (*Anguilla japonica* y *Anguilla anguilla*) (Actis *et al.*, 1999; Toranzo y Barja, 1993; Toranzo *et al.*, 2005). Los brotes de vibriosis han sido, a través de los años, un problema continuo y un factor limitante para el desarrollo de la piscicultura marina en todo el mundo incluidas nuestras costas. Desde la descripción de su primer aislamiento en 1985 (Devesa *et al.*, 1985) *V. anguillarum* ha sido el principal agente causal de vibriosis en el cultivo de alevines de rodaballo en Galicia, aunque también se ha podido aislar esporádicamente a partir de salmón y de trucha arcoiris (Toranzo y Barja, 1990).

1.2 Sintomatología y epidemiología

Los brotes de vibriosis afectan a peces que viven tanto en aguas saladas como salobres, por lo regular poco profundas y, generalmente, tienen lugar entre la primavera y el otoño, cuando la temperatura del agua sube o baja rápidamente. El periodo de incubación está, por tanto, directamente relacionado con la temperatura del agua, aunque también depende de la virulencia de la cepa y del grado de estrés al que se encuentre sometido el animal. De este modo la enfermedad se declara por debajo de un umbral de temperatura variable que va de los 10-11 °C en peces salmónidos a límites entre 15-16 °C en peces planos (lenguado, rodaballo) y anguílidos. En lo referente a la vía de entrada se supone que el patógeno penetra en el organismo hospedador a través del tracto gastrointestinal (Bordas *et al.*, 1998; Olsson *et al.*, 1996). Generalmente el primer síntoma de una posible infección es la inactividad y la falta de apetito, así como un oscurecimiento de la piel y la muerte súbita. En el caso de rodaballos

jóvenes y salmónidos éstos pueden ser los únicos síntomas aunque, a veces, se manifiesta una hidropesía periorbital y/o abdominal. Los síntomas clínicos característicos de la vibriosis incluyen úlceras rojas en las áreas ventral y lateral del pez, concretamente en la base de las aletas y cola, alrededor del ano y en la boca. La evolución de la infección puede variar entre una fase aguda y otra crónica. En el caso de la evolución aguda, en la piel aparecen protuberancias de color oscuro que se ulceran con un exudado teñido de sangre. Internamente se produce una dilatación y licuefacción del bazo y riñón. Por otro lado si la evolución de la enfermedad es crónica, las lesiones de la piel pueden pasar a una granulomatosis, las branquias pierden color y las hemorragias de la cavidad abdominal terminan convirtiéndose en adherencias fibrinosas entre las vísceras. El ojo también suele estar afectado, siendo un primer síntoma de la infección la opacidad de la córnea y que puede llegar a ulcerarse con pérdida del contenido de la cavidad orbital.

Por regla general la mortalidad es de curso rápido y alta (hasta de un 80% en casos de infección aguda). Incluso aplicando un tratamiento específico contra la vibriosis, frecuentemente se pierde entre el 10 y el 20% de los peces. Estas pérdidas se producen en pocos días, si se trata de casos agudos, o durante períodos prolongados en aquellos brotes crónicos. Normalmente las mortalidades son mayores cuando más alta sea la densidad de la población.

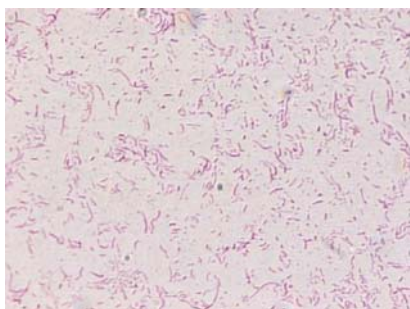


Efecto de la infección causada por *V. anguillarum* en lubina (*Dicentrarchus labrax*)

1.3 Características generales de *V. anguillarum*

Morfológicamente *V. anguillarum* es un bacilo Gram-negativo, curvado, de 0,5 x 1,0 a 2,0 μm y móvil por medio de un único flagelo polar. Este microorganismo crece bien en la mayor parte de los medios ordinarios suplementado con un mínimo de NaCl del 1 al 1,5%. Este requerimiento absoluto por el ión Na^+ hace que se encuentre en hábitats acuáticos con un amplio rango de salinidades. Las colonias alcanzan una dimensión de 0,5 a 1 mm en cuarenta y ocho horas y a una temperatura de 25 °C, siendo sensibles a un compuesto de pteridina denominado agente vibriostático 129/150 (2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina) y al antibiótico novobiocina. Bioquímicamente el microorganismo se caracteriza por ser anaerobio

facultativo con capacidad de fermentar la D-glucosa sin producción de gas. Crece en el medio selectivo y diferencial para vibrios TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) con utilización de la sacarosa. Además, es positivo para las pruebas de la oxidasa y Voges-Proskauer y negativo para la descarboxilación de los aminoácidos Lisina y Ornitina, aunque da reacción positiva en la descarboxilación de la Arginina.



Tinción Gram de un cultivo puro de *V. anguillarum*

Desde el punto de vista serológico y según la designación de serotipado europea, dentro de los aislados de *V. anguillarum* se establecen un total de 23 serotipos O (O1-O23) (Grisez y Ollevier, 1995; Pedersen *et al.*, 1999; Sørensen y Larsen, 1986). De todos éstos sólo los serotipos O1 y O2 y en menor medida el serotipo O3, se han asociado a mortalidades en granjas y en peces salvajes de todo el mundo (Pazos *et al.*, 1993; Toranzo y Barja, 1990). El resto de serotipos se consideran cepas ambientales y sólo en raras ocasiones se aíslan como agentes causales de la enfermedad. Mientras que los serotipos O1 y O2 tienen una amplia distribución, el serotipo O3 ha sido aislado principalmente de anguilas enfermas (*Anguilla anguilla*) (Larsen *et al.*, 1994).

En contraste con el serotipo O1, que es antigénicamente homogéneo, los serotipos O2 y O3 poseen una cierta heterogeneidad, pudiéndose establecer, dentro de cada serotipo, dos subgrupos denominados O2a y O2b y O3A y O3B respectivamente (Bolinches *et al.*, 1990; Olsen y Larsen, 1993; Santos *et al.*, 1995). Cabe destacar que, mientras el subgrupo O2a ha sido aislado tanto de peces salmónidos como no salmónidos, el subgrupo O3B sólo se ha aislado de peces estrictamente marinos. Asimismo, en el caso del serotipo O3, el subgrupo O3A se ha aislado a partir de peces infectados mientras que el O3B, hasta el momento, comprende solamente cepas ambientales.

1.4 Diagnóstico del agente causal de la vibriosis

Uno de los pasos críticos en el estudio y control de los patógenos bacterianos es la correcta identificación del agente infeccioso. En algunos casos estas infecciones bacterianas pueden desarrollarse como infecciones subclínicas asintomáticas, de manera que el diagnóstico y detección específica del patógeno sólo es posible a través de métodos de laboratorio.

Las técnicas tradicionales de aislamiento y caracterización de patógenos bacterianos de peces incluye la siembra directa a partir de una muestra de tejido en medios selectivos o diferenciales. Las colonias aisladas se someten a pruebas de identificación que incluyen una batería de ensayos bioquímicos y de confirmación serológica. Sin embargo, estos métodos de diagnóstico e identificación presentan el inconveniente de ser demasiado largos, lo que puede influir en las posibles medidas de control de la infección. Por tanto, durante los últimos años se han desarrollado numerosos sistemas de diagnóstico rápido de patógenos bacterianos basados en técnicas de análisis molecular (Osorio y Toranzo, 2002).

El diagnóstico de la vibriosis se basa principalmente en las características fenotípicas de la bacteria aislada, seguido de una confirmación serológica. Para la detección de la bacteria en tejidos de peces, también se han desarrollado ensayos inmunológicos como los basados en *dot-blot* (Cipriano *et al.*, 1985) y ELISA (Adone *et al.*, 1996), aunque la aplicación de estos métodos se ve limitada por los bajos niveles de detección y la existencia de reacciones cruzadas con especies próximas como *Vibrio ordalii*. Por esta razón se han desarrollado métodos moleculares más específicos que permiten la detección rápida de la presencia de *V. anguillarum* a partir del análisis simultáneo de un gran número de muestras.

Los conocimientos acerca del genoma de esta especie están aumentando continuamente gracias a la disponibilidad de la secuencia completa de nuevos genes, incluyendo una gran variedad de genes relacionados con factores de virulencia y que son de gran interés en la caracterización molecular de los aislados. De este modo, la secuenciación de los genes codificantes para el rRNA 5S y el rRNA 16S (Macdonell y Colwell, 1985; Valle *et al.*, 1990), así como sus homólogos en otras especies del género *Vibrio* (Kitatsukamoto *et al.*, 1993; Ruimy *et al.*, 1994), han facilitado enormemente el diseño de sondas específicas para la detección de *V. anguillarum*. Rehnstam *et al.* (1989) e Ito *et al.* (1995) utilizaron la secuencia del rRNA 16S y 5S, respectivamente, en la identificación del patógeno mediante técnicas de hibridación RNA-DNA. Sin embargo estos protocolos presentan grandes limitaciones, como su elevado límite de detección o posibles falsos positivos por hibridación con otras especies del género. Otros autores trataron de diseñar nuevas sondas para la detección específica de la bacteria pero, al igual que en los casos anteriores y aunque los límites de detección fueron aceptables para la hibridación de colonias, éstos métodos no se pueden considerar suficientemente sensibles para la detección de células directamente en el tejido infectado (Aoki *et al.*, 1989). Posteriormente, Martínez-Picado *et al.* (1996) publicaron un método de detección basado en el uso combinado del medio selectivo VAM (Alsina *et al.*, 1994) y la

hibridación con un fragmento de DNA de secuencia complementaria al rRNA 16S. A pesar de que esta técnica de hibridación de DNA es útil en la identificación de *V. anguillarum*, hay que tener en cuenta la necesidad de un aislamiento previo del patógeno.

En otras especies bacterianas estos problemas de diseño de protocolos de detección se solventaron mediante la utilización de métodos basados en la técnica de la PCR (Hiney y Smith, 1998). Existen múltiples secuencias que pueden ser utilizadas como molde para su amplificación por PCR. El conocimiento de la secuencia del gen del rRNA 16S en multitud de especies bacterianas lo ha convertido en una de las herramientas más importantes para el diseño de métodos de diagnóstico basados en esta técnica de amplificación (Osorio y Toranzo, 2002). Sin embargo, la comparación de las secuencias depositadas en las bases de datos demuestran que las diferencias encontradas entre el rRNA 16S de *V. anguillarum* y el de otras especies próximas son insuficientes para garantizar el diseño de cebadores específicos para el patógeno.

El primer protocolo de detección de *V. anguillarum* mediante PCR fue descrito por Hirono *et al.* (1996) basándose en el gen de la hemolisina. Sin embargo, este gen no está presente en todas las cepas de la especie, de manera que el método descrito por estos autores no es capaz de detectar algunos de los aislados del patógeno. González *et al.* (2003) han descrito un nuevo protocolo de amplificación utilizando como diana el gen *rpoN* (también denominado *ntxA* o *glnF*) y que codifica el factor sigma σ^{54} . Tras comparar la secuencia de este gen con sus homólogos descritos en otras especies, como *V. cholerae*, *V. alginolyticus* e incluso *E. coli*, estos autores diseñaron una pareja de cebadores delimitando un fragmento interno de 519 pb. La especificidad de la amplificación se ensayó con más de 20 cepas de *V. anguillarum*, pertenecientes a los serotipos O1 al O10, así como con una colección de 60 aislados marinos y que incluían cepas del género *Vibrio*, *Aeromonas* y *Photobacterium*. Este método se caracteriza por su gran especificidad, rapidez (el ensayo puede realizarse en 5 horas, frente a las 48-72 horas de los análisis serológicos y bioquímicos) y por su elevada sensibilidad pudiendo detectar 11 células por tubo de PCR y a partir de muestras de tejido.

1.5 Prevención y tratamiento de la vibriosis causada por *V. anguillarum*

En el momento de la detección de un brote de vibriosis, la terapia antimicrobiana es esencial para el tratamiento de la infección. Además de los estudios clínicos y el análisis de la concentración mínima inhibitoria (CMI), también son esenciales los datos obtenidos del

estudio de las propiedades farmacocinéticas de los agentes antimicrobianos para el establecimiento de las dosis correctas y duración del tratamiento. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas propiedades farmacocinéticas varían significativamente entre especies, de manera que es necesario un estudio previo del efecto de una determinada droga con respecto a la especie sobre las que se tiene intención de actuar.

Las quinolonas son uno de los agentes antibacterianos más utilizados en el tratamiento de infecciones de peces y son especialmente activos frente a bacterias Gram-negativas. Su actividad antibacteriana se basa en la inhibición de la DNA-girasa, provocando la condensación inestable del DNA durante la división celular. Dentro de este grupo, actualmente la flumequina y el ácido oxolínico son dos de los antibióticos más utilizados en el tratamiento sistemático de la vibriosis, especialmente la provocada por *V. anguillarum* (Samuelsen, 1997; Vik-Mo *et al.*, 2005). Aunque en ensayos *in vitro* la flumequina y el ácido oxolínico presentan actividades antimicrobianas similares, la flumequina es más efectiva *in vivo* (Martinsen *et al.*, 1992). Otro antimicrobiano muy utilizado en el tratamiento de vibriosis es el florfenicol, una droga sintética con una estructura y espectro de actividad antibacteriana muy similar al cloranfenicol (Samuelsen y Bergh, 2004).

Respecto a la vía de administración del agente antibacteriano, la inyección dentro de la cavidad peritoneal del pez representa la forma más efectiva y exacta en cuanto a la dosis administrada. Sin embargo, además de provocar situaciones de estrés para el animal, la inyección individual es muy costosa tanto en tiempo como en trabajo. Por esta razón hoy en día la administración del agente por inyección sólo se utiliza en el tratamiento de los individuos reproductores. Por el contrario la administración oral de la sustancia antibacteriana a través de los piensos permite el tratamiento de grandes cantidades de peces de una forma relativamente fácil y con un coste menor, habiéndose convertido en la principal vía de administración de todos estos medicamentos contra la vibriosis.

Ya que las enfermedades infecciosas, que tienen lugar como un evento esporádico en las poblaciones salvajes de peces, pueden provocar grandes mortalidades cuando suceden en granjas de cultivo intensivo, la industria de la acuicultura se ve obligada a minimizar estas pérdidas a través del uso de antibióticos. Sin embargo este mismo sector también se ve forzado a reducir lo más posible estos tratamientos debido a la posibilidad de generar resistencias tanto en los microorganismos patógenos como en los no patógenos (Giraud *et al.*, 2006; Le *et al.*, 2005). Por esta razón, durante los últimos 20 años la vacunación se ha

consolidado como un método fundamental en la prevención de enfermedades infecciosas dentro de la acuicultura, especialmente en lo referente al cultivo de especies de salmónidos.

Los peces pueden ser inmunizados a través de tres vías diferentes: por inyección (preferentemente intraperitoneal); por inmersión (sumergiendo al pez en una solución de la vacuna diluida); o a través de la administración oral de la vacuna. En general la vía de vacunación elegida constituye un punto crítico en el grado de eficiencia de la vacuna, ya que además de administrarse de manera que induzcan un alto nivel de inmunización en el pez, la inmunización ha de durar lo más posible. Del mismo modo, el sistema de vacunación ha de ser rápido, evitando el estrés del animal y con un control exhaustivo de la dosis de vacuna administrada. Actualmente tan sólo la administración por inmersión e inyección han sido desarrolladas para su uso a escala industrial, llegando a integrarse completamente en la rutina del proceso de producción (Gudding *et al.*, 1999).

La mayoría de las vacunas utilizadas en acuicultura son vacunas inactivadas, obtenidas a partir de un cultivo incubado hasta su fase estacionaria y, seguidamente, inactivado con formalina. Los principales antígenos utilizados en la acuicultura son los derivados de especies Gram-negativas como *Vibrio ordalii*, *V. salmonicida*, *Yersinia ruckeri* y, especialmente, *V. anguillarum*. Actualmente existe un gran número de vacunas comerciales diseñadas específicamente para este último y que son administradas tanto por baño como por inyección (Bowden *et al.*, 2002; Toranzo *et al.*, 1997). Sin embargo la mayoría de estos tratamientos incluyen en sus formulaciones sólo los serotipos O1 o bien una mezcla del serotipo O1 y O2a. Hasta el momento tan sólo la vacuna GAVA-3, desarrollada en la Universidad de Santiago de Compostela, es capaz de proteger al pez frente a los tres grupos antigénicos de *V. anguillarum* responsables de la mayoría de epizootias ocurridas en la acuicultura marina (O1, O2a y O2b) (Toranzo *et al.*, 1997).

En el caso de especies estrictamente marinas, como el rodaballo o lenguado, las vacunas diseñadas para *V. anguillarum* son administradas por inmersión y suelen ser necesarios dos tratamientos de vacunación con intervalos de un mes. La necesidad de un doble proceso de vacunación deriva de los numerosos trabajos existentes acerca de la relación entre la respuesta inmune y la protección ante un determinado patógeno bacteriano. Así, Palm *et al.* (1998), estudiando la infección por vibriosis causada por *V. anguillarum*, demostraron la existencia de una respuesta de anticuerpos específicos asociada directamente al proceso de inmunización por inyección, inmersión y aplicación oral del antígeno. Además se comprobó como en las dos últimas vías de administración la respuesta humoral inmune sólo era

detectada tras la administración de una segunda dosis de la vacuna. Igualmente, recientes estudios de vacunación por inmersión en estadios juveniles de lubina confirmaron el mayor efecto de la suspensión anti-*V. anguillarum* cuando los animales era tratados nuevamente a los 60 días de la inmunización inicial (Angelidis, 2006).

Por otra parte, en el cultivo de salmónidos en los países nórdicos se han desarrollado vacunas de inoculación intraperitoneal a partir de la combinación de *V. anguillarum* con otros patógenos como *V. ordalii*, *V. salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Moritella viscosa* y el *Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa* (IPNV) (Toranzo *et al.*, 2005). Aunque en general este tipo de vacunas polivalentes son igual de efectivas que las monovalentes, en algunos casos la combinación de diferentes especies puede estimular aún más la inmunización, haciendo que estas vacunas sean más efectivas que las vacunas derivadas de una única especie bacteriana. De hecho se ha comprobado como las vacunas con antígenos de *V. anguillarum*, *V. salmonicida* y *A. salmonicida* pueden llegar a ser más efectivas en la protección contra la furunculosis que las vacunas monovalentes correspondientes a esta enfermedad (Gudding *et al.*, 1999).

Hoy en día la tecnología genética moderna, combinada con el aumento de conocimientos acerca de la inmunología y biología molecular, proporciona nuevas vías para el diseño de vacunas a partir de especies patógenas cuya virulencia ha sido atenuada previamente. En el caso de *V. anguillarum*, los estudios realizados en la cepa 775 del serotipo O1 permitieron establecer la importancia del plásmido pJM1 en la virulencia de la bacteria (Wolf y Crosa, 1986). A partir de la presencia de plásmidos similares en otras cepas aisladas de brotes de vibriosis se han diseñado vacunas derivadas de estos aislados atenuados previamente mediante la pérdida de dicho plásmido de virulencia (Zhu *et al.*, 2004). Actualmente también se está estudiando la posible utilidad de la tecnología de ingeniería genética de anticuerpos para el diseño de nuevas vacunas en la prevención de la infección por *V. anguillarum* (Xia *et al.*, 2002; 2005).

1.6 Factores de virulencia de *V. anguillarum*

Los factores de virulencia se refieren a las propiedades que contribuyen a que un patógeno infecte y dañe los tejidos del hospedador, de modo que la virulencia en sí (invasión y toxicidad microbiana) puede deberse a uno o a múltiples factores. Éstos son importantes para que las bacterias invadan y colonicen rápidamente el tejido, alcanzando unos altos

niveles de población antes de que la respuesta de dicho hospedador limite el crecimiento bacteriano.

Actualmente se dispone de la secuencia completa del genoma de diversas especies pertenecientes al género *Vibrio*, incluyendo *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000), *V. vulnificus* (Chen *et al.*, 2003), *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.*, 2003) y *V. fischeri* (Ruby *et al.*, 2005). Como resultado de estos proyectos de secuenciación, se han podido caracterizar genes, tanto similares como diferentes, relacionados con la virulencia de estas especies bacterianas. La identificación de estos genes es esencial para una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de virulencia de dichas bacterias patógenas. Aunque todavía no se dispone del genoma completo de *V. anguillarum*, recientemente Rodkhun *et al.* (2006) partieron de una librería génica para la secuenciación al azar de un número determinado de clones. Dentro de los fragmentos secuenciados se identificaron cuarenta genes posiblemente relacionados con la virulencia y de los cuales 36 no habían sido descritos hasta el momento en *V. anguillarum*.

En general los factores identificados en *V. anguillarum* y relacionados con su virulencia pueden clasificarse en exotoxinas, factores de adherencia/colonización, factores que favorecen la invasión, componentes de la superficie celular y cápsula y sistemas de captación de hierro.

» **Exotoxinas:** Durante la fase de proliferación en el hospedador, la bacteria puede expresar específicamente una serie de proteínas extracelulares como proteasas, hemolisinas o citotoxinas y que son secretadas durante la infección. Todos estos enzimas tienen como fin romper e infligir daños en las estructuras epiteliales. Así disuelven las barreras defensivas del huésped y promueven la diseminación de los microorganismos en tejidos más profundos, aunque también pueden utilizarse para la obtención de algún nutriente que favorezca la multiplicación del microorganismo.

El primer gen de hemolisina caracterizado en *V. anguillarum* (*vah1*) fue descrito por Hirono *et al.* (1996). Posteriormente se caracterizaron cuatro genes más y se analizó el efecto de este tipo de exotoxinas sobre la virulencia de la bacteria (Rodkhun *et al.*, 2005). Es muy posible que las hemolisinas secretadas por *V. anguillarum* estén implicadas en el proceso de patogénesis debido a la anemia que caracteriza al pez infectado. Sin embargo todavía existen dudas acerca de la relación entre la producción de estas hemolisinas y la patogenicidad de la bacteria (Toranzo y Barja, 1993). Los cinco genes de hemolisinas descritos en *V. anguillarum*

poseen una alta similitud con homólogos identificados en otras especies del género *Vibrio*, como *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000), *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.*, 2003) o *V. vulnificus* (Chen *et al.*, 2003).

V. anguillarum también se caracteriza por la presencia de la toxina RTX (Rodkhum *et al.*, 2006). Este tipo de toxinas pertenecen a una familia de exotoxinas formadoras de poros e incluidas dentro del sistema de secreción bacteriano de tipo I (TISS). Constituyen un factor de virulencia muy importante en diversos patógenos Gram-negativos (Coote, 1992) e incluye toxinas citolíticas, metaloproteasas y lipasas. Pese a que se han descrito toxinas RTX en patógenos como *V. cholerae* (Lin *et al.*, 1999), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Jansen *et al.*, 1993) y *E. coli* (Bauer y Welch, 1996), la información disponible acerca de estos factores de virulencia en *V. anguillarum* todavía es muy limitada.

» **Factores de adherencia/colonización:** En muchas bacterias patógenas se ha observado cómo el flagelo juega un papel importante en la adherencia y en la invasión de los tejidos del hospedador (Ottemann y Miller, 1997). Durante las fases iniciales de entrada en el organismo, el flagelo puede servir tanto como un orgánulo de movilidad, que ayuda en la penetración de las mucosas, o como un órgano implicado en la fijación de la bacteria a las mucosas del hospedador. *V. anguillarum* se caracteriza por ser una bacteria móvil con un flagelo polar y de estructura compleja, compuesta por cuatro o cinco flagelinas y recubierta por una vaina membranosa (McGee *et al.*, 1996; Milton *et al.*, 1996; Norqvist y Wolfwatz, 1993).

De los estudios realizados con mutantes inmóviles de *V. anguillarum* se puede concluir que la presencia de un flagelo funcional junto con la quimiotaxis son dos factores de virulencia muy importantes. Sin embargo esto sólo es así en aquellos casos de infecciones por inmersión, ya que no ocurre lo mismo en el caso de las infecciones promovidas por inyección intraperitoneal (O'Toole *et al.*, 1996). En realidad todavía no está clara la vía de penetración del patógeno hasta los tejidos internos del pez en el medio natural, aunque parece que el intestino, las branquias y algunas zonas de la piel pueden considerarse importantes puntos de entrada (Olsson *et al.*, 1996). Diversos estudios *in vitro* han demostrado que *V. anguillarum* muestra una respuesta quimiotáctica hacia el mucus de la piel (Larsen *et al.*, 2001; O'Toole *et al.*, 1999), por lo que la quimiotaxis podría ser un factor muy importante en el proceso de colonización de la superficie del animal. Sin embargo también es sabido que esta respuesta quimiotáctica no es necesaria para la entrada del patógeno en el intestino (O'Toole *et al.*, 2004). De hecho, probablemente la entrada al tracto gastrointestinal no esté relacionada con

funciones propias de la bacteria sino que depende exclusivamente de las actividades del hospedador, tales como el simple proceso de tragar agua.

Pese a todo, la respuesta quimiotáctica de *V. anguillarum* juega un papel esencial en el proceso de infección una vez que la bacteria llega al intestino del pez. Además de presentar una fuerte respuesta quimiotáctica hacia el mucus, *V. anguillarum* también es capaz de adherirse y colonizar el tracto intestinal (Bordas *et al.*, 1998; Olsson *et al.*, 1998). Estudios realizados con *V. cholerae* mostraron resultados similares, apoyando la idea de la importancia de la quimiotaxis y la movilidad en la capacidad infectiva de un microorganismo (Freter *et al.*, 1981). Es por todo ello que el flagelo de *V. anguillarum* es considerado como un elemento fundamental en su patogenicidad dentro de los tejidos del hospedador. Recientes estudios han demostrado como este flagelo y especialmente los genes de las flagelinas (*flaA*, *flaD* y *flaE*) ayudan a la bacteria a atravesar el tegumento del pez (McGee *et al.*, 1996; Milton *et al.*, 1996).

Asimismo el flagelo también podría tener algún tipo de papel en relación a la fagocitosis de la bacteria por parte de los macrófagos del hospedador. De hecho, en ausencia del flagelo se ha comprobado como se reduce la internalización de *P. aeruginosa* por parte de macrófagos (Mahenthiralingam y Speert, 1995). Sin embargo los estudios realizados en *V. anguillarum* a este respecto establecen que el flagelo no parece tener relación con la mayor o menor fagocitosis de la bacteria. Por el contrario sí ha quedado demostrado el efecto de la quimiotaxis en el proceso, de manera que la falta de respuesta quimiotáctica parece estar relacionada con una mayor capacidad invasiva de la bacteria o con un aumento de la fagocitosis por parte de los macrófagos (Larsen y Boesen, 2001).

Finalmente no sólo la movilidad y la quimiotaxis están relacionadas con la virulencia de esta bacteria. La adhesión del microorganismo a los tejidos del hospedador es fundamental en el proceso de colonización y multiplicación. *V. anguillarum* muestra una clara capacidad de adherencia a distintos tipos de líneas celulares (Ormonde *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998). Además se han identificado los genes *pilC*, *pilB* y *pilQ* asociados a la síntesis del pili y que poseen elevada homología con genes identificados en *V. cholerae* y *V. vulnificus* (Rodkhun *et al.*, 2006). De todos éstos, PilC se considera esencial en la virulencia de *V. vulnificus* participando como una molécula de adhesión fundamental en la adherencia y colonización de las células epiteliales del hospedador (Paranjpye *et al.*, 1998).

Hay que tener en cuenta que la movilidad y la adherencia no se excluyen mutuamente, de manera que en muchos casos la movilidad juega un papel esencial en una secuencia de eventos dirigidos al establecimiento de la unión estable y colonización de las mucosas.

» **Factores de invasión:** El mucus del tracto gastrointestinal de salmón es un excelente medio de cultivo para *V. anguillarum* de forma que cuando la bacteria se encuentra en este medio comienza a expresar específicamente diversas proteínas, incluyendo proteínas de membrana externa (García *et al.*, 1997) y la metaloproteasa EmpA (Denkin y Nelson, 1999, 2004). Esta última ha sido estudiada en profundidad durante los últimos años confirmándose su papel en la virulencia del microorganismo (Milton *et al.*, 1992). Por tanto, el crecimiento en el mucus no sólo facilita la multiplicación del patógeno sino que también induce las actividades necesarias para el éxito de la colonización e invasión de los tejidos del hospedador.

En general las metaloproteasas de *V. anguillarum* participan en el proceso de invasión del pez hospedador ayudando a promover la colonización en el intestino y la patogénesis (Denkin y Nelson, 1999; Norqvist *et al.*, 1990). Igualmente y en relación a la capacidad invasiva de *V. anguillarum*, se han identificado tres genes, caracterizados como posibles proteasas, que también podrían participar en esta fase del proceso infectivo (Rodkhum *et al.*, 2006). Seguramente estos genes codifiquen enzimas proteolíticos que participan junto con las metaloproteasas en la invasión de las células del organismo hospedador.

» **Cápsula y componentes de la superficie celular:** La activación del Sistema del Complemento presente en el suero del pez hospedador juega un papel importante en la defensa del animal ante posibles bacterias patógenas. En general existe una ruta clásica de activación del Sistema de Complemento que requiere la síntesis previa de anticuerpos y el reconocimiento específico de los antígenos de superficie de la bacteria, mientras que la ruta alternativa puede iniciarse y amplificarse en ausencia de estas interacciones antígeno-anticuerpo. Ciertos componentes de este sistema de defensa tienen actividad bactericida, siendo capaces de polimerizarse sobre las superficies celulares de las bacterias y provocar su lisis al formar poros o roturas en la integridad de sus membranas. En otros casos, las proteínas del Complemento pueden mediar en los procesos de fagocitosis, uniéndose a la superficie de la bacteria y facilitando su reconocimiento por los leucocitos fagocíticos.

Algunas bacterias patógenas Gram-negativas, como *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *Y. enterocolitica* y *Shigella flexneri*, son capaces de resistir el efecto bactericida del

suero, bien mediante el bloqueo de la activación inicial del proceso o a través de mecanismos que hagan a la bacteria resistente a la actuación del Sistema de Complemento del hospedador (Bengoechea *et al.*, 2004; Boesen *et al.*, 1999; Gulig *et al.*, 2005; Hong y Payne, 1997; Schild *et al.*, 2005). Uno de estos mecanismos de resistencia consiste en la síntesis de cadenas laterales largas de polisacáridos (el denominado antígeno O) e incluidas en las estructuras de lipopolisacáridos de la superficie celular. Aquellas cepas que presenten este antígeno O en su superficie son más resistentes al Sistema de Complemento del suero que aquellas cepas carentes de estas cadenas laterales. Por tanto, las estructuras de lipopolisacáridos de estas bacterias Gram-negativas actúan no sólo como una barrera molecular y física, sino que pueden influir en el efecto bactericida del Sistema de Complemento, facilitando la resistencia al suero del hospedador. En el caso de un animal inmune, los anticuerpos se unen a los componentes de superficie de la bacteria bloqueando dicha resistencia y favoreciendo la eliminación del patógeno.

Actualmente se han caracterizado genes de biosíntesis de lipopolisacáridos tanto en el serotipo O1 como en el serotipo O2 de *V. anguillarum* (Amor y Mutharia, 1995; Stroehler *et al.*, 1998) y en ambos casos se ha comprobado como la presencia del antígeno O está relacionado directamente con la supervivencia de la bacteria en el suero del pez hospedador (Boesen *et al.*, 1999). Los genes descritos más recientemente poseen homología con genes identificados en *V. cholerae*, *V. vulnificus* o *Photobacterium profundum* (Rodkhum *et al.*, 2006). En conjunto, todos estos lipopolisacáridos de la superficie de *V. anguillarum* pueden considerarse como un factor de virulencia que ayuda a la patogenicidad de la bacteria en el pez hospedador.

» **Adquisición de hierro:** En la mayoría de las bacterias patógenas invasivas se ha comprobado como el aumento de la concentración de hierro en el hospedador implica una mayor susceptibilidad a la infección. Esto hace que su disponibilidad y la capacidad de captación de este elemento constituyan uno de los principales factores de virulencia de los microorganismos patógenos.

Dentro del organismo hospedador el hierro en forma libre se encuentra en concentraciones en torno a 10^{-18} M, lo que supone unos niveles muy inferiores a los necesarios para el crecimiento y multiplicación de la bacteria. La mayor parte del hierro se localiza en los glóbulos rojos y asociado a proteínas como transferrina y lactoferrina, de manera que las bacterias han de encontrar formas de superar estas limitaciones en los niveles de hierro disponibles para sobrevivir y poder establecer la infección. La capacidad de síntesis

y utilización de sideróforos u otros mecanismos de alta afinidad de captación de hierro, es una característica general de multitud de patógenos, como *V. cholerae* (Wyckoff *et al.*, 1997), *V. vulnificus* (Litwin *et al.*, 1996), *Neisseriae* spp. (Schryvers y Stojiljkovic, 1999) o *S. marcescens* (Létoffé *et al.*, 1994a), lo que da idea de la gran importancia que tiene la adquisición de hierro como factor de virulencia para este tipo de bacterias.

En *V. anguillarum*, al igual que ocurre con otros muchos microorganismos patógenos Gram-negativos, la capacidad de obtención de hierro está considerado como uno de sus principales factores de virulencia y quizás el más estudiado. El primero de los mecanismos descritos en esta especie bacteriana e implicado en la captación de hierro está codificado en el plásmido de virulencia pJM1 caracterizado en la cepa 775 (Crosa, 1980). Posteriormente, se determinó la presencia de plásmidos similares en otras cepas patógenas de *V. anguillarum* (Di Lorenzo *et al.*, 2003; Tolmasky *et al.*, 1985; Toranzo *et al.*, 1983a). En todos los casos, estos plásmidos proveen a la bacteria de un sistema de captación de hierro fundamental para evitar la inmunidad nutricional, uno de los mecanismos de defensa no-específicos utilizados por el hospedador. El mecanismo de captación de hierro codificado por estos plásmidos consiste en la síntesis del sideróforo anguibactina y en el transporte del complejo Fe-anguibactina hasta el citosol de la célula bacteriana mediante un sistema de transporte específico (Stork *et al.*, 2002). Este sideróforo sólo se produce cuando no hay hierro suficiente en el medio, de manera que el sistema está controlado por la concentración de hierro disponible para la célula (Crosa y Walsh, 2002).

V. anguillarum también incluye cepas altamente virulentas, carentes de plásmidos de virulencia pero capaces de sintetizar y utilizar sideróforos. En estos casos los sistemas de captación de hierro están codificados por el cromosoma bacteriano (Conchas *et al.*, 1991; Lemos *et al.*, 1988). Recientemente, se ha comprobado como en la cepa 775 parte de los genes implicados en la síntesis del sideróforo anguibactina se encuentran duplicados en el cromosoma, sugiriendo la existencia de un sistema cromosómico asociado a la biosíntesis de sideróforos y anterior al codificado por el plásmido pJM1 (Alice *et al.*, 2005).

Diversos estudios demuestran la importancia del sistema de captación de hierro a través de sideróforos en la virulencia de *V. anguillarum* (Pedersen *et al.*, 1997; Wolf y Crosa, 1986). De hecho, hasta el momento todos los aislados obtenidos de peces enfermos y caracterizados como altamente virulentos cuentan con un sistema (cromosómico o plasmídico) de síntesis de sideróforos (Conchas *et al.*, 1991; Lemos *et al.*, 1988). En el caso de la cepa 775, se ha comprobado como la pérdida del plásmido pJM1 o la mutación del

sistema de síntesis o captación del sideróforo anguibactina está asociada a la drástica reducción de la capacidad infectiva de la bacteria (Wolf y Crosa, 1986).

2. IMPORTANCIA DEL HIERRO EN LOS PROCARIOTAS

2.1 Disponibilidad de hierro

Debido a su importancia en la bioquímica de la célula, el hierro es absolutamente necesario en la mayoría de los sistemas biológicos. De todos los cationes metálicos el metabolismo del hierro es el más conocido, tanto en lo que hace referencia a sus aspectos bioquímicos como a su transporte y almacenamiento. Sin embargo a pH neutro la concentración de Fe^{+3} viene marcada por la constante de solubilidad del hidróxido férrico que no es mayor de 10^{-18} M. Esto provoca la formación de complejos insolubles que limitan su disponibilidad y que hacen que la concentración de Fe^{+3} en disolución sea extremadamente baja (Bullen y Griffiths, 1999).

En el caso de los humanos y otros vertebrados superiores, el hierro es asimilado a partir de los componentes de la dieta y a través de las células mucosas del intestino. Una vez en el torrente sanguíneo la molécula de hierro es transportada gracias a su unión a la proteína denominada transferrina, de la que existen tres clases principales: transferrina del suero (o serotransferrina); lactoferrina o lactotransferrina, que se encuentra en la mayoría de los fluidos extracelulares; y la ovotransferrina, también denominada conalbúmina y que se encuentra en la albúmina de los huevos. Las tres poseen estructuras similares y su función es transferir los átomos de hierro a las células en dónde, a continuación, se incorporarán a las proteínas celulares. Las transferrinas son glicoproteínas de cadena única y alto peso molecular, caracterizadas por tener dos sitios similares de unión para el hierro aunque no idénticos. Una característica importante de la transferrina es que generalmente nunca está completamente saturada por el catión, lo cual resulta crucial para poder capturar cualquier resto del metal que pueda aparecer en la sangre o en otros fluidos durante un proceso de infección (Genco y Dixon, 2001; Ratledge y Dover, 2000).

Por otro lado, intracelularmente, el hierro tampoco se halla en forma libre debido a la existencia de una serie de moléculas encargadas de retenerlo, tanto para facilitar las diferentes funciones celulares en las que está implicado, cómo para dificultar que los microorganismos

dispongan de él. Así, la cantidad total de hierro presente dentro de la célula está constituido por el grupo hemo unido a la hemoglobina, mioglobina, hemo-enzimas, sales de hierro insolubles almacenadas en la ferritina y diversos compuestos implicados en el control de los procesos de oxidación intracelular como son los citocromos. En la mayoría de los organismos la ferritina es el principal almacén de hierro y se encuentra no sólo en los animales sino también en las plantas (fitoferritinas) e incluso en los microorganismos (bacterioferritina). Típicamente estas moléculas poseen pesos moleculares en torno a 500 kDa y están compuestas por 24 subunidades proteicas que forman una esfera hueca en la que se pueden acomodar más de 4.000 átomos de Fe^{+3} (Fig. I-1) (Andrews *et al.*, 2003; Wandersman y Delepelaire, 2004). También es posible encontrar pequeñas cantidades de hemoglobina libre en plasma como resultado de procesos de hemólisis espontánea (Ratledge y Dover, 2000).

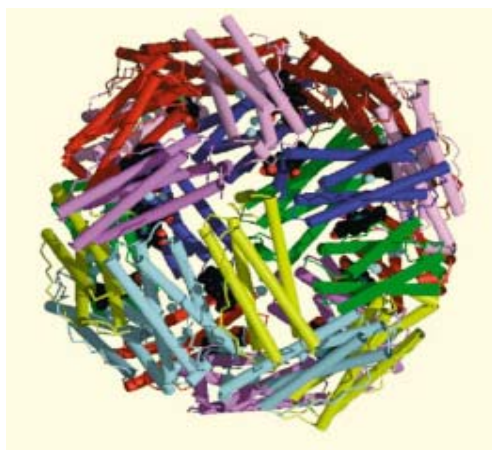


Figura I-1: Estructura cristalizada de la bacterioferritina de *E. coli*. Los grupos hemo y átomos de Mn asociados a la proteína están representados por las moléculas en color rojo/negro y azul, respectivamente.
Extraído de Berman *et al* (2002).

2.2 Fuentes de hierro y mecanismos bacterianos de captación

Los microorganismos que crecen en condiciones de aerobiosis, necesitan hierro para una gran variedad de funciones, incluyendo la reducción del oxígeno para la síntesis del ATP, reducción de los precursores del DNA, formación de hemo y otros procesos esenciales del metabolismo bacteriano. Se estima que la concentración mínima de hierro necesaria para un óptimo crecimiento bacteriano es, aproximadamente, de 1 μM (Neilands, 1995). Sin embargo la escasa disponibilidad de este metal hace que el hierro constituya un factor limitante en el desarrollo de la mayoría de los microorganismos.

El bloqueo de la disponibilidad de hierro ante una infección bacteriana constituye un paso clave en los mecanismos de defensa del hospedador. Las bacterias patógenas, por tanto, están limitadas en su capacidad de crecimiento *in vivo* debido a este sistema de defensa basado en el control de los niveles de hierro libre. Sin embargo los microorganismos han sido

capaces de desarrollar mecanismos muy eficaces, los cuales facilitan la captura del hierro a partir de distintas fuentes presentes en el medio. Así, aparte de las transferrinas que circulan por el torrente sanguíneo, las bacterias pueden utilizar el hierro de la hemoglobina (por lisis de los eritrocitos e hidrólisis de la propia hemoglobina) e incluso el propio hierro de la ferritina intracelular y que, probablemente, sea la mayor fuente de hierro disponible para estos microorganismos. Alternativamente, las bacterias (y también algunos hongos) son capaces de sintetizar moléculas de gran afinidad por el hierro que se liberan al medio externo y que, gracias a su mayor fuerza de unión al ión metálico, son capaces de formar complejos con el hierro extraído de proteínas como la ferritina o la transferrina. Estas moléculas se denominan sideróforos y juegan un papel fundamental en la adquisición microbiana de hierro y, por tanto, en la virulencia bacteriana.

Las fuentes de hierro presentes en el organismo hospedador y a partir de las cuales las bacterias patógenas tratan de cubrir las necesidades de este metal son muy diversas. Por esta razón las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos que les facilitan el acceso a los reservorios de hierro.

2.2.1 Captación de hierro mediada por sideróforos

Los sideróforos (del griego *sideros phoros* “portadores de hierro”) son moléculas de bajo peso molecular sintetizadas por bacterias, levaduras y hongos que actúan como agentes quelantes específicos para el Fe^{+3} y cuya síntesis se ve normalmente estimulada cuando el microorganismo se encuentra en un entorno pobre en este elemento. Se definen como moléculas de pequeño tamaño que se sintetizan siguiendo rutas metabólicas sencillas. Poseen cadenas laterales y grupos funcionales que dan lugar a un conjunto de ligandos de alta afinidad que forman complejos de coordinación con los iones Fe^{+3} . La característica principal de este tipo de moléculas es su elevada constante de disociación del hierro, oscilando entre 10^{22} y 10^{55} . Esta alta afinidad, además de facilitar la captación de hierro a partir de compuestos insolubles como el hidróxido férrico, también permite liberar los átomos de hierro unidos a proteínas como la transferrina o la ferritina (Neilands, 1995). Pese a todo, los sideróforos no son capaces de obtener el hierro a partir del grupo hemo asociado a proteínas.

Durante el proceso infectivo la escasez inicial de hierro induce la producción y liberación extracelular de sideróforos. De este modo se inicia la captura del hierro para que la bacteria pueda disponer de él. Una vez que las necesidades del microorganismo están cubiertas disminuye la necesidad por el metal, por lo que se bloquea la síntesis de las

moléculas quelantes y se pone de manifiesto la gran sensibilidad del microorganismo ante las variaciones de los niveles intracelulares de hierro.

Actualmente están caracterizados unos 500 sideróforos (Fig. I-2). Su ruta biosintética está interconectada con el metabolismo aeróbico ya que se utiliza el oxígeno molecular activado por mono-, di- y N-oxigenasas. También participan ácidos derivados de la oxidación final del ciclo del ácido cítrico, tales como citrato, succinato y acetato. La mayor parte de los sideróforos se sintetizan a través de péptido-sintetasas no-ribosómicas (NRPS) (Butterton *et al.*, 2000; Crosa y Walsh, 2002). Estas enzimas NRPS se identificaron originariamente en bacterias Gram-positivas como catalizadores de la síntesis de antibióticos y otras sustancias. Se trata de enzimas multimodulares que forman enlaces peptídicos entre aminoácidos cuando éstos se hallan unidos al complejo mediante enlaces tioéster y sin la participación de una molécula de RNA. Estos complejos multienzimáticos forman líneas de ensamblaje multimodulares. Los módulos a su vez constan de regiones catalíticas que constituyen dominios funcionales implicados en la selección y activación de monómeros, la elongación y, finalmente, la terminación de la cadena peptídica. Cada uno de estos módulos se diferencia según su posición dentro de la cadena de ensamblaje y su composición en los dominios catalíticos (Quadri, 2000).

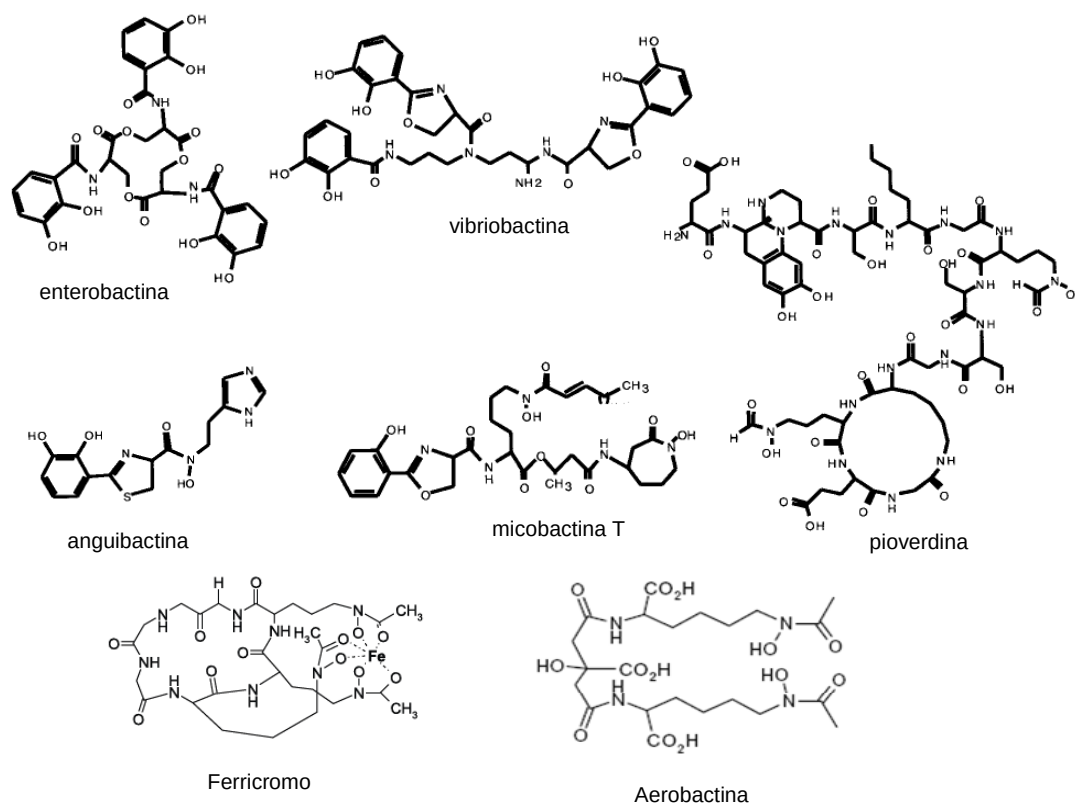


Figura I-2: Estructuras de distintos sideróforos bacterianos: enterobactina, ferricromo y aerobactina de *E. coli*, vibriobactina de *V. cholerae*; micobactina T de *M. tuberculosis*; pioverdina de *P. aeruginosa*; anguibactina de *V. anguillarum*.

Normalmente los sideróforos utilizan uno o más de los grupos de unión al Fe^{+3} descritos a continuación (Crosa y Walsh, 2002; Winkelmann, 2002):

1. Ácido 2,3-dihidroxibenzoico (catecol) o ácido salicílico unido a un aminoácido.
2. Grupos hidroxamatos conteniendo el N^5 -acil- N^5 -hidroxiornitina o N^6 -acil- N^6 -hidroxilisina.
3. Hidroxicarboxilatos formados a partir de ácido cítrico o ácido β -hidroxiaspártico.

Pese a las diferencias químicas que puedan existir entre estas moléculas, se ha comprobado como algunas bacterias son capaces de utilizar no sólo sus propios sideróforos sino también los producidos por otras especies bacterianas e incluso por hongos (Bullen y Griffiths, 1999; Winkelmann, 2002).

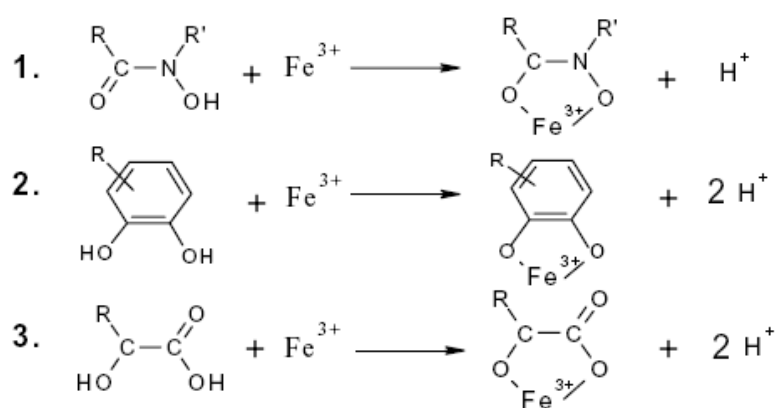


Figura I-3. Grupos funcionales de unión a metal de los sideróforos y los complejos que forman con el ion férrico. (1) Grupo ligando hidroxamato; (2) Grupo ligando catecolato; (3) Grupo ligando hidroxicarboxilato.

La utilización de sideróforos como agentes quelantes de hierro es un proceso cíclico que se inicia con su ensamblaje en el citoplasma celular. Tras su secreción al medio externo, a través de transportadores específicos, la molécula entra en contacto con el átomo de hierro dando lugar a la formación del complejo de coordinación con el ión Fe^{+3} (Boukhalfa y Crumbliss, 2002) (Fig. I-3). A continuación el complejo Fe-sideróforo es nuevamente transportado hacia el interior celular. En el caso de las bacterias Gram-negativas, éstas utilizan receptores específicos localizados en la membrana externa. A través de un proceso dirigido por el potencial de membrana citosólica y mediado por el sistema de transducción de energía TonB-ExbB-ExbD, el complejo Fe-sideróforo se transporta desde el exterior hasta el espacio periplásmico. Finalmente proteínas periplásmicas de unión facilitan un nuevo transporte hasta un sistema transportador ABC (*ATP-Binding Cassette*) ubicado en la membrana

citoplasmática y que permite el paso hasta el citosol (Andrews *et al.*, 2003; Köster, 2001) (Fig. I-4). Una vez en el interior celular, se supone una disociación del complejo por reducción del Fe^{+3} , quedando este último disponible para su incorporación al metabolismo microbiano (Clarke *et al.*, 2001). Por otro lado, las bacterias Gram-positivas, al carecer de membrana externa, no necesitan ni receptores de membrana externa ni un sistema TonB-ExbB-ExbD de transducción de energía. El paso del complejo Fe-sideróforo a través de su membrana citosólica está mediado por permeasas asociadas a un sistema transportador ABC análogo al descrito para las bacterias Gram-negativas. Sustituyendo a la proteína de transporte periplásmica, en estos casos existe una proteína de unión específica, generalmente una lipoproteína anclada a la superficie externa de la membrana plasmática.

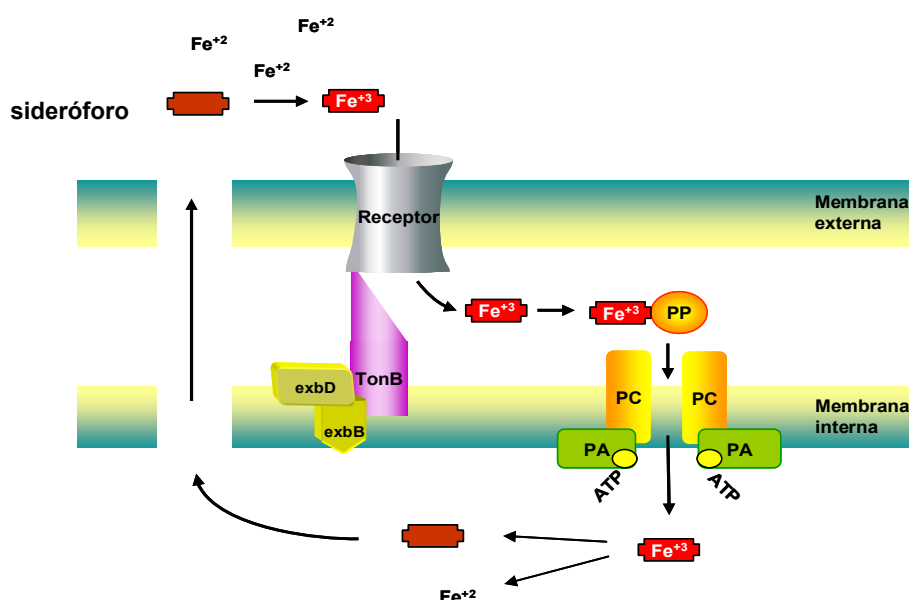


Figura I-4: Ciclo de utilización de sideróforos. Tras la entrada del complejo Fe-sideróforo hasta el interior celular el Fe^{+3} se libera de manera que la molécula quelante puede ser secretada de nuevo para iniciar un nuevo ciclo de captación de Fe. (PP) proteína de unión periplásmica; Las proteínas PC (Proteína canal) y PA (Proteína ATPasa) constituyen el sistema de transporte ABC.

Es posible que, una vez que ha tenido lugar la disociación del átomo de hierro, el sideróforo pueda ser reciclado y exportado nuevamente al exterior. De este modo se iniciaría un nuevo ciclo de captación manteniendo un nivel de adquisición de hierro constante y sin necesidad de sintetizar nuevas moléculas (Ratledge y Dover, 2000).

Todo el sistema, tanto de síntesis como de transporte, incluye el producto de múltiples genes que, normalmente, se asocian formando *clusters* génicos. Así en el caso del sideróforo vibrioferrina, producido por *V. parahaemolyticus*, y anguibactina, producido por *V. anguillarum*, tanto los genes de biosíntesis como los de transporte se localizan en una única

región de DNA (Di Lorenzo *et al.*, 2003; Tanabe *et al.*, 2003). Sin embargo en otros casos, como el sideróforo vibriobactina sintetizado por *V. cholerae*, ambos tipos de genes se localizan en regiones génicas separadas (Wyckoff *et al.*, 1997; 1999).

Durante los últimos años *V. anguillarum*, y más concretamente la cepa 775 del serotipo O1, ha constituido uno de los principales modelos de estudio en lo referente a los mecanismos de obtención de hierro a través de la producción de sideróforos. Las proteínas implicadas en la biosíntesis del sideróforo anguibactina, así como su correspondiente sistema de transporte, están codificadas en el plásmido de virulencia pJM1 (Di Lorenzo *et al.*, 2003). Estudios mutacionales llevados a cabo en *V. cholerae* o *V. vulnificus* confirman la importancia de los sideróforos en la obtención eficaz de hierro *in vivo* y su relación directa con la virulencia de la cepa (Henderson y Payne, 1994a; Litwin *et al.*, 1996; Webster y Litwin, 2000).

Dentro del género *Vibrio* se ha caracterizado un gran número de sideróforos de estructuras diferentes. Así *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. fluvialis* se caracterizan por producir sideróforos de tipo catecol (vibriobactina, vulnibactina y fluvibactina respectivamente). Por otro lado, la anguibactina de *V. anguillarum* se considera de tipo catecol-tiazolin-hidroxamato, mientras que en otras especies marinas de vibrios se ha detectado la producción de aerobactina, un sideróforo de tipo hidroxamato derivado del citrato. Asimismo, también se ha detectado el sideróforo ferrioxamina G y, recientemente, en el patógeno de peces *Vibrio salmonicida* se ha identificado el hidroxamato denominado bisucaberina (Winkelmann, 2002). Esta amplia gama de sideróforos estructuralmente diferentes dentro de la familia *Vibrionaceae* podría ser reflejo del gran número de genes implicados en la biosíntesis de estas moléculas. En el caso de otras bacterias marinas como *Alteromonas*, *Halomonas* y *Marinobacter*, también se ha descrito la síntesis y utilización de sideróforos, lo que da idea de la importancia de este mecanismo en la obtención de hierro también dentro del ambiente marino (Winkelmann, 2002).

2.2.2 Sistemas independientes de sideróforos

Además de los sideróforos las bacterias cuentan con otros sistemas dirigidos a la obtención de hierro a partir de las distintas fuentes presentes en el organismo hospedador. Así algunos microorganismos anaeróbicos, como *Clostridium perfringens*, captan hierro mediante la disminución del pH y creación de un microambiente anaeróbico en el tejido del organismo infectado. Esta acidificación del medio favorece la aparición de especies químicas más

solubles. De este modo el hierro de moléculas como la transferrina o la lactoferrina es reducido a Fe^{+2} facilitando, así, su movilización y asimilación (Ratledge y Dover, 2000). En el caso de los anaerobios facultativos *E. coli* y *S. typhimurium*, también se han caracterizado dos proteínas (FeoA y FeoB) implicadas en la absorción del ión ferroso (Kammler *et al.*, 1993; Tsolis *et al.*, 1996). En este sistema de transporte la proteína FeoB, localizada en la membrana citoplasmática, posee una secuencia típica de unión a ATP lo que supone una obtención de Fe^{+2} a través de un sistema de transporte activo y similar al de otros iones metálicos divalentes.

Algunas especies bacterianas no productoras de sideróforos, como *Neisseria* y *Haemophilus* spp, poseen receptores de superficie específicos para la propia molécula de transferrina y lactoferrina del hospedador (Gray-Owen y Schryvers, 1996; Loosmore *et al.*, 1996; Renauld-Mongenie *et al.*, 2004).

Finalmente en numerosas bacterias patógenas Gram-negativas se han caracterizado mecanismos de transporte implicados en la adquisición específica del hierro incluido en el anillo porfirínico de la molécula de hemo, tanto en su forma libre como asociado a diversas hemoproteínas (Lee, 1995; Wandersman y Delepelaire, 2004). La importancia de esta molécula como fuente de hierro para los microorganismos se trata más detenidamente a continuación.

3. EL HEMO COMO FUENTE DE HIERRO PARA LOS MICROORGANISMOS

3.1 El hemo en el metabolismo bacteriano

Seguramente las porfirinas sean los cofactores enzimáticos más abundantes en la naturaleza. La clorofila, la vitamina B₁₂ y el hemo participan en múltiples rutas metabólicas desde la fotosíntesis hasta el transporte y la detoxificación del oxígeno en eucariotas y bacterias. Todos estos pigmentos tetrapirrólicos proceden de un precursor común, el ácido δ -aminolevulínico, pero se diferencian en la naturaleza del ión metálico central que determina sus propiedades químicas y las reacciones catalizadas por dichos pigmentos. El anillo porfirínico puede contener diferentes metales, como el cobre, magnesio o zinc, pero la designación de hemo se refiere únicamente al anillo tetrapirrólico al que se une un átomo de hierro.

El hemo, o protoporfirina IX-hierro, es un importante catalizador biológico. Su reactividad deriva de la capacidad del ión metálico para sufrir cambios reversibles en su estado de oxidación. Cuando el hierro se encuentra en un estado reducido, Fe^{+2} , al compuesto se le denomina *hemo*, mientras que el término *hemina* se refiere a la forma oxidada de Fe^{+3} . Esta propiedad permite a la molécula de hemo actuar como grupo prostético de una gran variedad de hemoproteínas, como por ejemplo:

1. Hemoglobina: Es la proteína más importante y abundante de todas las hemoproteínas. Cumple su función en el transporte de oxígeno y puede llegar a contener un 65% del hierro total del organismo.
2. Citocromos: Son proteínas asociadas a membrana y participan en las reacciones de transferencia de electrones.
3. Catalasas y peroxidasas: Son enzimas encargadas de la protección celular frente a las especies químicas potencialmente dañinas generadas en las reacciones de oxidación en las que participan el peróxido de hidrógeno entre otros sustratos.

Los procariotas son capaces de sintetizar su propio grupo hemo. El precursor tetrapirrólico universal, el ácido δ -aminolevulínico (ALA), puede ser sintetizado tanto a partir del glutamato, a través de la ruta del C5, como desde la glicina y el succinil-coenzima A a través del enzima ALA sintetasa. Hasta el momento no se han descrito organismos procariotas que posean simultáneamente ambas rutas de síntesis de ALA. De hecho la ruta de la ALA-sintetasa sólo se ha encontrado en las denominadas α -proteobacterias, un grupo taxonómico muy diverso que incluye bacterias fotosintéticas, patógenos intracelulares obligados de eucariotas y simbioses de plantas.

Una vez obtenido el ácido δ -aminolevulínico, el uroporfirinógeno III, precursor final de todos los tetrapirroles, se sintetiza a través de una ruta común a todos los microorganismos. Aquellos organismos que sintetizan tetrapirroles diferentes al hemo contienen los genes necesarios para la síntesis del uroporfirinógeno III, pero carecen de los genes que catalizan los siguientes pasos de la ruta de síntesis de grupo hemo. En el caso de la síntesis específica del grupo hemo y clorofila, el uroporfirinógeno III se metaboliza en tres pasos enzimáticos sucesivos que modifican los grupos laterales y que, finalmente, dan lugar a la molécula de protoporfirina. El enzima ferroquelatasa cataliza la unión del hierro, en su estado ferroso, a la protoporfirina dando lugar al denominado protohemo (Fig. I-5). Éste es el grupo prostético de

numerosas hemoproteínas y puede volver a ser modificado para sintetizar el hemo que se encuentra en el citocromo C y en las oxidasas terminales (Panek y O'Brian, 2002).

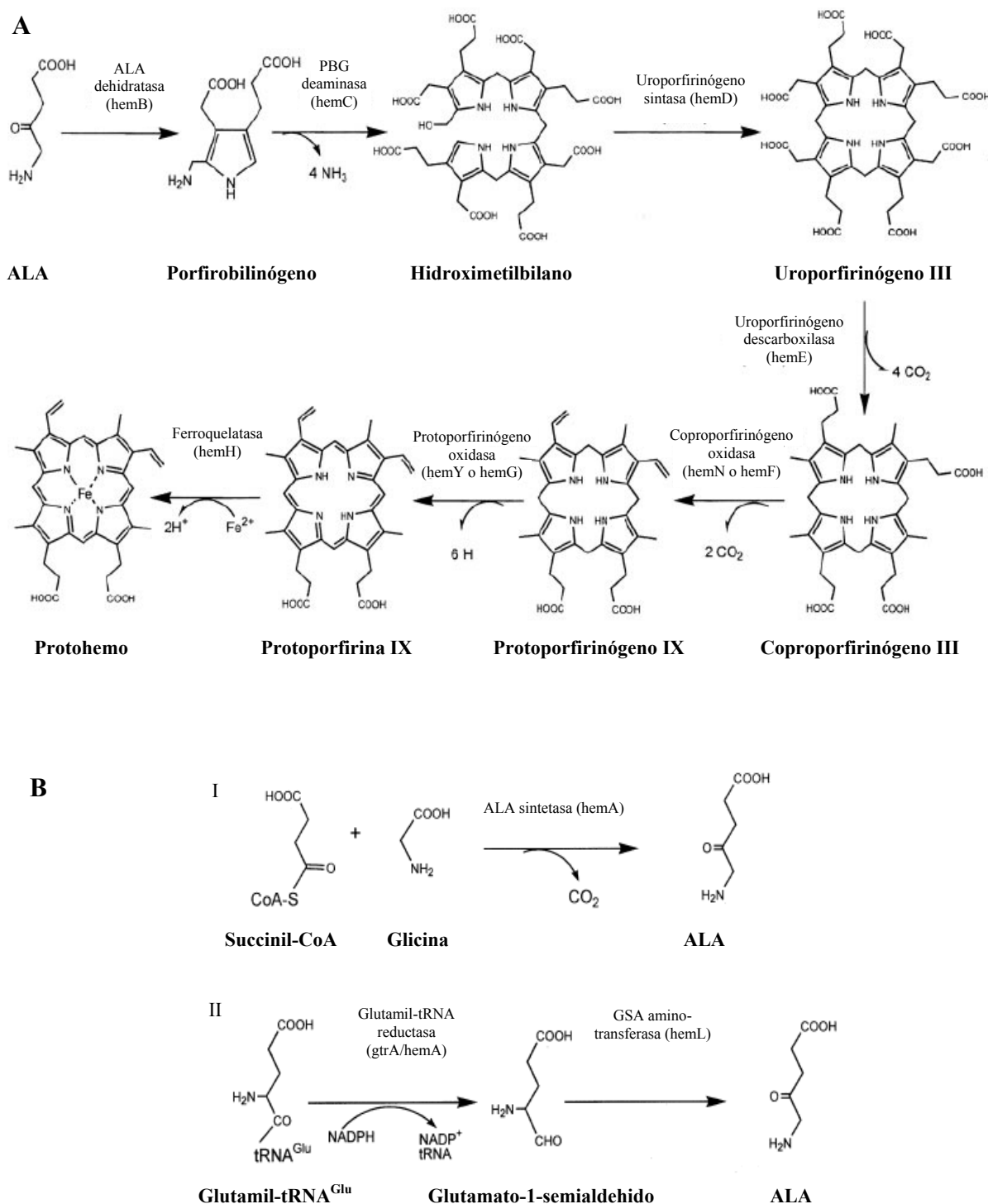


Figura I-5: (A) Ruta de biosíntesis de Hemo a partir de ALA hasta la molécula de protohemo. Se indican los enzimas que intervienen en cada paso y los genes que los codifican se muestran en paréntesis. (B) Dos rutas de síntesis del ácido δ -aminolevulínico (ALA), (I) a través del enzima ALA sintetasa y (II) la ruta del carbono C5. Extraído de Panek y O'Brian (2002).

3.2 El hemo como fuente de hierro

El hierro unido al anillo porfirínico del grupo hemo constituye una fuente excelente de hierro para la mayoría de los microorganismos patógenos.

La pared de las bacterias Gram-negativas está compuesta por la membrana citoplasmática, el periplasma y la membrana externa. Este sistema, pese a su eficacia como protector, también es un impedimento para el intercambio de nutrientes y otros compuestos con el exterior. La superfamilia de las porinas constituye un grupo de proteínas canal muy abundante y centro de numerosos estudios por su importancia en la permeabilidad de la membrana externa ante solutos hidrofílicos. Sin embargo el diámetro del canal formado por estas proteínas excluye al hierro unido a otras moléculas (Moeck y Coulton, 1998). Por esta razón las bacterias patógenas han desarrollado mecanismos específicos para poder captar y utilizar el grupo hemo del hospedador, tanto en su forma libre como asociado a proteínas. En este último caso hay que hablar de hemoproteínas intracelulares como la hemoglobina, por lo que los microorganismos se ven obligados a producir y secretar enzimas del tipo hemolisinas, proteasas o citolisinas dirigidas a facilitar el acceso a estos reservorios de hemo (Carniol y Gilmore, 2004; Gulig *et al.*, 2005; Olczak *et al.*, 2005). Una vez en circulación el hemo y hemoglobina, a pesar de mantenerse unidas a sus respectivas proteínas de unión en el suero (hemopexina, albúmina y haptoglobina), pueden ser utilizados como sustratos para el crecimiento bacteriano. De hecho la utilización de hemo como fuente de hierro es una característica de gran número de microorganismos patógenos y que actualmente incluye *Vibrio* spp, *Shigella dysenteriae*, *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pestis*, *Neisseria* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* o *Staphylococcus aureus* (Fig. I-6).

Dentro de las bacterias Gram-negativas se pueden definir dos mecanismos básicos para la utilización de hemoproteínas. El primer mecanismo, además de ser el más común, consiste en la unión directa del grupo hemo (o hemoproteína) a través de un receptor de membrana externa dependiente de un sistema TonB y su posterior transporte desde el exterior celular, a través del periplasma, hasta el citoplasma bacteriano. En el segundo mecanismo participa una proteína soluble o “hemóforo” que interactúa con la hemoproteína en el medio externo y captura el hemo para, a continuación, llevarlo hasta la superficie celular en dónde se produce la interacción con su receptor específico dependiente de TonB (Genco y Dixon, 2001; Wandersman y Delepelaire, 2004).

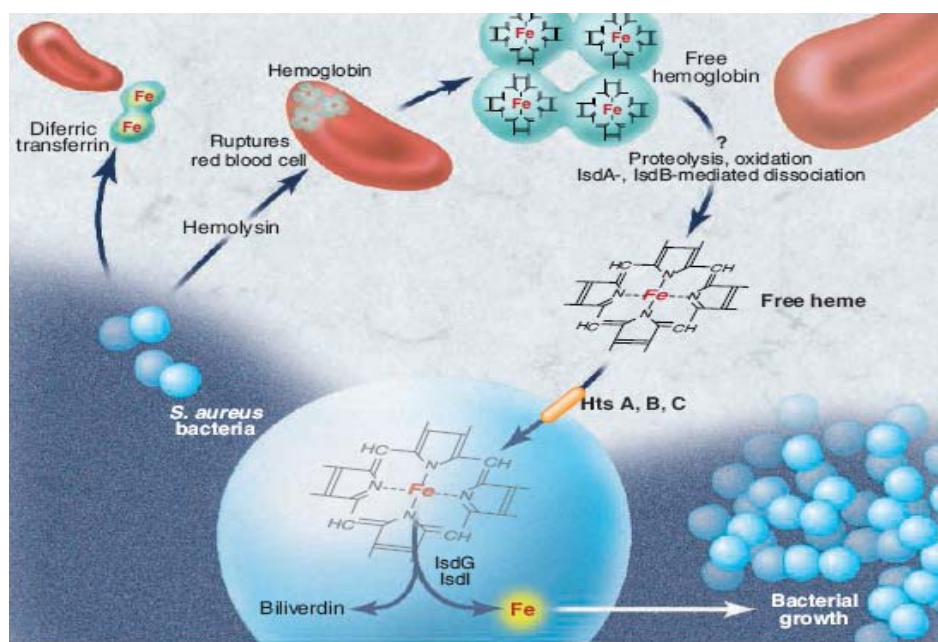


Figura I-6: Esquema del proceso de obtención de hierro de *S. aureus*. Esta bacteria obtiene la mayoría del hierro que necesita para su crecimiento a partir de la molécula de hemo. Las hemolisinas producidas por el patógeno lisan los glóbulos rojos liberando la hemoglobina. Aunque no está claro como esta bacteria es capaz de liberar el grupo hemo de la hemoglobina (quizás por intervención de las proteínas IsdA o IsdB), lo que sí es cierto es que el hemo es transportado hasta el interior celular mediante un sistema de transporte específico. Una vez aquí, la molécula es catabolizada a través de hemo-oxigenasas separando el anillo porfirínico del átomo de hierro. Extraído de Rouault (2002).

3.2.1 Utilización de hemóforos

Los hemóforos (denominados así por su analogía con los sideróforos) consisten en proteínas extracelulares capaces de capturar el hemo a partir de una fuente específica o, como en el caso del hemóforo HxuA de *H. influenzae*, a partir de diversas hemoproteínas (Cope *et al.*, 1995). Su alta afinidad por el grupo hemo permite a los hemóforos capturar el hemo a partir de una gran variedad de sustratos, como la hemoglobina, hemopexina y mioglobina, leghemoglobina y albúmina, y transportarlo, a continuación, hasta un receptor específico ubicado en la membrana externa de la bacteria (Wandersman y Delepelaire, 2004).

El sistema de hemóforos mejor caracterizado hasta el momento es el de *Serratia marcescens*. En condiciones de escasez de hierro esta bacteria produce una proteína extracelular denominada HasA que actúa uniéndose a la hemoproteína y escindiendo el grupo hemo (Létoffé *et al.*, 1994b) (Fig. I-7). Su estructura hace pensar que su unión a la hemoproteína correspondiente induce la disminución de la afinidad de esta proteína por el grupo hemo, de forma que éste queda libre para poder unirse al hemóforo. Una vez formado

el complejo hemóforo-hemo la transferencia al periplasma a través de un receptor específico anclado a la membrana externa sería relativamente fácil (Létoffé *et al.*, 2001; 2004). Los estudios acerca de este sistema de captación de hemo sugieren que así como el receptor es esencial para el proceso no ocurre lo mismo con el hemóforo. Sin embargo la acción conjunta del hemóforo y del receptor permite reducir la concentración mínima de hemo o hemoglobina necesaria para el crecimiento bacteriano (Ghigo *et al.*, 1997).

Se han descrito homólogos de HasA en diversas bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa*, *Y. pestis* o *H. influenzae* (Cope *et al.*, 1994; Ochsner *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2001). En todos estos sistemas se producen y secretan proteínas solubles que tienen una gran afinidad por la hemoglobina y hemopexina. Todas constituyen una familia de proteínas de unión a hemo sin homología con otras proteínas conocidas.

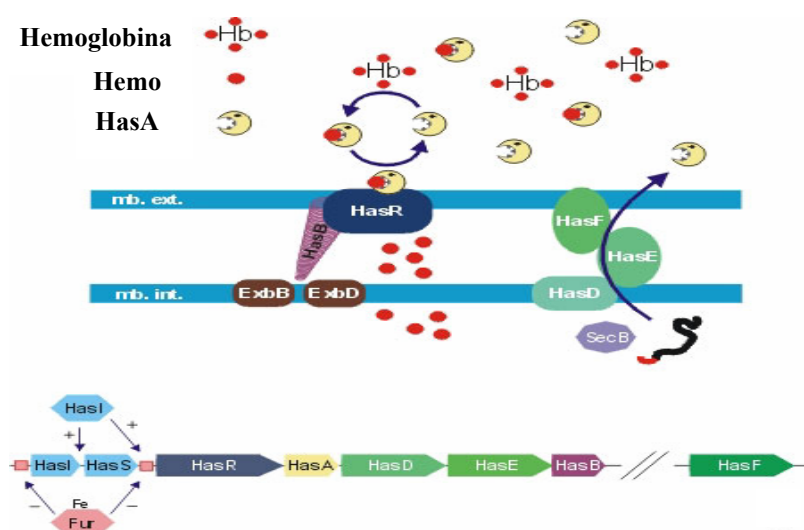


Figura I-7: Modelo de captación del grupo hemo a través del hemóforo HasA en *Serratia marcescens*.

3.2.2 Sistemas de transporte asociados a la membrana externa

En el caso de la interacción directa del grupo hemo con proteínas receptoras específicas ancladas en la superficie bacteriana, dicha interacción constituye el primer paso en un proceso de transporte que dirige a la molécula de hemo desde el medio externo hasta el interior celular.

En las bacterias Gram-negativas el transporte de hemo a través de la membrana externa, desde el exterior celular hasta el espacio periplásmico, constituye un proceso activo que implica un gasto de energía procedente de la membrana citoplasmática. Al igual que los receptores de sideróforos y de transferrinas, los receptores de hemo necesitan un sistema

TonB intacto para poder funcionar (Henderson y Payne, 1994a; Stojiljkovic y Hantke, 1992). Estos sistemas TonB están compuestos por las proteínas TonB, ExbB y ExbD asociadas a la membrana citoplasmática. El conjunto de las tres proporciona la energía necesaria para el transporte de la molécula desde su receptor específico hasta el periplasma (Postle y Kadner, 2003). Una vez aquí, el hemo se asocia específicamente a una nueva proteína que lo transporta hasta la cara interna de la membrana citoplasmática. Finalmente un sistema de transporte ABC es el responsable, mediante la hidrólisis de ATP, del paso del grupo hemo desde el periplasma al citoplasma celular en dónde la molécula podrá ser utilizada como fuente de hierro o bien incorporarse directamente al metabolismo bacteriano (Fig. I-8).

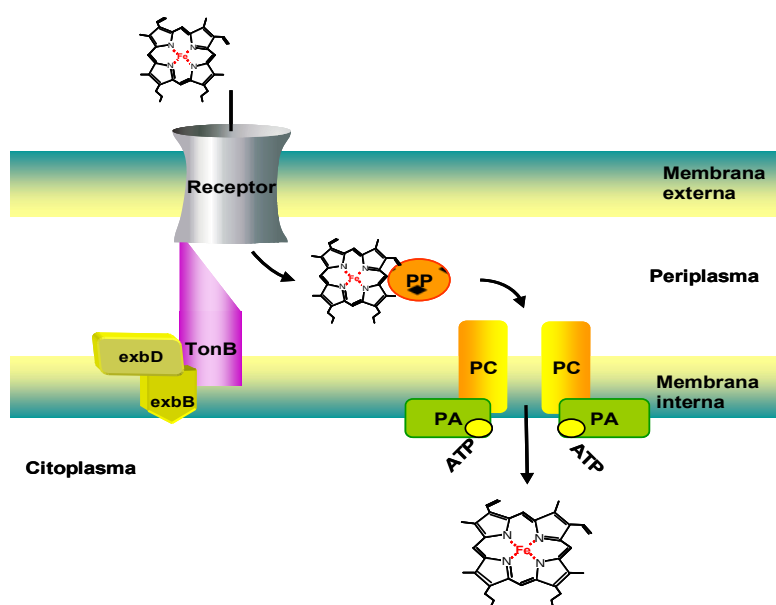


Figura I-8: Mecanismo general de transporte de hemo desde el medio externo hasta el citoplasma bacteriano. El receptor de membrana externa interacciona específicamente con la molécula de hemo. El transporte desde el exterior hasta el espacio periplásmico es un proceso activo que depende de un sistema de transducción de energía TonB; (PP) proteína de unión periplásmica; Las proteínas PC (Proteína canal) y PA (Proteína ATPasa) constituyen el sistema de transporte ABC.

A continuación se describen detalladamente cada uno de los componentes de estos sistemas específicos para el transporte de la molécula de hemo.

3.2.2.1 Receptores específicos de membrana externa

Existe un gran número de receptores de membrana capaces de reconocer específicamente la molécula de hemo o distintas hemoproteínas. Los receptores descritos hasta el momento comparten entre el 21% y el 90% de la secuencia de aminoácidos y su tamaño varía entre los 70 kDa de muchos receptores de enterobacterias y vibrios (Henderson

y Payne, 1994b; Mazoy *et al.*, 2003; Mills y Payne, 1997; Stojiljkovic y Hantke, 1992) hasta los 100 kDa del receptor de *Haemophilus spp* (Cope *et al.*, 1994).

Debido a que normalmente la molécula de hemo está asociada a proteínas, los receptores bacterianos se han adaptado a esta falta de hemo libre a través de dominios proteicos capaces de unir el complejo hemo-proteína, como en el caso de la hemoglobina, hemopexina y haptoglobina. Cabe destacar que algunas bacterias patógenas pueden expresar simultáneamente varios receptores diferentes relacionados con la captación de hemo a partir de las diferentes proteínas de unión, aunque muchas veces su función es redundante y llegan a utilizar las mismas fuentes de hemo (Genco y Dixon, 2001). Así, tanto los receptores de membrana externa PhuR y HasR expresados en *P. aeruginosa* como los tres receptores caracterizados en *V. cholerae* (HutA, HutR y HasR) tienen afinidad por el hemo y la hemoglobina, de modo que la mutación de alguno de ellos no impide seguir utilizando estas moléculas como fuentes de grupos hemo (Mey y Payne, 2001; Ochsner *et al.*, 2000).

Si analizamos la especificidad de sustrato, los receptores de membrana externa se pueden dividir entre aquellos típicos de patógenos extremadamente adaptados al hospedador y que son específicos para el grupo hemo o la hemoglobina (Ratledge y Dover, 2000; Stojiljkovic *et al.*, 1995) y aquellos que no discriminan entre las diferentes proteínas de unión, como los receptores de *Y. pestis* o *Y. enterocolitica* (HmuR y HemR). Estos últimos son capaces de unir indistintamente hemoproteínas como hemopexina, hemoglobina-haptoglobina, hemoglobina, mioglobina y albúmina sérica humana (Hornung *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1999).

No está claro cuál es el mecanismo que confiere la especificidad al receptor, aunque una posibilidad sería el reconocimiento del grupo hemo y su estructura dentro de los diferentes esqueletos proteicos. Así, por ejemplo, en el hemo que forma parte de la hemoglobina sólo quedan expuestas al exterior dos cadenas laterales que serían las reconocidas por la proteína receptora (Stojiljkovic y Perkins-Balding, 2002). Sin embargo, en el estudio del receptor de membrana externa caracterizado en *V. anguillarum* (HuvA) se describe la capacidad de utilización de hemo tanto en su forma libre como asociado a la hemoglobina y, por tanto, se establece un reconocimiento concreto del grupo hemo y no de la proteína que lo envuelve (Mazoy *et al.*, 2003). En otros casos, como en el receptor HutA de *V. cholerae*, se hablaría de un reconocimiento exclusivo del átomo de hierro dentro del anillo tetrapirrólico, de modo que el componente estructural por sí solo (protoporfirina IX) no tendría capacidad de interaccionar con el receptor (Henderson y Payne, 1993).

A pesar de sus diferencias todos los receptores de hemo de bacterias Gram-negativas comparten las siguientes características (Stojiljkovic y Perkins-Balding, 2002):

- Transportan la molécula de hemo mediante un proceso activo.
- Para su funcionamiento requieren de un sistema TonB que proporcione una fuerza protón-motriz a través de la membrana citoplasmática.
- Su expresión se ve estimulada en condiciones limitantes de hierro.
- La mayoría posee la secuencia conservada de aminoácidos “FRAP(10x)H(XX)NPNL(2x)E”.
- Son homólogos estructurales de los receptores de sideróforos.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de varias de estas proteínas llevó a identificar una región muy conservada y próxima al extremo N-terminal, la cual constituye el punto de interacción entre el receptor y la proteína TonB. Por esta razón a esta secuencia consenso se la denominó *TonB-box* (D/ETMVVTA). Pese a la gran conservación de la secuencia ésta puede sufrir ligeros cambios sin que se vea afectada su actividad. De hecho se supone que la estructura secundaria de esta zona es la que, seguramente, determina la función de la *TonB-box* y no la secuencia concreta de aminoácidos.

En todos los receptores específicos de hemo caracterizados hasta la fecha dentro del género *Vibrio*, se han identificado regiones de interacción con TonB, como son el receptor HuvA de *V. anguillarum* (DEVVSA) (Mazoy *et al.*, 2003), HupA de *V. vulnificus* (DEVVSA) (Litwin y Byrne, 1998), HutA de *V. cholerae* (DEVVST) (Henderson y Payne, 1994b), HutA de *V. parahaemolyticus* (NEVVTA) (O'Malley *et al.*, 1999), HupO de *V. fluvialis* (DEVVSA) (Ahn *et al.*, 2005) y el receptor HutA de *P. damsela* (DEVVSG) (Juiz-Río *et al.*, 2005).

3.2.2.2 Sistemas TonB

Tal como se explicó anteriormente los sideróforos, la vitamina B₁₂ o la molécula de hemo son demasiado grandes para pasar a través de los clásicos canales formados por porinas y, por tanto, el transporte se realiza a través de los receptores de membrana externa que facilitan el paso de estos compuestos de una manera específica. La energía necesaria para permitir ese transporte de sustancias hasta el espacio periplásmico procede del complejo proteico conocido como sistema TonB. Localizado en la membrana citoplasmática de la célula dirige la energía protón-motriz, necesaria para el proceso de transporte, desde la

membrana interna, dónde se genera, hasta la membrana externa de la célula (Postle y Kadner, 2003). El sistema es un complejo proteico ternario compuesto por la proteína TonB y las proteínas accesorias ExbB y ExbD.

La proteína TonB es el componente más importante del proceso de transducción de energía desde la membrana citoplasmática hasta la membrana externa, de modo que interactúa con componentes de ambas membranas. Letain y Postle (1997), mediante el análisis de fracciones celulares en gradientes de densidad de sacarosa, establecieron que la proteína TonB de *E. coli* se distribuye, aproximadamente, en un 40% y un 60% entre la membrana citoplasmática y las fracciones de la membrana externa, mientras que las proteínas ExbB y ExbD se localizan en la fracción de la membrana citoplasmática. Según los datos disponibles hasta el momento, se supone que ExbB y ExbD utilizan la fuerza protón-motriz para cambiar la conformación energética de TonB a un estado de alta energía, a partir de la cual dicha energía es transmitida a las correspondientes proteínas receptoras de la membrana externa (Postle y Kadner, 2003). La relación establecida para las tres proteínas que constituyen el sistema proteico TonB, es 1 TonB: 2 ExbD: 7 ExbB (Higgs *et al.*, 2002). Esta estequiometría predice un complejo de 260 kDa. Sin embargo bajo determinadas circunstancias el sistema puede dimerizarse, lo que hace que el tamaño del complejo pase a ser, aproximadamente, el doble (Sauter *et al.*, 2003).

Las proteínas TonB y ExbD poseen un único segmento transmembrana próximo a su extremo N-terminal, localizándose la mayor parte de la secuencia proteica en el espacio periplásmico. Por su parte ExbB consta de tres segmentos transmembrana orientados de modo que la mayor parte de la proteína permanece en el citoplasma celular (Fig. I-9). Las tres proteínas interaccionan entre sí, principalmente a través de las regiones transmembrana (Larsen y Postle, 2001) y según diversos estudios forman un complejo en el que ExbB sería el responsable de estabilizar a TonB y ExbD (Ahmer *et al.*, 1995; Postle y Kadner, 2003).

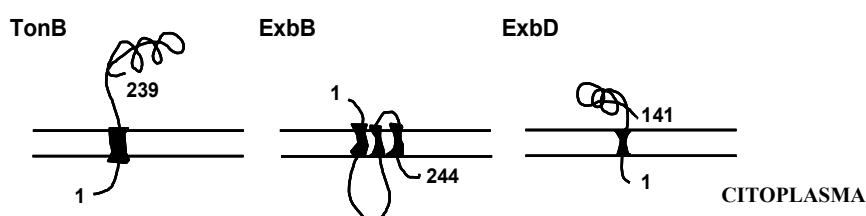


Figura I-9: Topología transmembrana (membrana citoplasmática) de las proteínas TonB, ExbB y ExbD que constituyen el sistema TonB de transducción de energía.

La proteína TonB, responsable de establecer la interacción con el receptor de la membrana externa, se divide en varios dominios funcionales de secuencias conservadas (Fig. I-10). El primero de ellos se localiza en la región transmembrana N-terminal y juega un papel directo en el proceso de transducción de energía constituyendo la zona de interacción con el segmento transmembrana de ExbB. Se ha demostrado que su delección elimina completamente la actividad de la proteína y, por tanto, la funcionalidad del sistema (Jaskula *et al.*, 1994). Además los residuos Ser-16 y His-20 resultan esenciales para el cambio del estado energético de TonB y en último término para el transporte activo del soluto a través de la membrana externa (Larsen y Postle, 2001).

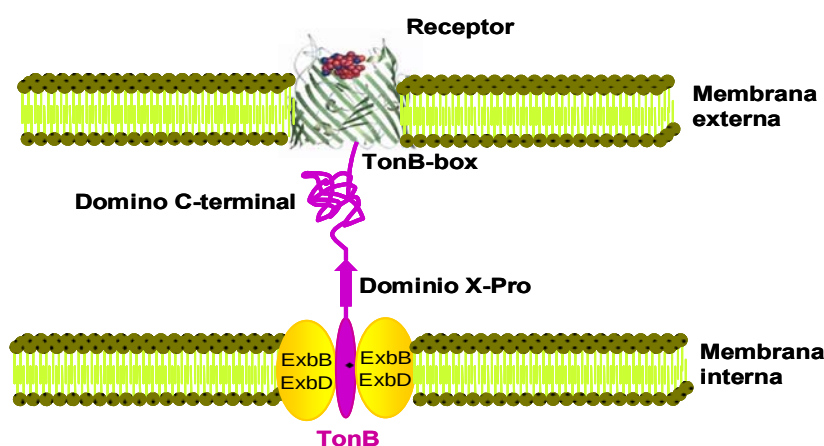


Figura I-10: Modelo de interacción del sistema TonB con el receptor. A través del dominio C-terminal la proteína TonB interactúa con la región *TonB-box* del receptor. Al mismo tiempo su dominio N-terminal se asocia con las proteínas ExbB y ExbD, formando un complejo proteico estable que facilita la transducción de energía desde la membrana interna hasta el receptor asociado a la membrana externa de la célula.

El segundo de los dominios se caracteriza por ser rica en Prolinas (aminoácidos 66-120) y contener series de repeticiones Pro-Glu y Pro-Lys. La función propuesta para esta zona es la de extender la estructura de la proteína TonB a través del periplasma facilitando así la interacción con la molécula receptora (Khursigara *et al.*, 2005). El análisis *in vivo* de la delección de esta región demostró que se produce una significativa reducción de la actividad del sistema TonB. La explicación de este efecto podría estar relacionado con una alteración de la interacción TonB-ExbB/ExbD, o bien, al limitar la capacidad de expansión de TonB a través del periplasma, podría bloquearse el contacto con el receptor de la membrana externa (Larsen *et al.*, 1993).

Finalmente la tercera región conservada corresponde al dominio C-terminal cuya característica fundamental es su cristalización como dímero compuesto por láminas- β antiparalelas, aunque todavía no se sabe si este dímero representa algún tipo de estado

funcional (Postle y Kadner, 2003). Los análisis en gradientes de densidad mencionados anteriormente demostraron como ni la porción N-terminal de TonB ni la fuerza protón-motriz de la membrana citoplasmática, los cuales son esenciales para la actividad de TonB, son necesarios para la asociación de la proteína con la membrana externa (Letain y Postle, 1997). Sin embargo si se elimina el extremo C-terminal la proteína TonB permanece siempre asociada a la membrana citoplasmática, sugiriendo que esta porción es fundamental para la asociación con la membrana externa. Según los resultados obtenidos por Cadieux y Kadner (1999) la secuencia alrededor del aminoácido 160 también podría estar implicada en la asociación estable de TonB con esta membrana y por tanto constituir una región fundamental para la funcionalidad de la proteína.

En base al marcaje *in vivo* del extremo N-terminal de TonB con marcadores de fluorescencia específicos para cisteína, se ha propuesto un modelo de interacción TonB-receptor en el que la proteína TonB comienza en un estado conformacional de baja energía y asociada a la membrana citoplasmática formando un complejo con ExbB y ExbD (Larsen *et al.*, 2003). La fuerza protón-motriz de la membrana (o alguna otra fuente de energía que genere dicha fuerza protón-motriz) es utilizada por ExbB/D para conseguir que TonB pase a un estado energético superior. En este momento el extremo N-terminal de TonB se libera del complejo ExbB/D y la proteína se asocia al transportador de membrana externa. Por su parte la unión de las proteínas de transporte activo con sus ligandos correspondientes provoca un cambio conformacional, reconocido por TonB y que inicia la transducción de la energía almacenada hasta la molécula transportadora. Finalmente TonB se reasocia con ExbB y ExbD en la membrana citoplasmática volviendo a su estado de baja energía para iniciar así un nuevo ciclo.

Aunque en la mayoría de los casos los sistemas de captación de hemo se asocian a un único sistema TonB, no siempre es así. En cepas patógenas de *Neisseria* (*N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*) se ha observado como la mutación del complejo no bloquea la utilización de la hemoglobina como fuente de hierro (Desai *et al.*, 2000). En este caso se ha postulado la existencia de un transporte mediado por un segundo sistema de transducción de energía, todavía sin caracterizar, similar al descrito anteriormente. Por otra parte, en *V. cholerae* sí se ha caracterizado un segundo sistema TonB (proteínas TonB2-ExbB2-ExbD2) (Occhino *et al.*, 1998). Ambos sistemas TonB1 y TonB2 están codificados en regiones diferentes del genoma y participan en el transporte de hemina y de los sideróforos vibriobactina y ferricromo (Seliger *et al.*, 2001). Pese a esta redundancia en sus funciones existe una preferencia por el

sistema TonB1 durante el proceso de transporte de grupos hemo. En *P. aeruginosa* y *S. marcescens* también se ha descrito la existencia de dos sistemas TonB con funciones tanto específicas como redundantes (Paquelin *et al.*, 2001; Zhao y Poole, 2000).

3.2.2.3 Transportadores periplásmicos y Sistemas ABC

» **Proteínas Periplásmicas:** Las proteínas periplásmicas asociadas al transporte de sustancias se agrupan en clases diferentes según sus similitudes dentro de la secuencia de aminoácidos. Muchas de estas proteínas se caracterizan por tener dos dominios globulares formados por una lámina- β flanqueada por α -hélices. El reconocimiento molecular de los solutos estriba en las ligeras diferencias en cuanto al número y ordenación de esas láminas- β y α -hélices. A su vez ambos dominios se encuentran conectados mediante cadenas polipeptídicas cortas que permiten un movimiento de los dominios similar al de una bisagra.

Como resultado de estas diferencias en la estructura de ambos dominios, la organización del sitio de unión a la molécula a transportar es muy variable. En la mayoría de las proteínas periplásmicas los entrecruzamientos de las cadenas polipeptídicas entre los dominios forman, además de la denominada “región bisagra”, la base de la zona de unión. Por otro lado la conformación final del complejo transportador-ligando también es importante a la hora de establecer las interacciones adecuadas con la permeasa situada en la membrana interna y a la que se va a transferir dicho ligando (Clarke *et al.*, 2001).

La topología típica de las proteínas de unión periplásmicas está representada por las proteínas homólogas de unión a hierro FbpA de *N. gonorrhoeae* y HitA de *H. influenzae* (Adhikari *et al.*, 1995; Bruns *et al.*, 1997; 2001) (Fig. I-11) aunque existen excepciones, como es la proteína periplásmica de unión del complejo Fe-sideróforo, FhuD, de *E. coli* (Clarke *et al.*, 2002). Otros ejemplos de proteínas periplásmicas asociadas al transporte de sustancias serían HemT de *Y. enterocolitica* (Stojiljkovic y Hantke, 1994), HmuT de *C. diphtheriae* (Drazek *et al.*, 2000), HutB de *V. cholerae* (Henderson y Payne, 1993) y HugB de *P. shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001). En estos casos todas las proteínas están implicadas en el transporte específico de grupos hemo y comparten una similitud entre el 34 y el 90% dentro de su secuencia de aminoácidos.

Las bacterias Gram-positivas, al carecer de membrana externa y, por tanto, de espacio periplásmico, poseen proteínas de unión ancladas en la cara externa de la membrana a través de cadenas lipídicas y equivalentes a las proteínas periplásmicas. Tras su unión específica con

el soluto estas proteínas transfieren la molécula a un sistema de transporte, también específico, y que permite su paso a través de la membrana hasta el citoplasma celular.

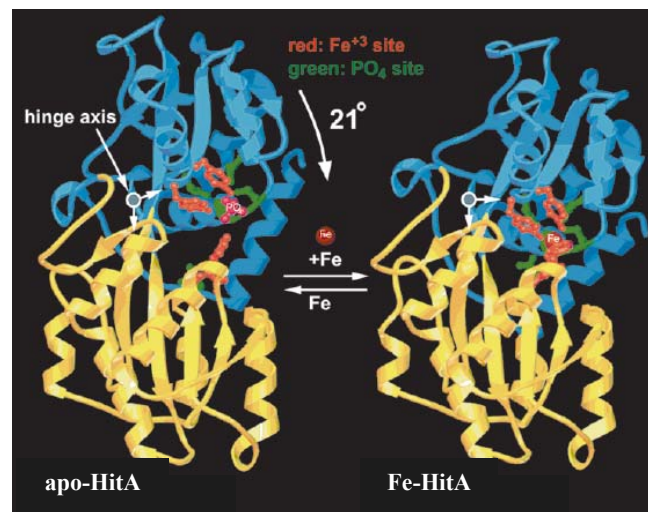


Figura I-11: Esquema del movimiento en bisagra de la proteína periplásmica de unión HitA de *H. influenzae* durante la unión de la molécula de hierro. La principal diferencia entre la proteína HitA sin (apo-HitA) y con hierro (Fe-HitA) es la rotación de los dos dominios estructurales. Extraído de Bruns *et al.* (2004).

» **Sistemas ABC:** Los transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) comprenden una de las familias proteicas más abundantes tanto en procariotas como en eucariotas. Una de sus características principales es la gran conservación en términos de la secuencia de aminoácidos y de la organización de sus dominios o subunidades. De este modo se pueden dividir en tres grandes grupos (Dassa y Bouige, 2001):

1. Importadores: Constituyen los principales transportadores de moléculas dentro de los organismos procariotas y su función principal es la de proporcionar nutrientes esenciales para la bacteria, incluso cuando dichos nutrientes se encuentran en concentraciones mínimas.
2. Exportadores: Se pueden encontrar tanto en organismos procariotas como en eucariotas y están implicados en la expulsión de sustancias de desecho, secreción de toxinas extracelulares y traslado de componentes celulares.
3. Sistemas ABC no implicados en procesos de transporte: Estos sistemas suelen asociarse a procesos celulares como son la reparación del DNA, traducción, o regulación de la expresión génica.

Los sistemas ABC se caracterizan por tener un dominio ATPasa altamente conservado (dominio ABC o “de unión a nucleótido”) con capacidad de unión e hidrólisis de ATP y que proporciona la energía necesaria para una larga secuencia de procesos biológicos. Esta subunidad ABC contiene a su vez otras dos regiones altamente conservadas: las secuencias WalkerA “GPNGAGKSTLL” y WalkerB “hhhD” (“h” representa residuos hidrofóbicos). Juntas forman la estructura de unión para el fosfato del ATP y para la unión de un ión Mg^{+2} respectivamente. Entre las secuencias WalkerA y WalkerB se localiza otra región específica de esta superfamilia y que se denomina región C (LSGGE(2X)R). Esta última zona es fundamental para el proceso de transporte, aunque se desconoce su papel exacto.

En general el transportador ABC está compuesto por cuatro subunidades o dominios que, normalmente, se sintetizan como polipéptidos independientes y que, posteriormente, se ensamblan formando la unidad básica del transportador (Fig. I-12). La organización común consiste en dos subunidades ABC (o dominios de “unión a nucleótido”) y dos subunidades transmembrana. Se han descrito casos en los que sólo están presentes tres de los cuatro dominios. Cuando esto sucede una de las subunidades es capaz de funcionar como un homodímero con el fin de mantener la funcionalidad del sistema.

Las subunidades transmembrana atraviesan la membrana varias veces en forma de α -hélices de modo que suele haber 6 α -hélices por dominio (12 por transportador). Determinan la especificidad del transporte de solutos y forman un canal a través del cual se facilita dicho transporte desde el periplasma hasta el citoplasma celular. El porcentaje de identidad establecido para la secuencia de aminoácidos de las permeasas de los sistemas ABC descritas hasta la fecha, oscila entre el 37% y el 93%. A partir de la comparación de 68 de estas proteínas, aproximadamente a 100 residuos de la región C-terminal, se pudo identificar una región altamente conservada (EAA(3X)G(9X)I(X)LP). Sin embargo del análisis de un mayor número de miembros de la familia se dedujo que la secuencia consenso de esta región sería la secuencia E(X)A(3X)G. Otras regiones más o menos conservadas dentro de los dominios transmembrana, aunque de función desconocida, son: HemU-53 “NIRLPR(2X)L(3X)VG(11X)FRNP”, HemU-150 “L(X)GIAINALC”, los aminoácidos W181 y H226 descritos en la mayoría de las permeasas analizadas y la región HemU-255 “G(X)IGF(X)GL(2X)PH” (Stojiljkovic y Perkins-Balding, 2002).

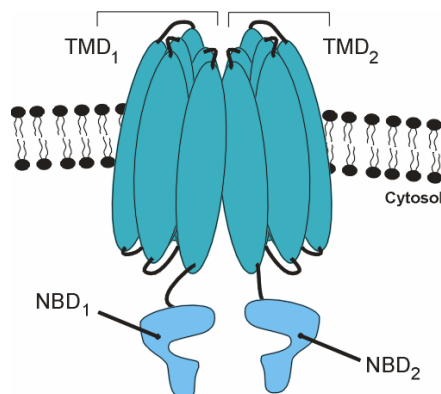


Figura I-12: Organización estructural de complejo de transporte ABC. Los dominios transmembrana (TMD) forman un poro y determinan la especificidad del transportador. Las dos subunidades citosólicas de unión al ATP (NBD) asocian la unión del ATP al movimiento del soluto. Las regiones NBD poseen secuencias altamente conservadas (WalkerA y WalkerB) e incluyen la secuencia señal del transportador ABC (Región C).

Los dominios ABC, responsables de la actividad ATPasa, son hidrofóbicos y están en contacto con la cara citoplásmica de la membrana interna. Precisamente esta última región es la fundamental a la hora de definir y delimitar a la familia del transportador ABC (Higgins, 2001). La identidad entre las subunidades ATPasas está entre el 41% y el 90%. Además de las regiones típicas de este tipo de proteínas (secuencias WalkerA, WalkerB y la región C), las subunidades ABC se caracterizan por la presencia de un residuo conservado de Histidina (H206) junto con la secuencia “VLHDLN(X)AA(X)Y(X)D”. Tanto la secuencia como el residuo aminoacídico son esenciales en el proceso de transporte, aunque no están implicadas en la unión de ATP (Stojiljkovic y Perkins-Balding, 2002).

En general los transportadores ABC establecen interacciones específicas con las proteínas periplásmicas descritas anteriormente. De hecho estas proteínas últimas juegan un papel fundamental en el transporte a través de los sistemas ABC y son las que determinan, en gran medida, alguna de sus características más importantes, como por ejemplo:

- *Especificidad y afinidad:* Aquellos transportadores dependientes de proteínas periplásmicas (como, por ejemplo, los transportadores específicos de hemo) poseen una alta afinidad por el sustrato. Lo mismo ocurre con respecto a la especificidad en donde aquellos transportadores que carecen de proteínas periplásmicas de unión son menos específicos en cuanto al transporte de sustancias.
- *Direccionalidad del sistema de transporte:* Existe una correlación entre la presencia de la proteína de unión periplásmica y la captación del soluto, así como

entre la ausencia de esta proteína y la exportación de dicha molécula. Aunque esto no constituye una prueba definitiva de la participación de la proteína periplásmica en la direccionalidad, la interacción entre esta proteína y el transportador ABC en la cara externa de la membrana citoplasmática podría ser el desencadenante del proceso de hidrólisis de ATP que tiene lugar en la cara citoplasmática y, por tanto, el inicio de un transporte desde el exterior hacia el interior celular.

La caracterización de sistemas génicos implicados en el transporte del grupo hemo también está asociada la identificación de transportadores ABC específicos. Sin embargo los datos experimentales acerca de la funcionalidad de estos sistemas son muy escasos y lo que realmente se conoce procede del análisis de proteínas del tipo permeasas y ATPasas asociadas al transporte de otras moléculas diferentes como sideróforos o la vitamina B₁₂ (Köster, 2001).

Según los datos disponibles, el transporte del grupo hemo a través de un transportador ABC requiere la interacción de la proteína periplásmica de unión y su correspondiente permeasa. Al mismo tiempo esta permeasa interactuaría con la subunidad ATPasa del transportador, seguramente a través de la región C y la región EAA(3X)G (Stojiljkovic y Perkins-Balding, 2002). El mecanismo detallado por el que los transportadores ABC son capaces de mover el soluto a través de la membrana celular no está del todo claro. Sin embargo, basándose en sistemas similares descritos tanto en procariotas como en eucariotas, se ha propuesto un modelo en el que el ciclo de transporte se inicia con la interacción del complejo de unión proteína periplásmica-sustrato con las subunidades transmembrana del transportador. En ese momento se produce la liberación de la molécula de sustrato que interactúa con estas subunidades induciendo su cambio conformacional. Dicho cambio se transmite, a su vez, hacia las subunidades ATPasa desencadenando la hidrólisis de ATP. Como resultado, las subunidades ABC sufren nuevos cambios conformacionales que se transmiten, en dirección contraria, hacia las subunidades transmembrana y que provocan la reorientación del sitio de unión al sustrato (dirigido inicialmente hacia el espacio periplásmico) para quedar expuesto en la cara contraria de la membrana, es decir, hacia el citoplasma. Simultáneamente disminuye la afinidad por el sustrato y éste se libera al interior celular. La reorientación del sitio de unión no implica necesariamente el movimiento completo del transportador a través de la bicapa lipídica. Probablemente permanece en la cara periplásmica de la membrana y los cambios conformacionales simplemente sirven para alterar su exposición hacia el medio intracelular (Higgins, 2001). El proceso se completa con la vuelta del transportador a su posición inicial y la restauración de su afinidad.

3.3 Utilización del grupo hemo en el citoplasma bacteriano

Tras su entrada en el interior de la célula, la bacteria puede utilizar el grupo hemo como fuente de hierro para lo cual, previamente, ha de ser capaz de romper el anillo porfirínico que lo envuelve (Fig- I-13). El primer enzima bacteriano caracterizado con actividad hemo-oxigenasa fue el producto del gen *hmuO* de *C. diphtheriae* (Schmitt, 1997). La proteína codificada por este gen tiene un 36% de identidad con una hemo-oxigenasa humana y su mutación bloquea la utilización del hemo o de la hemoglobina como fuente de hierro. Del mismo modo en algunas cepas de *Neisseria* se ha descrito recientemente un homólogo de *hmuO*, denominado *hemO*, que comparte su participación en la degradación del grupo hemo (Zhu *et al.*, 2000). La caracterización de ambos genes como hemo-oxigenasas demuestra la existencia de un mecanismo específico para romper el grupo hemo mediante su oxidación y por el que estas bacterias son capaces de utilizar la molécula de hemo como una fuente alternativa de hierro.

Sin embargo, hasta el momento, no se han encontrado más homólogos de estas proteínas en otras especies bacterianas. Tan sólo en *Pseudomonas* spp y *Legionella* se ha identificado una ORF con una posible actividad hemo-oxigenasa, aunque dicha función todavía está por demostrar (Ratliff *et al.*, 2001). La ausencia de homólogos o de genes con funciones similares lleva a pensar que no todos los microorganismos emplean enzimas de este tipo para conseguir el hierro necesario en su metabolismo, por lo que es posible que existan otros mecanismos diferentes con esta misma finalidad.

Cuando las bacterias no son capaces de degradar el grupo hemo, la molécula puede dirigirse a los sistemas de la cadena respiratoria o a otros enzimas para ser incorporada directamente. En este caso el hierro necesario para el metabolismo procedería de su almacenaje previo o de otros reservorios disponibles en el medio externo. De hecho normalmente las bacterias pueden disponer de fuentes de hierro diferentes en cantidades limitantes. Las pequeñas cantidades de hierro inorgánico asimiladas al mismo tiempo que el hemo, serían capaces de mantener parcialmente los niveles de hierro almacenado en el interior celular y también ser utilizado como cofactor de aquellos enzimas que lo necesiten. En este sentido, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Plesiomonas* y *Vibrio* son bacterias que poseen diversos sistemas de asimilación de hierro altamente eficaces además de importantes mecanismos de almacenaje y que, aunque aparentemente son incapaces de degradarlo, también utilizan el grupo hemo como fuente de hierro.

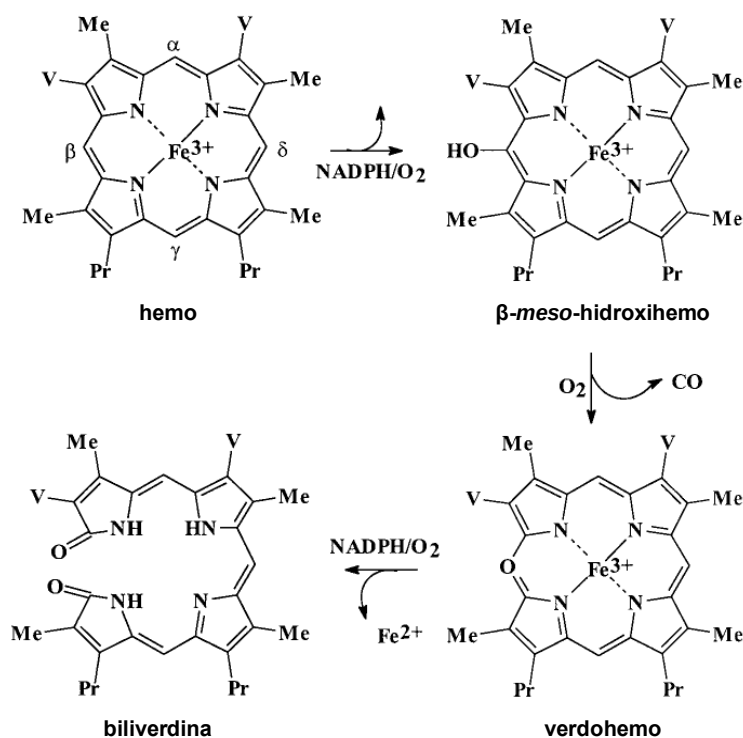


Figura I-13: Proceso químico de degradación de la molécula de hemo definida a partir de los estudios con hemo-oxigenasas de eucariotas y HmuO de *C. diphtheriae*. Me, grupo metilo; V, grupo Vinilo; Pr, grupo propiónico. Hasta la fecha, todas las hemo-oxigenasas caracterizadas rompen el anillo porfirínico en el átomo del carbono- α . La única excepción es la supuesta hemo-oxigenas PigA caracterizada en *P. aeruginosa*, que cortaría la molécula en el carbono- β .

Aunque el hemo es un cofactor esencial para muchos enzimas también posee una cierta toxicidad y las células deben protegerse de su exceso. Se ha visto como la expresión en *E. coli* del producto del gen *hemS* de *Y. enterocolitica* es capaz de proteger a la bacteria de esta hemo-toxicidad (Stojiljkovic y Hantke, 1994). Sin embargo, el homólogo en *Y. pestis* (*hmuS*) parece participar en la utilización de ciertas hemoproteínas como fuentes de hierro, aunque todavía se desconoce su papel concreto (Thompson *et al.*, 1999). Así proteínas similares a HemS podrían jugar dos papeles en el metabolismo bacteriano del hierro y del hemo: proteger frente a la hemo-toxicidad y participar en un proceso de almacenamiento de hierro (Stojiljkovic y Perkins-Balding, 2002). Recientemente, la proteína HutZ, asociada al sistema de captación y transporte de hemo caracterizado en *V. cholerae*, se ha propuesto como proteína de unión al hemo una vez finalizado su transporte a través de la envuelta celular, facilitando su almacenaje y previniendo así su toxicidad (Wyckoff *et al.*, 2004).

4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS SISTEMAS DE CAPTACIÓN DE HIERRO

El catión metálico Fe^{+2} es un oligoelemento esencial para el crecimiento de todos los organismos, participando como cofactor en muchos procesos enzimáticos o formando parte de estructuras anatómicas celulares. Sin embargo una elevada concentración de este elemento puede llegar a ser letal para las células, ya sea por inhibición de ciertos procesos metabólicos (como por ejemplo la respiración aeróbica) o por acumulación de radicales libres generados en los procesos de reducción de los que es partícipe (Fig. I-14). La producción de radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno se cataliza a través de las reacciones Fenton durante el metabolismo oxidativo de las células (Arroyo *et al.*, 1994; Halliwell y Gutteridge, 1984; Touati, 2000). Estos radicales de oxígeno y peróxidos provocan daños en lípidos (formación de uniones insaturadas, disminución de la fluidez de membrana y lisis celular), proteínas (reacción con los grupos tiol) y ácidos nucleicos (extracción de los átomos de hidrógeno del DNA y RNA, mutaciones y ruptura de los enlaces fosfodiéster). Por todo ello es fundamental que las células no sobrepasen la concentración intracelular a partir de la cual el catión metálico resulta tóxico.

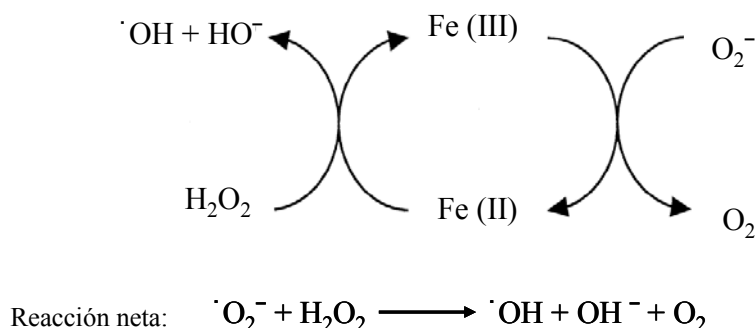


Figura I-14: Reacciones químicas en las que participa el hierro y que dan lugar a la formación de especies reactivas del oxígeno ($\cdot\text{O}_2$ y $\cdot\text{OH}$). El esquema completo se conoce como Ciclo de Haber-Weiss, mientras que la parte izquierda corresponde a la reacción Fenton.

En general las bacterias poseen mecanismos específicos dirigidos a la regulación y el control de las concentraciones de hierro intracelular: transporte de hierro mediante sistemas de alta afinidad desde el medio externo hasta el citoplasma bacteriano; almacenaje intracelular para mantener disponible una fuente de hierro que pueda ser utilizada cuando las fuentes externas sean limitadas; utilización de sistemas de resistencia al estrés oxidativo; control del consumo de hierro inhibiendo la expresión de proteínas cuando las condiciones sean

limitantes; y utilización de sistemas de regulación que coordinen la expresión de toda la maquinaria homeostática anterior, de acuerdo con la disponibilidad de hierro existente.

Obviamente todos estos procesos han de estar perfectamente coordinados, no sólo entre sí sino también con las condiciones del entorno, por lo que, además de las proteínas destinadas a realizar funciones concretas, existen sistemas reguladores que controlan su expresión génica en función de las necesidades celulares de cada momento. Teniendo en cuenta que no se han descrito bombas bacterianas de excreción para hierro inorgánico, la principal forma de control de los niveles intracelulares de este compuesto es la regulación de los mecanismos de importación a través de membrana.

4.1 Regulación Fe^{+2} -Fur

La mayor parte de los genes que codifican los sistemas de captación y transporte de hierro responden a su concentración intracelular por mediación del represor transcripcional Fur (*Ferric Uptake Regulator*). La proteína Fur en presencia de elevadas concentraciones de hierro tiene la capacidad de unirse a regiones concretas del DNA, denominadas *Fur-boxes*, incluidas dentro de las regiones promotoras o en sus proximidades y provocando la inhibición de la transcripción de los genes que están bajo su control. Hasta el momento los estudios bioquímicos más importantes acerca de esta proteína se han centrado en la proteína Fur descrita en *E. coli*. Dentro del genoma de este microorganismo (así como en otras muchas bacterias) se han encontrado más de 90 genes cuya expresión depende de los niveles de hierro y está controlada por Fur (Panina *et al.*, 2001). En general se trata de un homodímero compuesto por subunidades de 17 kDa y que actúa como inhibidor del proceso de transcripción, previa interacción con la molécula co-represora Fe^{+2} . En condiciones de ausencia de Fe^{+2} el sistema se revierte y la expresión génica queda desbloqueada (Fig. I-15).

De los estudios en *E. coli* también se demuestra que Fur posee dos sitios de unión a iones metálicos diferentes. En el primero de ellos, de unión al co-represor Fe^{+2} , la molécula de hemo también puede interaccionar, llegando incluso a desplazar al propio metal (Smith *et al.*, 1996). El segundo sitio de unión a cationes está implicado en la estructura de la proteína y su estabilidad. En este caso, el metal que se une con gran afinidad es el Zn^{+2} y a veces la presencia de este ión es suficiente para la unión de Fur con su operador (Althaus *et al.*, 1999). En el homólogo Fur descrito en *V. anguillarum* estos sitios de unión de Zn^{+2} se caracterizan,

además de por su función estructural, por ser indispensables para el mantenimiento de la capacidad de unión al DNA (Zheleznova *et al.*, 2000).

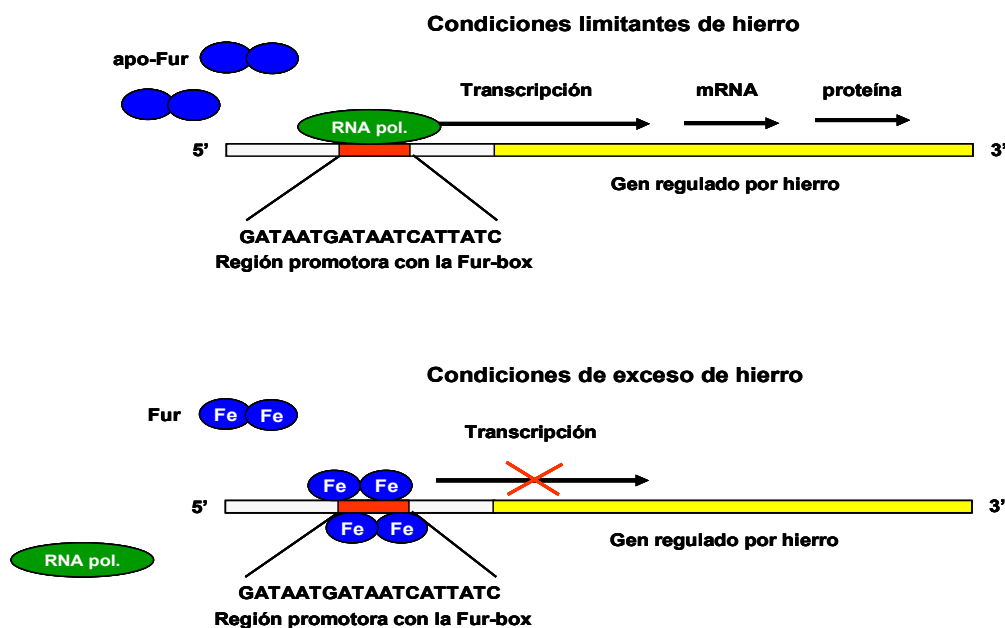


Figura I-15: Representación esquemática de la represión de la expresión génica mediada por la proteína Fur. En condiciones de un exceso de hierro en el medio el regulador transcripcional se une al DNA a través de la *Fur-box* localizada en la región promotora bloqueando la transcripción. Tanto en presencia como en ausencia de Fe²⁺, Fur es una metaloproteína dimérica que cambia su conformación en respuesta a la presencia de cationes divalentes. RNA pol., RNA polimerasa.

Respecto a la zona de unión de Fur a la doble hélice de DNA, normalmente el complejo Fe²⁺-Fur interacciona con una región específica del promotor (*Fur-box*) situada entre los sitios -10 y -35 (Fig. I-16). En un primer momento esta región se definió como una secuencia palindrómica de 19 pb: GATAATGAT(A/T)ATCATTATC (de Lorenzo *et al.*, 1987). Actualmente puede definirse como una combinación de tres repeticiones adyacentes del hexámero NAT(A/T)AT. La unión de tres o más repeticiones de esta secuencia permite la unión estable de la proteína, aunque la orientación de dichos hexámeros puede ser variable (Escolar *et al.*, 1999). Este tipo de secuencias permite una gran variabilidad en cuanto a las regiones promotoras reguladas, de modo que los cambios en éstas no siempre conllevan una desregulación del sistema. A menudo los sitios de unión consisten en dos o más *Fur-boxes* adyacentes o solapadas, planteando la posibilidad de una unión simultánea de varios dímeros de Fur. En realidad existen diversas interpretaciones del modelo de unión para poder explicar la fijación de los dímeros proteicos alrededor de la doble hélice de DNA.

El modelo clásico propone un reconocimiento de dos repeticiones palindrómicas de 9 pb como secuencia consenso, con una A:T entre ellas y la unión de un monómero de Fur por cada una de estas secuencias de repetición (Bagg y Neilands, 1987). Posteriormente se planteó un modelo en hexámeros en el que la secuencia consenso estaría compuesta por 3 unidades hexaméricas adyacentes (5'-GATAAT-3'). En este caso, se necesitaría un mínimo de tres hexámeros para establecer una interacción estable Fur-DNA, mientras que la presencia de unidades de repetición adicionales aumentaría la afinidad de Fur por esta región (Escolar *et al.*, 1998). Lavrrar *et al.* (Lavrrar *et al.*, 2002; Lavrrar y McIntosh, 2003) propusieron, recientemente, un nuevo modelo de interacción DNA-Fur en el que la secuencia consenso de 19 pb estaría definida por la unión de tres hexámeros adyacentes (configuración F-F-F), o bien por dos hexámeros, también adyacentes, junto con un tercero dispuesto en orientación contraria y separado de los primeros a través de una base nucleotídica (configuración F-F-x-R). En este modelo ("modelo de unión de dímeros solapados") la interacción DNA-proteína se establecería entre dos dímeros de Fur y un único sitio específico, de modo que dichos complejos proteicos quedan solapados y en caras opuestas de la doble hélice envolviendo, así, al dúplex de DNA. En algunos promotores se ha detectado la unión de más de dos de estos dímeros Fur llegando a abarcar una región de más de 100 pb (Escolar *et al.*, 2000). Finalmente existe un último de modelo, propuesto por Baichoo y Helmann (2002) que establece que la *Fur-box* está formada por dos repeticiones de 7 pb invertidas y solapadas. La suma de ambos heptámeros delimita una secuencia de 21 pb capaz de interaccionar con la proteína Fur (estructura (7-1-7)₂).

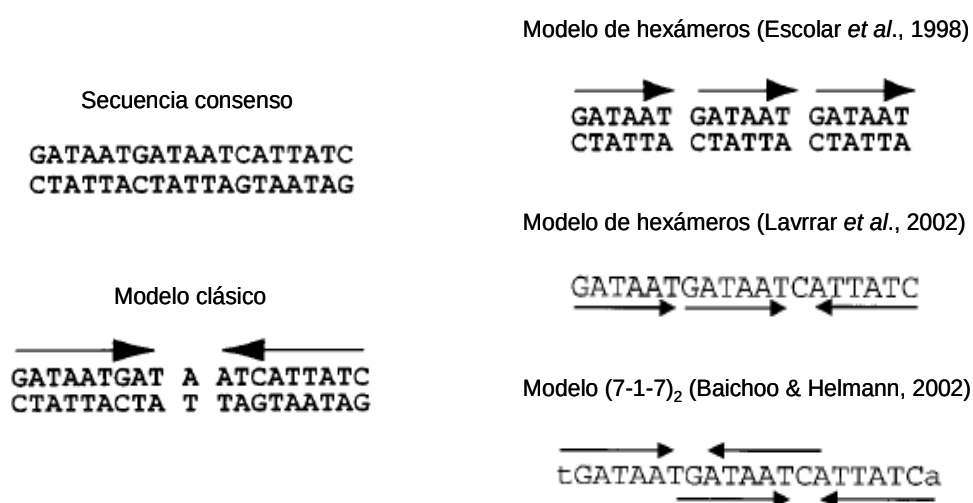


Figura I-16: Modelos de organización de la secuencia consenso de interacción con la proteína Fur (*Fur-box*).

En algunos casos la expresión del gen *fur* también se encuentra regulada por el propio producto de su transcripción utilizando el mismo mecanismo que el establecido para los demás genes sobre los que va a ejercer su acción reguladora (Haraszthy *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2002). Sin embargo en especies del género *Vibrio*, como *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. salmonicida* y *V. logei*, así como *P. damsela*, no se han encontrado *Fur-boxes* que apoyen este tipo de regulación (Colquhoun y Sorum, 2002; Juiz-Río *et al.*, 2004; Litwin *et al.*, 1992; Litwin y Calderwood, 1993). En *V. anguillarum* se ha comprobado como el gen *fur* no sólo no está autorregulado por su propio producto sino que, además, tiene una expresión constitutiva e independiente de las concentraciones de hierro presente en el medio (Tolmasky *et al.*, 1994).

La caracterización de genes que se encuentran bajo el control negativo de este regulador ha puesto de manifiesto la implicación de Fur no sólo en el transporte, reducción e incorporación del hierro a la célula, sino también en otros procesos, alguno de los cuales no están directamente involucrados en el metabolismo de este metal (Serkin y Seifert, 2000). Además de la represión clásica mediada por esta proteína, recientes estudios en *V. cholerae* han puesto de manifiesto la existencia de otros patrones de regulación, como son la inducción de la expresión génica en presencia de hierro y Fur, la regulación dependiente de los niveles de hierro e independiente de Fur y la regulación mediada por este último pero independiente de la concentración de hierro en la célula (Mey *et al.*, 2005).

Cada vez son más los genes descritos cuya expresión está directamente inducida por la presencia de Fur (Dubrac y Touati, 2000; Ernst *et al.*, 2005; Grifantini *et al.*, 2003). El ejemplo más claro de esta función activadora de Fur es el gen de la ferritina (*pfr*) de *H. pylori*. En esta bacteria la capacidad de unión de la proteína Fur a su correspondiente *Fur-box* depende directamente de la concentración de Fe^{+2} . En condiciones de ausencia de hierro Fur permanece unida al promotor del gen, bloqueando el acceso de la RNA polimerasa e inhibiendo el proceso de transcripción. Al aumentar los niveles del catión divalente la afinidad de la proteína por el DNA disminuye, momento en el que Fur se libera de la zona de unión induciendo la expresión génica (Delany *et al.*, 2001). Sin embargo, en la mayoría de estos casos, dentro de esta regulación positiva dependiente de Fur también participa una pequeña molécula de RNA, denominada RhyB (Massé y Gottesman, 2002). Así, en *E. coli* se ha comprobado como Fur regula negativamente la expresión de este RNA, el cual, a su vez, bloquea a nivel postranscripcional la expresión de genes como, por ejemplo, *sodB*, *ftn* y *bfr* (ferritina y bacterioferritina) entre otros. El resultado final de todo el proceso de regulación es

una activación de la transcripción de estos genes en condiciones de exceso de hierro. En este sentido, mientras la limitación de hierro provoca un incremento en la síntesis de proteínas relacionadas con la adquisición de hierro, su exceso estimula, por otro lado, la producción de proteínas de almacenaje como la ferritina o bacterioferritina (Massé y Gottesman, 2002).

Probablemente el control exclusivo de los sistemas relacionados con el transporte y utilización de hierro a través de Fur sea un derroche energético de recursos ya que es improbable que los microorganismos invasivos y colonizadores encuentren todas las posibles fuentes de hierro en un único micro-hábitat. Por esta razón las bacterias han desarrollado mecanismos de regulación adicionales que interactúan de manera coordinada con Fur para responder, rápida y específicamente, a la presencia de moléculas concretas que puedan ser utilizadas como fuentes de hierro.

4.2 Reguladores LysR

En organismos procariotas las proteínas de tipo LysR (LTTRs) constituyen la familia más importante de factores de regulación transcripcional, estando ampliamente representados en bacterias, Archaea y cloroplastos de algas (Pérez-Rueda *et al.*, 2004; Schell, 1993). Los reguladores LTTRs controlan la expresión de genes implicados en una gran variedad de procesos celulares, como la biosíntesis de aminoácidos, fijación de CO₂, transporte de iones, resistencia a antibióticos, inicio de nodulación, replicación del cromosoma y síntesis de factores de virulencia. La mayoría de las proteínas asociadas a esta familia ejercen su función como activadores transcripcionales en presencia de una molécula que actúa como coinductor, regulando la expresión de genes adyacentes y dispuestos en orientación contraria al propio regulador, siguiendo la estructura típica de promotores divergentes (Schell, 1993). Sin embargo también se han descrito casos en los que la función reguladora puede ejercerse sobre genes dispuestos en zonas más alejadas del genoma (Klauck *et al.*, 1997; Sperandio *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2003).

Las distintas subfamilias de LTTRs incluyen proteínas de tamaños entre 270 y 330 aminoácidos, con zonas concretas de similitud a lo largo de unos 280 residuos. Así, gracias al análisis de mutantes y la comparación de secuencias de proteínas, se han podido identificar tres regiones características (Schell, 1993): (i) Región hélice-giro-hélice cerca del extremo N-terminal (residuos 1-65) e implicado en la unión al DNA; (ii) domino asociado al reconocimiento y/o respuesta del coinductor (residuos 100-173 y 196-206); (iii) dominio

implicado tanto en la unión al DNA como en la respuesta del coinductor (aminoácidos 227-253). El dominio N-terminal, además de ser el más conservado a lo largo de toda la familia, es el más importante a nivel funcional. La mayoría de los LTTRs se unen al DNA como dímeros o tetrámeros y durante estas interacciones ocupan secuencias entre 40 y 60 pb.

Otra característica común a muchos miembros de esta familia proteica es su necesidad de la presencia de una molécula pequeña coinductora durante el proceso de activación transcripcional. El proceso de unión-cofactor/respuesta se asocia al dominio C-terminal en el que se han identificado subregiones fundamentales para dicha función (Schell, 1993). Diversos estudios sugieren que la interacción con el cofactor conlleva un cambio conformacional en el regulador LysR. Estos cambios inducidos por el conjunto regulador/coinductor provocarían una alteración en la topología o en la estequiometría de la unión al DNA con el fin de asegurar el contacto adecuado con la RNA polimerasa y, por tanto, el incremento en los niveles de expresión génica (Akakura y Winans, 2002a, 2002b).

En lo referente al gen regulado, normalmente, los miembros de esta familia reconocen y se unen a dos áreas próximas y diferentes situadas dentro de la región promotora. A menudo la primera de esas secuencias, conocida como “secuencia de reconocimiento”, se localiza aproximadamente en la posición -65. Esta región, parcialmente palindrómica, suele estar compuesta por unos 15 nucleótidos con la estructura T-N₁₁-A y actuaría como anclaje o guía para la unión de la proteína a la doble hélice del DNA. Los nucleótidos adyacentes (variables en cuanto a posición y secuencia) conferirían una cierta especificidad a este reconocimiento. La segunda región del promotor reconocida por el regulador, corresponde a la denominada “secuencia de activación” y se localiza próxima al sitio de unión -35 de la RNA polimerasa (Fig. I-17). Esta región, aunque diferente a la “secuencia de reconocimiento”, también es palindrómica y a menudo es necesaria la presencia de la molécula coinductora para que pueda tener lugar la interacción DNA-Regulador (Schell, 1993). Tanto en los genes de virulencia *irgA* y *irgB* de *V. cholerae* (Watnick *et al.*, 1998) como en el gen que codifica el receptor de membrana externa para grupos hemo de *V. vulnificus* (Litwin y Quackenbush, 2001) se han caracterizado reguladores transcripcionales positivos relacionados con esta familia de proteínas LysR y que actúan conjuntamente con Fur para el control transcripcional de los genes específicos sobre los que ejercen su regulación.

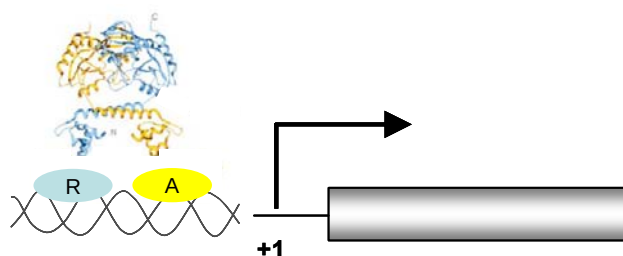


Figura I-17: Esquema de la interacción del regulador transcripcional LysR con la doble hebra del DNA. La proteína interacciona con la zona de reconocimiento (R) y la zona de activación (A), ambas situadas entre las regiones -65 y -35 del promotor regulado y cuyo resultado es un incremento en los niveles de transcripción del gen.

4.3 Factores Sigma (σ) ECF

Los factores sigma son pequeños polipéptidos que durante el proceso de transcripción incrementan la especificidad de la RNA polimerasa por las secuencias promotoras. Estas proteínas se encuentran en un amplio espectro de bacterias y controlan multitud de funciones, como pueden ser la respuesta al choque térmico, al estrés oxidativo y osmótico, virulencia, movilidad y transporte de iones metálicos. Dentro de los factores sigma, el grupo específico de factores σ ECF (*extracytoplasmatic function*) se caracteriza por requerir de la presencia de moléculas extracelulares específicas para que sus respectivas actividades biológicas puedan ser inducidas.

En algunos casos la expresión de este tipo de factores de regulación está controlada directamente por la proteína Fur y, en consecuencia, controlada indirectamente por las concentraciones locales de hierro. Actualmente están descritos diversos factores σ ECF que cumplen esta dependencia de Fur, así como los genes sobre los que ejercen su control. En muchos casos controlan sistemas de captación de hierro mediados por sideróforos, bien regulando su síntesis o controlando la expresión de sus receptores de membrana externa, siendo el género *Pseudomonas* un buen ejemplo de la gran variedad de factores ECF de este tipo: PupI de *P. putida* (Koster *et al.*, 1994), PbrA de *P. fluorescens* (Sexton *et al.*, 1996), PbsS de *Pseudomonas* B10 (Leoni *et al.*, 2002) y FiuI y PigD de *P. aeruginosa* (Ochsner y Vasil, 1996), entre otros. Concretamente, en *P. aeruginosa*, los genes de síntesis de pioverdina están regulados a través del factor sigma PvdS, a su vez controlado por Fur, constituyendo un claro ejemplo de modelo de regulación de síntesis de sideróforos a través de estos reguladores σ ECF (Leoni *et al.*, 2000; Visca *et al.*, 2002). En este modelo, cuando las concentraciones de hierro intracelular son bajas, desaparece la represión ejercida por Fur

sobre el gen que codifica el factor de regulación PvdS. Éste va a actuar directamente sobre los genes *pvc* implicados en la síntesis de pioverdina, uniéndose a la región promotora de estos genes biosintéticos e induciendo su expresión. Aunque parece claro que estos factores de regulación tienen un papel importante en dirigir la expresión de los genes de síntesis de pioverdina/pseudobactina, no hay que descartar la participación, en otras especies bacterianas, de factores diferentes que también modulen la expresión génica en la síntesis de sideróforos.

En muchos casos se establecen cascadas de transducción de señales, iniciadas en la membrana externa, que tienen como objetivo la activación del factor sigma localizado en el citoplasma celular. Así el factor σ ECF, RhuI, implicado en la regulación del sistema de utilización de hemo y hemoproteínas en *Bordetella avium*, se activa a través de una cascada de señales que comienza con la unión de moléculas de hemo extracelular al receptor de membrana externa BhuR. Esta unión provoca la transducción de la señal a través del periplasma hacia la proteína RhuR y de aquí, a través de la membrana citoplasmática, hasta llegar al factor sigma RhuI ubicado en el citoplasma bacteriano. Este último, bien directa o indirectamente, acompaña a la RNA polimerasa hasta el promotor del gen *bhuR* induciendo su transcripción y, por consiguiente, la transcripción de los demás genes asociados al transporte del grupo hemo (Kirby *et al.*, 2001; Kirby *et al.*, 2004). En este modelo de regulación, la característica principal es la doble función del receptor de membrana externa, necesario tanto para el transporte como para la inducción de los genes del sistema. Además es un sistema homólogo al descrito en *E. coli* K-12 para el transporte del complejo Fe^{3+} -citrato a través del receptor FecA y en el que el factor sigma FecI dirige la expresión del operón de transporte del citrato férrico *fecABCDE* (Kim *et al.*, 1997).

4.4 Mecanismos de control de la expresión génica a través de la acción conjunta de factores activadores y represores de la transcripción

La expresión de muchos genes relacionados con la captación de hierro se regula a nivel transcripcional a través de los niveles de hierro y de la proteína Fur. Normalmente este tipo de regulación es suficiente para el mantenimiento de un control adecuado en la expresión de un gen específico. Sin embargo en otros casos estos sistemas génicos pueden requerir un nivel de regulación adicional. Actualmente existen muchos ejemplos de factores de regulación, tanto positivos como negativos, que actúan de manera coordinada para el control de la entrada de hierro y su almacenaje. El número de factores de regulación que pueden

participar en estos sistemas de control transcripcional varía según la naturaleza de la molécula reguladora o la importancia de los genes regulados. En función de esto los sistemas de regulación pueden ser relativamente sencillos, o bien mucho más complejos. De este modo la expresión del gen de virulencia *irgA* codificado en el cromosoma de *V. cholerae*, así como del receptor de membrana externa para grupos hemo *hupR*, descrito en *V. vulnificus*, está controlada a nivel transcripcional por la acción conjunta de un regulador positivo perteneciente a la familia LysR, y el regulador negativo Fur (Litwin y Quackenbush, 2001; Watnick *et al.*, 1998). La intervención de ambos reguladores parece ser suficiente para dirigir los niveles de expresión de los genes que están bajo su control según las necesidades celulares de hierro de cada momento.

Por el contrario en aquellos casos en los que la acción reguladora se ejerce sobre un sistema génico formado por operones o genes relacionados a nivel de función, se han descrito mecanismos que requieren más de un factor, tanto para su activación como para su represión. En *V. anguillarum* se ha demostrado la existencia de tres moléculas reguladoras que actúan conjuntamente con la proteína Fur para el control del sistema de biosíntesis del sideróforo anguibactina y del sistema de transporte del complejo Fe-anguibactina. Por un lado existen dos reguladores positivos que participan en la activación de la transcripción de los genes de biosíntesis y que se denominan AngR (*anguibactin system regulator*) y TAF (*trans-acting factor*). El primero de ellos se caracteriza por dos regiones hélice-giro-hélice típicas de las proteínas de unión a DNA en procariotas así como por la presencia de secuencias características de péptido-sintetasas no ribosómicas, lo que lleva a pensar que la proteína AngR sea bifuncional y que esté implicada tanto en la biosíntesis de anguibactina como en la función reguladora mencionada anteriormente (Farrell *et al.*, 1990; Wertheimer *et al.*, 1999). La zona descrita como región TAF está poco estudiada aunque se supone que, en condiciones limitantes de hierro, su producto activaría la expresión del gen *angR* y es la actividad conjunta de ambos la que permite que se alcance la máxima expresión del sistema de síntesis y transporte del sideróforo (Crosa, 1997). Existe un tercer regulador, el RNA α antisentido codificado en el plásmido de virulencia pJM1 y que, junto con la proteína Fur, regula negativamente la expresión del sistema. Este RNA α constituye un sistema de control de la expresión génica postranscripcional seguramente mediante su interacción con el RNA mensajero policistrónico *fatDCBA*. La propia proteína Fur es esencial para la expresión del RNA α , independientemente del nivel de hierro intracelular (Chen y Crosa, 1996).

También se ha descrito el efecto de moléculas extracelulares, como el hemo o hemoproteínas, sobre la expresión de sus propios receptores de membrana o sistemas de transporte. En *Porphyromonas gingivalis* y *Corynebacterium diphtheriae* se han descrito genes cuya transcripción está directamente relacionada con los niveles de hemo extracelular aunque hasta el momento no se ha podido definir el mecanismo exacto de actuación (Bibb *et al.*, 2005; Karunakaran *et al.*, 1997; Olczak *et al.*, 2005). Sin embargo, en otros casos como el sistema de captación y utilización de hemo caracterizado en *Bordetella avium*, se ha comprobado cómo el efecto de activación de la molécula de hemo se establece a través de cascadas de regulación en las que participan factores sigma ECF. La interacción del grupo hemo con su correspondiente receptor de membrana externa desencadena un proceso de transducción de señales que finaliza con la activación de la región promotora específica localizada en el citoplasma bacteriano (King *et al.*, 2005; Kirby *et al.*, 2004).

5. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA CAPTACIÓN DE HEMO EN *V. anguillarum*

Debido a la abundancia del grupo hemo en la naturaleza y su importancia como fuente de hierro, cada vez son más los estudios dirigidos a la caracterización de los sistemas bacterianos implicados en su adquisición (Genco y Dixon, 2001). Son especialmente importantes los trabajos llevados a cabo en *V. cholerae* y la caracterización de un sistema de captación y transporte de hemo compuesto por hasta tres receptores de membrana externa diferentes asociados a su correspondiente sistema TonB-ExbB-ExbD de transducción de energía, una proteína de transporte periplásmico y un sistema de transporte ABC localizado en la membrana interna de la bacteria y que facilita el transporte de la molécula desde el espacio periplásmico hasta el interior celular (Henderson y Payne, 1993; Mey y Payne, 2001; Occhino *et al.*, 1998). Sin embargo esta capacidad de utilizar compuestos de hemo como fuentes de hierro parece ser una característica común a especies patógenas del género *Vibrio* (O'Malley *et al.*, 1999). La identificación en un primer momento de receptores homólogos al receptor de membrana externa HutA de *V. cholerae* (Litwin y Byrne, 1998; O'Malley *et al.*, 1999) y la posterior conclusión de los proyectos genoma de especies como *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.*, 2003), *V. vulnificus* (Chen *et al.*, 2003) o *V. fischeri* (Ruby *et al.*, 2005) han puesto de manifiesto la existencia de sistemas génicos similares al descrito anteriormente.

Pese a la importancia que tiene *V. anguillarum* como patógeno de peces se sabe relativamente poco acerca de los mecanismos por los que esta bacteria es capaz de captar hierro del hospedador y así poder incorporarlo a su metabolismo. Hasta el momento tan sólo se ha estudiado en profundidad el sistema génico que codifica la obtención de hierro mediante el sideróforo anguibactina en la cepa 775 del serotipo O1 (Crosa y Walsh, 2002; Di Lorenzo *et al.*, 2003). Este sistema, relacionado directamente con la virulencia de la cepa (Stork *et al.*, 2002; Wolf y Crosa, 1986), está considerado como el mecanismo principal de obtención de hierro a partir de la transferrina del hospedador (Mazoy y Lemos, 1991). Sin embargo, estudios previos al presente trabajo, también pusieron de manifiesto la capacidad de *V. anguillarum* de utilizar otras fuentes de hierro, como la hemoglobina o diversas hemoproteínas, a partir de mecanismos independientes de los sideróforos.

La primera evidencia de la capacidad de este microorganismo de utilizar compuestos de hemo como fuentes de hierro viene dada por el trabajo de Mazoy y Lemos en 1991. Estos autores plantearon la necesidad que tienen aquellas cepas deficientes en la síntesis de sideróforos de utilizar fuentes de hierro alternativas a la transferrina para poder crecer en el suero del animal hospedador. El resultado fue la confirmación del crecimiento de estas cepas en presencia de hemina, hemoglobina y haptoglobina-hemoglobina como únicas fuentes de hierro disponibles para *V. anguillarum*. Se propuso entonces la existencia de, al menos, dos sistemas diferentes implicados en la obtención de hierro, uno basado en la síntesis de sideróforos y que facilita la obtención de este compuesto a partir de la transferrina y un mecanismo independiente asociado a la captura y utilización del grupo hemo como fuente de hierro.

Posteriormente esta idea se vio reforzada con la detección, en la cepa H775-3 (cepa deficiente en la síntesis de sideróforos), de proteínas de membrana capaces de unir hemina y hemoglobina. Dentro de las bandas detectadas, dos de ellas (de 79 y 76 kDa respectivamente) estaban reguladas por hierro, de manera que su expresión sólo se veía inducida en condiciones de escasez de este metal. El resto de las proteínas eran capaces de unir ambos compuestos de hemo independientemente de los niveles de hierro en el medio de cultivo. Asimismo el análisis de la unión de hemoglobina a la superficie de células inmovilizadas permitió comprobar como la hemina era capaz de inhibir competitivamente dicha unión, sugiriendo por primera vez que el ligando del posible receptor de superficie era la molécula de hemo y no el esqueleto proteico que la rodea (Mazoy y Lemos, 1996; Mazoy *et al.*, 1996).

Finalmente, para tratar de caracterizar los componentes genéticos de este sistema de utilización de hemo, Mazoy *et al.* (2003) diseñaron una genoteca de la cepa H775-3 de *V. anguillarum* en el cósmido pVK100. De los plásmidos resultantes, uno de ellos, denominado pML1, incluía un fragmento de 21,5 kb producto de la digestión parcial del DNA genómico anterior con el enzima de restricción *HindIII*. Lo más destacable de este plásmido fue su capacidad para complementar la cepa de *E. coli* 101ESD, deficiente en la síntesis de enterobactina e incapaz de transportar el grupo hemo, confiriéndole la capacidad de utilizar el hemo como única fuente de hierro. De la secuenciación parcial del inserto clonado en pML1 se dedujo una ORF, denominada *huvA*, que codifica una proteína de 79 kDa y que posee homología a receptores de membrana externa previamente descritos en especies como *V. cholerae* (Henderson y Payne, 1994b) o *V. vulnificus* (Litwin y Byrne, 1998). La principal característica de estas proteínas homólogas es su relación directa con el transporte específico de hemo, de manera que la caracterización en *V. anguillarum* de la proteína HuvA confirma la existencia de un sistema asociado a la captación de hemo y, posiblemente, muy similar al descrito en estas otras especies.

Respecto a la relación que existe entre la captación de hemo y la virulencia, ésta está muy bien documentada en casos como *V. cholerae* (Henderson y Payne, 1994a), *Neisseria meningitidis* (Stojiljkovic *et al.*, 1995), *Haemophilus ducreyi* (Stevens *et al.*, 1996) o *Streptococcus pneumoniae* (Tai *et al.*, 1993), aunque en otras especies dicha correlación no parece tan clara (do Vale *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 1999). Mientras que el sistema de síntesis de sideróforos caracterizado en *V. anguillarum* es determinante para la virulencia de las cepas patógenas, Mazoy *et al.* (2003) observaron que, en peces tratados previamente con hemina, la mutación del gen *huvA* podía relacionarse con una reducción en la virulencia de la cepa. Según estos autores, en algún punto del proceso de infección se induce la expresión y secreción de factores de virulencia como hemolisinas o citotoxinas, las cuales aumentan la disponibilidad de grupos hemo en el medio circundante. La posesión de un sistema eficaz de captación de esta molécula como fuente de hierro podría representar una clara ventaja durante la colonización de los tejidos del hospedador.

En el presente trabajo nos hemos propuesto, por tanto, caracterizar en profundidad el sistema de transporte de hemo en el patógeno de peces *V. anguillarum*.

II. OBJETIVOS

Según lo expuesto en la Introducción, es evidente que se necesita alcanzar un mayor conocimiento de las bases genéticas del sistema relacionado con la captación y transporte de la molécula de hemo en *Vibrio anguillarum*. Por tanto en el presente estudio nos hemos marcado los siguientes objetivos:

1.- Caracterizar el sistema de captación de hemo en *V. anguillarum*:

- a) Identificar los determinantes genéticos del transporte y utilización de los grupos hemo en *V. anguillarum*.
- b) Comparar la organización genética del sistema de *V. anguillarum* con sistemas homólogos descritos en otras especies de *Vibrio*.
- c) Llevar a cabo el análisis funcional de los genes implicados en el transporte de hemo como fuente de hierro y porfirinas.

2.- Estudiar la regulación de la expresión de los genes de captación de hemo.

3.- Caracterizar el complejo TonB-ExbB-ExbD asociado al sistema de captación de hemo:

- a) Identificar y analizar la funcionalidad de los posibles sistemas TonB presentes en *V. anguillarum* y su relación con los principales mecanismos de captación de hierro.
- b) Evaluar la relación de estos sistemas genéticos con la virulencia de *V. anguillarum* en peces.

4.- Analizar la diversidad intraespecífica de los genes de captación de hemo en *V. anguillarum* y evaluar su posible aplicación como sistema de identificación específica para *V. anguillarum*.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS, CULTIVO Y CONSERVACIÓN

Todas las cepas y especies bacterianas utilizadas en el presente trabajo se muestran en el Anexo I.

1.1 Medios de cultivo

Todas las cepas utilizadas en este estudio se almacenaron a -80 °C en medio LB conteniendo un 20% de glicerol.

» **Cultivo de *V. anguillarum*** (Temperatura óptima de incubación 25 °C):

- TSA-1 (Pronadisa): Peptona de soja 5 g/l; Peptona de caseína 15 g/l; NaCl 10g/l; Agar 15 g/l.
- TSC-1 (Pronadisa): Peptona de soja 3 g/l; D(+)-Glucosa 5 g/l; Peptona de caseína 17 g/l; K₂HPO₄ 2,5 g/l; NaCl 10 g/l.
- CM9 (Miller, 1972): Sales M9 (Na₂PO₄H 6 g/l; KPO₄H₂ 3 g/l; NaCl 5 g/l; NH₄Cl 10 mg/l); Glucosa 0,25%; Casaminoácidos 0,2%; CaCl₂ 0,01 mM; MgSO₄ 0,1 mM.

» **Cultivo de *E. coli*** (Temperatura óptima de incubación 37 °C):

- LB (Pronadisa): Triptona 10 g/l; Extracto de Levadura 5 g/l; NaCl 5 g/l.
- LBA (Pronadisa): Triptona 10 g/l; Extracto de Levadura 5 g/l; NaCl 5 g/l; Agar 15 g/l.
- NB (Difco): Extracto de carne 3 g/l; Peptona 5 g/l.

» **Detección de producción de sideróforos en medio Cromo-Azurol S (CAS)** (Schwyn y Neilands, 1987):

Para la preparación de un volumen de 500 ml de este medio se prepararon previamente las siguientes disoluciones:

Disolución I: 50 ml de sales M9 10x en MOPS; pH 6,8 ajustado con NaOH 5 N; 7,5 g de agar; 400 ml de agua destilada.

Disolución II: 25 ml de Cromo-Azurol S (Sigma) a 1,2 mg/ml; 5 ml de HDMTA 7,2 mg/ml; 500 µl de FeCl₃ 10 mM preparado en 10 mM HCl; 2 ml H₂O destilada.

Ambas disoluciones se mezclaron tras ser previamente esterilizadas. Finalmente, la mezcla resultante se completó con 500 µl de CaCl₂ 0,1 M, otros 500 µl de MgSO₄ 0,1 M, 10 ml Glucosa al 25% y 10 ml de casaminoácidos al 10%.

1.2 Suplementos

La preparación de todas las disoluciones acuosas utilizadas en este trabajo se llevó a cabo utilizando agua ultrapura milli-Q (Millipore).

» **Antibióticos:** Las concentraciones finales de los diferentes antibióticos utilizados en este trabajo fueron: Tetraciclina (Tet) 15 µg/ml (disolución stock 15 mg/ml en agua); Kanamicina (Kan) 50 µg/ml (disolución stock 50 mg/ml en agua); Ampicilina (Amp) 50 µg/ml (disolución stock 50 mg/ml en agua); Gentamicina (Gm) 10 µg/ml (disolución stock 10 mg/ml en agua); Rifampicina (Rif) 50 µg/ml (disolución stock 25 mg/ml en DMSO); Cloranfenicol (Cm) 20 µg/ml (disolución stock 20 mg/ml en etanol). Los antibióticos se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros de 0,2 µm y se guardaron a -20 °C.

Para el crecimiento rutinario de la cepa de *E. coli* EB53 (*aroB hemA*) los medios de cultivo se suplementaron con ácido δ-aminolevulínico (ALA) a una concentración final de 2 µg/ml. La disolución stock (concentración 2 mg/ml en agua) se esterilizó mediante filtración utilizando filtros de 0,2 µm y se almacenó a -20 °C.

» **Fuentes de hierro:** Las correspondientes disoluciones stock de Hemina bovina (Sigma) o Protoporfirina IX (Sigma) se prepararon en agua a una concentración final 5 mM con NaOH 10 mM. La Hemoglobina bovina (Sigma) se disolvió a una concentración de 0,1 mM en agua. Todas las disoluciones stock se esterilizaron por filtración (filtros de 0,2 µm) y se almacenaron a -20 °C.

» **Ensayos de disponibilidad de hierro:** la ausencia de hierro libre en el medio se consiguió añadiendo los quelantes 2,2'-dipiridil (disolución stock 10 mM) y ácido etilendiamino-di-(o-hidroxifenilacético) (EDDA) (disolución stock 138 mM). Para preparar la disolución stock de este último, se disolvió 1 g del producto en 20 ml de una disolución acuosa de NaOH 1 N. El pH se ajustó a 9,0 con HCl 6 N. En ambos casos las disoluciones se almacenaron a 4 °C y en oscuridad.

Las condiciones de exceso de hierro se obtuvieron suplementando el medio con Citrato férrico amónico (FAC) a una concentración de 4 µg/ml o bien Fe₂(SO₄)₃ a 40 µM.

2. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1 DNA plasmídico

2.1.1 Purificación a pequeña escala

Para la purificación de plásmidos, así como para la purificación de fragmentos de DNA producto de la digestión con enzimas de restricción tras su separación en geles de agarosa, se utilizaron los sistemas *QIAprep Spin Miniprep kit* y *QIAquick Gel extraction kit* (Qiagen) respectivamente, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.1.2 Purificación a gran escala (Sambrook y Rusell, 2001)

Se partió de un volumen de 500 ml de un cultivo puro de la cepa de *E. coli* correspondiente incubada a 37 °C entre 12 y 16 h. Las células se recogieron por centrifugación (4.000 rpm/15 min a 4 °C) y se resuspendieron en 100 ml de tampón TES (Tris-HCl 10 mM en agua, pH 8,0; NaCl 0,1 M; EDTA 1 mM). Tras una nueva centrifugación el sedimento se resuspendió en 18 ml de disolución I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; Glucosa 50 mM; EDTA 10 mM). A continuación las células se rompieron añadiendo 40 ml de disolución II (NaOH 0,2 N; SDS 1% en agua). La mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente y se añadieron 20 ml de disolución III (60% de acetato potásico 5 M en agua; 11,5% de ácido acético glacial; 28,5% de agua v/v). Tras incubar 10 min en hielo y centrifugar a 4.000 rpm/15 min (4 °C) el sobrenadante se filtró a través de una gasa estéril y los ácidos nucleicos (DNA plasmídico y RNA) se precipitaron con 0,6 volúmenes de isopropanol. Éstos se recuperaron centrifugando 15 min a 5.000 rpm y se lavaron con etanol al 70%, previamente enfriado a -20 °C. El precipitado se disolvió en 5 ml de TE (Tris-HCl 10 mM en agua, pH 8,0; EDTA 1 mM) y el RNA de alto peso molecular se eliminó añadiendo 3 ml de LiCl 5 M y centrifugando a 10.000 rpm/10 min (4 °C). Nuevamente y para precipitar el resto de ácidos nucleicos, el sobrenadante obtenido se mezcló con 1 vol de isopropanol y se centrifugó a 10.000 rpm/10 min a temperatura ambiente. Por último, el precipitado se disolvió en 0,7 ml de TE con RNasa (20 µg/ml) y, tras una incubación a 37 °C/30 min, se añadieron 0,7 ml de NaCl 1,6 M con polietilenglicol al 13%. De este modo se precipitó el DNA plasmídico que se recuperó centrifugando a 13.000 rpm/5 min (4 °C). Los restos de proteínas se eliminaron

mediante extracción fenólica tratando con 1 vol de fenol, 1 vol de fenol:cloroformo (1:1) y, finalmente, con 1 vol de cloroformo. El DNA se precipitó con 0,1 vol de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2 vol de etanol. El DNA plasmídico se resuspendió en un volumen adecuado de tampón TE y se almacenó a -20 °C.

2.2 DNA cromosómico

Según el protocolo descrito por Meade *et al.* (1982), a partir de un cultivo puro de 10 ml en medio mínimo CM9, se recogieron las células por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min. El precipitado se resuspendió en 5 ml de TE + 0,5 ml de una disolución de lisozima (2 mg/ml en TE pH 8,0) y se incubó a 37 °C/15 min. Se añadieron 0,6 ml de sarkosil-proteinasa K (sarkosil 10% + 300 µg de proteinasa K en agua destilada) y nuevamente se incubó a 37 °C/1 h. A continuación se trató dos veces con 5 ml de fenol y una con 5 ml de cloroformo, separando las fases fenol/agua mediante centrifugación a 10.000 rpm/15 min. El DNA se recuperó precipitándolo con 0,1 vol de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1 vol de isopropanol. Tras disolver el DNA en 1 ml de agua destilada, se llevó a cabo una nueva precipitación con 0,1 vol de acetato sódico y 2 vol de etanol a -20 °C. Finalmente el DNA se recuperó por centrifugación a 10.000 rpm/20 min y se resuspendió en TE. Las muestras se guardaron a 4 °C.

En determinados casos el DNA genómico se purificó con el sistema *InstaGeneTMMatrix* (Biorad), siguiendo las recomendaciones del fabricante y guardando las muestras a -20 °C.

2.3 RNA

La purificación de RNA se realizó siempre a partir de células de *V. anguillarum*. Partiendo de un cultivo puro en medio líquido CM9, se utilizaron 500 µl para inocular 25 ml de nuevo medio mínimo CM9 que se incubó a 25 °C hasta que el cultivo alcanzó la densidad óptica (600 nm) correspondiente a la fase exponencial de crecimiento (0,4-0,6) (Fig. III-1).

Las células se recuperaron por centrifugación a 5.000 rpm/15 min (4 °C) y se homogenizaron en 1 ml de RNAwiz (*RNA isolation Reagent RNAwizTM*, Ambion). El homogenizado se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para disociar las proteínas de

los ácidos nucleicos. A continuación se añadieron 0,2 ml de cloroformo y se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm/15 min (4 °C). Se separaron 3 fases, siendo la fase acuosa superior la correspondiente al RNA. Ésta se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 0,5 ml de agua libre de RNasas (Promega) y 1 ml de isopropanol, incubando la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. El RNA total precipitado se recuperó por centrifugación a 10.000 rpm/15 min (4 °C) y se resuspendió en agua libre de RNasas. Las muestras se guardaron a -80 °C.

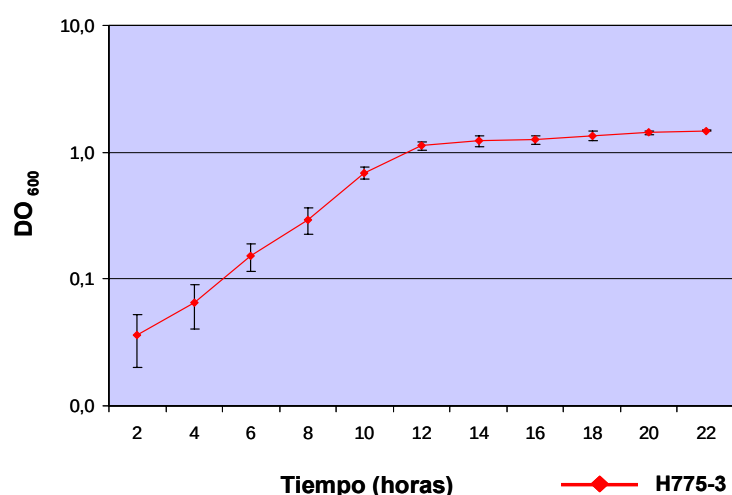


Figura III-1: Curva de crecimiento de la cepa H775-3 de *V. anguillarum* en medio mínimo CM9 para la determinación de su fase exponencial de crecimiento. Los valores obtenidos resultan de la media de tres experimentos independientes.

2.4 Purificación de DNA a partir de cultivos bacterianos puros y mixtos

En la detección de *V. anguillarum* mediante PCR, los límites de detección establecidos en el presente trabajo se evaluaron a partir de suspensiones bacterianas de la cepa 775. La suspensión inicial, en solución salina (NaCl 0,85%), se ajustó a 10^9 células/ml según la escala McFarland (Nº 4) y, seguidamente, se prepararon diluciones seriadas desde 10^8 hasta 10 células/ml. El DNA utilizado en las reacciones de amplificación se extrajo a partir de 1 ml de cada una de estas diluciones. Tras centrifugar a 12.000 xg durante 2 min, la células se resuspendieron en 200 µl de *InstaGeneTMMatrix* (Biorad) y el DNA se purificó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para el análisis de la eficacia de la amplificación a partir de cultivos mixtos, las muestras anteriores con 1 ml de las diluciones de *V. anguillarum* se mezclaron, previamente a la extracción del DNA, con 10 µl de suspensiones celulares preparadas a partir de distintas especies bacterianas y ajustadas, aproximadamente, a una concentración de 10^9 células/ml.

La concentración de todas las suspensiones se confirmó mediante la siembra de 0,1 ml de las diluciones en placas de medio TSA-1 y recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) tras 24 h de incubación a 25 °C.

3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Salvo excepciones, todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en presencia de 1 U del enzima *Taq* polimerasa (*BioTaq*, Bioline), tampón de PCR (Bioline), $MgCl_2$ 4 mM, 0,4 mM de cada dNTP, 100 pmol de cada cebador, DNA y agua desionizada estéril hasta un volumen final de 25 μ l. Todas las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo así como sus respectivas T_m están incluidas en el Anexo II.

Las temperaturas de hibridación y los tiempos de elongación se establecieron según el tamaño del fragmento a amplificar y la T_m de los cebadores utilizados en cada reacción. En todos los casos se incluyeron controles negativos para garantizar la ausencia de DNA 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. Todas las reacciones de amplificación descritas en este estudio se realizaron en un Termociclador *T-Gradient* (Biometra).

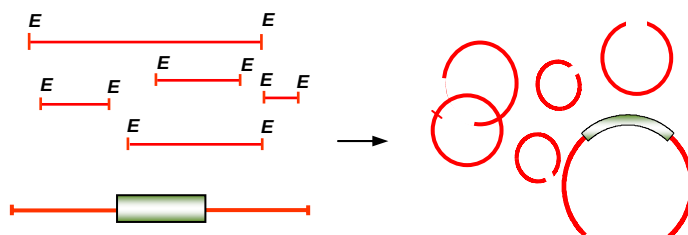
Para el análisis de los productos de amplificación las muestras se mezclaron con 1,5 μ l de la disolución de carga (azul de bromofenol 0,25% en agua destilada; Glicerol 40%; EDTA 100 mM) y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (1,4%) con tampón TAE 1X (Tris Base 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0) visualizando el DNA mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml).

3.1 PCR-Inversa

Esta técnica se dirige a la amplificación de las regiones de secuencia desconocida que flanquean a una región de DNA previamente caracterizada. En una PCR convencional los cebadores se unen a los extremos de una secuencia y permiten la extensión de la región que queda delimitada entre ellos. En el caso de la PCR Inversa los cebadores se unen a los extremos del fragmento de DNA conocido pero orientados hacia las regiones flanqueantes, tal como se muestra en la Figura III-2. Para conseguir que los cebadores adquieran de nuevo la

orientación adecuada, el DNA, previamente digerido con un enzima que corte fuera de la región de partida, se recirculariza en una reacción de autoligación. Como resultado los cebadores quedan nuevamente orientados uno hacia el otro pudiéndose iniciar la amplificación de la secuencia intermedia, la cual se corresponde con las regiones que quedaban fuera de la secuencia conocida.

Paso 1. Digestión del DNA genómico con un enzima de restricción y autoligación del DNA digerido.



Paso 2. El DNA religado se utiliza como molde para una reacción de amplificación por PCR, con cebadores diseñados a partir de los extremos de la secuencia conocida

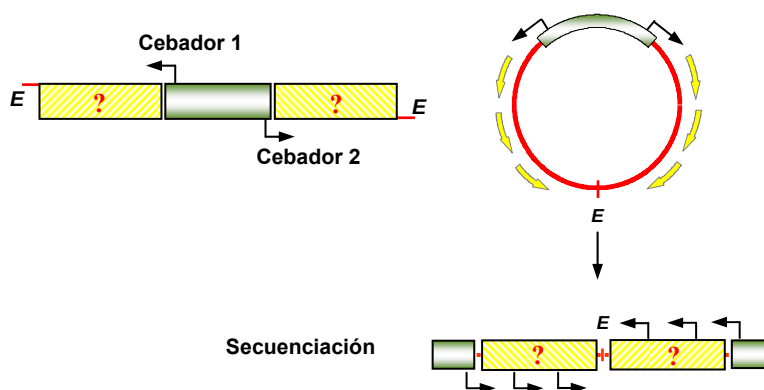


Figura III-2: Esquema de la PCR-Inversa utilizada para amplificar y secuenciar las regiones adyacentes a una secuencia previamente caracterizada. Tras el corte del DNA genómico con un enzima de restricción (*E*), los fragmentos obtenidos se autoligaron y sirvieron como molde en una reacción de amplificación con cebadores orientados hacia los extremos 5' y 3'. Como resultado final, se obtiene un fragmento de DNA delimitado por la secuencia de partida, a partir de la cual se puede secuenciar en ambas direcciones hasta la diana de restricción *E*.

Utilizando diferentes enzimas de restricción, se diseñaron reacciones de digestión con aproximadamente 2 μ g de DNA genómico, a un volumen final de 50 μ l, e incubadas un mínimo de 6 h a la temperatura óptima establecida para cada enzima. Las reacciones se limpiaron con el sistema *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) para eliminar de la reacción de digestión los restos de enzima y sales. De cada una de las reacciones se utilizaron 19 μ l como molde para la reacción de autoligación: 1 U de T4-DNA ligasa (Fermentas); 5 μ l de

tampón de reacción; 5 µl de PEG 4000 al 50%; agua hasta un volumen final de 50 µl. La reacción se incubó a 4 °C durante toda la noche y se inactivó a 65 °C durante 10 min.

Finalmente se utilizaron entre 2 y 3 µl de DNA religado como molde para la reacción de PCR diseñada a continuación. El sistema de amplificación empleado fue el *Expand Long Template PCR System (Buffer 1)* (Roche) con cebadores homólogos a los extremos 5' y 3' de la región de DNA de partida.

4. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Los fragmentos de DNA utilizados en las reacciones de clonación fueron de dos tipos: (i) productos de PCR y (ii) fragmentos derivados de la digestión con enzimas de restricción.

En el caso de los productos de amplificación se emplearon dos sistemas específicos para la clonación de este tipo de fragmentos de DNA: Sistema *pGEM-T-Easy Vector System* (Promega) y el sistema *TOPO-TA Cloning kit* (Invitrogen). Los plásmidos pCR2.1-TOPO y pGEM-T-Easy (Fig. III-3), suministrados por cada uno de los proveedores, son vectores sin circularizar a los que se les ha incorporado un único residuo de deoxitimidina (T) en cada uno de sus extremos 3' para evitar su recircularización. Por su parte la *Taq* polimerasa empleada en las reacciones de PCR tiene una actividad terminal que añade una única deoxiadenosina (A) a los extremos 3' de los productos de amplificación, de forma que se incrementa de manera muy significativa la eficiencia de la unión entre los insertos de PCR y el vector.

Por último ambos plásmidos cuentan con un sistema de selección por α -complementación. La inserción de un fragmento de DNA en el punto de clonación interrumpe la secuencia que codifica para el gen de la β -galactosidasa. De este modo los clones recombinantes se pueden seleccionar a partir de placas con IPTG y X-gal en base a su coloración blanca, resultado de la incapacidad de la bacteria de degradar este último compuesto. Las bacterias que hubieran incorporado un plásmido recircularizado sin inserto mostrarán coloración azul por la degradación del X-gal.

Previamente a su clonación, las reacciones de PCR se limpiaron con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) o bien, en el caso de obtener múltiples fragmentos de amplificación, los fragmentos de interés se purificaron con el *QIAquick Gel extraction kit* (Qiagen) tras su separación electroforética en geles de agarosa. La relación molar inserto/vector utilizada en la

reacción de ligación fue 3:1, con 1 U del enzima T4-DNA ligasa, suministrado por el sistema de clonación elegido, tampón de reacción y H₂O hasta un volumen final de 10 µl. En el caso de la clonación en el vector pGEM-T-*Easy* las reacciones se incubaron durante toda la noche a 4 °C mientras que con el vector pCR2.1-TOPO la incubación fue de 30 min a temperatura ambiente. En ambos casos las reacciones se utilizaron para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5α. Las colonias positivas para la reacción de clonación se seleccionaron a partir de placas de LBA con Ampicilina (50 µg/ml), IPTG (0,5 mM) y X-gal (40 µg/ml). Las colonias de coloración blanca se reislaron para su confirmación. El plásmido se purificó según el sistema especificado en el apartado 2.1.1 y, tras su digestión con *EcoRI*, el tamaño del fragmento clonado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,4%.

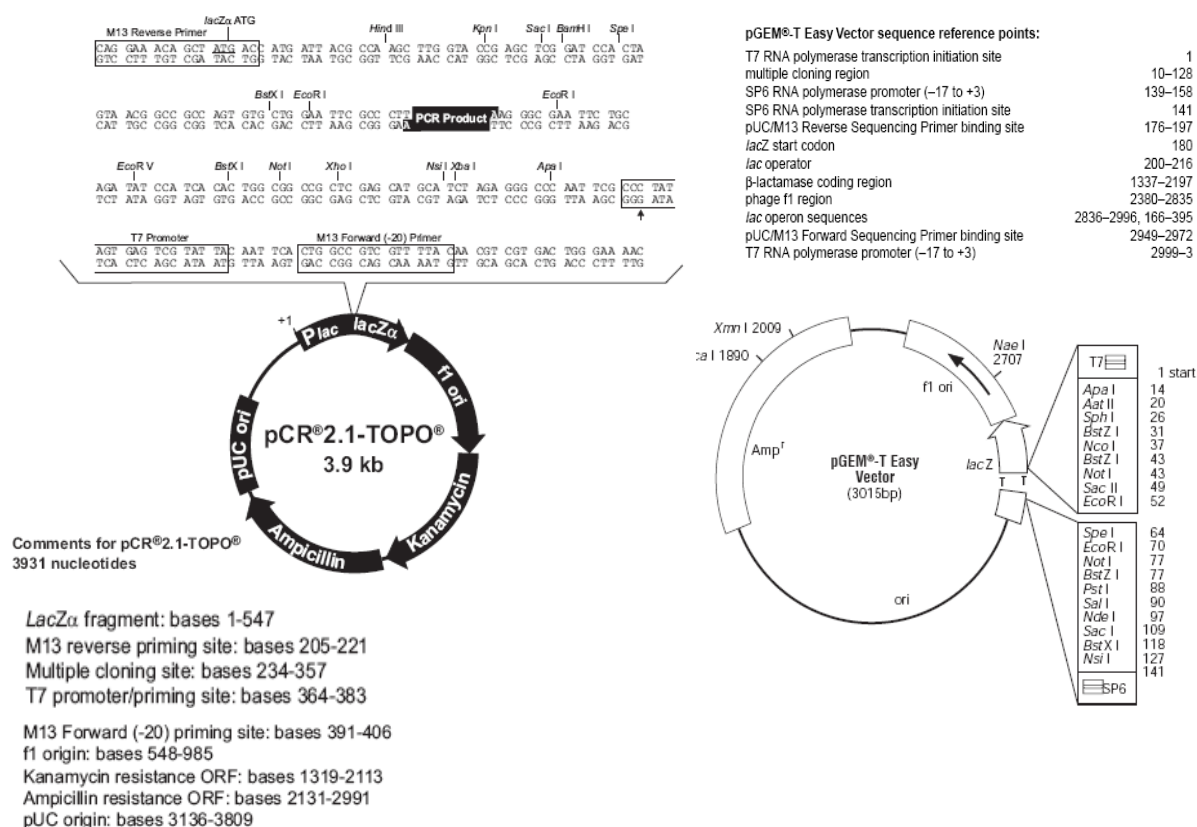


Figura III-3: Mapa de los plásmidos pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y pGEM-T-*Easy* (Promega). Ambos vectores están especialmente diseñados para la clonación de productos de PCR.

En la clonación de fragmentos de DNA no obtenidos por PCR se siguió la misma relación inserto/vector especificada para el caso anterior. Las reacciones de ligación se diseñaron para un volumen final de 20 µl con 1 U de T4-DNA ligasa (Fermentas) y 2 µl de tampón de reacción 10X (Fermentas). En el caso de fragmentos con extremos romos, las

reacciones se diseñaron para un volumen final de 20 μ l con 1 U de T4-DNA ligasa (Fermentas), 2 μ l tampón de reacción 10X (Fermentas) y 2 μ l de PEG 4000 al 50%. En cualquier caso, todas las reacciones se incubaron a 4 °C durante toda la noche y se inactivaron a 65 °C/10 min previamente a su introducción en la cepa de *E. coli* correspondiente. Los clones recombinantes se seleccionaron en base al marcador de resistencia codificado por el vector (Fig. III-4) y se confirmaron por digestión con endonucleasas de restricción y electroforesis en gel de agarosa al 1,4%.

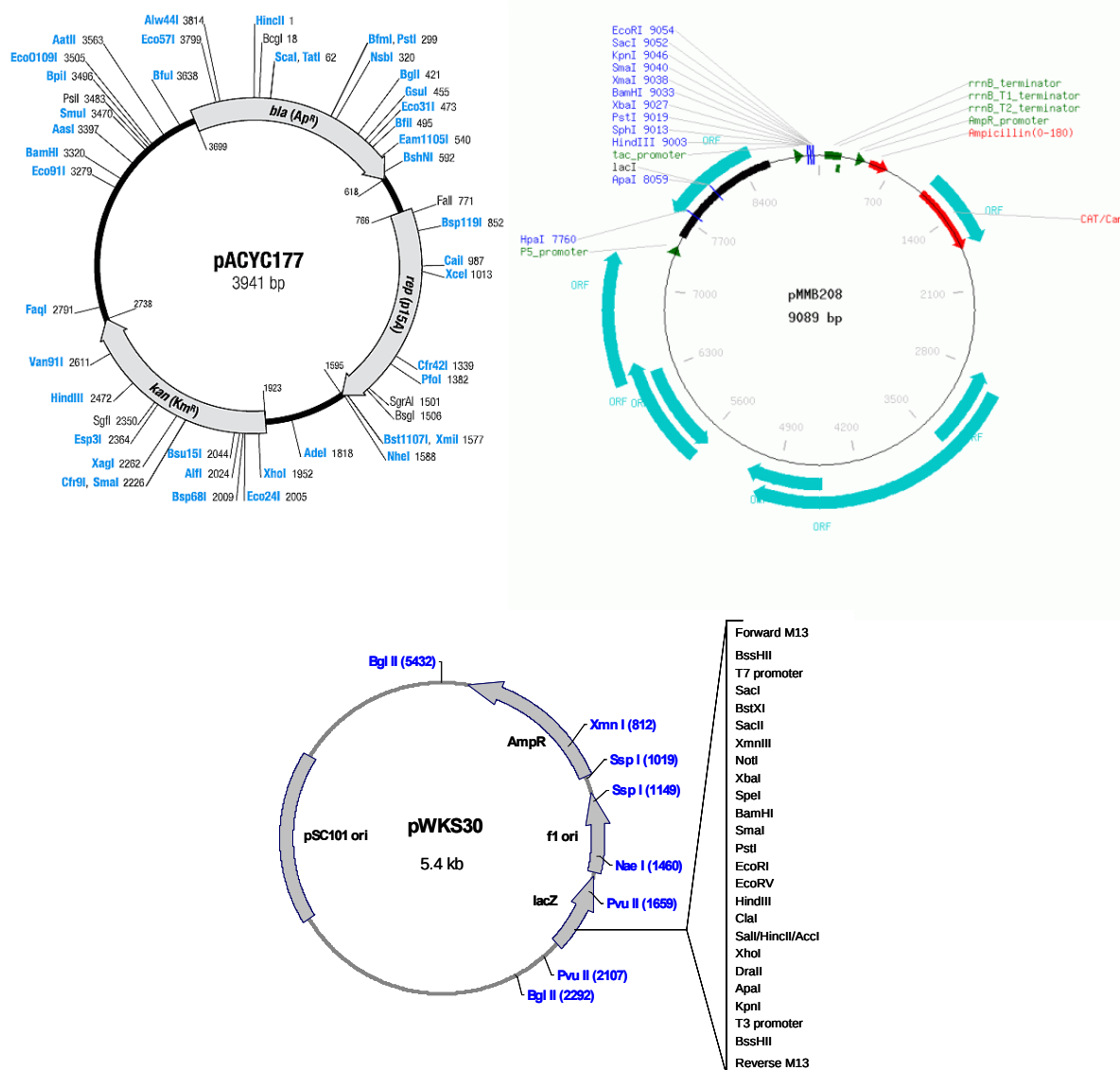


Figura III-4: Mapa de restricción de los principales vectores de clonación utilizados en este trabajo.. Todos ellos se caracterizan por llevar genes que confieren resistencia específica a uno o más antibióticos, de modo que los clones recombinantes puedan ser fácilmente aislados a partir de su siembra en medios selectivos.

5. TRANSFORMACIÓN DE PLÁSMIDOS

5.1 Cepas de *E. coli*

» **Transformación:** Previamente al proceso de transformación, las células se hicieron “competentes” a la incorporación de DNA exógeno según el siguiente protocolo (Sambrook y Rusell, 2001): A partir de una colonia aislada de la cepa de *E. coli* correspondiente, se inoculó 1 ml de medio LB que se incubó a 37 °C durante toda la noche. A continuación, se utilizaron 500 µl de este cultivo para inocular 50 ml de medio nuevo que se incubó hasta alcanzar una densidad óptica (DO₆₀₀) entre 0,3 y 0,4. Las células se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm/10 min (4 °C) y se resuspendieron en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M previamente enfriado en hielo. Tras incubarlo en frío durante 30 min se centrifugó a 4.000 rpm /10 min. Finalmente el precipitado se resuspendió en 750 µl de CaCl₂ 0,1 M y 750 µl de glicerol al 50%. La suspensión final se repartió en alícuotas de 100 µl que se guardaron a -80 °C.

Para la transformación se mezclaron 10-20 ng de DNA plasmídico con 100 µl de células competentes y se mantuvo en hielo durante 30 min. A continuación, para aumentar la eficiencia del proceso, la mezcla se incubó a 42 °C durante 1 min e inmediatamente se transfirió a hielo en donde se incubó otros 2 min. Por último se añadió 1 ml de medio LB y se incubó durante 1 h a 37 °C en agitación. La selección de las colonias recombinantes se hizo mediante siembra en placas de LBA suplementadas con los antibióticos apropiados según la resistencia conferida por el plásmido.

» **Apareamiento Triparental** (Goldberg y Ohman, 1984): Este método se basa en la incubación conjunta de tres cepas bacterianas para facilitar la transferencia de un plásmido de una cepa a otra. Una de las cepas contiene el plásmido que va a ser transferido, la segunda es la cepa “aceptora” y la tercera es la cepa HB101 de *E. coli* que lleva el plásmido *helper* pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980) y cuya finalidad es la de facilitar el proceso de transferencia. La cepa “aceptora” y la cepa con el plásmido a transferir han de poseer marcadores de resistencia diferentes.

Las tres cepas se incubaron conjuntamente sobre una placa de medio no selectivo (LBA) a 37 °C durante 12 h. Una porción de la mezcla se sembró en aislamiento en una nueva placa de LBA con los antibióticos necesarios para la selección simultánea de la cepa “aceptora” y el plásmido. Se incubó a una temperatura de 37 °C hasta la aparición de colonias aisladas (24-48 h). Para asegurar el aislamiento de un cultivo puro cada colonia se reaisló en

pases sucesivos en placas de LBA y los antibióticos anteriores.

» **Electroporación:** Para la obtención de células electrocompetentes se partió de 500 ml de un cultivo en medio LB de la cepa de *E. coli* correspondiente e incubada a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,2 y 0,4. Tras centrifugar a 5.000 rpm/10 min (4 °C), las células se resuspendieron dos veces en 100 ml de agua ultrapura (*Milli-Q*, Millipore), estéril y previamente enfriada en hielo. Tras una nueva centrifugación, el sedimento se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10%. Finalmente, esta suspensión se centrifugó a 5.000 rpm/10 min (4 °C) y las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10%. La suspensión final se repartió en alícuotas de 40 µl que se guardaron a -80 °C.

La transformación de la cepa de *E. coli* con DNA exógeno se llevó a cabo en un electroporador *Gene Pulser* (Biorad) estableciendo los siguientes parámetros:

Voltaje: 2,5 kV

Resistencia: 200 Ω

Capacitancia: 25 µF

Duración del pulso: 5 ms

Por último se añadió 1 ml de medio LB y la suspensión se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. La selección de las colonias recombinantes se hizo mediante siembra en placas de LBA suplementadas con los antibióticos apropiados según la resistencia conferida por el plásmido.

5.2 Cepas de *V. anguillarum*

» **Conjugación:** La cepa donadora utilizada fue la *E. coli* S17-1-λpir que, a su vez, previamente se transformó con los plásmidos de auto-transferencia derivados del pNidKan (Kan^r) (ver apartado 8 de Material y Métodos) o del pHRP309 (Gm^r) (Parales y Harwood, 1993). La cepa de *E. coli* y la cepa de *V. anguillarum* correspondiente se incubaron conjuntamente sobre una placa de medio TSA-1 a 25 °C entre 12 y 18 h. La selección de las células transconjugantes se hizo reaislando una porción de la mezcla anterior en una nueva placa de medio general suplementado con una combinación de los antibióticos necesarios para la selección simultánea de *V. anguillarum* y el plásmido a transferir.

6. HIBRIDACIÓN DNA-DNA

1) Transferencia a membrana de Nylon: A partir de 5 µg de DNA cromosómico se diseñaron reacciones de digestión, con uno o varios enzimas, en un volumen final de reacción de 50 µl. Tras incubar durante un mínimo de 12 h a la temperatura especificada según el enzima empleado en cada reacción, los fragmentos de DNA obtenidos se separaron en función de su tamaño por electroforesis en gel de agarosa al 1,1%.

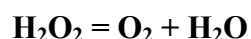
El gel se sometió a una depurinización en HCl 0,25 M, seguido por un lavado en disolución de desnaturalización (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) y un lavado en disolución neutralizante (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; NaCl 1,5 M). Finalmente los fragmentos de DNA se transfirieron a membrana de nylon (*Hybond N+ Nylon Membrane*TM, Amersham Biosciences) mediante un sistema de vacío (*Vacum-Blot System*; Biometra) de tal modo que en la membrana quedó reproducida la distribución de los fragmentos de DNA del gel. El DNA se fijó con una exposición de 2 min a luz UV (*Ultraviolet Crosslinker*, Linus).

2) Hibridación: La detección de las secuencias específicas de interés se obtuvo mediante la hibridación con fragmentos marcados de DNA complementario. Como sondas se emplearon tanto fragmentos de DNA clonados y liberados por restricción, como productos de amplificación obtenidos mediante PCR. El marcaje se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del sistema *ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System* (Amersham Biosciences) basado en la unión covalente de complejos del enzima peroxidasa a la sonda desnaturalizada.

Previamente a la incorporación de la sonda, la membrana de nylon se incubó durante 1 h a 42 °C en un horno rotatorio con el tampón de hibridación (*ECL Gold Hybridization Buffer*, Amersham Biosciences) para bloquear posibles uniones inespecíficas de la sonda. Tras la adición de la sonda marcada (10 ng/ml), se continuó la incubación durante 12 h a una temperatura de 42 °C.

3) Revelado: El exceso de sonda no unida a la membrana se eliminó lavando ésta con 50 ml de una disolución SSC 5X (Citrato sódico 75 mM; NaCl 0,75 M; pH 7,0) a 42 °C durante 5 min. A continuación se realizó un lavado de 20 min, seguido de otros dos de 10 min, con 100 ml de la disolución de lavado primario (SSC 0,5 X; Urea 6 M; SDS 0,4%) a una temperatura de 42 °C. Seguidamente se hicieron otros dos lavados de 5 min, a temperatura ambiente, con 100 ml de la disolución de lavado secundario (SSC 0,2X).

Para la detección de la sonda hibridada se emplearon los reactivos del sistema *ECL*. El mecanismo por el cual se genera la señal de hibridación es el siguiente: la acción de la peroxidasa, unida a la sonda durante su marcaje, provoca la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia del denominado *Reactivo de Detección 1* y siguiendo la reacción química:



A su vez, la reducción del peróxido de hidrógeno está asociada a una reacción luminosa mediada por el *Reactivo de Detección 2* que contiene luminol y que al oxidarse emite dicha señal de quimioluminiscencia. Para su detección las membranas se expusieron a diferentes tiempos empleando películas de autorradiografía (*HyperfilmTM ECL*, Amersham Biosciences) y a temperatura ambiente (*HypercassetteTM*, Amersham Pharmacia-Biotech). Para el revelado se utilizaron reactivos Kodak (*GBX Developer and replenisher*; *GBX fixer and replenisher*).

7. SECUENCIACIÓN DE DNA Y ANÁLISIS DE DATOS

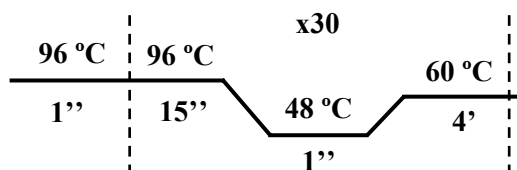
El método de secuenciación empleado en el presente trabajo fue el de Terminación de Cadena Dideoxi de Sanger (1977). Esta metodología se fundamenta en una reacción de PCR que incluye los cuatro tipos de dNTP y un pequeño porcentaje de ddNTP marcados con fluorocromos específicos. Durante la reacción de síntesis, la polimerasa adiciona los dNTP hasta que, en un momento dado, se introduce un ddNTP carente del grupo -OH en su extremo 3'. En este momento, el enzima es incapaz de introducir un nuevo dNTP de manera que se paraliza la polimerización. Como resultado se obtiene una mezcla de fragmentos de DNA de distintos tamaños según el momento de incorporación del ddNTP.

En las reacciones de determinación de secuencias de DNA se partió de muestras tanto de DNA plasmídico como productos de PCR. En este último caso y para eliminar los restos de cebadores, nucleótidos y sales de la reacción, los productos de amplificación se purificaron con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) o bien a partir de geles de agarosa al 1,2% con el *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen).

1) Secuenciación: Se emplearon dos sistemas comerciales diferentes:

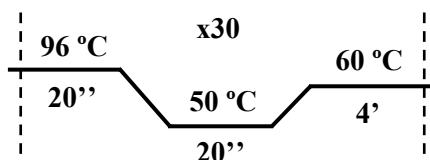
» *Big Dye Terminator v3.0 DNA sequencing kit* (Applied Biosystems) y electroforesis

en el secuenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un termociclador *T-Gradient* (Biometra) en las siguientes condiciones:



Previamente a su análisis, las reacciones se limpiaron añadiendo a cada muestra 1 µl de una disolución de acetato sódico 3 M (pH 4,6) y 25 µl de etanol absoluto. La mezcla se incubó en hielo durante 10 min y el DNA se recuperó por centrifugación a 13.000 rpm/25 min. El precipitado se lavó con 300 µl de etanol 70% y nuevamente se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min. Tras desechar el sobrenadante el DNA se resuspendió en 4 µl del tampón de carga (formamida desionizada:EDTA 25 mM 5:1 (pH 8,0) con azul dextrano 50 mg/ml).

» *Sequenase kit Version 2.0* (U.S. Biochemical Corp.) y electroforesis en el secuenciador capilar *CEQ 8000 DNA Sequencer*. El programa de secuenciación fue el siguiente:



Las reacciones se limpiaron añadiendo 2 µl de acetato sódico 3 M (pH 5,2), 2 µl de una disolución Na₂-EDTA 100 mM (pH 8,0) y 1 µl de glicógeno 20 mg/ml. Tras añadir 60 µl de etanol absoluto a -20 °C la mezcla se centrifugó a 13.000 rpm/15 min (4 °C). El precipitado se lavó dos veces con 200 µl de etanol al 70% previamente enfriado a -20 °C. Entre cada lavado se hicieron sendas centrifugaciones de 5 min a 13.000 rpm (4 °C). Finalmente el DNA precipitado se resuspendió en 40 µl de tampón de carga (*Sample Loading Solution*, U.S. Biochemical Corp).

2) Análisis de las secuencias: Para el análisis de las secuencias obtenidas, mapas de restricción y detección de posibles secuencias codificadoras de proteínas (ORFs) se empleó el programa informático *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999).

Para la búsqueda de posibles homólogos, tanto en lo referente a secuencia de

nucleótidos como a secuencia de aminoácidos, se consultaron las bases de datos europeas EMBL (Heidelberg, Alemania) con el algoritmo FASTA3 (Pearson, 2000). En el establecimiento de porcentajes de similitud entre secuencias homólogas se empleó el algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Ambos análisis se realizaron dentro del sitio web del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/>). Los números de acceso EMBL para las secuencias de *V. anguillarum* descritas en el presente trabajo son:

Cluster de captación de grupos hemo (cepa H775-3): **AJ496544**.

Gen *huvR* (cepa H775-3): **AM259387**

Gen *huvS* (cepa ET-208): **AM042548**

Genes *tonB1-exbB1-exbD1* (cepa RV22): **AM259386**

Genes *exbB2-exbD2-tonB2* (cepa RV22): **AM259385**

Para el análisis de dominios proteicos conservados se consultó la dirección web de la base de datos PFam (*Protein families database of alignments and HMMs*: <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.s.html>).

8. OBTENCIÓN DE MUTANTES CROMOSÓMICOS

8.1 Mutagénesis por intercambio alélico

Esta técnica de mutagénesis se basa en un doble evento de recombinación que permite la sustitución de un gen por una copia modificada previamente y transferida a la cepa parental a través de su clonación en un plásmido específico. La característica primordial del plásmido utilizado es su incapacidad de replicarse en la bacteria receptora, de modo que únicamente se perpetuará cuando se integre en el cromosoma bacteriano por un proceso de recombinación entre secuencias homólogas. La resistencia a un antibiótico marcador del vector facilitará la selección de las colonias recombinantes. Un segundo proceso de recombinación entre las secuencias flanqueantes, resultará en la escisión del plásmido del cromosoma bacteriano arrastrando consigo una de las copias de la región duplicada. Aproximadamente en un 50% de los casos, la resolución de este segundo proceso de recombinación implica la pérdida de la secuencia salvaje dejando la copia mutante en el cromosoma (Fig. III-5).

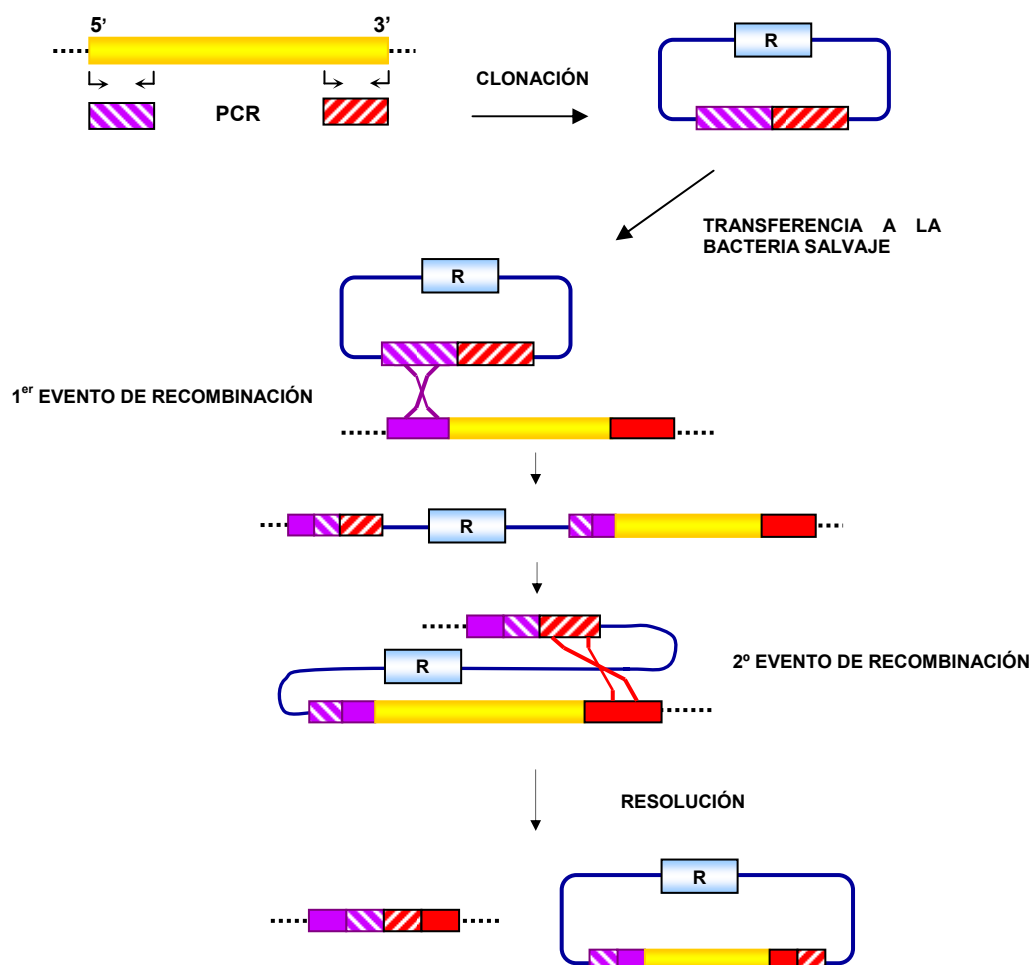
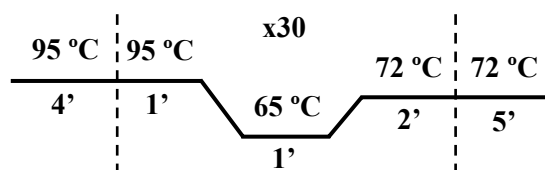


Figura III-5: Esquema del proceso de mutación por intercambio alélico: El alelo mutante se obtiene amplificando las regiones 5' y 3' del gen, y uniendo ambos fragmentos en un mismo plásmido. A través de esta construcción se facilita la transferencia de la copia delecionada a la bacteria. Tras un primer 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.

Inicialmente, a partir del DNA genómico de la cepa de *V. anguillarum* correspondiente, se amplificaron por separado los extremos 5' y 3' de cada uno de los genes a mutar. Los cebadores utilizados se diseñaron de modo que la unión de ambos fragmentos de amplificación mantuviese la pauta de lectura de la proteína, originando una mutación de carácter “no-polar” sin afectar a la transcripción de los genes adyacentes. Para facilitar la unión y clonación de ambos fragmentos se incluyeron dianas de restricción en los extremos 5' y 3' de cada uno de los cebadores empleados. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región del gen correspondiente al extremo carboxi-terminal y amino-terminal de cada

proteína, así como las dianas de restricción incluidas en cada uno de ellos se describen en el Anexo II. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

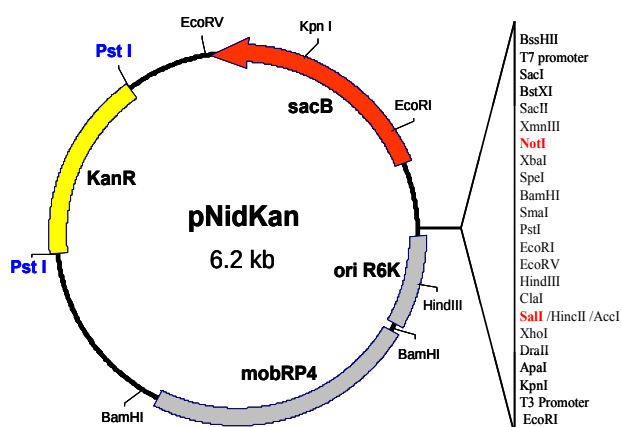


El fragmento correspondiente a la región carboxi-terminal se clonó en el vector pWKS30. A continuación el plásmido resultante se cortó con los enzimas necesarios para la unión del extremo amino-terminal. Tras esta segunda reacción de ligación, el inserto se liberó con los enzimas de restricción *NotI* y *SalI* y se subclonó entre los sitios *NotI/SalI* del plásmido suicida pNidKan (Fig. III-6). Este segundo vector es un derivado del plásmido pKEK229 (Correa *et al.*, 2000) con un fragmento *PstI-PstI* que incluye el gen de resistencia a la Kanamicina (*Genblock*, AmershamPharmacia). Además el vector pNidKan contiene el origen de replicación R6K (*oriR6K*) que requiere el producto del gen *pir* para su replicación y los genes *mob* que permiten la movilización del plásmido de una bacteria a otra. Otra de sus características principales es la presencia del gen *sacB* que codifica el enzima levansacarasa y cuya expresión es tóxica para las bacterias Gram-negativas crecidas en un medio con sacarosa al 10% (p/v). Los plásmidos resultantes utilizados durante el proceso de mutagénesis se enumeran en el Anexo I.

Cada una de las construcciones del plásmido pNidKan fue transferida por conjugación desde la cepa S17-1- λ pir de *E. coli* a la correspondiente cepa de *V. anguillarum*. Mediante un proceso de recombinación homóloga el vector se insertó en el cromosoma de *V. anguillarum* y las bacterias transformantes se aislaron en placas de LBA con los antibióticos de selección para el plásmido (Kan) y para la bacteria “aceptora” (Amp o Rif según la cepa). Para promover un segundo evento de recombinación, se inoculó una única colonia en 1 ml de medio LBA y se incubó durante 12-18 h a 25 °C. A partir de este cultivo se inoculó 1 ml de medio fresco, el cual se incubó otras 12 h a 25 °C. Finalmente se diluyeron 10 μ l de este último cultivo en 1 ml de solución salina estéril (NaCl 0,85%). La dilución se sembró en placas de LBA con sacarosa 10% (p/v) y el antibiótico de resistencia específico para la cepa “aceptora”. Bajo estas condiciones, la expresión del gen *sacB* permitió eliminar todas aquellas colonias en las que el plásmido no se hubiera escindido del cromosoma o no se hubiera perdido durante la división celular. Para verificar el correcto intercambio alélico entre el gen

salvaje y el gen deleciónado se empleó la amplificación por PCR, utilizando las condiciones de amplificación descritas anteriormente, y el análisis de hibridación por *Southern blot*.

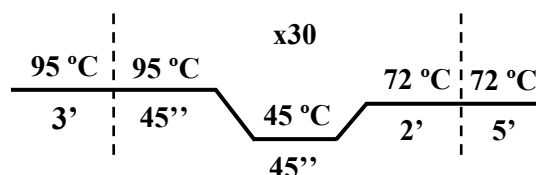
Figura III-6: Mapa de restricción del plásmido pNidKan. La copia deleciónada del gen se clonó entre los sitios *NotI* y *SalI* del punto de clonación. KanR, gen de resistencia a la Kanamicina.



8.2 Mutagénesis por *Lambda-Red* del sistema TonB1

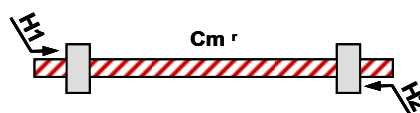
Este sistema de mutación de genes cromosómicos se inicia con la amplificación del gen de resistencia a Cloranfenicol con cebadores de entre 56 y 70 nucleótidos de longitud. De toda la secuencia del cebador, entre 36 y 50 nucleótidos se corresponden con las regiones adyacentes del gen que se quiere inactivar (Datsenko y Wanner, 2000). Igual que en el proceso de mutagénesis descrito en el apartado anterior, el producto de PCR es introducido en la célula “aceptora” de modo que la recombinación entre las secuencias homólogas (extremos de los cebadores) da como resultado la sustitución del gen cromosómico por el gen de resistencia al antibiótico. Durante el proceso de recombinación se requiere la recombinasa del fago λ -Red (codificado por los genes γ , β y exo y cuyos productos se denominan Gam, Bet y Exo respectivamente). En este sistema *Lambda-Red*, clonado en el plásmido de bajo número de copias pKD46, la proteína Gam inhibe la exonucleasa V del hospedador, de modo que las proteínas Bet y Exo tienen acceso a los extremos del DNA para, así, promover su recombinación (Fig. III-7).

El gen de resistencia Cm^r se obtuvo a partir del plásmido pKD3 mediante amplificación por PCR y con los cebadores tonB1LR1 y tonB1LR2 (Anexo II). Éstos se caracterizan por contener, respectivamente, las primeras y últimas 40 bases del gen *tonB1* de *V. anguillarum*. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

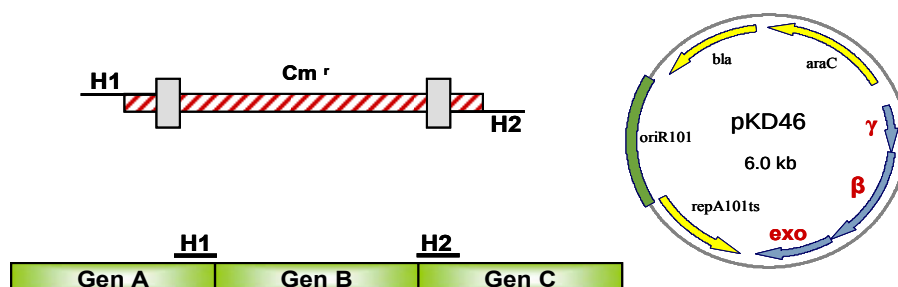


El proceso de mutagénesis se llevó a cabo sobre el gen *tonB1* de *V. anguillarum* clonado en el cósmido pVK100 y utilizado para transformar la cepa de *E. coli* 101ESD (Mazoy *et al.*, 2003). Inicialmente esta cepa de *E. coli* fue transformada con el vector pKD46, cuyo origen de replicación es compatible con el de pML1. A continuación se prepararon células electro-competentes y se electroporaron con el producto de PCR que incluye el gen Cm^r . La reacción de electroporación se sembró en placas de medio LBA suplementado con Cm e incubando a 37 °C hasta la aparición de colonias aisladas. El proceso de recombinación que tiene lugar entre las regiones flanqueantes del producto de PCR y las secuencias homólogas en el gen *tonB1* da como resultado la sustitución de este último por el gen de resistencia al cloranfenicol.

Paso 1. Amplificación por PCR del gen de resistencia flanqueado por las regiones homólogas al gen a inactivar e incluidas en los cebadores de amplificación (H1 y H2)



Paso 2. Transformación en la cepa capaz de expresar la recombinasa λ Red



Paso 3. Selección de los recombinantes por su resistencia al antibiótico



Figura III-7: Estrategia de inactivación génica por el sistema Lambda Red. H1 y H2 representan las extensiones de los cebadores o regiones de homología. Cm^r , Gen de resistencia al Cloranfenicol amplificado a partir del plásmido pKD3 con los cebadores H1 y H2. pKD46, plásmido con los genes γ , β y exo que codifica el sistema de la recombinasa del fago lambda, fundamental para el proceso de recombinación entre las regiones de homología del producto de PCR y el gen a inactivar.

Seguidamente el plásmido pML1, con el gen *tonB1::Cm^r*, se transfirió por conjugación a la cepa de *V. anguillarum* 775, en donde tuvo lugar un nuevo evento de recombinación entre secuencias homólogas del plásmido y del cromosoma. Igual que antes, el resultado final fue la

inserción del gen de resistencia Cm^r dentro del cromosoma bacteriano, sustituyendo así a la copia salvaje del gen *tonB1*. Para la selección de las colonias recombinantes derivadas de este proceso, la cepa de *V. anguillarum* se transformó con el plásmido pPH1JI (Gm^r), caracterizado por su origen de replicación incompatible con el replicón de pML1. En base a la doble resistencia $Gm + Cm$ fue posible aislar colonias con el gen *tonB1* inactivado por la inserción del gen Cm^r y manteniendo, al mismo tiempo, la selección del plásmido pPH1JI (Gm^r) en detrimento del plásmido pML1.

9. REVERSO TRANSCRIPCIÓN (RT)-PCR

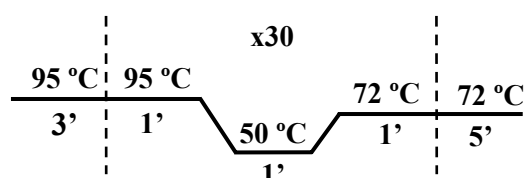
La RT-PCR se basa en la obtención del cDNA a partir de un RNA mensajero, derivado de la transcripción de uno o más genes, mediante una reacción de reverso-transcripción. A su vez este cDNA es susceptible de ser utilizado como molde en una reacción de PCR con cebadores específicos del gen o genes codificados dentro de la secuencia del mRNA inicial y que constituyen la unidad transcripcional.

Para los ensayos de RT-PCR se partió de 2,5 μ g de RNA total, obtenido de un cultivo de *V. anguillarum* en medio mínimo CM9 y bajo diferentes condiciones de disponibilidad de hierro. El protocolo de purificación de RNA utilizado fue el descrito anteriormente en el apartado 2.3 del presente capítulo. El RNA se trató con 3 unidades de DNasa (*RQ1 RNase-Free DNase*, Promega) en tampón de reacción *RQ1* (Tris-HCl 40 mM, pH 7,9; $MgSO_4$ 10 mM; $CaCl_2$ 1 mM) y a un volumen final de 10 μ l. La reacción se incubó a 37 °C durante 30 min y la DNasa se inactivó añadiendo 1 μ l de solución EGTA 20 mM, pH 8,0 e incubando a 65 °C durante 10 min.

En la reacción de síntesis del cDNA se emplearon 625 ng de este RNA libre de DNA. La reacción de reverso-transcripción se inició mezclando la muestra con 5 pmol del cebador específico, 1 μ l de dNTPs (10 mM) y agua hasta un volumen final de 13 μ l. Tras incubación durante 5 min a 65 °C, la mezcla se enfrió en hielo y se añadieron 2 μ l de DTT 0,1 M y 4 μ l de tampón de reacción (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; $MgCl_2$ 15 mM). Finalmente tras una nueva incubación a 37 °C durante 2 min se añadieron 200 U de *M-MLV Reverse-Transcriptase* (Invitrogen) y se continuó la incubación a 37 °C durante 50 min.

El cDNA resultante se utilizó como molde en distintas reacciones de PCR con objeto de amplificar el RNA producto de la transcripción de los genes bajo estudio. Como control

negativo y para comprobar la ausencia de contaminación por DNA genómico, en todos los casos se incluyó una reacción de amplificación utilizando como molde el RNA tratado con la DNasa. Los oligonucleótidos utilizados para la obtención del cDNA a partir del RNA total, así como los utilizados en las posteriores reacciones de amplificación, se recogen en el Anexo II. Salvo excepciones, las condiciones de amplificación utilizadas para las reacciones de PCR con el cDNA obtenido de la reacción de reverso-transcripción fueron las siguientes:



10. PRIMER EXTENSION

Esta técnica permite la identificación del punto de inicio de la transcripción de un determinado gen a partir de la síntesis del cDNA correspondiente a su mRNA. Para ello se utiliza un oligonucleótido específico, marcado previamente con ^{32}P , y homólogo a la secuencia próxima al extremo 5' de dicho RNA. Tras el análisis electroforético del producto de la reacción de reverso-transcripción se estima el tamaño de dicha molécula de cDNA, pudiendo deducir la posición +1 a partir de la cual se inicia el proceso de síntesis del RNA.

Se siguió básicamente el protocolo descrito por Delany *et al.* (2001). Para el análisis de las regiones promotoras de los genes *huvA* y *huvX* se diseñaron cebadores localizados aproximadamente a 50 pb y a 100 pb “corriente abajo” del ATG inicial del gen a estudiar. En el caso del gen *tonB1* y del gen *huvB* sólo se utilizó un cebador situado aproximadamente a 100 y 50 pb, respectivamente, del punto de inicio de la traducción. Estos mismos cebadores se utilizaron en las reacciones de secuenciación que sirvieron como marcadores de peso molecular. Por otra parte el RNA empleado en los ensayos se purificó a partir de cultivos de la cepa H775-3 de *V. anguillarum*, crecida en medio mínimo CM9 y en medio mínimo en presencia de un exceso de hierro (FAC 4 $\mu\text{g/ml}$).

1) Marcaje de la sonda: Cada oligonucleótido (75 pmol) se marcó en su extremo 5' con 10 U del enzima T4 polinucleótido kinasa (Roche) y en presencia de 120×10^6 μCi (γ - ^{32}P)-dATP (6.000 Ci/mmol, Perkin Elmer) a un volumen final de 10 μl . La reacción se incubó a una temperatura de 37 °C durante 30 min. Para eliminar los restos de isótopo no unido a la sonda las reacciones se limpiaron con el sistema *QIAquick Nucleotide Removal kit* (Qiagen).

El DNA marcado se resuspendió en 150 µl de agua desionizada estéril.

2) Hibridación y *primer extension*: La reacción de hibridación RNA:sonda se llevó a cabo en un volumen final de 13 µl, en los que se mezclaron 10 µg de RNA total con, aproximadamente, 10^6 cpm de la sonda marcada y dNTPs 10 mM. La mezcla de reacción se desnaturalizó a 95 °C durante 5 min y se dejó enfriar a 25 °C/10 min. La reacción de *primer extension* se inició añadiendo a la mezcla anterior 2 µl de DTT 0,1 M y 4 µl de tampón de reacción (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM). Tras una incubación de 2 min a 42 °C, la reacción se completó con 200 U del enzima *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y se continuó la incubación a 42 °C/40 min.

Una vez finalizada la síntesis del cDNA, la reacción se llevó hasta un volumen final de 50 µl con agua desionizada y se extrajo una vez con fenol:cloroformo (1:1). El cDNA se recuperó precipitando con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol a -20 °C. Finalmente se resuspendió en 4 µl de agua + 4 µl de tampón de carga (formamida 95%; EDTA 20 mM; azul de bromofenol 0,05%; xylene cyanol FF 0,05%).

3) Secuenciación: Simultáneamente se procedió a secuenciar la región de DNA con los mismos cebadores empleados en las reacciones de *primer extension*. Se siguió el método de terminación de cadena dideoxi con el sistema *DNA Sequenase kit Version 2.0* (U.S. Biochemical Corp.) y [α -S³⁵]dATP como isótopo radioactivo (6.000 ci/mmol, Perkin Elmer). Entre 0,5 y 3 µg de DNA genómico se mezclaron con 2 µl de tampón de reacción (Tris-HCl 200 mM, pH 7,5; MgCl₂ 100 mM; NaCl 250 mM), 0,5 pmol del cebador y agua hasta un volumen final de 10 µl. La reacción se calentó a 65 °C durante 2 min y a continuación se incubó durante 15-30 min a 35 °C. Tras enfriar la mezcla en hielo, se añadió 1 µl de DTT 0,1 M, 2 µl de una dilución 1:5 de la mezcla de marcaje (7,5 µM dGTP; 7,5 µM dCTP; 7,5 µM dTTP), 0,5 µl de [α -S³⁵]dATP (1250 Ci/mmol) y 2 µl de secuenasa T7. La reacción se incubó 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se transfirieron 4,5 µl a cada uno de los tubos de terminación con 2,5 µl del ddNTP correspondiente (8 µM) y calentados previamente a 37 °C. Tras seguir la incubación a 37 °C durante otros 5 min, la reacción se paró añadiendo 4 µl del tampón de carga descrito en el apartado anterior.

4) Electroforesis: Los productos secuenciados y los fragmentos de cDNA obtenidos tras la reacción de reverso-transcripción se sometieron a electroforesis en un gel desnaturizante de poli(acrilamida) al 6% (acrilamida:bis-acrilamida 19:1 (Biorad); Urea 7 M) y 0,2 mm de espesor. Tras la polimerización el gel se sometió a una electroforesis previa en

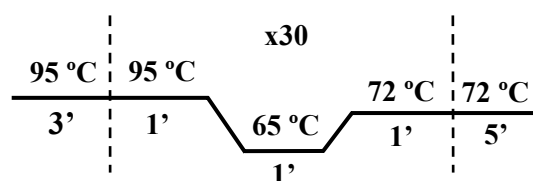
tampón TBE (Tris base 90 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 1 mM) durante 1 h a 800 V y manteniendo una temperatura constante de 50 °C. Las reacciones de secuenciación y de *primer extension* se desnaturalizaron a 90 °C durante 3 min cargando en el gel entre 2 y 3 µl. La electroforesis se llevó a cabo a 2.000 V y a 50 °C de temperatura. Finalmente el gel se desecó a 80 °C durante 2 h (583 *Gel Drying System*, Biorad) y se expuso entre 12-16 h empleando una película de autorradiografía (*Hyperfilm MP*, Amersham Pharmacia-Biotech) a -80 °C (*HypercassetteTM*, Amersham Pharmacia-Biotech).

11. FUSIONES TRANSCRIPCIONALES Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

El plásmido de bajo número de copias pHRP309 (Parales y Harwood, 1993), específico para la construcción de fusiones transcripcionales, se caracteriza por incluir el gen *lacZ* sin un promotor que regule su expresión (Fig. III-8). La clonación de una secuencia con actividad promotora dentro de la región localizada “corriente arriba” de este gen implica que su transcripción y síntesis queda bajo el control del inserto clonado. Los niveles de actividad β -galactosidasa, producto de la expresión del gen *lacZ*, estarán directamente relacionados con los niveles de transcripción, determinados a su vez por el promotor asociado al gen. La detección de los niveles de actividad promotora se basa en la utilización del ortonitrofenil β -D-galactopiranosido (ONPG), molécula estructuralmente similar a la lactosa y en la que la glucosa es sustituida por un grupo ortonitrofenilo. La hidrólisis del ONPG por acción del enzima β -galactosidasa implica la liberación del cromóforo ortonitrofenilo que es fácilmente detectable, por el cambio de coloración del medio a amarillo, y cuantificable por espectrofotometría.

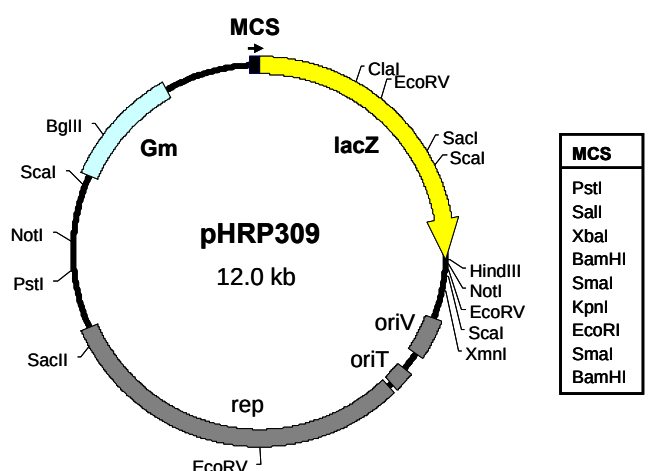
Para la construcción de las fusiones *promotor::lacZ*, las secuencias promotoras se obtuvieron mediante amplificación por PCR. Los cebadores utilizados para la amplificación de la región promotora correspondiente al gen *huvA* fueron FT-huvA1/FT-huvA2, para el promotor de *huvX* se utilizaron los cebadores FT-huvXZ1-FT-huvXZ2 y para la amplificación del promotor adyacente al gen *tonB* los cebadores FT-tonB1/FT-tonB2. Finalmente se emplearon los cebadores FT-huvBCD1 y FT-huvBCD2 para amplificar y clonar la región intergénica *exbD1-huvB*. En el extremo 5' de cada par de cebadores se incluyeron dianas de restricción para facilitar su posterior clonación. La secuencia correspondiente a cada uno de

estos cebadores se muestra en el Anexo II. Las condiciones de PCR empleadas en todas las amplificaciones fueron las siguientes:



Inicialmente los productos de amplificación, de un tamaño aproximado de 400 pb, se clonaron en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Los insertos se liberaron por digestión con *KpnI-EcoRI* y se subclonaron en el plásmido pHRP309. Las construcciones resultantes (*phuvA::lacZ*, *phuvX::lacZ* y *ptonB1::lacZ*) se transfirieron por conjugación desde la cepa S17-1- λ pir de *E. coli* a las cepas de *V. anguillarum* H775-3, 775met11, B106, B219 y B228. Los clones transformados se seleccionaron en base a su resistencia al antibiótico Gm (marcador del pHRP309) y a la Rif (marcador de resistencia para la cepa 775met11) o a la Amp (marcador para el resto de cepas de *V. anguillarum*).

Figura III-8: Mapa del plásmido pHRP309 específico para el ensayo de fusiones transcripcionales. MCS, punto de clonación.



Para los ensayos de actividad transcripcional los niveles de β -galactosidasa se determinaron siguiendo el método de Miller (1992). Cada una de las cepas de *V. anguillarum* transformada con el plásmido de fusión se ensayó en medio mínimo CM9 bajo distintas condiciones de disponibilidad y fuentes de hierro. Dichas condiciones fueron las siguientes: $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 40 μM ; EDDA 1,5 μM ; EDDA 1 μM ; Hemina 10 μM + EDDA 5 μM ; Protoporfirina IX 10 μM .

Las células se incubaron en medio líquido CM9 a 25 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0,3 y 0,4. De cada cultivo se hicieron dos ensayos con 0,1 y 0,3 ml respectivamente. Ambos se llevaron hasta un volumen final de 1 ml con tampón Z (Na₂HPO₄·2H₂O 60 mM; NaH₂PO₄·H₂O 40 mM; KCl 10 mM; MgSO₄·7H₂O 1 mM; β-mercaptoethanol 50 mM; pH 7,0). Tras añadir 20 µl de cloroformo y 10 µl de una disolución de SDS al 0,1%, la mezcla se incubó a 37 °C durante 5 min. La reacción se inició añadiendo 0,2 ml del compuesto ONPG (4 mg/ml en tampón Z). Cuando la reacción cambió su color a amarillo, ésta se bloqueó con 0,5 ml de Na₂CO₃ 1 M. Finalmente la actividad promotora se cuantificó en **Unidades de β-galactosidasa** midiendo la absorbancia a 420 nm y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidasa} = \text{DO}_{420} \times 1000 / T \times V \times \text{DO}_{600}$$

DO₆₀₀: densidad celular del cultivo justo antes del ensayo (600 nm)

DO₄₂₀: lectura de la mezcla de reacción a 420 nm

T: tiempo de la reacción (min)

V: volumen del cultivo ensayado (ml)

Los ensayos se repitieron un mínimo de tres veces de manera independiente y las medias de los resultados obtenidos así como los índices de error derivados del experimento se calcularon con el programa de análisis de datos Microsoft EXCEL (Microsoft Office).

12. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE QUELANTES DE HIERRO

Para el cálculo de la CMI de los quelantes de hierro 2,2'-dipiridil y EDDA para *V. anguillarum* se partió de un cultivo en medio mínimo CM9 incubado a 25 °C entre 12-16 h. Éste se utilizó para la inoculación (1:100) de una serie de tubos con 3 ml de nuevo medio CM9 y con concentraciones crecientes de la sustancia quelante. En el caso del 2,2'-dipiridil las concentraciones ensayadas fueron 0, 50 µM, 100 µM y 250 µM, mientras que para el EDDA fueron 0, 1,5 µM, 2 µM, 3 µM, 4 µM y 5 µM.

Tras una incubación de 24 h a 25 °C en agitación, se determinó el crecimiento del

cultivo en cada uno de los tubos determinando la DO a 600 nm. La CMI se estimó en función de la concentración de quelante a la que no se detectó crecimiento bacteriano.

13. ENSAYOS DE UTILIZACIÓN DE HEMINA Y HEMOGLOBINA

La cepa parental H775-3 de *V. anguillarum* y sus correspondientes mutantes se cultivaron en 3 ml de medio mínimo CM9 a 25 °C/12 h. Para igualar sus concentraciones los inóculos se ajustaron aproximadamente a una DO₆₀₀ de 0,1 midiendo la absorbancia de una dilución 1:10 de cada cultivo. A partir de estos cultivos se reinoculó (1:100) nuevo medio CM9 suplementado con hemina (10 µM) o hemoglobina (1 µM). Para suprimir cualquier efecto del hierro libre presente en el medio se incluyó el quelante de hierro 2,2'-dipiridil a una concentración final de 100 µM. La DO₆₀₀ de los nuevos cultivos se fue midiendo en intervalos de una hora durante un período máximo de incubación de 12 h a 25 °C. Los resultados finales se expresan como la media aritmética de tres experimentos independientes.

14. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN

Salvo para las cepas derivadas de la cepa H775-3 de *V. anguillarum*, en cuyo caso las complementaciones se ensayaron en medio líquido CM9, el resto de experimentos de complementación se realizaron siempre sobre medio sólido. Los medios empleados fueron específicos para cada experimento y cepa ensayada. Así en los ensayos de complementación de la cepa EB53 de *E. coli* se empleó caldo nutritivo (NB) con agar (15 g/l), mientras que para la cepa 101ESD se utilizaron placas de medio mínimo CM9 con agarosa (0,8%) y suplementado con 2,2'-dipiridil a una concentración de 200 µM. Por otra parte, en el caso de las complementaciones para determinar la funcionalidad de los sistemas TonB, tanto en la cepa 775 de *V. anguillarum* como en las cepas DHH11 de *V. cholerae* y KP1032 de *E. coli*, los bioensayos se llevaron a cabo en placas de CM9 con azarosa (0,8%) suplementado con EDDA 10 µM. En los ensayos con la cepa RV22 de *V. anguillarum* la concentración de EDDA utilizada en las placas de medio CM9 fue de 300 µM.

En todos los casos se utilizaron 100 µl de un cultivo líquido de la bacteria a ensayar para inocular 3 ml del medio semisólido específico (agarosa 0,4% o agar 7 g/l según el medio

de cultivo utilizado en el bioensayo), licuado y atemperado a 45 °C. Tras homogenizar la mezcla, ésta se vertió sobre placas del mismo medio preparadas previamente y con los suplementos adecuados.

Los compuestos purificados empleados en los bioensayos fueron: Hemina (5 mM y 0,5 mM); hemoglobina (0,1 mM); anguibactina (1 mg/ml); enterobactina (1 mg/ml); ferricromo (1 mg/ml); vancrobactina (1 mg/ml); FAC (2 mg/ml); $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (40 mM); ALA (2 mg/ml).

Para el ensayo tanto de las cepas de *V. anguillarum* como de *E. coli*, sobre cada placa se dispusieron discos de papel de filtro estériles e impregnados con 20 µl de cada una de las fuentes de hierro. Para el resto de cepas se depositaron 5 µl de las distintas fuentes de hierro directamente sobre la placa del bioensayo. Tras 24 h de incubación, la detección de un halo de crecimiento alrededor de la fuente de hierro se consideró como resultado positivo. La ausencia de crecimiento, tras un período máximo de 48 h, se consideró como negativo.

15. PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

Para el análisis de proteínas cuya expresión depende de los niveles de hierro se siguió el procedimiento descrito por Crosa y Hodges (1981). Para ello las cepas a analizar se cultivaron en 10 ml de medio CM9 suplementado con FeCl_3 10 µM y EDDA 10 µM (condiciones de exceso y limitación de hierro respectivamente) a 25 °C y en agitación constante. Las células se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm/15 min (4 °C) y se resuspendieron en 3 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) con NaCl al 0,3%. A continuación las células se rompieron mediante sonicación tratando con 3-4 pulsos de 30 s, intercalados con periodos de descanso en hielo de otros 30 s. La suspensión se repartió en 2 tubos de microcentrífuga, uno para la obtención de proteínas de membrana totales y otro para la obtención de proteínas de membrana externa. Para eliminar los restos celulares se centrifugó durante 1 min a 13.000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf). El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que se centrifugó a 17.000 rpm (centrífuga *AvantiTM J-25* con rotor JA-25.50; Beckman Coulter) durante 60 min (4 °C). Tras desechar el sobrenadante, se procedió de manera diferente según la fracción proteica a purificar:

- 1) Proteínas de Membrana Totales:** El precipitado obtenido de la centrifugación anterior se resuspendió directamente en 20 µl de agua desionizada.

2) Proteínas de Membrana Externa: El sedimento de membranas totales se resuspendió en 100 µl de agua desionizada y se añadieron 100 µl de lauroyl-sarcosinato sódico al 3% en Tris-HCl 20 mM (pH 8,0). Tras incubar durante 20 min, a temperatura ambiente, se centrifugó de nuevo a 17.000 rpm durante 60 min (4 °C). Finalmente se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 20 µl de agua destilada.

Las concentraciones de los extractos se determinaron mediante el método Bradford (1976) utilizando como patrón concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina.

Previamente a su análisis electroforético, a cada una de las muestras se le añadió 1 vol de tampón FSB (2X) (Tris-HCl 0,13 M, pH 6,8; SDS 4%; Glicerol 20%; 2-Mercaptoetanol 10%; Azul de Bromofenol 0,002%). Tras calentar a 100 °C durante 10 min, las muestras se analizaron por electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida-SDS y con tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 1% p/v). El gel separador estaba compuesto por poliacrilamida al 12,5% (acrilamida/bis-acrilamida 44:0,8) en tampón Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) con SDS al 0,2%. Como catalizadores se utilizaron PSA al 0,02% y TEMED al 0,03%. Por su parte el gel de concentración estaba compuesto por poliacrilamida al 3% (acrilamida/bis-acrilamida 30:0,8) en Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) con SDS al 0,1%, PSA 0,02% y TEMED al 0,4%. Los geles se sometieron a electroforesis en una cubeta *Protean II xi Cell* (Biorad) durante 12 h a 30 mA.

Tras la separación electroforética los geles se tiñeron con Azul de Coomasie (Azul de Coomasie 0,05%; Isopropanol 25%; Ácido acético 10%) durante 2 h y se destiñeron con lavados sucesivos con ácido acético al 5%.

16. ENSAYOS DE VIRULENCIA

Las infecciones experimentales de peces se llevaron a cabo en rodaballos jóvenes (*Scophthalmus maximus*) con pesos en torno a los 12 g. Las células de las cepas a ensayar se resuspendieron en solución salina (NaCl 0,85%) ajustando la concentración a 10^8 células/ml con el tubo N° 2 de la escala McFarland. Tras preparar diluciones seriadas desde 10^8 hasta 10^2 células/ml, los peces fueron infectados mediante inyección intraperitoneal (0,1 ml/pez). Se probaron dos concentraciones de células por experimento, de manera que se infectaron 10

peces por cada una de las cepas y 5 peces por dosis. La dosis inoculada se cuantificó, por duplicado, mediante siembra de 0,1 ml de la suspensión en una placa de medio TSA-1. Una vez infectados, los peces se mantuvieron durante 13 días a 15 °C, comprobando las mortalidades diariamente.

El grado de virulencia de cada una de las cepas ensayadas se expresó como la dosis letal 50% (LD₅₀) según la fórmula de Reed y Muench (1938):

$$LD_{50} = \text{Log Dosis} > 50\% - \frac{\%mortalidad > 50\% - 50}{\%mortalidad > 50\% - \%mortalidad < 50\%}$$

La causa de la muerte del animal se confirmó por aislamiento de la bacteria inoculada en cultivo puro a partir del riñón del pez. La siembra se hizo en placas de TSA-1 y los aislados se confirmaron mediante ensayos de aglutinación con antígenos específicos anti-*V. anguillarum*.

IV. RESULTADOS

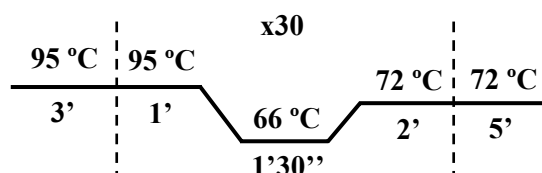
1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL SISTEMA DE CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE HEMO EN *V. anguillarum*

1.1 Secuenciación y análisis de los genes asociados a la utilización de hemo

En un estudio previo (Mazoy *et al.*, 2003) se aisló un clon a partir de una genoteca de cósmidos de *V. anguillarum* H775-3, conteniendo los determinantes genéticos capaces de otorgar a la cepa de *E. coli* 101ESD la capacidad de utilizar el grupo hemo como única fuente de hierro. Dicho clon, denominado pML1, mostró contener el gen *huvA*, que codifica un receptor de membrana externa implicado en la captación y transporte de la molécula de hemo. Para continuar con este trabajo, inicialmente se trató de caracterizar las secuencias adyacentes a *huvA* para la identificación de posibles genes relacionados con el proceso de captación y/o utilización del grupo hemo.

Debido al gran tamaño del cósmido pML1 se diseñaron estrategias de digestión y subclonaje. Las secuencias y Tm de todos los cebadores utilizados en las reacciones diseñadas en el presente apartado, así como los cebadores utilizados en las correspondientes reacciones de secuenciación, se recogen en el Anexo II.

En un primer momento el cósmido se cortó con distintas endonucleasas de restricción y las digestiones resultantes se hibridaron utilizando como sonda un fragmento *Hind*III de 1 kb que incluye parte de la secuencia 5' del gen *huvA*. Tras el revelado de la membrana, se detectó un fragmento de aproximadamente 4,5 kb obtenido de la digestión con *Pst*I. A partir de aquí y conociendo la posición de una de las dianas *Pst*I dentro de la secuencia del gen (a 2 kb del extremo 3') se dedujo la posición de la segunda diana, localizada aproximadamente a 2,5 kb "corriente abajo" del receptor (Fig. IV-1). Para aislar y poder secuenciar esta región, el cósmido pML1 se cortó con los enzimas *Hind*III y *Pst*I. Uno de los fragmentos resultantes, de 3,5 kb, se purificó a partir de gel de agarosa y se utilizó en una reacción de ligación con el vector pUC118. Dicha reacción sirvió, a su vez, como molde para una amplificación por PCR con los cebadores pML1.102 (localizado en el extremo 3' de *huvA*) y el cebador universal M13-Reverse (incluido en el plásmido de clonación). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



El producto obtenido (2,5 kb) se secuenció partiendo de los mismos cebadores pML1.102 y M13-Reverse. Dentro de dicho fragmento se caracterizaron 3 ORFs completas y una ORF parcial, todas con homología a genes relacionados con sistemas de utilización de hemo y descritas más adelante.

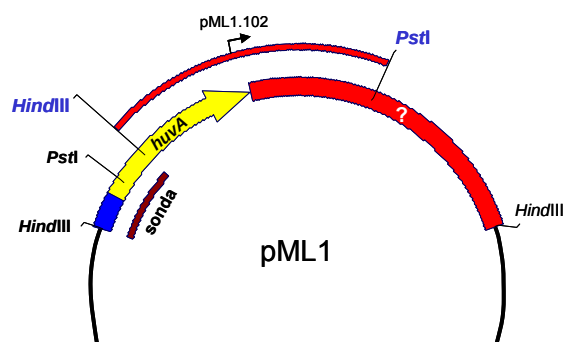


Figura IV -1: Esquema del proceso de hibridación del cósmido pML1 con la sonda *HindIII-HindIII* que incluye la región “corriente abajo” de *huva* y parte del extremo 5’ de dicho gen. A partir de esta hibridación se diseñó la digestión doble *HindIII-PstI* que facilitó la amplificación y la secuenciación de la región adyacente al extremo 3’ del receptor de grupos hemo.

Continuando con esta misma estrategia, el DNA genómico de *V. anguillarum* H775-3 se utilizó como molde para su digestión con varias combinaciones de dos enzimas de corte diferentes. Los fragmentos obtenidos se analizaron por *Southern Blot*, en este caso utilizando como sonda el producto de PCR obtenido con los cebadores pML1.102 / VA-exbB (Fig. IV-2) y utilizando las mismas condiciones de amplificación que las citadas anteriormente

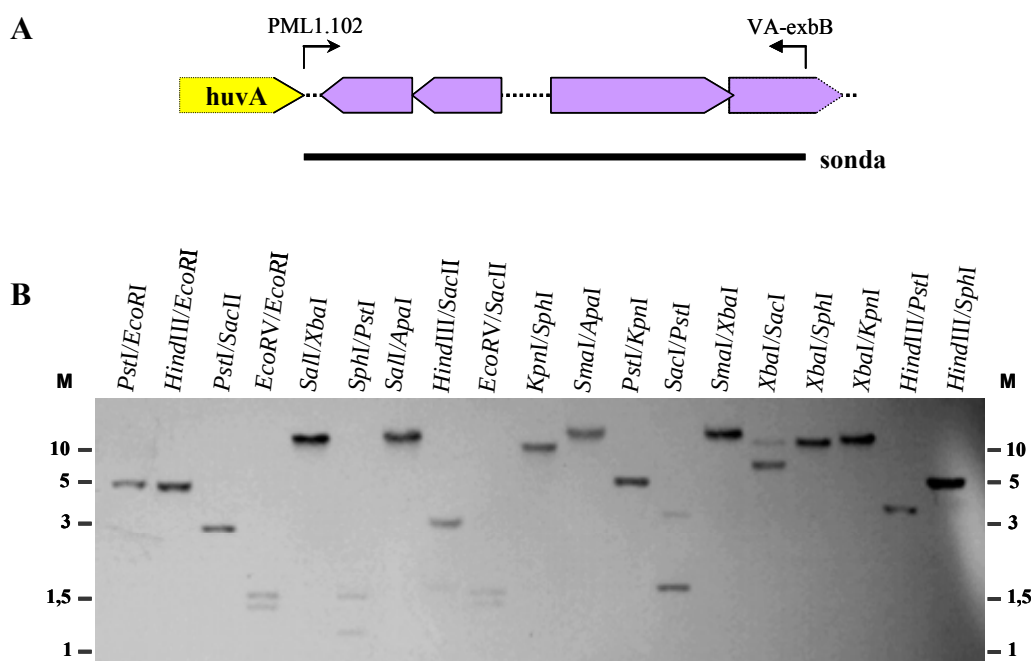


Figura IV-2: (A) Esquema del fragmento de 2,5 kb obtenido por PCR a partir de la ligación del cósmido pML1, digerido con los enzimas *HindIII/PstI*, en el vector pUC118. Las flechas indican los cebadores utilizados en la amplificación posterior de la sonda pML1.102 / VA-exbB. (B) Resultado de la hibridación de las digestiones dobles diseñadas a partir del DNA genómico de la cepa H775-3 de *V. anguillarum* con la sonda pML1.102 / VAexbB. M, marcador de peso molecular (kb).

El resultado de la hibridación se muestra en la Figura IV-2B. Aquellas combinaciones de enzimas que generaron fragmentos entre 1 y 3 kb se utilizaron para cortar el cósmido pML1 y diseñar nuevas reacciones de ligación en el vector de clonación pUC118. A su vez las reacciones se utilizaron como molde para su amplificación por PCR empleando un cebador localizado dentro de la región ya secuenciada y uno de los cebadores universales M13 (Forward o Reverse, según la orientación del inserto). De este modo se obtuvieron distintos productos de amplificación, los cuales se purificaron y se secuenciaron tal como se describe en Material y Métodos.

Simultáneamente a la secuenciación de estos productos de PCR, se trató de subclonar el inserto clonado en pML1. Para ello el cósmido se digirió con el enzima de restricción *Apa*LI y los fragmentos resultantes se clonaron en el plásmido pACYC177 (Rose, 1988). Como resultado se obtuvieron 6 clones con insertos de tamaños 0,6 kb (pCAR123), 0,9 kb (pCAR124), 1,4 kb (pCAR125), 2,6 kb (pCAR121), 5 kb (pCAR126) y 7 kb (pCAR127) (Fig. IV-3). De todos ellos, los clones pCAR121, pCAR124 y pCAR126 incluían secuencias similares a las descritas en otros sistemas de captación y transporte específico de hemo.

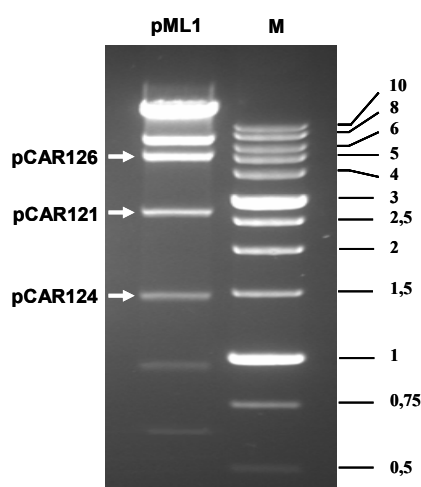


Figura IV-3: Digestión del cósmido pML1 con el enzima de restricción *Apa*LI para su subclonaje en el vector pACYC177. Los fragmentos de 1,4, 2,6 y 5 kb incluyen secuencias homólogas a sistemas de utilización de hemo y dan lugar a los plásmidos pCAR124, pCAR121 y pCAR126 respectivamente. M, marcador de peso molecular (kb).

La secuenciación de estos nuevos fragmentos y su solapamiento con las secuencias obtenidas anteriormente, permitió caracterizar la región, de aproximadamente 6.000 pb, localizada “corriente abajo” del gen *huvA*. Dentro de esta región se identificaron 8 ORFs muy próximas entre sí y con características que las relacionan con la captación y transporte de hemo, sugiriendo una organización en *cluster* para los genes identificados (Fig. IV-4). A continuación se describen más detenidamente los productos proteicos derivados de la secuencia de nucleótidos de cada una de estas nuevas ORFs.

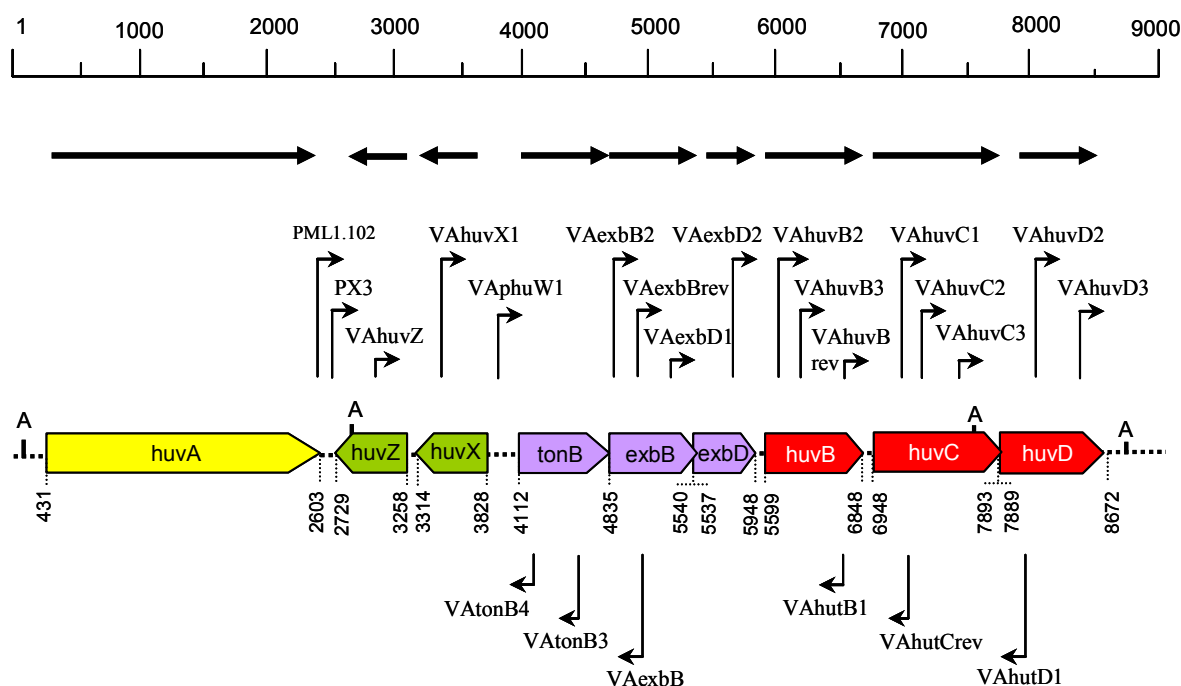


Figura IV-4: Organización genética del *cluster* de captación de hemo caracterizado en *V. anguillarum* H775-3. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Los números muestran el inicio y el final de cada gen (pb). En el esquema también se indican los cebadores empleados en las reacciones de amplificación y secuenciación. A: diana de restricción *Apa*LI.

» *huvZ*

A 125 pb del codón de parada de la traducción de *huvA*, se identificó una ORF, transcrita en sentido contrario y a la que se denominó *huvZ*. La proteína codificada, de 176 aminoácidos y 20,1 kDa, posee homología con el producto de genes asociados a sistemas de transporte de hemo. El mayor porcentaje de similitud se encontró con proteínas, de igual tamaño, incluidas dentro de los sistemas de transporte de hemo descritos para *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Chen *et al.*, 2003; Makino *et al.*, 2003; Wyckoff *et al.*, 2004). Sin embargo también existe una elevada similitud con HugZ, proteína de 185 aminoácidos perteneciente al sistema de utilización de hemo caracterizado en *P. shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001) (Fig. IV-5).

Hasta el momento no se ha podido establecer una función concreta para esta proteína dentro del proceso de transporte y utilización intracelular de hemo, según se desprende del estudio de sus correspondientes homólogos. Sin embargo en *P. shigelloides* se ha planteado la posible implicación de HugZ en la prevención de la toxicidad derivada de la molécula de hemo a través de su degradación controlando los niveles de hemo que entra en el citoplasma o

simplemente actuando como una proteína de almacenamiento (Henderson *et al.*, 2001). Por el contrario, recientemente, los estudios acerca de la proteína HutZ de *V. cholerae* han rechazado una posible actividad hemo-oxigenasa, al mismo tiempo que se le ha asignado una función como proteína de almacenamiento y asociada al incremento de la eficacia en el proceso de transporte desde la membrana hasta las hemoproteínas localizadas en el citoplasma bacteriano (Wyckoff *et al.*, 2004). Pese a los escasos datos existentes, lo que parece evidente es la participación de esta proteína en algún punto del metabolismo del grupo hemo, puesto que su mutación afecta a la capacidad de crecimiento de las células en presencia de esta molécula como fuente de hierro (Wyckoff *et al.*, 2004).

El análisis en mayor profundidad de la secuencia de la proteína HuvZ caracterizada en el presente trabajo y su comparación con diversas proteínas incluidas en las bases de datos, puso de manifiesto la similitud existente entre la secuencia que abarca los aminoácidos del R13 al L75 y proteínas de unión a flavin-mono-nucleótidos (FMN). Esta familia proteica está asociada a procesos de óxido-reducción y transporte electrónico, de modo que HuvZ también podría estar relacionada con procesos de transferencia de electrones, posiblemente a través de la participación del grupo hemo.

<i>V. anguillarum</i>	-----MDQQIKQERLQGRLEPEIQEFRQERRTLQLATVDAEGRPNVSYAPFVQNQEGYFV	55
<i>V. cholerae</i>	-----MDQQVKQERLQGRLEPEIQEFRQERKTLQLATVDAQGRPNVSYAPFVQNQEGYFV	55
<i>V. parahaemolyticus</i>	-----MDQQVKQERLQGRLEPEIQEFRQERRTLQLATVDSEGRPNVSYAPFVQNQEGYFV	55
<i>V. vulnificus</i>	-----MDQQVKQERLQGRLEPEIQEFRQERQTLQLATVDADGRPNVSYAPFVQNQEGYFV	55
<i>P. damsela</i>	-----MN-QVKQERLQSRLEPEIQEFRDSCLTQLATVDNSGQPNISYAPFVLLEDGYV	54
<i>P. shigelloides</i>	MKEDI VMTNERQERLQNRLOPEIAEFRNECRTLVLATVDADGMPNVSYAPFVQLTDGYV	60
<i>V. anguillarum</i>	LISHIARHARNLEVNPHVSLMMIADEGSSKQIFARQLTFDAVASVVPRETPLWQQVIGQ	115
<i>V. cholerae</i>	LISHIARHARNLEVNPPQVSLMMIEDETEAKQLFARKRLTFDAVASMVERDSELWCQVIAQ	115
<i>V. parahaemolyticus</i>	LISQIARHARNLLENPNVSLMMIEDEDSKQLFARKRLTFDAVATVVERDTEMMQLVVGQ	115
<i>V. vulnificus</i>	LISKIARHARNLLENPNVSLMMIEDEEGAKQLFARKRLTFDAVASVIERDTQLWHQVITQ	115
<i>P. damsela</i>	LISQIAKHARNLLENPRVSLMMIEDEKTAKVLYARKRLTFEADVEKVERESAANLIAIDG	114
<i>P. shigelloides</i>	LISEIARHARNLQQVPRTSLMMIEDESQSRQLFARKRLTFDARVEKVARDTASWQEA VAA	120
<i>V. anguillarum</i>	MQARFGETIIDGLSQLQDFALFLKVEKGLVYKGFQAYQVSGDDLVDFVHLDEGHKKISN	175
<i>V. cholerae</i>	MGERFGETIIDGLSQLQDFMLFRLQPEQGLFVKGFQAYQVSGDDLVDVHLEEGHRKISN	175
<i>V. parahaemolyticus</i>	MKARFGETIIDGLSQLQDFVLFNLKAEKGLFVKGFQAYQISGDDLVDVHLEEGHKKIEN	175
<i>V. vulnificus</i>	MEERFGETIVSGLSQLQDFVLFNLKAEKGLFVKGFQAYQVSGDDLVDVHLEEGHRKISN	175
<i>P. damsela</i>	LTNRFGETIVEGLSGLQDFVLFRLKPTHGLFVKGFQAYQVSGDDLVDVHLEEGHRRIKD	174
<i>P. shigelloides</i>	LEARHGDIIVANLSQMAFILFRMVPEQGLVYKGFQAYQVSSDDLVDVHLEEGHKT VSG	180
<i>V. anguillarum</i>	A-----	176
<i>V. cholerae</i>	G-----	176
<i>V. parahaemolyticus</i>	A-----	176
<i>V. vulnificus</i>	G-----	176
<i>P. damsela</i>	GSEIQEPSEKL	185
<i>P. shigelloides</i>	EPVKA-----	185

Figura IV-5: Secuencia de aminoácidos de la proteína HuvZ y alineamiento con proteínas homólogas identificadas en especies del género *Vibrio*, *Photobacterium damsela* y *Plesiomonas shigelloides*. La secuencia desde el residuo R13 al L75 con homología a proteínas de unión a nucleótidos de flavina está enmarcada en rojo. En la comparación de secuencias, las identidades se resaltan en negro mientras que en gris se indican los residuos similares. La búsqueda de dominios conservados dentro de la proteína HuvZ se realizó dentro de la base de datos Pfam (Protein families database of alignments and HMMs; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>).

» *huvX*

A 55 nucleótidos “corriente arriba” del codón de iniciación de *huvZ* se identificó una nueva ORF designada *huvX*. Este gen codifica una proteína de 171 aminoácidos y un peso molecular de 19,2 kDa (Fig. IV-6). Al analizar sus posibles homólogos se observó que las mayores similitudes corresponden a la proteína VCA0908 de *V. cholerae* y a la proteína VPA0428 de *V. parahaemolyticus*, ambas asociadas a sistemas de transporte de hemo.

Ninguno de los homólogos de HuvZ posee una función conocida y la secuencia, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, tampoco revela regiones conservadas que pudieran asociarse a algún tipo de función o proteína específica. Aún así, en el caso de su homólogo HugX caracterizado en *P. shigelloides*, se ha propuesto un papel similar al de HugZ, participando de algún modo en la prevención de la hemo-toxicidad (Henderson *et al.*, 2001).

<i>V. anguillarum</i>	-----MNMDLLEQKVASLLEQQPTLLPTAMAEQLNVTEFEV	36
<i>V. cholerae</i>	MYSGAYSFVQISTAAYRISITRLEKTMESLQQQVAQLLEQQPTLLPAAMAEQLNVTEFDI	60
<i>V. parahaemolyticus</i>	-----MENKMESIEQQVEVLLEQEPQLLPAAMAEERLGVTEFDV	38
<i>V. vulnificus</i>	-----MNSLQQQVAELLQEPQLLPAAMAEERLSVTETDI	34
<i>P. damsela</i>	-----MSLAEQLKVTETGEV	14
<i>P. shigelloides</i>	-----MSASTQELAAARFGVSEYQL	19
<i>V. anguillarum</i>	VQALPKEMVAIVDGAQAQSLLESILADWGMVTTIVHSFGSIFEVKAPFPKGKLGARYYNLM	96
<i>V. cholerae</i>	VHALPEEMVAVVDGSHAQTILESLPEWGPVTTIMTIAGSIFEVKAPFPKGKVGARYYNLM	120
<i>V. parahaemolyticus</i>	VAALPQEMVAISPGEQAQTILESLVGFGPVTIVHSFGSIFEVKAPFPKGKVGARYYNLM	98
<i>V. vulnificus</i>	VQSLPQDMAVLVKGLAQSIENLVDFGPVTIVHAFSGSIFEVKAPFPKGKVGARYYNLM	94
<i>P. damsela</i>	VLSFPESMVSHLPGLKLAQSIQLPQWGPVTIVHSMGSIFEVKAPFPKGKVGARYYNLM	74
<i>P. shigelloides</i>	VAALPEAMAVMAHGSWAQSLLEELTDWGLTTIVSESGSIFEVKAPFPKGKVGARYYNLM	79
<i>V. anguillarum</i>	GKEGE-LHGHLKLESIQHVALVSKPFMGRESHYFGFFSEQGDNIFFKIYLGKREKRELI	155
<i>V. cholerae</i>	GRDGE-LHGHLKLENIHVALVSKPFMGRESHYFGFFTAQGENAFKIYLGKREKRELI	179
<i>V. parahaemolyticus</i>	GREGE-LHGHLKLDNVKNIALVSKPFMGRESHYFGFFSECGSNIFKVYLGKREKRELI	157
<i>V. vulnificus</i>	GKQGE-LHGHLKLDNVVAVALVSKPFMGKESHYFGFFSASGENIFKIYLGKREKRELF	153
<i>P. damsela</i>	GRDGE-LHGHLRLDLVSDIALVSKPFMGQESYFIGFFAAQGEVFKVYLGKREKRELF	133
<i>P. shigelloides</i>	SKEGTGLHGHLLLSQVSHIALAKPFMGKASYSLOFFAANGRTMFKVYLGKREKRELF	139
<i>V. anguillarum</i>	QVARFKALQQDVHSNQ-----	171
<i>V. cholerae</i>	QVARFKAMQQQHKQ-----	193
<i>V. parahaemolyticus</i>	QVTAFRAMQAELNQ-----	171
<i>V. vulnificus</i>	QVARFKSMQNEFAQ-----	167
<i>P. damsela</i>	QIEMFKKLKQLGEDS-----	148
<i>P. shigelloides</i>	QVALFEQLRARLIAQPQPAE	160

Figura IV-6: Secuencia de aminoácidos de la proteína HuvX y alineamiento con proteínas homólogas identificadas en especies del género *Vibrio*, *Photobacterium damsela* y *Plesiomonas shigelloides*. En la comparación de secuencias, las identidades se resaltan en negro mientras que en gris se indican los residuos similares.

» Sistema TonB1: *tonB1*, *exbB1* y *exbD1*

Siguiendo con la caracterización de la secuencia adyacente, siempre en sentido 3' respecto a *huvA*, a 283 pb del codón de inicio de *huvX* se identificaron tres ORFs, cuya

transcripción mantenía la misma orientación que el receptor del sistema. Por homología con otras especies bacterianas las proteínas codificadas por estas ORFs de *V. anguillarum* se incluyen dentro de las familias TonB, ExbB y ExbD respectivamente (Bosch *et al.*, 2002; Occhino *et al.*, 1998; Perry *et al.*, 2003), por lo que los genes caracterizados se denominaron a su vez *tonB*, *exbB* y *exbD*. En general los complejos TonB tienen el propósito de transferir la energía protón-motriz generada en la membrana citoplasmática hasta la membrana externa dónde es necesaria para el transporte activo de moléculas, como pueden ser la vitamina B₁₂, complejos Fe-sideróforo o la molécula de hemo procedente de diversas hemoproteínas del hospedador (Postle y Kadner, 2003).

La secuencia de aminoácidos de los polipéptidos predichos para las tres ORFs identificadas en *V. anguillarum* tienen, aproximadamente, entre un 42 y un 50% de identidad con la proteína TonB1 de *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998), *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.*, 2003), *V. vulnificus* (Chen *et al.*, 2003) y *Photobacterium damsela* (Juiz-Río *et al.*, 2005) (números de acceso: O52042, Q9XCY6, Q7MF96 y Q76FA9, respectivamente) y valores de identidad alrededor del 60 y el 75% con sus homólogos ExbB1 (números de acceso: O52043, Q87J28, Q7MF97 y Q659V8) y ExbD1 (números de acceso: O52044, Q87J29, Q7MF98 y Q659V7) (Tabla IV-1). Por esta razón los genes de este sistema TonB asociado al transporte de hemo se denominaron *tonB1*, *exbB1* y *exbD1*.

Tabla IV-1: Porcentaje de Identidad/Similitud de los componentes del sistema TonB1 caracterizado en *V. anguillarum* y sus homólogos descritos en otras especies bacterianas

	<i>V. anguillarum</i>		
	TonB1	ExbB1	ExbD1
<i>V. cholerae</i>	49 / 73	75 / 91	72 / 92
<i>V. parahaemolyticus</i>	53 / 76	78 / 97	72 / 95
<i>V. vulnificus</i>	42 / 72	79 / 94	71 / 93
<i>P. damsela</i>	42 / 70	64 / 89	60 / 83

- **Proteína TonB1** (Fig. IV-7): En general las proteínas TonB pueden dividirse en varios dominios funcionales caracterizados por la presencia de secuencias conservadas. El gen *tonB1* identificado en *V. anguillarum* codifica una proteína de 240 aminoácidos y 26 kDa,

dentro de la cual se han podido identificar los dominios típicos que caracterizan a esta familia proteica. El primero de ellos es la región transmembrana implicada en la unión a la membrana interna de la bacteria, localizándose en la región N-terminal de la secuencia de aminoácidos y caracterizada por la presencia de los residuos S18 y H22. Éstos están considerados como esenciales para el cambio conformacional de la proteína desde un estado de baja a alta energía y mediado por la interacción de las proteínas accesorias ExbB/D.

		▼ ▼	
<i>V. anguillarum</i>	MEYHVNFTRYLVAGSLSLAIHAAILFVDDSKVFAMPAGNQSTSVSINFVAQPQA--QVV	58	
<i>V. cholerae</i>	---MNLNRYVIAGGLSLAFHALLITDEAQVFAMPAGNPTQSVSINMVSM---KVA	52	
<i>V. parahaemolyticus</i>	---MNVQRYVIAGGASLVIHAAALLFSQENKVFAMPAGNPASSVSLNLVSAPPP--TLE	54	
<i>V. vulnificus</i>	---MNLPRYLFAGSLSLMLHAAFISAKEQAVIFQTNAGSDSASVSLNLVSNPP--SSN	54	
<i>P. damsela</i>	---MDTTRYVIAGAVSVIIHGLILSAVPSQNAIAMPIGNQIAPVSLNLVTAPPPPPA	56	
<i>V. anguillarum</i>	QEAT-----KTPPEKRANKPKPAKKEPQKVQKKSLSKPVK-DKPAKPIPTK	106	
<i>V. cholerae</i>	PAQE-----QTQTEQSKPESVKPTPVQEVVKTTPAKPKVKPHKPKPQTVKVPVPAEQVP	107	
<i>V. parahaemolyticus</i>	KTPPENVPKPEQPQKQPEPEKKVVKQVVKKEAVKKKVEKKPEPIKQPKVEPTQTV	114	
<i>V. vulnificus</i>	NAVEKN-----VEPKEETKPTKPKPK-PVEPKKEVVKPKPPTPKKASLEKPVV	103	
<i>P. damsela</i>	QDVAKAEVKPKQKSVKKTQIEQKTAVKKLVKTTPIKKAKKVANKTTTKKAEQKPIVK	116	
<i>V. anguillarum</i>	-SAQVQTPVKEAVTSSVENENSAEST---PKTAAAPSSSGATNQPKLVDPASFVTRPAPP	162	
<i>V. cholerae</i>	-SKSVAKPQPEKVERTAETAQKPAPTPNQPSQPTAASQGITSQPTLVDPKALVSAQVQP	166	
<i>V. parahaemolyticus</i>	-AKQETQPKAE-PKKKIEPVKDKDTVT---QQTASASQSGKATSQPTLVDPKPTFVSQPTQP	169	
<i>V. vulnificus</i>	ENKSSTKPAESTPVEQPEPVEHKTPKGADNDKPASSASQGVSSQPTLIEKPSFMEKPVQP	163	
<i>P. damsela</i>	NRDREPVKSATKPPQSKPNQTSQVNTTNNKALLSSGTQS-PELVSRPTFATRPGVP	175	
<i>V. anguillarum</i>	VYPRLAQKRGIEGVAMYEVLWDENGRIKQVLLSSSGAALLDESALNAIKQWKFSPQVNV	222	
<i>V. cholerae</i>	RYPRIARKRGIEGTVMYEIWLDAQGNQIKQQLSSSGTEALDQSALEAIKQWKFSPHILD	226	
<i>V. parahaemolyticus</i>	RYPRSAQRRGIEGAALYEVLWDENGRIKHVLLSSSGTESLDASALRAIKQWQFTPHILG	229	
<i>V. vulnificus</i>	KYPRVAQKRGIEGTALFELWIDEQGLTQLLLITSSGAKMLDDAARKAIQWQFTPHAEN	223	
<i>P. damsela</i>	SYPRLAQRRIQGVMEIWLDPKQKQIKQKVISSSGTEILDQAALKAIKWKFSSHIVD	235	
<i>V. anguillarum</i>	GEKIAHRVQIPVRFKLEG	240	
<i>V. cholerae</i>	GVPVAHRIHIPIRFKLEG	244	
<i>V. parahaemolyticus</i>	GLKVAHRVQIPVRFKLEG	247	
<i>V. vulnificus</i>	GQKMPSRVRVPVRFSLD-	240	
<i>P. damsela</i>	GQAIHRVHIPVRFQLD-	252	

Figura IV-7: Secuencia de la proteína TonB1 caracterizada en *V. anguillarum* y alineamiento con proteínas homólogas identificadas en especies del género *Vibrio* y *Photobacterium damsela*. En la comparación de secuencias, las identidades se resaltan en negro mientras que en gris se indican los residuos similares. Las regiones correspondientes a los dominios característicos de las proteínas TonB se encuadran en rojo. Las puntas de flecha señalan los residuos conservados S18 y H22 incluidos dentro del dominio transmembrana N-terminal.

El segundo de los dominios característicos incluye una región rica en Prolinas situada entre los aminoácidos 64 y 106. Posiblemente esta región esté implicada en la extensión a través del periplasma de la proteína TonB durante el proceso de transducción de energía, para mantener el contacto con la membrana interna y externa simultáneamente. A continuación de

esta región rica en Prolinas y próximo al extremo C-terminal, se localizaría un dominio que abarca la secuencia en torno al residuo 160 y que supondría la zona de interacción entre la proteína TonB y el receptor de membrana externa para grupos hemo, HuvA. El contacto entre TonB y HuvA tendría lugar a través de la secuencia “FDEVVVS” localizada en el extremo N-terminal del receptor y caracterizada como la región *TonB-box* (Mazoy *et al.*, 2003). Finalmente la región C-terminal también constituye una región fundamental para la correcta actividad de la proteína puesto que constituye la zona de asociación con la membrana externa de la bacteria.

- **Proteínas accesorias ExbB1/ExbD1** (Fig. IV-8): Tanto ExbB como ExbD se asocian al mantenimiento de la estabilidad de la proteína TonB durante el proceso de transducción de energía, acoplado la fuerza protón-motriz a los cambios conformacionales de esta última (Ferguson y Deisenhofer, 2004). Dentro del sistema TonB1 caracterizado en el presente trabajo, ExbB1 corresponde a una proteína de 235 aminoácidos y 25,2 kDa. En base a lo que se conoce de otros homólogos se podría predecir que ExbB1 de *V. anguillarum* atraviesa tres veces la membrana citoplasmática (residuos 23-51; 118-155; 164-193), mientras que la mayor parte de su secuencia se localizaría en el espacio periplásmico. La proteína ExbD1 (136 aminoácidos y 15 kDa), por su parte, estaría anclada a la membrana interna a través de una única región transmembrana en su extremo N-terminal (posiblemente entre los residuos 12-37) y el resto de la secuencia de aminoácidos en el periplasma de la bacteria.

A

<i>V. anguillarum</i>	MELLTQLEQQLGLMAWPLFVCSALATMIITERLFQVLLSLGVGKGATGSALNQISPTNTA	60
<i>V. cholerae</i>	MESLQQLQQQLGLMAWPLFICSAITVMLLAERLFQVLLSLTVGKGAIKRALQATSPKNPK	60
<i>V. parahaemolyticus</i>	MEQLQELQTFGLMTWPLIICSALTVMIIAERLFQVFISLGVGKSAIRQHLASLDPTNSR	60
<i>V. vulnificus</i>	MQQLLELQNLGLMTWPLILCSAVTVMIVIERLIQVALSIGVGKSAIRRLSTISPTNSQ	60
<i>P. damsela</i>	MEFINQYQEQFGLMAWPLFICSLTVMILLERFIQVLLCTGVGRTKTNQILNNQRHDEQ	60
<i>V. anguillarum</i>	QTEALASEFSSKRPLLYKGVAMLLAHHDFSKGLREDAAGIWLQEKRHQLHSGRLRLSLIG	120
<i>V. cholerae</i>	QLAELTEHFASKRPVLYRGVAMLLAHHQFDKSLREDAAGIWLQEQRHOFNSGLRRLTLIG	120
<i>V. parahaemolyticus</i>	DIEALADELSGKRPLLYRGVAMLLAHHSFAKSLREDAAGMWLQEKRHQLHSGRLRLTLIG	120
<i>V. vulnificus</i>	QIEQLAQALSNGRPLLYRGVAMLLAHHDFAKSLREDAAGMWLQEKRHQLHSGRLRLTLIG	120
<i>P. damsela</i>	ALDHLAQQLQNRPLLYKGIAMLLISHRHFALREDAAGMWLQQRITQLRSGKLKLSLIG	120
<i>V. anguillarum</i>	VISPLLGLLGTVLGLIEMFKGVALSSGNITPNDLADGLGIMRTTAAGLIAPAITGAQ	180
<i>V. cholerae</i>	VISPLLGLLGTVLGLIEMFKGVAATTGSITPNVLADGLGVAMRTTAAGLIAPAVAGAQ	180
<i>V. parahaemolyticus</i>	VISPLIGLLGTVLGLIEMFKGIIVSTGNITPNDLADGLGIMRTTAAGLIAPATSGAQ	180
<i>V. vulnificus</i>	VISPLLGLLGTVLGLIEMFKGVAASSGNITPNDLAEGGLAMRTTAAGLIAPATASAQ	180
<i>P. damsela</i>	VISPLLGLLGTVLGLIDMFKGIAMTTGSVTPNDLADGLGIMQTTAAGLIAPAITGAQ	180
<i>V. anguillarum</i>	LLGVWADRVMAKLEHTLNLYVNLWLEGVSLQHDCTTKQERVAKYEDVSDNDVNAS	235
<i>V. cholerae</i>	LLSLWADRTMAKLEHTLNLYVNLWLEGMTLHADASLT---VVTPEATTENL----	228
<i>V. parahaemolyticus</i>	IIGLWADRVLAKLEHTLNLYVNLWLEGISLQHVSPKTTASVTKTAETKAS-----	230
<i>V. vulnificus</i>	LLGLWADRVMSKLEHSLNLYVNLWLEGVSLQHVSPGKHISEQNKLQVTAHD-----	230
<i>P. damsela</i>	LLGLWADSITSKLEHSLNRCNLWLEGISVTTTCDKP----VQGEALS-----	223

B

<i>V. anguillarum</i>	MIKTP-HSHS-SALMPDLTPLLDIIFIVMVFLLLTAAVKFESLDVSLPTTDSPTVSEVVK 58
<i>V. cholerae</i>	MIKSS-AKHNDGFLTPDLTPLLDIIFIVMVFLLLTASVRLSLEVALPTTDSPPVNEVVK 59
<i>V. parahaemolyticus</i>	MIKVP-QDNNRGLTPDLTPLLDIIFIVMVFLMLTAAYKLDSDVALPSTDSQAVAEVDK 59
<i>V. vulnificus</i>	MIKVP-QSHQDSGLTPDLTPLLDIIFIVMVFLMLTAAYKLESIDVNLPSDSKVVPVDK 59
<i>P. damselae</i>	MISTGNSRWQDDELSPDLTPLLDIIFIVMVFLLLTASVKIKSLNVDLPQTETQILQTSSA 60
<i>V. anguillarum</i>	QSITVNL LAHEPYWAIDGKQYIDWNNFTLALLEQSKAS-DRPIVIGADKTAEVQQLVKLL 117
<i>V. cholerae</i>	ESITVNL LAPEPYWAIDGKPYLDWHNFSLLLESVQVD-KRPVVIADQGAEVQQLVKLL 118
<i>V. parahaemolyticus</i>	QSITVNL KDEPYWAINGQTYIDWENFTLALLEESKST-DKPIVIGAECTANIQSLVQLL 118
<i>V. vulnificus</i>	QSLTINIL ANEPHWAINGQRYLDWQNFLLTEETKNS-DKPVIIGADKTADIQHLVTLL 118
<i>P. damselae</i>	DPITINIL ASEPHWALDGNQKSWAEFSTTLDEVKANPSKPVVIGAEKTASVEQMLKLL 120
<i>V. anguillarum</i>	AFLQDNGIAATQLLTDHPQ-- 136
<i>V. cholerae</i>	SFLQENGIAATQLLTEPSHS- 138
<i>V. parahaemolyticus</i>	GFLQENGIAATQLLTEESP-- 137
<i>V. vulnificus</i>	AFLQEKGIKATQLLTDQPQ-- 137
<i>P. damselae</i>	AFLQKNEIKATQLLMEEDNKA 141

Figura IV-8: Secuencia y alineamiento de las proteínas ExbB1 (A) y ExbD1 (B) caracterizadas en *V. anguillarum* con proteínas homólogas identificadas en especies del género *Vibrio* y *Photobacterium damselae*. En la comparación de secuencias las identidades se resaltan en negro mientras que en gris se indican los residuos similares. Las posibles regiones transmembrana se indican enmarcadas en rojo.

» *huvB*

A tan sólo 51 nucleótidos “corriente abajo” del codón de parada de *exbD1* se identificó una nueva ORF de 849 pb. Este gen, que recibió el nombre de *huvB*, es homólogo a genes que codifican para proteínas de unión a grupos hemo y localizadas en el espacio periplásmico. La proteína correspondiente, de 29,7 kDa (Fig. IV-9), posee una gran similitud con HutB de *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998) y HugB de *P. shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001). Ambas están implicadas en el transporte de hemo a través del periplasma, trasladando la molécula desde el receptor de membrana externa hasta un sistema de transporte ABC situado en la membrana interna de la bacteria. Por esta razón HuvB probablemente cumpla una función similar como proteína periplásmica de transporte dentro de lo que sería el mecanismo de captación y utilización de hemo caracterizado en *V. anguillarum*.

<i>V. anguillarum</i>	MT-----HKSLSHWLVAITLFI LSPWLCAQ-----ERIIS	30
<i>V. cholerae</i>	MK-----ITQSLALLLACCTSGISFAQ-----ERIVS	27
<i>V. parahaemolyticus</i>	MKNTLSPVRTALTATALLASTNLFANNAPNS-----ERVVS	37
<i>V. vulnificus</i>	MK-----KTMILGLSFALLSTALSMPLQAAQ-----ERIIS	31
<i>P. damsela</i>	MSLIKPAVPFKTVSLAVAILFGATSAYAQNND-----SRIIS	37
<i>P. shigelloides</i>	MKQMRLSRYALLACLSTPTVTLLHAAPTDSATNTHPVAASAIPTGPQSTPKIAPTRVIS	60
<i>V. anguillarum</i>	AGSAVTEILVALGAQNKLVAVDVTSEIPNDLALPKIGYHRLSAEGLLALAPTQLTGSSE	90
<i>V. cholerae</i>	AGSAVTEILVALGAQNKLVAVDVTSEVPSSNLPTVGYHRRLLAEGLLTLEPTHLIGSDE	87
<i>V. parahaemolyticus</i>	AGSAVTEILLALDAKDSLVAVDVTSTLPQGMELPDVGYHRRLLSAEGLLALSPTKLIGSDE	97
<i>V. vulnificus</i>	AGSAVTEILVALHAEQSLIAVDVTSQLPEGQQLPKIGYHRRLLSAEGLLALSPTTLIGSDE	91
<i>P. damsela</i>	AGSAITEIINALDASNLVAVDVTSQTLVDTKMPKVGYHRLSAENLMSLTPTTRIIGSNE	97
<i>P. shigelloides</i>	AGSNVTEIIVALGAGDVLVGVDSSSRLPADSKAATLGVIROLPAEGMLALRPDYVIGSDE	120
<i>V. anguillarum</i>	MGPSTLQQKKGAGVNVVVNDESTPQGLLARIDQIATLADAKPQAKALKQQVQSTIAAL	150
<i>V. cholerae</i>	MGPDTALQQLRSSGIQVNVINSSTPQGLLTRIDQIAQITHTEQHAQKLKENVQQQINAL	147
<i>V. parahaemolyticus</i>	MGPPTTLNQKKSAGVDVEIVNTEANVDGLLHRIDQIATIMNRESQAANLKQEVKTQVESL	157
<i>V. vulnificus</i>	MGPAPVLQQKSTGVDIEVVNTQANVDGLKARIDQIAAILNKPQEAQQLKSLVDQQVQSL	151
<i>P. damsela</i>	MGPSTLTILKQAGVAVDIVNSGNTVSDLSKRIEQVAQLTGHQKQANKLEQTVQHTVQTL	157
<i>P. shigelloides</i>	MAPASALTALQQAQKIPLTVLPSTTPEALKAQVTQIAALLHKEAAGQTLQTKIDQQLQL	180
<i>V. anguillarum</i>	THHQSTHK-----TPKKVLFLLIHEGRAANVAGSDTPNSITELAGAVNPAAEQVTSYKP	205
<i>V. cholerae</i>	QAKRPE-----KPKKVLFLLLHEGRAANVAGSDTPDITIGLIGAHNPASPSITSYKP	200
<i>V. parahaemolyticus</i>	QANQPAPS-----AKKKVLFLLIHEGRPANVAGLDITPDATIALAGGDNPAACKLTSYKP	212
<i>V. vulnificus</i>	KANQPT-N-----QKKKVLFLLLIHEGRAANVAGTDITPDATIALAGAINPAADKITAYKP	205
<i>P. damsela</i>	TEHRSQKKQPNFKEKVLVFMIDGRPVNVAGKGTADTVINLAGAINPAAAFVENYKP	217
<i>P. shigelloides</i>	AQTRAQLQGKQHGKPLKAVYLLLDGRPPMIAGGNTPADTLLTAGAVNPAAA-VRNYQT	239
<i>V. anguillarum</i>	LSMEAIIEMQPDVILVSGRSYEKLGGADAILQSIPTLVATPAGINKQIITIDGHALVGGI	265
<i>V. cholerae</i>	LSMESMIEMQPDMLVSGRSLEKLGGADAVLNAVPMLAATPAGQNKNIIVATIDGHALVGGI	260
<i>V. parahaemolyticus</i>	LSTEAMVEMQPDVILVSGRSYETMGGADAILKAMPLLAAATPAGQTKNIITIDRHALVGGI	272
<i>V. vulnificus</i>	LSSESVMVEMQPDVILVSGRSFEKLGGPDAILKMMPLLAAATPAGQNKQIMTIDGAALVGGI	265
<i>P. damsela</i>	ISSEAMLQMPDIILLSSRTAATIKTMPDLIKKIPVLAQTPAAQNNAFAVIDGTALIGGI	277
<i>P. shigelloides</i>	VSAESLLAMQPDLLIVSERNWT--GDADSLAKQPLLQNTPAGRNVKAVLPINGKALIGGI	297
<i>V. anguillarum</i>	GLKSLAEARLNALLYP----	282
<i>V. cholerae</i>	GLKSLQEAQRIQTLLYP----	277
<i>V. parahaemolyticus</i>	GLKSLSEAKRLNALLYP----	289
<i>V. vulnificus</i>	GLKSLAEAKRLNQLLYTQ---	283
<i>P. damsela</i>	GIHSLNEAARLSNVFYPTVNQ	298
<i>P. shigelloides</i>	GLSTLNEAARLANHLNQ---	315

Figura IV-9: Secuencia de la proteína HuvB implicada en el transporte periplásmico de la molécula de hemo y alineamiento con proteínas homólogas identificadas en especies del género *Vibrio*, *Photobacterium damsela* y *Plesiomonas shigelloides*. En la comparación de secuencias las identidades se resaltan en negro mientras que en gris se indican las similitudes.

» Sistema de transporte ABC: *huvC* y *huvD*

Finalmente se caracterizaron otros dos genes, *huvC* y *huvD*, que por homología con otras especies bacterianas codifican para proteínas incluidas dentro de la superfamilia de Sistemas de Transporte ABC (*ATP-Binding cassette*). Los miembros de esta familia proteica están implicados en el transporte específico de multitud de sustancias y comparten una serie de características comunes, tanto en su secuencia como en su estructura. Los sistemas de transporte de hemo caracterizados hasta el momento cuentan con homólogos de las proteínas HuvC y HuvD identificadas en *V. anguillarum*, de manera que el complejo proteico formado

por ambas proteínas da lugar al componente responsable del transporte final, a través de la membrana interna, de la molécula de hemo desde el periplasma hasta el citoplasma celular.

- **Proteína HuvC:** El gen *huvC* se identificó a 100 pb adyacente a *huvB* y codifica una proteína de 314 aminoácidos y 32,9 kDa (Fig. IV-10). Todas las proteínas encontradas en las bases de datos con algún grado de homología se incluyen dentro de la familia de los transportadores ABC y dentro de estos sistemas constituyen el componente transmembrana del complejo proteico, el cual forma el canal a través del cual se establece el transporte específico de solutos.

<i>V. anguillarum</i>	-----	1
<i>V. cholerae</i>	MASLSRRLRSEKSARSAAYSNSAVPLRPLVLRFPFAVTISCLTLAVFFAGLYSITVGP	60
<i>V. parahaemolyticus</i>	-----MLLRRIPLSTTLITLSGFLAFIAIASITVGP	31
<i>V. vulnificus</i>	-----MLRHIPLSICVTALLVTLSTAISSVTVGP	30
<i>P. damsela</i>	-----MGNQRLSIRSLYPIGFGLLLLAIVSSIVIGP	31
<i>P. shigelloides</i>	-----MLRLKLSLLGSSGLLLLSFMLLLSIATGP	29
<i>V. anguillarum</i>	MNISFSDSIKSLVLHSNDIAAH--INLVTHETRFPRTLCLLVGAILALCGTVMQGLFRN	58
<i>V. cholerae</i>	MNITISDSIQSLFRSEQLTNA--IHLVHDIRLPRTLCLLVGAILALCGTAMQGLFRN	118
<i>V. parahaemolyticus</i>	MNISFTDSLRLSLVGAHSELAPH--IQLVINEIRLPRTLCLLVGAILALCGVVMQGLFRN	89
<i>V. vulnificus</i>	MNISGADTLRLSLRLG-DLAPH--IDVVIQEIIRLPRTLCLLVGAILALCGVVMQGLFRN	87
<i>P. damsela</i>	MSISYSDSIKALLPWHTELPNH--ISLVINQIRLPRTLCLLVGAILALCGAVMQGLFRN	89
<i>P. shigelloides</i>	VRLPLSESLQALLSLPSHANDLSTQQLTIQIRLPRTLCLLVGAILALCGAVMQGLFRN	89
<i>V. anguillarum</i>	PLAEPGIIGVSAGSALGAALATVLFAN-----LALFSNPWMSTAVVPIFAFLGGALT	110
<i>V. cholerae</i>	PLAEPGIIGVSAGSALGAALATVLLSD-----VVS-SLPWVNSLVPIAAFIGGALT	169
<i>V. parahaemolyticus</i>	PLAEPGIIGVSAGSALGAALATVVFAN-----FSQNHQPLMNLAALPLFAFLGGALT	141
<i>V. vulnificus</i>	PLAEPGIIGVSAGSALGAALATVLSQ-----VAMLSTSIMNLAVPLIASFLGGALT	139
<i>P. damsela</i>	PLADPAIIGVTGGAGLGAALATVVFAN-----IAAQFPTILNLGAIPFAFIGGALT	141
<i>P. shigelloides</i>	PLADPAIIGVSAGSALGAALATVLSQ-----IAAQFPTILNLGAIPFAFIGGALT	149
<i>V. anguillarum</i>	TLLVYRLGTSKFGTSVTIMLAGVAISALSAGAGIYLNLYVADDQMLRDLTLWSMGSVAGA	170
<i>V. cholerae</i>	TLLVYRLGTSKFGTSVTIMLAGVAISALSAGAGIYLNLYVADDQMLRDLTLWSMGSVAGA	229
<i>V. parahaemolyticus</i>	TLLVYRLGTSKFGTSVTIMLAGVAISALSAGAGIYLNLYVADDQMLRDLTLWSMGSVAGA	201
<i>V. vulnificus</i>	TLLVYRLGTSKFGTSVTIMLAGVAISALSAGAGIYLNLYVADDQMLRDLTLWSMGSVAGA	199
<i>P. damsela</i>	TLLVYRLGTSKFGTSVTIMLAGVAISALSAGAGIYLNLYVADDQMLRDLTLWSMGSVAGA	201
<i>P. shigelloides</i>	TLLVYRLGTSKFGTSVTIMLAGVAISALSAGAGIYLNLYVADDQMLRDLTLWSMGSVAGA	209
<i>V. anguillarum</i>	NWQNILLCAVTLTLLVCFSRQAMALNALLGSEEARHLGTSVQRLKRSMILLSSALGVGV	230
<i>V. cholerae</i>	TTSSILLCAVTLTLLVCFSRQAMALNALLGSEEARHLGTSVQRLKRSMILLSSALGVGV	289
<i>V. parahaemolyticus</i>	NWAGIGLSSVTLLVLLFWFHKAMSLNALLGSEEARHLGTSVQRLKRSMILLSSALGVGV	261
<i>V. vulnificus</i>	NWGSIALAALTLLVLLFWFHKAMSLNALLGSEEARHLGTSVQRLKRSMILLSSALGVGV	259
<i>P. damsela</i>	TWGSIALAALTLLVLLFWFHKAMSLNALLGSEEARHLGTSVQRLKRSMILLSSALGVGV	261
<i>P. shigelloides</i>	RWDTLTLLVLLVLLFWFHKAMSLNALLGSEEARHLGTSVQRLKRSMILLSSALGVGV	269
<i>V. anguillarum</i>	TVSAGMIGFIGLIVPHLGRMLVGPDRHSLIPISALLGALLTLVADMFAIAVAPAEIPV	290
<i>V. cholerae</i>	AVSAGMIGFIGLIVPHLGRMLVGPDRHSLIPISALLGALLTLVADMFAIAVAPAEIPV	349
<i>V. parahaemolyticus</i>	TVSICGATGFIGLIVPHLGRMLVGPDRHSLIPISALLGALLTLVADMFAIAVAPAEIPV	321
<i>V. vulnificus</i>	TVSICGATGFIGLIVPHLGRMLVGPDRHSLIPISALLGALLTLVADMFAIAVAPAEIPV	319
<i>P. damsela</i>	TVSLTGPIGFIGLIVPHLGRMLVGPDRHSLIPISALLGALLTLVADMFAIAVAPAEIPV	321
<i>P. shigelloides</i>	SVSVSGMIGFIGLIVPHLGRMLVGPDRHSLIPISALLGALLTLVADMFAIAVAPAEIPV	329
<i>V. anguillarum</i>	GIVTALVGAPFFLYLLFQQKGKVF	314
<i>V. cholerae</i>	GIVTALVGAPFFLYLLFQQKGRIF	373
<i>V. parahaemolyticus</i>	GIVTALVGAPFFLYLLFQQKGKIL	345
<i>V. vulnificus</i>	GIVTALVGAPFFLYLLFQQKGRIL	343
<i>P. damsela</i>	GIVTALVGAPFFLYLLFQQKGRMA	345
<i>P. shigelloides</i>	GIVTALVGAPFFLYLLFQQKRSAA	353

Figura IV-10: Secuencia de aminoácidos de la proteína HuvC y alineamiento con proteínas homólogas identificadas en especies del género *Vibrio*, *Photobacterium damsela* y *Plesiomonas shigelloides*. En la comparación de secuencias, las identidades se resaltan en negro mientras que en gris se indican las similitudes. Los dominios conservados HemU-53 “EIRFPRTLCLLVGAILALCGTVMQGLFRNP”, HemU-150 “LAGVAISALS”, HemU-255 “GMIGFIGLIVPH” y la secuencia consenso característica de los dominios transmembrana de los sistemas ABC “EARHLG”, se indican enmarcadas en rojo.

El mayor porcentaje de similitud correspondió a las proteínas HutC de *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998) y HugC de *P. shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001), en ambos casos asociados al transporte de la molécula de hemo. En el análisis con el algoritmo FASTA, también se obtuvo correspondencia con proteínas incluidas en el proyecto genoma de *V. vulnificus* (Chen *et al.*, 2003) y *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.*, 2003). La localización de los genes que codifican para dichas proteínas da idea de su relación con sistemas de transporte de hemo y sus correspondientes sistemas TonB de transducción de energía. Además de la relación de homología, la asignación de la proteína HuvC como parte de un sistema de transporte ABC se apoya en la caracterización de la secuencia consenso EARHLG próxima a su región C-terminal así como otras regiones conservadas y representativas de esta familia proteica (Fig. IV-10).

- **Proteína HuvD:** La última ORF con relación a sistemas de captación y transporte de grupos hemo identificada en *V. anguillarum*, se denominó HuvD. En este caso, la proteína codificada (Fig. IV-11) posee homología con la subunidad ATPasa de los sistemas de transporte ABC asociados al transporte de hemo en *V. cholerae* y *P. shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001; Occhino *et al.*, 1998), de modo que, muy posiblemente, HuvD cumpla la misma función dentro del sistema de transporte caracterizado en *V. anguillarum*. Las subunidades ATPasa específicas para el transporte de hemo comparten una similitud en su secuencia de aminoácidos de entre el 40% y el 90%, y se caracterizan por secuencias altamente conservadas típicas de proteínas con función ATPasa (Stojiljkovic y Perkins-Balding, 2002). HuvD también presenta cierta homología con proteínas de unión a ATP de *E. coli* e implicadas en el transporte de citrato férrico (FecE) y ferricromo (FhuC) (Coulton *et al.*, 1987; Staudenmaier *et al.*, 1989).

Según la secuencia obtenida a partir de la cepa H775-3 de *V. anguillarum*, la traducción del gen *huvD* a partir del primer codón ATG de la ORF origina una proteína de 199 aminoácidos. Esta secuencia es significativamente más corta que la establecida para sus homólogos HutD (259 aa.) y HugD (262 aa.). Sin embargo a 183 pb “corriente arriba” de este codón Met se localiza un triplete TTG (Leu), que a su vez solapa con el codón de terminación de *huvC*. Pese a que esta situación es poco frecuente en procariotas, se ha establecido la posibilidad de un inicio del proceso de traducción a partir del aminoácido Leucina codificado por el triplete TTG en vez del ATG que codifica para la Metionina habitual (Gualerzi y Pon, 1990; Torarinsson *et al.*, 2005). Si este fuera el caso de *huvD*, la proteína codificada tendría un tamaño más próximo al de sus homólogos (260 aa. y 28,5 kDa).

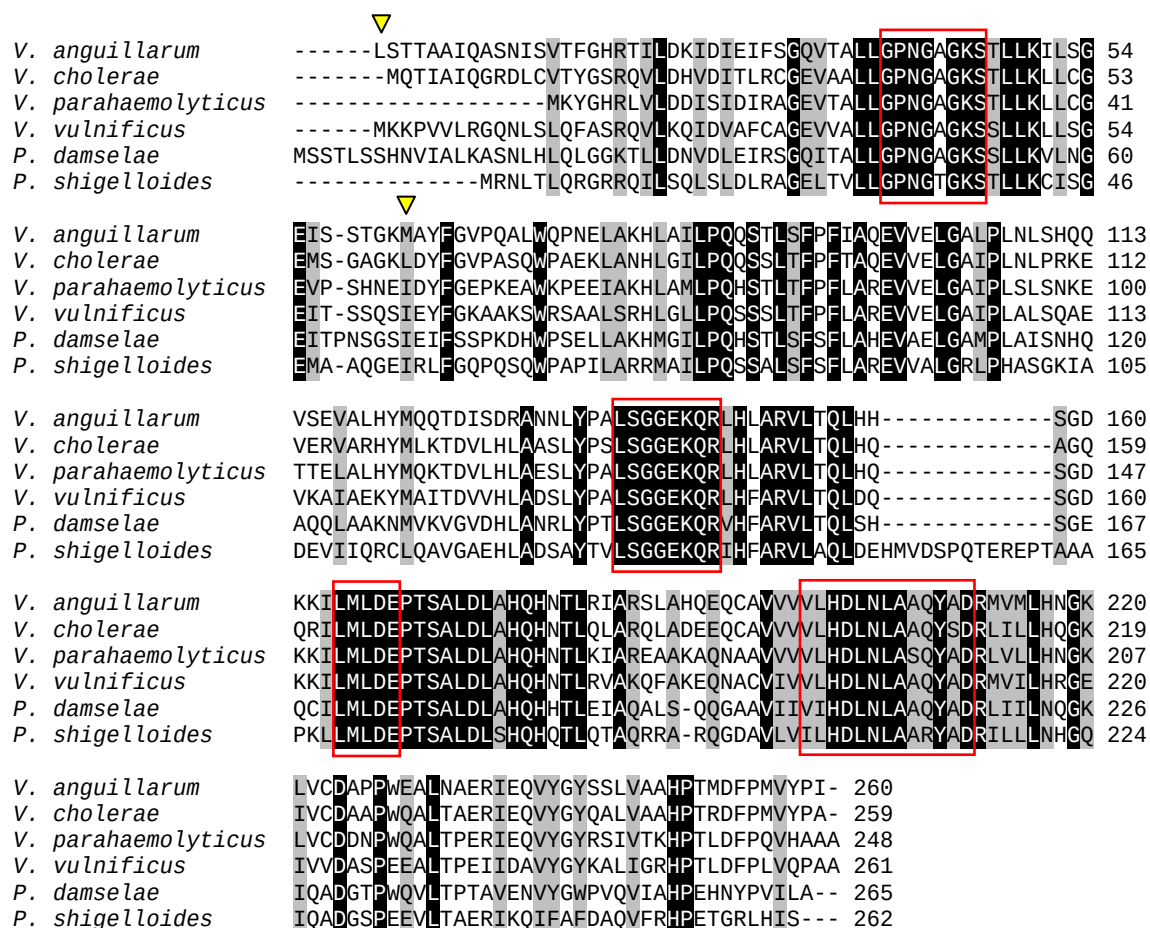


Figura IV-11: Secuencia de la proteína HuvD y alineamiento con proteínas homólogas identificadas en especies del género *Vibrio*, *Photobacterium damsela* y *Plesiomonas shigelloides*. En la comparación de secuencias, las identidades se resaltan en negro mientras que en gris se indican las similitudes. Las secuencias consenso Walker A, Walker B, la región C y la secuencia conservada “VLHDLNLAAQYAD”, todas ellas características de los dominios ATPasa de los complejos transportadores ABC. Las puntas de flecha señalan la primera Metionina de la secuencia de aminoácidos y la Leucina codificada por el codón TTG que constituiría el punto de inicio de la traducción de la proteína.

A partir del análisis de la secuencia de aminoácidos y su comparación con proteínas homólogas (Fig. IV-11) se identificaron las siguientes secuencias características de la subunidad ATPasa de los transportadores ABC:

- Secuencia consenso Walker A “GPNGAGKS” (residuos 39-46) y secuencia Walker B “LMLDE” (aminoácidos 164-168). Ambas están implicadas en la unión del fosfato del ATP y un ión Mg^{+2} , respectivamente. La región que engloba a estas secuencias está altamente conservada y se denomina “ATP binding site” (Walker *et al.*, 1982).

- Secuencia señal de transportadores ABC o región C, “LSGG EKQR”. Abarca las posiciones 138-145 de HuvD y se considera fundamental para el proceso de transporte, aunque todavía no se ha establecido su papel exacto.
- Secuencia “VLHDLNLAAQYAD” entre las posiciones 199 y 211. Esta región, aunque es esencial para el transporte, no está implicada en la unión de ATP y es característica de este tipo de transportadores.

De las secuencias obtenidas a partir de las regiones adyacentes a *huvA* y *huvD*, en sentido 5' y 3' respectivamente, no se obtuvo ninguna ORF con relación a sistemas de captación o transporte de hemo, de modo que no se consideraron como parte del *cluster* génico caracterizado e implicado en la utilización de esta molécula en *V. anguillarum*.

1.2 Similitud con otros sistemas de captación de hemo

Las funciones de las ORFs caracterizadas en el presente trabajo y que forman el supuesto sistema de captación y transporte de hemo de *V. anguillarum*, se asignaron en base a su homología con genes identificados en otras especies bacterianas y cuyas funciones habían sido previamente establecidas. En todos los casos, los mayores porcentajes de similitud se obtuvieron con especies del género *Vibrio* (Chen *et al.*, 2003; Makino *et al.*, 2003; Occhino *et al.*, 1998), *Photobacterium damsela* (Juiz-Río *et al.*, 2005) y *Plesiomonas shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001) (Tabla IV-2a, 2b).

Tabla IV-2a: Porcentaje de similitud entre las secuencias de nucleótidos de los genes caracterizados en el sistema de captación y transporte de grupos hemo de *V. anguillarum* y sus homólogos en otras especies bacterianas

	<i>V. anguillarum</i>								
	<i>huvA</i>	<i>huvZ</i>	<i>huvX</i>	<i>tonB1</i>	<i>exbB1</i>	<i>exbD1</i>	<i>huvB</i>	<i>huvC</i>	<i>huvD</i>
<i>V. cholerae</i>	67	74	71	61	67	68	64	67	68
<i>V. parahaemolyticus</i>	66	73	67	61	69	68	65	66	65
<i>V. vulnificus</i>	69	75	69	55	69	65	65	69	63
<i>P. damsela</i>	63	62,	65	57	66	60	58	63	60
<i>P. shigelloides</i>	54	65	59	47	57	59	44	63	61

Tabla IV-2b: Porcentaje de Identidad/Similitud entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por el *cluster* de captación y transporte de grupos hemo de *V. anguillarum* y sus homólogos descritos en otras especies bacterianas.

	<i>V. anguillarum</i>								
	HuvA	HuvZ	HuvX	TonB	ExbB	ExbD	HuvB	HuvC	HuvD
<i>V. cholerae</i>	53 / 78	83 / 94	78 / 94	49 / 73	75 / 91	72 / 92	67 / 91	76 / 95	72 / 90
<i>V. parahaemolyticus</i>	52 / 81	82 / 95	74 / 92	53 / 76	78 / 97	72 / 95	65 / 86	74 / 92	72 / 91
<i>V. vulnificus</i>	64 / 88	81 / 95	72 / 93	42 / 72	79 / 94	71 / 94	66 / 86	75 / 92	60 / 84
<i>P. damsela</i>	34 / 68	63 / 87	63 / 87	42 / 70	64 / 89	60 / 83	54 / 79	64 / 89	56 / 84
<i>P. shigelloides</i>	26 / 41	64 / 86	52 / 83	33 / 59	49 / 81	45 / 78	44 / 72	62 / 86	46 / 66

Asimismo, la organización espacial de estos genes en el cromosoma de *V. anguillarum* resultó similar a la descrita en estas otras especies, tal como se muestra en la Figura IV-12. En todos los sistemas comparados, los genes se encuentran asociados en una región concreta del genoma formando un *cluster*. La excepción la constituye el gen que codifica el receptor de membrana externa, el cual no siempre se localiza en la misma región cromosómica que el resto de componentes del sistema. De hecho en las tres especies de vibrio analizadas los genes que codifican este receptor están localizados en regiones muy alejadas del *cluster* que incluye a los demás genes asociados al transporte de hemo. *V. anguillarum* constituye el único ejemplo en el que el receptor de membrana externa está asociado al resto de genes transportadores.

Otra diferencia entre el sistema de transporte caracterizado en *V. anguillarum* y sistemas homólogos previamente descritos, se encuentra en la región “corriente arriba” a *huvX*. En esta zona del DNA, tanto en las especies *Vibrio* como en *P. damsela* o *P. shigelloides* se ha caracterizado un gen (denominado *hutW*, *hupW*, *phuW* o *hugW* según la especie bacteriana), que se transcribe en la misma dirección que los homólogos de *huvX* y *huvZ*. Sin embargo en el caso de *V. anguillarum* no está presente en ningún punto de la región génica secuenciada. Este gen codifica una supuesta coproporfirinógeno oxidasa, un enzima que participa en uno de los pasos de la ruta biosintética de síntesis de hemo convirtiendo el coproporfirinógeno III en protoporfirina IX (Panek y O'Brian, 2002). Al no tener una función directamente relacionada con la utilización del hemo exógeno, es muy posible que *V.*

anguillarum posea un homólogo de este gen en algún otro punto del genoma diferente a la región descrita en el presente trabajo.

Finalmente en *V. vulnificus* también se ha descrito otro gen, *hupR*, asociado al receptor de membrana externa de hemo, *hupA*. El gen *hupR* ha sido caracterizado como miembro de la familia de activadores transcripcionales LysR y responsable de la regulación de la expresión de *hupA* (Litwin y Quackenbush, 2001). Dentro de la secuencia adyacente a los genes *hutA* de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* también se han identificado genes homólogos a este regulador. Sin embargo en *V. anguillarum* la secuencia que se encuentra inmediatamente “corriente arriba” del receptor *huvA* no codifica para ningún homólogo de *hupR*. Este tipo de proteínas reguladoras del tipo LysR también pueden actuar sobre genes localizados en otros puntos del genoma (Schell, 1993), de modo que no se puede descartar la existencia de un homólogo que actúe en *trans* regulando a nivel transcripcional la expresión de uno o más genes del sistema descrito en *V. anguillarum*.

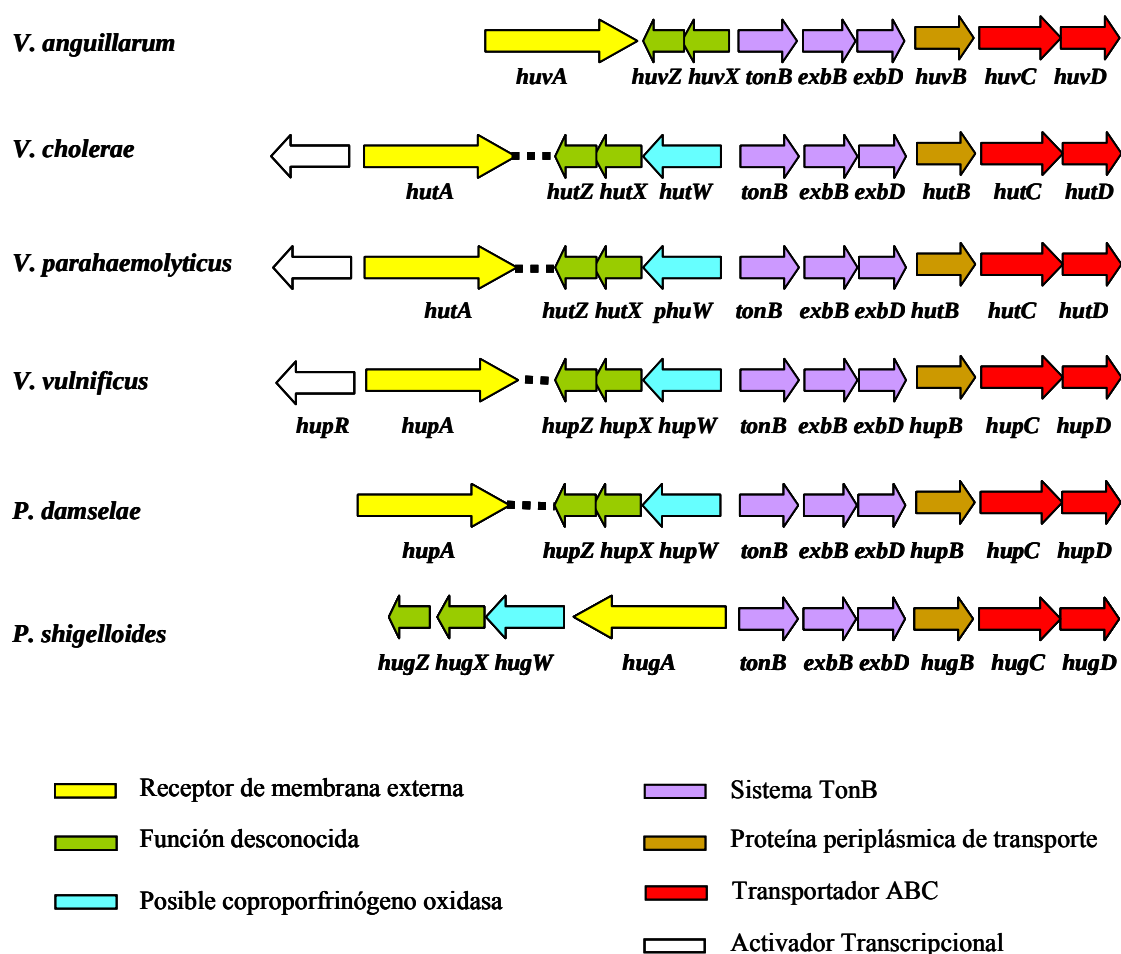


Figura IV-12: Comparación de la organización genética del sistema de captación de hemo caracterizado en *V. anguillarum* y de los sistemas homólogos descritos en otras especies del género *Vibrio*, *Photobacterium damsela* y *Plesiomonas shigelloides*.

2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES RELACIONADOS CON LA CAPTACIÓN DE HEMO EN *V. anguillarum*

2.1 Análisis de los genes *huvA*, *huvZ*, *huvX*, *huvB*, *huvC* y *huvD*

2.1.1 Construcción de mutantes cromosómicos

Para poder evaluar individualmente la importancia de cada uno de los genes descritos en el apartado anterior en la utilización de hemina o hemoglobina como fuentes de hierro, los genes *huvA*, *huvZ*, *huvX*, *huvB*, *huvC* y *huvD* se deleccionaron siguiendo el protocolo de mutagénesis por intercambio alélico descrito en Material y Métodos. Estas delecciones conservan las pautas de lectura iniciales de cada una de las ORFs evitando, así, posibles efectos polares derivados del proceso de mutación. Además de los mutantes génicos individuales, se diseñó un mutante del sistema génico completo en el que se eliminó toda la secuencia comprendida entre los genes *huvA* y *huvD*.

Todos los mutantes fueron contruidos a partir de la cepa H775-3 de *V. anguillarum* considerada, por tanto, como la cepa parental. Ésta procede a su vez de la cepa 775 y es incapaz de sintetizar el sideróforo anguibactina tras haber perdido el plásmido pJM1 que codifica una parte de los genes implicados en su biosíntesis y transporte. De esta forma se suprime la posibilidad de crecimiento residual resultante de la captación de hierro mediada por la anguibactina y las posibles interacciones con el plásmido pJM1.

Debido a que la probabilidad de recombinación está directamente relacionada con el tamaño de las secuencias homólogas, los fragmentos de DNA amplificados y clonados en el vector pNidKan incluyeron, aproximadamente, 1.000 pb de las regiones 5' y 3' adyacentes a los extremos carboxi- y amino-terminal, respectivamente, de la ORF a mutar (Fig. IV-13A). La construcción se transfirió por conjugación a la cepa H775-3 de *V. anguillarum* y tras un primer evento de recombinación el plásmido se insertó en el cromosoma de la bacteria. Tras el segundo proceso de recombinación, las colonias obtenidas en el medio de selección (LBA con sacarosa 10% + Ampicilina; Material y Métodos) se analizaron tanto por PCR como por *Southern Blot* para confirmar la sustitución cromosómica del gen salvaje por la copia deleccionada.

En el análisis por PCR se emplearon los cebadores A y D específicos de cada uno de los genes a mutar y correspondientes a los extremos 5' y 3' utilizados en la construcción del alelo deleccionado (Fig. IV-13A). Los fragmentos obtenidos se analizaron por electroforesis

en geles de agarosa y en todos los casos se incluyó como control positivo la cepa parental H775-3 (Fig. IV-13B).

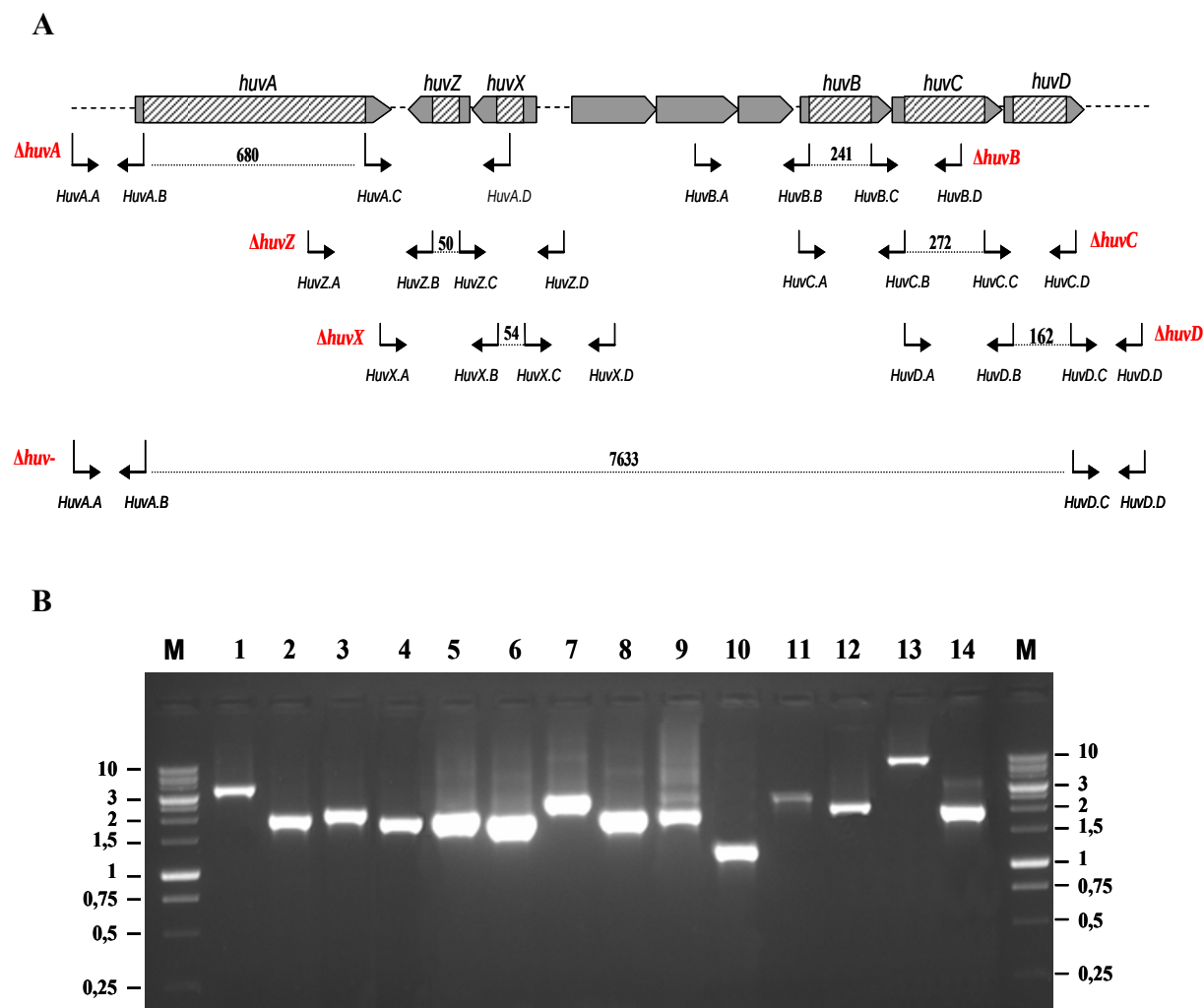


Figura IV-13: (A) Esquema del diseño de las mutaciones cromosómicas de los genes *huvA*, *huvX*, *huvZ*, *huvB*, *huvC*, *huvD* y la mutación del sistema de captación y transporte de hemo completo (*huv-*). Las flechas indican los cebadores y las regiones amplificadas en la construcción de los plásmidos de recombinación. Las regiones rayadas dentro de cada gen, así como los números indicados entre las regiones de amplificación, representan el tamaño de la delección. (B) PCR de confirmación de los mutantes cromosómicos derivados de la cepa H775-3 de *V. anguillarum*. Las líneas 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 muestran el alelo salvaje de cada uno de los genes mutados. Las líneas 2 ($\Delta huvA$); 4 ($\Delta huvX$); 6 ($\Delta huvZ$); 8 ($\Delta huvB$); 10 ($\Delta huvC$); 12 ($\Delta huvD$); y 14 ($\Delta huv-$) corresponden a las cepas mutantes. M, marcador de peso molecular (kb).

Las colonias en las que el tamaño del fragmento de amplificación fue igual al esperado en la copia deleccionada de cada gen, fueron seleccionadas como mutantes y sometidas a una segunda confirmación mediante hibridación DNA-DNA. En este caso, para poder diferenciar entre el gen deleccionado y el salvaje, el DNA genómico de estas cepas se trató con endonucleasas de restricción que presentaban una única diana dentro de la región deleccionada. Al mismo tiempo se diseñaron sondas específicas para cada uno de los

mutantes, obtenidas mediante amplificación por PCR utilizando como molde la cepa H775-3, e incluyendo toda la secuencia del gen (Fig. IV-14A). La delección de la zona intermedia de la secuencia de la ORF y, por tanto, la pérdida de la diana de restricción, conlleva la hibridación con un único fragmento de DNA. Por el contrario, la digestión del alelo salvaje con este enzima de restricción específico origina dos fragmentos, de distinto tamaño y capaces de unirse a la misma sonda, lo que se traduce en la detección de dos señales de hibridación. Los enzimas empleados en las digestiones del DNA genómico fueron: *Bam*HI para la confirmación del mutante *huvA* y del mutante del sistema completo; *Bss*HI para el mutante de *huvX*; *Pml*II para *huvZ*; *Cla*I para el gen *huvB*; *Kpn*I para el mutante *huvC*; y *Eco*RV para la confirmación de la delección de *huvD* (Fig. IV-14B).

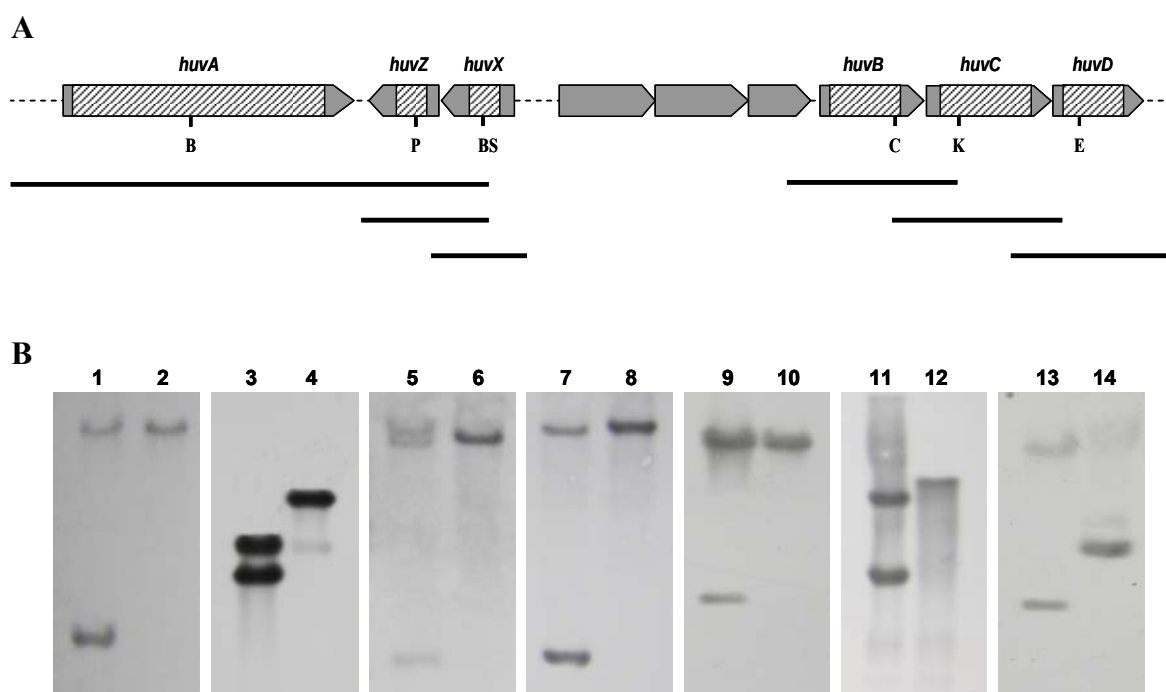


Figura IV-14: (A) Esquema de las sondas utilizadas en la hibridación DNA-DNA para la confirmación de los mutantes cromosómicos del sistema de captación y transporte de hemo caracterizado en *V. anguillarum*. B, *Bam*HI; P, *Pml*II; BS, *Bss*HI; C, *Cla*I; K, *Kpn*I; E, *Eco*RV. (B) Resultado de *Southern Blot*. Las líneas 2 (Δ *huvA*), 4 (Δ *huvX*), 6 (Δ *huvZ*), 8 (Δ *huvB*), 10 (Δ *huvC*), 12 (Δ *huvD*) y 14 (Δ *huv*-) corresponden a las cepas mutantes.

Las cepas confirmadas y utilizadas en los análisis posteriores fueron:

-B111: Mutante Δ *huvZ* por delección de la secuencia codificante para los aminoácidos 76-126 de la proteína HuvZ.

-B106: Mutante Δ *huvX* por delección de la secuencia codificante para los aminoácidos 90-144 de la proteína HuvX.

- B117**: Mutante $\Delta huvC$ por delección de la secuencia codificante para los aminoácidos 19-291 de la proteína HuvC.
- B128**: Mutante $\Delta huvB$ por delección de la secuencia codificante para los aminoácidos 18-259 de la proteína HuvB.
- B122**: Mutante $\Delta huvD$ por delección de la secuencia codificante para los aminoácidos 183-345 de la proteína HuvD.
- B146**: Mutante $\Delta huvA$ por delección de la secuencia codificante para los aminoácidos 178-698 de la proteína HuvA.
- B154**: Mutante del sistema completo Δhuv por delección de la secuencia codificante entre los aminoácidos 178 de la proteína HuvA y el aminoácido 345 de HuvD.

2.1.2 Utilización de compuestos de hemo como fuentes de hierro

Cada uno de los mutantes descritos en el apartado anterior se ensayó para determinar su capacidad de crecimiento utilizando hemina y hemoglobina como únicas fuentes de hierro. Para alcanzar las condiciones limitantes, en las que la única fuente de hierro disponible sea la constituida por el suplemento de compuestos de hemo, todos los experimentos se llevaron a cabo en medio mínimo CM9 suplementado con el quelante de hierro libre 2,2'-dipiridil.

Previamente, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para este agente quelante, para lo cual se ensayó el crecimiento de las cepas H775-3, B111 y B117 en medio líquido y en presencia de distintas concentraciones de 2,2'-dipiridil. Al mismo tiempo, estas cepas se ensayaron en una segunda serie suplementada con hemina 10 μ M, de manera que ésta constituyese la única fuente de hierro disponible para la bacteria. Tras una incubación de 24 horas se procedió a la determinación de la densidad óptica a 600 nm e interpretación de los resultados (Fig. IV-15).

De los resultados obtenidos se dedujo el posible efecto tóxico del 2,2'-dipiridil, ya que la capacidad de crecimiento de *V. anguillarum* se vio fuertemente reducida (hasta un 80%) incluso con el suplemento de una fuente externa de hierro como la hemina (Fig. IV-15B). Sin embargo este efecto no influye en el análisis comparativo de crecimiento entre la cepa parental y los mutantes ya que todas se vieron afectadas por igual. Teniendo en cuenta esta observación, se eligió como CMI la concentración de 2,2'-dipiridil 100 μ M. Con esta concentración de quelante ninguna cepa presentó crecimiento, al mismo tiempo que la adición

de una fuente externa de hierro permitió establecer claras diferencias entre la cepa parental y sus respectivos mutantes.

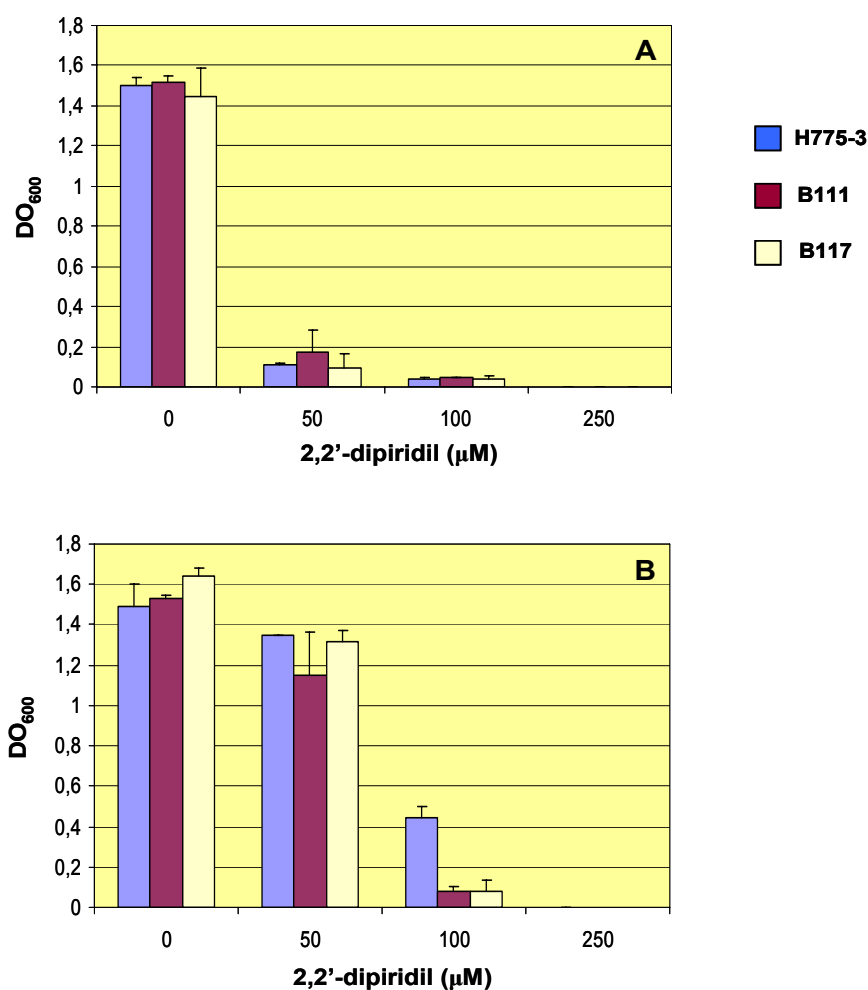


Figura IV-15: Determinación de la CMI de la cepa salvaje H775-3 y las cepas mutantes B111 ($\Delta huvZ$) y B117 ($\Delta huvC$) para el quelante de hierro libre 2,2'-dipiridil. (A) Crecimiento en CM9 con concentraciones crecientes de la sustancia quelante (0, 50 μ M, 100 μ M y 250 μ M). (B) Crecimiento en CM9 con concentraciones crecientes de la sustancia quelante + Hemina (10 μ M).

Una vez establecida la concentración del quelante de hierro libre a utilizar, se iniciaron los ensayos de utilización de hemina o hemoglobina como fuentes de hierro. Para descartar cualquier tipo de crecimiento residual derivado del inóculo, en un primer momento se analizó el crecimiento de las cepas resultado de la mutación individual de los genes *huvA*, *huvZ*, *huvX*, *huvB*, *huvC* y *huvD*, así como el mutante del sistema génico completo, en medio CM9 suplementado sólo con 2,2'-dipiridil (100 μ M). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura IV-16 y confirman la ausencia de crecimiento bajo las condiciones limitantes de hierro ensayadas.

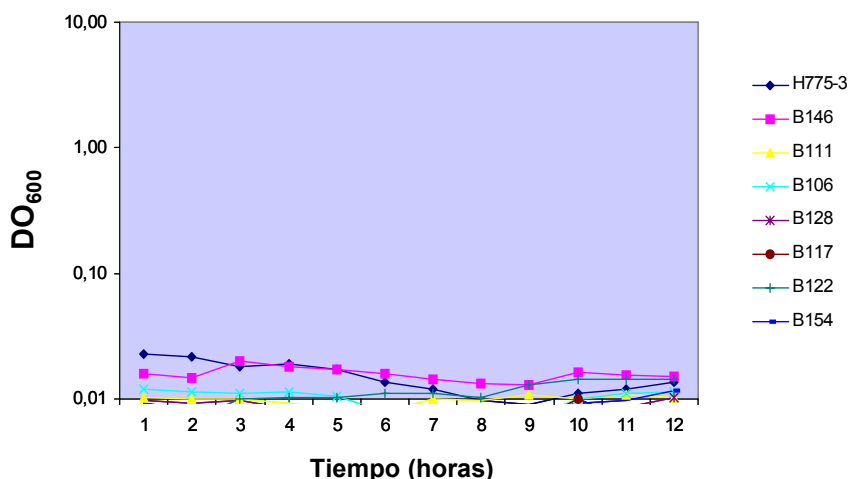


Figura IV-16: Ensayo de crecimiento de la cepa salvaje H775-3 y sus correspondientes mutantes en condiciones de limitación de hierro (CM9 + 2,2'-dipiridil 100 μ M).

2.1.2.1 Utilización de Hemina

Para determinar el efecto de cada una de las mutaciones en la capacidad de utilización de la hemina como fuente de hierro, la cepa salvaje H775-3 de *V. anguillarum* así como sus correspondientes mutantes, se ensayaron en medio mínimo CM9 suplementado con Hemina (10 μ M) y en medio CM9 suplementado con 2,2'-dipiridil (100 μ M) + Hemina (10 μ M).

En la primera de las condiciones, el hierro disponible, tanto en forma libre como asociado a la molécula de hemina, es suficiente para facilitar el crecimiento normal de la bacteria. Según los resultados obtenidos (Fig. IV-17A) no existen diferencias significativas en el crecimiento de las cepas ensayadas y los mutantes alcanzaron niveles de crecimiento similares a los de la cepa parental, pudiéndose deducir que dichas mutaciones no tienen efecto sobre la viabilidad de las células en condiciones normales.

Por otra parte el ensayo bajo condiciones limitantes en las que la hemina constituye la única fuente de hierro disponible, permite comprobar si alguna de las mutaciones generadas afecta a la captación, transporte o procesamiento de la molécula de hemo, ya que la bacteria sería incapaz de crecer bajo estas nuevas condiciones. Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos (Fig. IV-17B) mostraron que apenas existían diferencias entre el crecimiento de la cepa B106 (correspondiente a la mutación de *huvX*) y la cepa parental H775-3. Por el contrario la mutación de cualquiera de los genes *huvA*, *huvZ*, *huvB*, *huvC* o *huvD* provocó una caída del crecimiento bacteriano hasta niveles mínimos. En el caso del

mutante de todo el sistema (B154), tal como era de esperar, su capacidad de crecimiento con hemina como única fuente de hierro también se vio muy afectada, alcanzándose niveles comparables a los observados en los mutantes de cada uno de los genes anteriores.

Por todo ello se puede concluir que el gen *huvX* parece no ser esencial para la utilización de la molécula de hemina como fuente de hierro. Sin embargo el resto de los genes del *cluster* son fundamentales para dicha función, de modo que su mutación bloquea la capacidad de utilización de hemina y en consecuencia impide el crecimiento normal de la bacteria bajo las condiciones ensayadas.

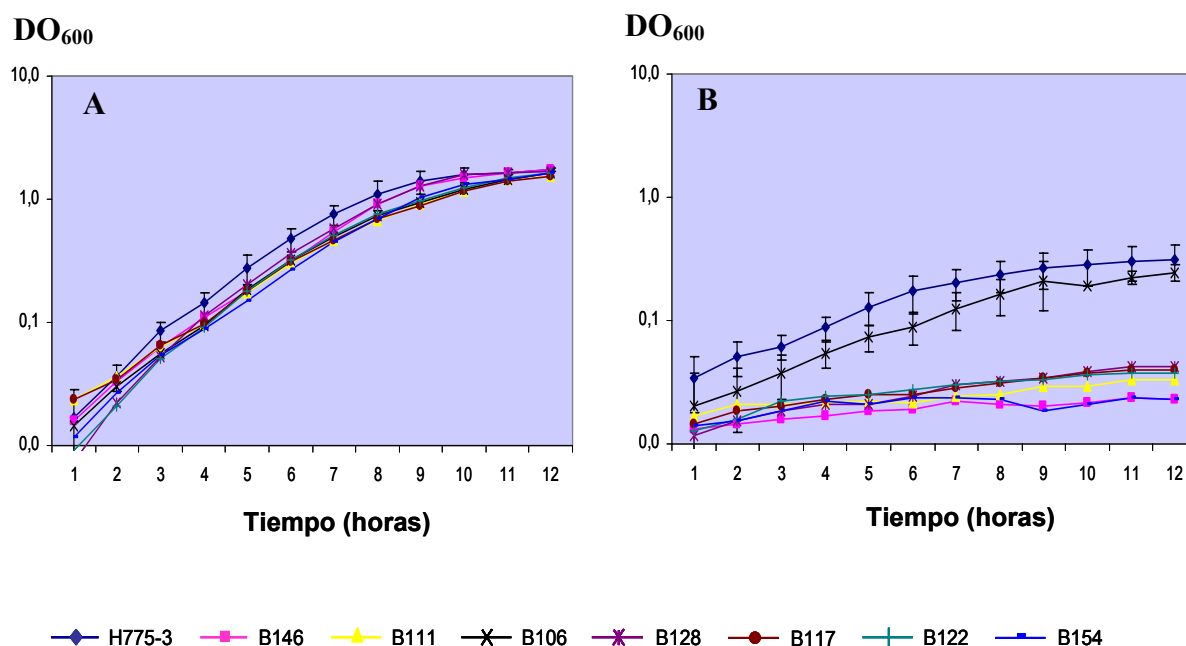


Figura IV-17: Curvas de crecimiento de la cepa salvaje H775-3 y los mutantes cromosómicos del sistema de captación y transporte de hemo B146 ($\Delta huvA$), B111($\Delta huvZ$), B106($\Delta huvX$), B128 ($\Delta huvB$), B117 ($\Delta huvC$), B122 ($\Delta huvD$) y B154 (Δhuv -). (A) Medio control (CM9 + Hemina 10 µM). (B) Medio CM9 + 2,2'-dipiridil (100 µM) + Hemina (10 µM).

2.1.2.2 Utilización de Hemoglobina

En este caso las condiciones de crecimiento fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior, sustituyendo el suplemento de hemina por hemoglobina a una concentración final de 1 µM.

Los resultados de los ensayos fueron similares a los obtenidos en los experimentos anteriores y confirman la participación del sistema génico descrito en la utilización de la hemoglobina como fuente de hierro (Fig. IV-18A, 18B). Bajo estas condiciones, los niveles

de crecimiento de los mutantes B146, B111, B128, B117, B122 y B154 se ven drásticamente reducidos frente a los niveles normales alcanzados por la cepa parental. Por otra parte, al igual que ocurría en los ensayos con hemina, el gen *huvX* tampoco resulta crucial para la utilización del grupo hemo asociado a esta hemoproteína.

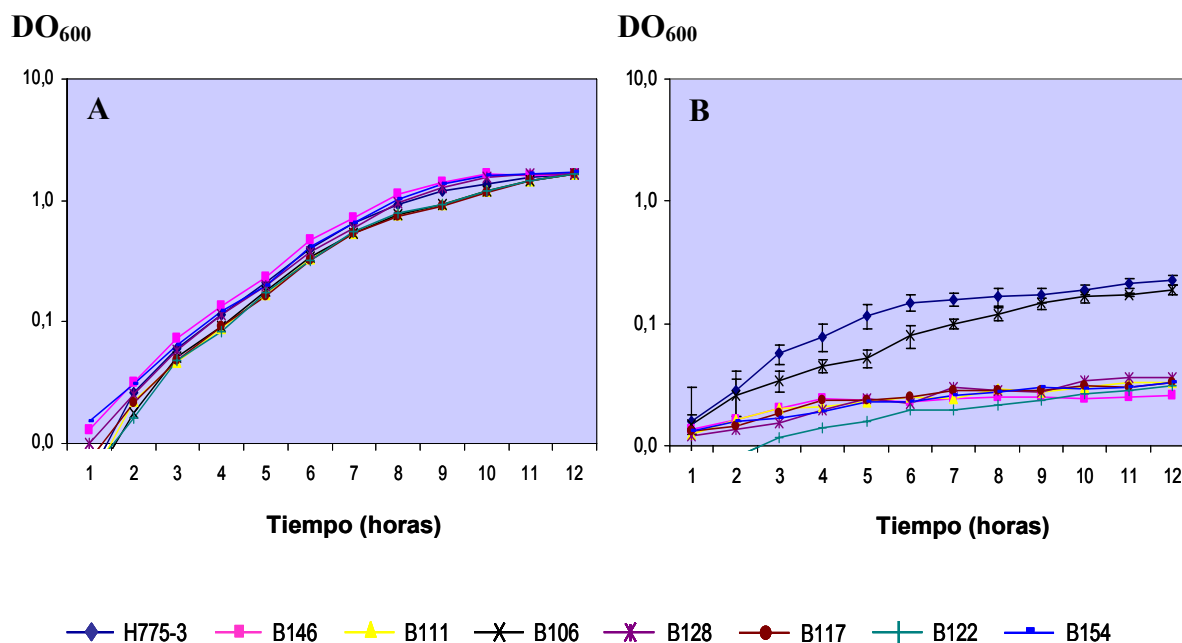


Figura IV-18: Curvas de crecimiento de la cepa salvaje H775-3 y los mutantes cromosómicos del sistema de captación y transporte de hemo B146 ($\Delta huvA$), B111($\Delta huvZ$), B106($\Delta huvX$), B128 ($\Delta huvB$), B117 ($\Delta huvC$), B122 ($\Delta huvD$) y B154 (Δhuv -). (A) Medio control (CM9 + Hemoglobina 1 µM). (B) Medio CM9 + 2,2'-dipiridil (100 µM) + Hemoglobina (1 µM).

2.2 Análisis funcional del sistema de utilización de hemo de *V. anguillarum* en *E. coli*

Tal como se demostró anteriormente, el sistema génico descrito en *V. anguillarum* es fundamental para el crecimiento del microorganismo cuando el grupo hemo constituye la única fuente de hierro disponible. Continuando con el análisis de este sistema se examinó la funcionalidad en *E. coli* de los genes caracterizados, *huvA-huvXZ-tonB1exB1D1huvBCD*. Para ello se escogieron las cepas de *E. coli* EB53 (*aroB hemA*) y 101 ESD ($\Delta(entC-entA)$). Además de carecer de un sistema propio de captación y transporte de hemo, las mutaciones que caracterizan a estas cepas afectan a la síntesis del sideróforo enterobactina (mutaciones *aroB* y *entC-entA*) o la síntesis de hemo (mutación *hemA*), de manera que permitirán analizar

el papel de los genes anteriores en el transporte de la molécula de hemo para su utilización como fuente de hierro o como fuente de porfirinas. Para ello estas cepas de *E. coli* fueron transformadas, previamente, con plásmidos que incluían diversas combinaciones de los genes que constituyen el sistema de utilización de grupos hemo en *V. anguillarum* y, a continuación, se analizó su capacidad de crecimiento en presencia de hemina o hemoglobina.

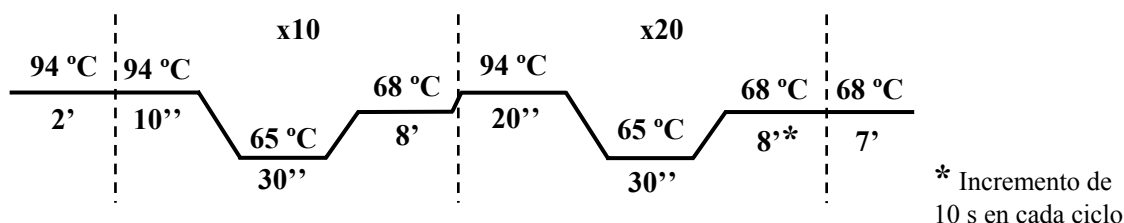
2.2.1 Construcción de los plásmidos de complementación

Las distintas combinaciones de los genes *huvA*, *huvX*, *huvZ*, *tonB1*, *exB1*, *exbD1*, *huvB*, *huvC* y *huvD* descritos en *V. anguillarum* se obtuvieron tanto por subclonaje del inserto clonado en el cósmido pML1 como por la amplificación y clonaje de productos de PCR. En este último caso se utilizó el sistema de amplificación *High-fidelity Bio-X-Act DNA polymerase* (Bioline), que se caracteriza por su reducida tasa de error en la copia y síntesis del DNA durante el proceso de amplificación por PCR.

En los experimentos de complementación se incluyeron los plásmidos, derivados del subclonaje del pML1, pCAR121 (conteniendo el gen *huvA*) y pCAR126 (conteniendo la secuencia completa de los genes *huvX*, *tonB1exbB1D1* y *huvB*, y parte de la secuencia de los genes *huvZ* y *huvC*), siendo ambos el producto de la digestión del pML1 con *ApaLI* y su subclonaje en el vector pACYC177 (apartado 1 de Resultados). Del mismo modo la digestión del cósmido con la endonucleasa de restricción *EcoRV* dio lugar a un fragmento de 1.617 pb, que incluía el operón completo *huvZX*. Tras su separación electroforética, el fragmento se purificó a partir del gel de agarosa y se clonó en el vector pWKS30 (Fig. III-4; Material y Métodos) originando el plásmido pSML11. Finalmente, una nueva digestión de pML1 con las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII*, facilitó la obtención de un nuevo fragmento de DNA, de 3.124 pb, que contiene la secuencia completa de los genes *tonB1exbB1D1*. Igual que en el caso anterior, tras su purificación, este fragmento se clonó en el vector pWKS30 dando lugar al plásmido denominado pSML34 (Fig. IV-19).

Como ya se mencionó anteriormente, la amplificación por PCR también facilitó la obtención de fragmentos con nuevas combinaciones de los genes a ensayar (Fig. IV-19). Previamente a su clonación, los productos de amplificación se purificaron bien a partir del gel de agarosa o utilizando el sistema *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) (Material y Métodos) y, en algunos casos, los plásmidos originados también sirvieron como base para el subclonaje de nuevos fragmentos.

Inicialmente, para eliminar las secuencias adyacentes al sistema de captación y transporte de hemo, éste fue amplificado por PCR (genes *huvA-huvZX-tonB1exbB1D1-huvBCD*) utilizando la pareja de cebadores HuvA-5'/HuvC.D y el siguiente programa de amplificación:



Para facilitar su clonación en el vector pWKS30, en el extremo 5' de ambos cebadores se incluyeron dianas para el enzima de restricción *EcoRI* (Anexo II). Una vez purificado el producto de PCR y cortado con este enzima, se clonó en el vector anterior dando lugar al plásmido pSML23. Éste fue utilizado a su vez para el subclonaje de otros dos fragmentos. El primero de ellos de 3,3 kb y obtenido de la digestión con *PstI* y *EcoRI*, contiene los genes *huvBCD*, mientras que el segundo, de 5 kb, deriva del corte del plásmido pSML23 con los enzimas de restricción *SacI* y *ApaI* e incluye el operón *tonB1exbB1D1-huvBCD*. Ambos se subclonaron en el vector pWKS30 y los plásmidos resultantes se denominaron pSML32 y pSML33 respectivamente.

La amplificación con los cebadores HuvZ.D y VA-huvZ1 (Anexo II) permitió obtener un fragmento de DNA con el gen *huvX*, el cual, en un primer momento, se clonó en el vector específico para productos de PCR pGEM-T-*Easy*. Seguidamente, este inserto se liberó por digestión con *EcoRI* y se subclonó en pWKS30, dando lugar al plásmido pCAR181. Lo mismo se hizo para el gen *huvZ* pero, en este caso, al formar parte del operón *huvZX*, el gen se amplificó por PCR con la pareja de cebadores PX3/VA-TonB4 (Anexo II) y utilizando como DNA molde la cepa de *V. anguillarum* B106 (apartado 2.1 de Resultados). De este modo el gen *huvZ* puede transcribirse a partir del promotor de *huvX*, sin que éste se llegue a expresar como una proteína funcional. Tras su clonaje en el vector pGEM-T-*Easy* el fragmento se liberó por digestión con *EcoRI* y se clonó en pWKS30, dando lugar al plásmido denominado pCAR179 (Fig. IV-19).

Finalmente, para asegurar la compatibilidad entre los plásmidos de clonación a la hora de ensayar combinaciones derivadas de más de una construcción, el gen que codifica para el receptor de hemo, *huvA*, se clonó en el plásmido pWKS30. Para ello, de manera similar al diseño de las construcciones anteriores, el gen se amplificó por PCR con los cebadores HuvA-

5' y HuvA-Eco3' (Anexo II). Ambos cebadores incluyen dianas para el enzima *EcoRI* en sus extremos 5', de manera que el corte del producto de amplificación con este enzima genera extremos cohesivos en ambos extremos y facilita su clonaje en el plásmido pWKS30. La construcción final se denominó pCAR115 (Fig. IV-19).

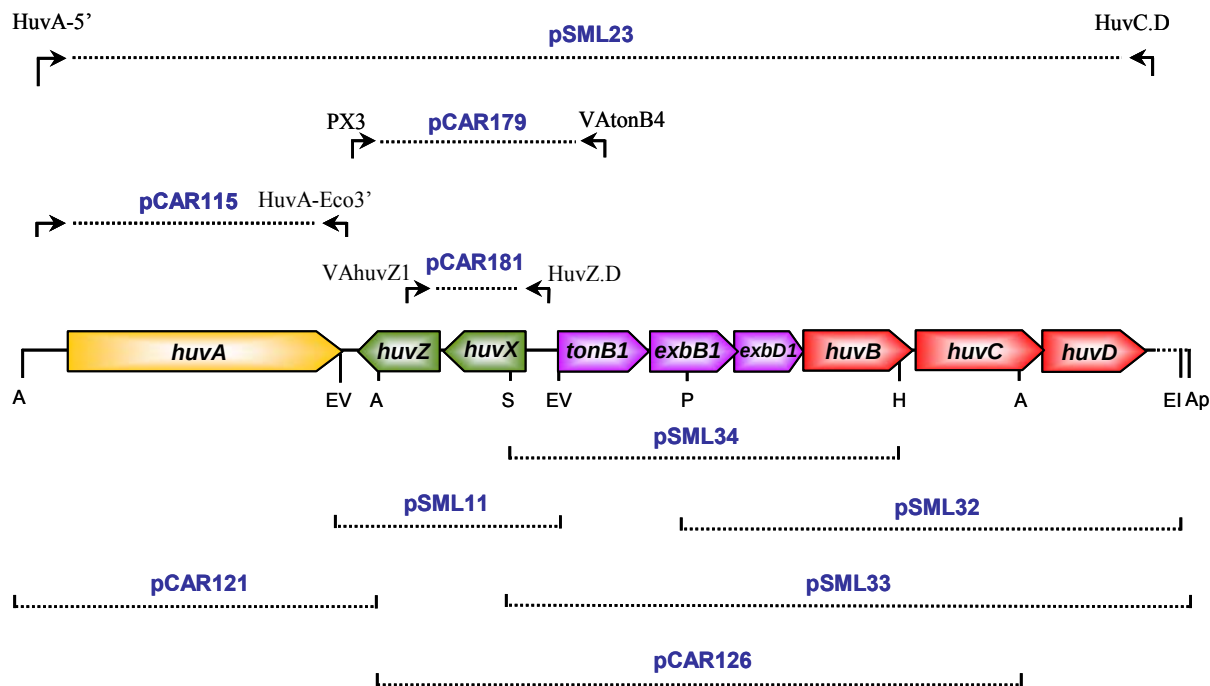
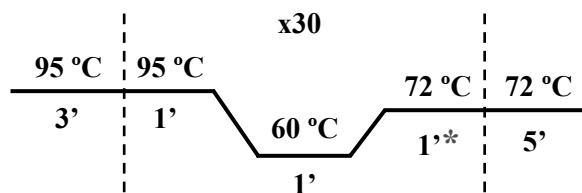


Figura IV-19: Esquema de las construcciones diseñadas a partir del *cluster* de captación y transporte de hemo utilizadas en los ensayos de complementación de las cepas de *E. coli* EB53 y 101ESD. Las líneas discontinuas representan los fragmentos clonados en los distintos plásmidos y obtenidos bien por PCR o por digestión. Las flechas indican los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación. A, *Apa*LI; EV, *Eco*RV; S, *Sac*I; P, *Pst*I; H, *Hind*III; EI, *Eco*RI; Ap, *Apa*I. Las dianas *Eco*RI y *Apa*I forman parte de la secuencia del plásmido pWKS30.

Las condiciones de PCR utilizadas para la obtención de los fragmentos clonados en los plásmidos pCAR115, pCAR181 y pCAR179 fueron las siguientes:



* En el caso de la amplificación de *huvA* el tiempo de elongación fue de 2 min 30 s.

2.2.2 Utilización de compuestos de hemo como fuente de porfirinas: Complementación de la cepa EB53 de *E. coli*

El enzima glutamil-tRNA reductasa (codificado por el gen *hemA*) junto con la glutamato-1-semialdehído-2,1-aminomutasa (codificada por el gen *hemL*) constituyen una de las dos rutas posibles de biosíntesis del ácido δ -aminolevulínico (ALA). Éste es el primer precursor de todos los tetrapirroles usados por la bacteria por lo que su producción constituye un punto crítico en la regulación de la síntesis de los derivados tetrapirrólicos.

La mutación del gen *hemA* en la cepa EB53 de *E. coli* bloquea la síntesis del ácido δ -aminolevulínico, de manera que el microorganismo sólo es capaz de crecer en presencia de una fuente externa de dicho precursor o bien con un aporte externo del anillo porfirínico. En base a esto, los ensayos de complementación de la cepa EB53 trataron de compensar esta deficiencia proporcionando a la cepa un sistema génico que permita la captura y el transporte de la molécula de hemo hasta el interior celular para, así, poder ser utilizada como fuente exógena de porfirinas.

En un primer momento se trató de probar si el *cluster* que codifica el sistema de transporte de hemo caracterizado en *V. anguillarum* era funcional en la cepa EB53 de *E. coli* facilitando su crecimiento alrededor de discos impregnados en hemina (5 mM) o hemoglobina (0,1 mM) (Material y Métodos). Para ello, esta cepa se transformó, mediante apareamiento triparental, con el cósmido pML1 y la cepa resultante se ensayó en medio NB, detectando halos de crecimiento alrededor de los discos de hemina y hemoglobina tras 24 horas de incubación. Este resultado confirma la funcionalidad en la cepa EB53 de *E. coli* del *cluster* génico de *V. anguillarum*, así como el transporte de la molécula de hemo para su utilización intracelular como fuente de porfirinas. Seguidamente, para determinar qué genes eran fundamentales en dicho proceso de transporte, la cepa se transformó con las construcciones diseñadas en el apartado anterior y las cepas resultantes se utilizaron en bioensayos de crecimiento con hemina o hemoglobina. Las combinaciones de genes ensayadas en cada uno de los experimentos, así como los resultados de crecimiento obtenidos, se resumen en la Tabla IV-3.

Según estos resultados, la complementación con el plásmido pCAR121, que incluye el gen *huvA*, fue suficiente para facilitar el crecimiento de la cepa EB53 con los distintos compuestos de hemo, sugiriendo, además, que el sistema TonB de *E. coli* EB53 es capaz de reconocer la *TonB-box* del receptor de membrana externa HuvA de *V. anguillarum* e inducir,

así, los cambios conformacionales necesarios para el transporte de la molécula de hemo desde el medio externo hasta el espacio periplásmico. Se puede concluir que una vez aportado el receptor de membrana externa específico, la cepa EB53 de *E. coli* cuenta en su genoma con los determinantes genéticos necesarios para completar el proceso de transporte y utilización de esta molécula como fuente de porfirinas. Ninguno de los demás genes o combinaciones de genes ensayados pudo complementar a esta cepa cuando el gen *huvA* no estaba también incluido en el experimento.

Tabla IV-3: Utilización de Hemina (Hm) y Hemoglobina (Hb) como fuentes de porfirinas por la cepa *E. coli* EB53 complementada con los genes del sistema de utilización de hemo de *V. anguillarum*. Los ensayos fueron realizados en placas de medio NB. El crecimiento en presencia de ALA se utilizó como control positivo.

CEPA / PLÁSMIDOS	GENES PRESENTES	CRECIMIENTO CON		
		Hb (0,1 mM)	Hm (5 mM)	ALA (2 mg/ml)
EB53	ninguno	–	–	+
EB53/pCAR121	<i>huvA</i>	+	+	+
EB53/pCAR126	<i>huvX tonB1exbB1D1huvB</i>	–	–	+
EB53/pML1	<i>huvAZX tonB1exbB1D1huvBCD</i>	+	+	+
EB53/pCAR115/pCAR126	<i>huvAX tonB1exbB1D1huvB</i>	+	+	+
EB53/pCAR121/pCAR179	<i>huvAZ</i>	+	+	+
EB53/pSML23	<i>huvAZX tonB1exbB1D1huvBCD</i>	+	+	+
EB53/pCAR121/pCAR181	<i>huvAX</i>	+	+	+
EB53/pCAR121/pSML11	<i>huvAZX</i>	+	+	+

2.2.3 Utilización de hemo como fuente de hierro: Complementación de la cepa 101ESD de *E. coli*

Los genes *entC* y *entA* de *E. coli* participan en la ruta de biosíntesis del sideróforo enterobactina y codifican los enzimas isocorismato-sintetasa y 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato-deshidrogenasa, respectivamente. Cuando los niveles de hierro libre presente en el medio son bajos, la mutación de ambos genes impide el crecimiento de la

bacteria, ya que ésta no puede utilizar el sistema de sideróforos como mecanismo de alta eficacia para la captación de este nutriente esencial.

En la cepa de *E. coli* 101ESD $\Delta(entC-entA)$ la utilización de una segunda fuente de hierro, como la hemina o la hemoglobina, sólo es posible si se proporciona al microorganismo un sistema genético relacionado con la captación y transporte del grupo hemo desde el medio externo hasta el citoplasma celular, ya que 101ESD también carece de dicha capacidad de transporte. Al igual que en el caso de la cepa EB53, se trató de comprobar la funcionalidad del sistema de transporte de hemo descrito en *V. anguillarum* transformando la cepa 101ESD con distintas combinaciones de los genes del *cluster* y comprobando qué gen o genes eran necesarios para facilitar el transporte de hemo y su utilización como fuente de hierro. En este caso, para conseguir unas condiciones limitantes de hierro libre, los bioensayos se realizaron en placas de medio CM9 suplementado con 2,2'-dipiridil (200 μ M) y el transporte de la molécula de hemo se determinó observando el crecimiento de la bacteria alrededor de discos impregnados con hemina (5 y 0,5 mM) o hemoglobina (0,1 mM) (Material y Métodos).

Tabla IV-4: Utilización de la hemina (Hm) y Hemoglobina (Hb) como fuentes de hierro en la cepa de *E. coli* 101ESD complementada con los genes del sistema de captación y transporte de hemo de *V. anguillarum*. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de CM9 suplementado con 2,2'-dipiridil 200 μ M. El crecimiento en presencia de $Fe_2(SO_4)_3$ se utilizó como control positivo.

CEPA / PLÁSMIDO	GENES PRESENTES	CRECIMIENTO CON		
		Hb (0,1 mM)	Hm (5 mM)	$Fe_2(SO_4)_3$ (40 mM)
101ESD	ninguno	–	–	+
101ESD /pCAR121	<i>huvA</i>	–	–	+
101ESD /pCAR126	<i>huvX tonB1exbB1D1huvB</i>	–	–	+
101ESD /pML1	<i>huvAZX tonB1exbB1D1huvBCD</i>	+	+	+
101ESD /pCAR115/pCAR126	<i>huvAX tonB1exbB1D1huvB</i>	–	–	+
101ESD /pCAR121/pCAR179	<i>huvAZ</i>	–	–	+
101ESD /pSML23	<i>huvAZX tonB1exbB1D1huvBCD</i>	+	+	+
101ESD /pCAR121/pCAR181	<i>huvAX</i>	–	–	+
101ESD /pCAR121/pSML11	<i>huvAZX</i>	–	–	+
101ESD /pCAR121/pSML32	<i>huvAexbD1huvBCD</i>	–	–	+
101ESD /pCAR121/pSML34	<i>huvA tonB1exbB1D1</i>	–	–	+
101ESD /pCAR121/pSML33	<i>huvA tonB1exbB1D1huvBCD</i>	+	+	+

Los resultados del experimento, resumidos en la Tabla IV-4, mostraron inicialmente cómo la transformación de la cepa 101ESD con el cósmido pML1 facilita la utilización de la hemina y la hemoglobina como fuente de hierro (Fig. IV-20). Asimismo la transformación con el plásmido pSML23 (que contiene el sistema *huvA-huvXZ-tonB1exbB1D1-huvBCD* amplificado por PCR) también permitió restaurar el crecimiento de la bacteria alrededor de ambos compuestos de hemo, lo que indica que la capacidad de transporte del grupo hemo procedente de la hemina y de la hemoglobina está codificada dentro del *cluster* descrito para *V. anguillarum* y no es debida a otros posibles genes presentes en el inserto del cósmido pML1.

Contrariamente a lo observado con la cepa EB53, de los resultados obtenidos se puede concluir que la complementación de la cepa 101ESD de *E. coli* con el gen *huvA* solamente (plásmido pCAR121) no es suficiente para permitir el crecimiento de esta bacteria en las condiciones ensayadas. Este mismo resultado se obtuvo en la complementación con el plásmido pSML11 (que contiene los genes *huvZX*) y en la complementación pCAR121/pCAR126 (genes *huvX-tonB1exbB1D1-huvB*). Tan sólo fue posible la utilización de la hemina y hemoglobina como fuentes de hierro cuando la cepa 101ESD era transformada, simultáneamente, con la combinación del gen *huvA* (pCAR121) y los genes *tonB1exbB1D1-huvBCD* (pSML33) (Tabla IV-4).

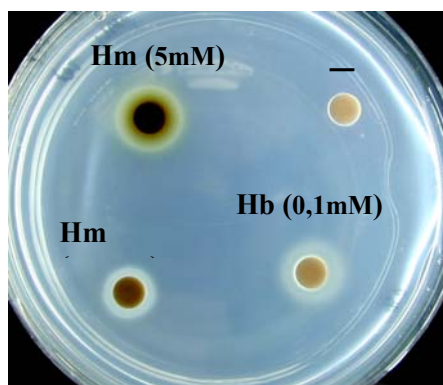


Figura IV-20: Ensayo de complementación de *E. coli* 101ESD con el plásmido pML1. El aporte de todo el sistema génico que codifica la captación y transporte de hemo de *V. anguillarum* permite la utilización de la Hemina (Hm) y la Hemoglobina (Hb) como fuentes de hierro, lo que se traduce en un halo de crecimiento alrededor de los discos impregnados con ambos compuestos. –, control negativo.

Para establecer la importancia del sistema *tonB1exbB1exbD1* y de los genes *huvBCD* en el transporte del hemo en la cepa 101ESD, se ensayó finalmente la combinación *huvA-huvBCD* (plásmidos pCAR121 + pSML32), así como la combinación *huvA-tonB1exbB1D1*

(plásmidos pCAR121 + pSML34). En ninguno de los dos casos se detectó crecimiento alrededor de las fuentes de hemina o hemoglobina, indicando que ni *huvBCD* ni *tonB1exbB1exbD1* por sí solos son suficientes para la utilización del hemo como fuente de hierro.

Según todos estos resultados, el transporte de la molécula de hemo en la cepa 101ESD para su utilización como fuente de hierro requiere la presencia de un receptor de membrana externa (*huvA*) junto con el sistema *tonB1exbB1exbD1* y los genes *huvBCD*. Sin embargo los ensayos con la cepa EB53 demostraron previamente la funcionalidad del sistema TonB de *E. coli* con el receptor de membrana de *V. anguillarum* de modo que, probablemente, sea la combinación *huvA-huvBCD* la responsable del transporte de los compuestos de hemo hasta el citoplasma celular dónde serán utilizados como fuente de hierro por la cepa 101ESD. La necesidad de incluir los genes *tonB1exbB1D1* en el mismo plásmido que los genes *huvBCD*, podría explicarse estableciendo la organización de los seis genes en una única unidad transcripcional, con su región promotora localizada “corriente arriba” del gen *tonB1* y a partir de la cual se transcribirían el resto de los genes del operón, incluidos *huvB*, *huvC* y *huvD*.

2.3 Análisis de proteínas de membrana

Para el análisis de las proteínas codificadas por el sistema de transporte de grupos hemo descrito en el presente trabajo, se realizó un aislamiento de proteínas de membrana partiendo de cultivos de la cepa salvaje 775 de *V. anguillarum* crecida en condiciones de exceso y ausencia de hierro en medio CM9 suplementado con FeCl₃ (10 µM) y EDDA (10 µM), respectivamente. Dicha cepa posee el plásmido pJM1 implicado en la síntesis de anguibactina, lo que facilita su crecimiento en condiciones de limitación de hierro y permite la obtención de una concentración de células suficiente para la extracción proteica.

Excepto el receptor de membrana externa HuvA, el resto de proteínas a analizar poseen tamaños muy similares, entre los 15 y los 33 kDa (Tabla IV-5), lo que dificulta la visualización de las bandas correspondientes a cada una de ellas en geles de poliacrilamida-SDS. Por esta razón, simultáneamente a la extracción a partir de la cepa 775 se hizo lo mismo con un mutante de todo el sistema de captación de hemo (cepa B210), derivado a su vez de la cepa 775 y diseñado del mismo modo que el mutante B154 procedente de la cepa H775-3 (apartado 2.1 de Resultados).

Tabla IV-5: Tamaño teórico de las proteínas asociadas a las membranas celulares codificadas por el sistema de captación y transporte de hemo.

PROTEÍNA	TAMAÑO (kDa)	FRACCIÓN PROTEICA
HuvA	79,7	Membrana Externa
TonB1	25,9	Membranas Totales
ExbB1	25,2	Membranas Totales
ExbD1	15,0	Membranas Totales
HuvB	29,6	Membranas Totales
HuvC	32,9	Membranas Totales
HuvD	28,4	Membranas Totales

En el análisis de las proteínas de membrana externa, al comparar los patrones correspondientes a la cepa salvaje y la cepa B210, se comprobó como en esta última desaparecía una banda de igual tamaño al esperado para la proteína HuvA. Asimismo se observó como la expresión de dicha proteína depende de las concentraciones de hierro, de modo que en presencia de un exceso de este metal se bloquea su síntesis (Fig. IV-21A).

Por otro lado, en el caso del extracto correspondiente a las proteínas totales de membrana tan sólo se pudo detectar la ausencia de una banda en el patrón de la cepa mutante y cuyo tamaño podría corresponderse con la proteína ExbB1 o la proteína TonB1 (Fig. IV-21B). Es posible que, debido a su función como responsable de la transducción de energía hasta el receptor de membrana externa, el sistema TonB1 se exprese en la célula en mayor número que el resto de las proteínas codificadas dentro del sistema de utilización de hemo. Esto daría una explicación a la falta de detección del resto de proteínas del sistema. Sin embargo también es posible que, debido a la proximidad en los pesos moleculares, la banda detectada englobe a más de una proteína, de modo que en el mutante es más fácil visualizar su ausencia. Finalmente, al igual que en el caso del receptor HuvA, las extracciones en condiciones de ausencia y exceso de hierro evidencian su expresión en función de los niveles de este metal.

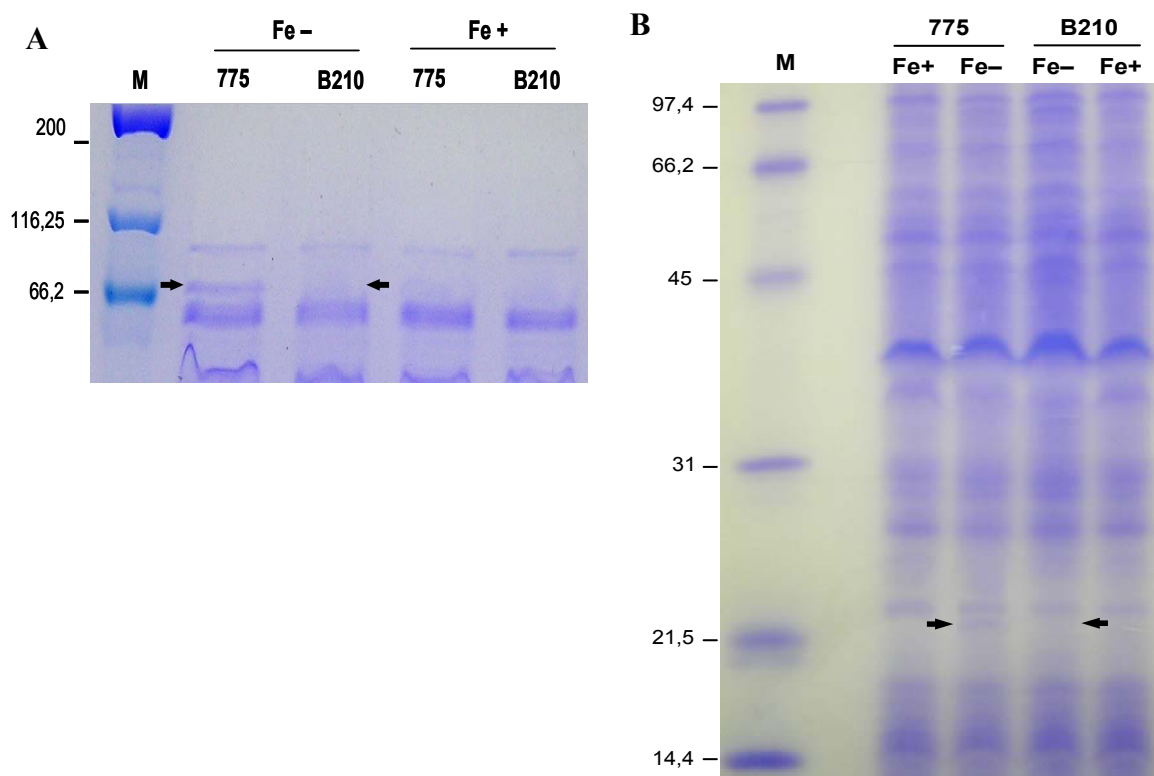


Figura IV-21: Geles de poliacrilamida-SDS para la comparación de los patrones de proteínas correspondientes a la cepa de *V. anguillarum* 775 y el mutante del sistema de captación y transporte de grupos hemo B210. (A) Extracción de proteínas de membrana externa. En condiciones de ausencia de hierro (Fe-) el mutante B210 posee el mismo patrón que la cepa salvaje salvo por la ausencia de una banda correspondiente al receptor de membrana externa HuvA (79 kDa). (B) Extracción de proteínas totales de membrana. En ausencia de hierro, el patrón de proteínas de la cepa B210 difiere de la cepa 775 en una banda de tamaño similar a las proteínas ExbB1 (25,2) y TonB1 (25,9). Tanto en el gel de proteínas de membrana externa como de proteínas totales de membrana, el exceso de hierro en el medio (Fe+) inhibe la expresión de ciertas proteínas en la cepa 775, entre ellas las ausentes en el patrón del mutante B210. M, marcador de peso molecular (kDa).

2.4 Análisis funcional del complejo TonB-ExbB-ExbD y su relación con los mecanismos de captación de hierro en *V. anguillarum*

El paso de la molécula de hemo desde el exterior hasta el periplasma bacteriano es un proceso activo que utiliza la energía de la membrana citoplasmática y que requiere la presencia de un sistema TonB intacto (Braun y Braun, 2002). Sin embargo, pese a que la unión receptor-ligando es específica, no tiene por qué ocurrir lo mismo con la interacción entre el receptor de membrana externa y la proteína TonB, de manera que esta última puede llegar a interactuar con múltiples receptores, participando así en el transporte activo de distintas fuentes de hierro (Bell *et al.*, 1990). Ya que *V. anguillarum* posee un mecanismo de captación de hierro mediado por sideróforos y un sistema de transporte específico para el

grupo hemo, inicialmente nos planteamos estudiar el papel que podría jugar en ambos casos el complejo TonB1-ExbB1-ExbD1 caracterizado como parte del *cluster* génico descrito en el presente trabajo.

2.4.1 Efecto de la mutación del gen *tonB1* sobre la capacidad de utilización de distintas fuentes de hierro por *V. anguillarum*

Para analizar la importancia del sistema TonB1 en los procesos de transporte mencionados anteriormente, el gen *tonB1* incluido en el inserto del cósmido pML1 se inactivó utilizando el sistema de recombinación *Lambda-Red*, quedando sustituido por el gen de resistencia al antibiótico cloranfenicol y dando lugar a una mutación de carácter no-polar (Material y Métodos). Seguidamente el cósmido pML1 mutado se transfirió por conjugación a la cepa de *V. anguillarum* 775. Por un proceso de recombinación entre secuencias homólogas este gen de resistencia Cm^r quedó insertado dentro del cromosoma bacteriano, sustituyendo así a la copia salvaje del gen *tonB1*. Finalmente, para la selección de colonias recombinantes, esta nueva cepa de *V. anguillarum* con pML1, se transformó con el plásmido pPH1JI (Gm^r) que posee un origen de replicación incompatible con el replicón de pML1, de manera que induce la pérdida de este último en base a la doble resistencia $\text{Gm} + \text{Cm}$.

Tabla IV-6: Efecto de la inactivación de los sistemas TonB1 y TonB2 de *V. anguillarum* en la capacidad de utilización de diversas fuentes de hierro.

CEPA	FUENTE DE Fe					
	FAC	Ang	Ent	Fer	Hm	CAS ^a
<i>V. anguillarum</i> 775	+	+	+	+	+	1,9 ± 0,2
<i>V. anguillarum</i> H775-3	+	—	+	+	+	0
MS533 (<i>tonB1</i> ⁻)	+	+	+	+	+	1,9 ± 0,1

(+) crecimiento alrededor de la fuente de hierro

(-) Ausencia de crecimiento alrededor de la fuente de hierro

^a Relación halo/tamaño colonia y error obtenido a partir de cinco experimentos independientes

Fuentes de hierro: FAC, Citrato férrico amónico; Ang, anguibactina; Ent, enterobactina; Fer, ferricromo; Hm, Hemina

La cepa mutante del sistema *tonB1* obtenida por este método (MS533) se utilizó en bioensayos en medio CM9 suplementado con EDDA (10 μM) para analizar su capacidad de crecimiento alrededor de discos impregnados con distintas fuentes de hierro, como el citrato

férrico amónico y la hemina. Al mismo tiempo, para determinar la importancia del complejo TonB1-ExbB1-ExbD1 en el transporte de sideróforos, se analizó la capacidad del mutante MS533 de crecer utilizando los sideróforos anguibactina, enterobactina y ferricromo. Tal como se muestra en la Tabla IV-6, la mutación del gen *tonB1* parece no tener ningún tipo de efecto en cuanto a la utilización del hierro asociado al grupo hemo o a los diferentes sideróforos ensayados.

2.4.2 Caracterización y análisis funcional de un segundo sistema TonB en la cepa 775 de *V. anguillarum*

El hecho de que la mutación del sistema TonB1 no afecte al transporte de hemo y sideróforos en la cepa 775 de *V. anguillarum*, planteó la posible existencia de al menos un segundo sistema TonB. En colaboración con el laboratorio del Dr. J. H. Crosa (Oregon Health & Science University, Portland-OR, USA) dicho sistema pudo ser caracterizado partiendo de la cepa MS533 y mediante un proceso de mutación al azar con el transposón mini Tn10. Era de esperar que la inactivación del sistema TonB asociado al transporte del complejo Fe-anguibactina provocara una sobreproducción del propio sideróforo, lo cual, en placas de medio CAS, se traduciría en un halo de diámetro mayor que el de la cepa salvaje. De las colonias que mostraban este fenotipo se escogió una incapaz de crecer utilizando anguibactina, hemo, enterobactina y ferricromo como fuentes de hierro. La construcción de una genoteca y la secuenciación a partir del transposón Tn10 permitió identificar una ORF incompleta homóloga al gen *tolR*. Inmediatamente a continuación se identificó el correspondiente gen *exbB2* y, adyacente a éste se caracterizaron dos nuevos genes *exbD2* y *tonB2*. Durante la secuenciación de esta región se identificó una última ORF, denominada *hp*, hasta el momento sin homología con ninguna proteína de función conocida y cuyo codón de inicio se intercala en la secuencia final del gen *tonB2* (Fig. IV-22).

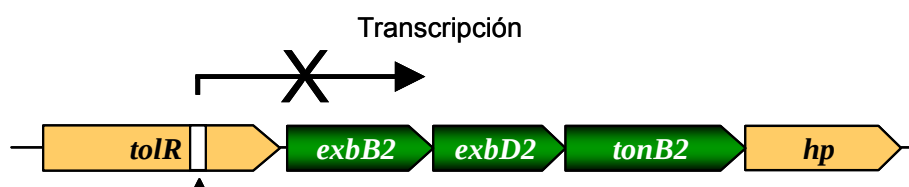


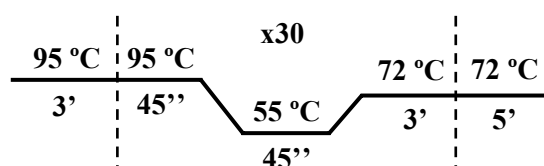
Figura IV-22: Mapa de la región cromosómica que incluye el sistema TonB2 (genes *tonB2-exbB2-exbD2*) caracterizado en *V. anguillarum*. La punta de flecha indica el punto de inserción del transposón Tn10 en el gen *tolR* y que conlleva el bloqueo en la expresión del sistema TonB2 adyacente.

Igual que en el caso del sistema TonB1, la nomenclatura *tonB2*, *exbB2* y *exbD2* asignada a este nuevo sistema TonB se basa en la comparación de secuencia con genes homólogos caracterizados en otras especies bacterianas. Así, de los tres componentes del sistema TonB2 de *V. anguillarum*, la secuencia de aminoácidos predicha para la proteína TonB2 (206 aminoácidos) posee alrededor del 58% de identidad con la proteína TonB2 descrita en *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *Photobacterium damsela* (números de acceso: Q9ZHV8, Q87JU3, Q8D709 y Q7WVC4, respectivamente) mientras que los polipéptidos ExbB2 (191 aminoácidos) y ExbD2 (134 aminoácidos) comparten un elevado porcentaje de identidad, entre el 62% y el 88%, con las proteínas ExbB2 y ExbD2 caracterizadas en las especies anteriores (números de acceso para los homólogos ExbB2: Q9ZHW0, Q87JU5, Q7MDW8 y Q7WVC6; números de acceso para los homólogos ExbD2: Q9ZHV9, Q87JU4, Q7MDW9 y Q7WVC5, respectivamente) (Tabla IV-7).

Tabla IV-7: Porcentaje de Identidad/Similitud de los componentes del sistema TonB2 caracterizado en *V. anguillarum* y sus homólogos descritos en otras especies bacterianas

<i>V. anguillarum</i> 775			
	ExbB2	ExbD2	TonB2
<i>V. cholerae</i>	69 / 87	87 / 97	62 / 82
<i>V. parahaemolyticus</i>	69 / 87	87 / 98	60 / 84
<i>V. vulnificus</i>	62 / 86	85 / 98	46 / 74
<i>P. damsela</i>	68 / 90	83 / 96	54 / 81

Para analizar en *V. anguillarum* la participación del sistema TonB2 en el transporte de compuestos de hierro, se suprimió la funcionalidad de dicho sistema mediante la mutación del gen *tonB2*. Para conseguir esta inactivación, los tres genes del sistema se amplificaron conjuntamente con los cebadores *exbB2U1* y *tonB2L1* (Anexo II). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:



Tras el clonaje del fragmento amplificado, de 1,7 kb, en el vector pCR2.1-TOPO (plásmido pMS616), el inserto se liberó con *EcoRI* y los extremos se hicieron romos con el

enzima Klenow-polimerasa para facilitar su subclonaje dentro de la diana *EcoRV* del plásmido suicida pTW-MEV (Welch *et al.*, 2000). Finalmente, dentro de la diana *EcoRV* que se mantiene dentro de la secuencia del gen *tonB2*, se clonó el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, liberado del vector pKan π y dando lugar al plásmido pMS645. Éste se transfirió mediante conjugación a la cepa 775 de *V. anguillarum* y las colonias recombinantes se seleccionaron en base a su resistencia al antibiótico Kan. La recombinación entre secuencias homólogas presentes en el plásmido y en el cromosoma bacteriano dio como resultado la inserción cromosómica de la copia mutante *tonB2::Kan^r* (cepa MS801). Del mismo modo, para el diseño de un doble mutante de *V. anguillarum tonB1-tonB2*, el plásmido pMS645 anterior se transfirió a la cepa mutante para *tonB1* MS533. La recombinación entre secuencias homólogas dio lugar a la cepa MS658, caracterizada por la doble inactivación *tonB1::Cm^r / tonB2::Kan^r*.

Estos dos nuevos mutantes MS801 y MS658, junto con la cepa salvaje 775, se ensayaron en placas de medio CAS para analizar el efecto de las inserciones sobre la utilización del sideróforo anguibactina. Tras una incubación a 25 °C durante 24 horas se midió el diámetro de los halos obtenidos alrededor de cada cepa (Tabla IV-8). En el caso de los mutantes los halos resultaron significativamente mayores que los de la cepa salvaje, lo que indica que la mutación del gen *tonB2* afecta de algún modo al mecanismo de utilización de sideróforos, posiblemente interfiriendo el proceso de entrada del complejo Fe-sideróforo.

Para determinar la función específica del sistema TonB2, se analizó la capacidad de crecimiento de las cepas mutantes MS801 y el doble mutante *tonB1/tonB2* en presencia de distintas fuentes de hierro. Al igual que en el caso del sistema TonB1, ambas cepas se ensayaron en placas de medio CM9 suplementado con EDDA (10 μ M), observando su crecimiento con hemina y los sideróforos anguibactina, enterobactina y ferricromo como únicas fuentes de hierro.

Según los resultados obtenidos (Tabla IV-8), el doble mutante MS658 es incapaz de utilizar cualquiera de las fuentes de hierro analizadas, sugiriendo que no existen otros sistemas TonB a mayores de los descritos, o genes análogos capaces de complementar el defecto de los sistemas TonB1 y TonB2 en el transporte de dichas fuentes de hierro a través de la membrana. Por otro lado, la cepa MS801 es capaz de crecer utilizando la hemina y el ferricromo como fuentes de hierro, lo que indica que el sistema TonB1, al permanecer intacto, es capaz de complementar el defecto del complejo TonB2-ExbB2-ExbD2. Por tanto, se establece una redundancia en cuanto a las funciones de ambos sistemas, pudiendo

interaccionar por igual con los receptores de membrana específicos para el transporte de hemo y de ferricromo.

Por el contrario no se detectó crecimiento en los bioensayos con anguibactina y enterobactina (Tabla IV-8). Este resultado confirma la especificidad del sistema TonB2 en el transporte de los complejos Fe-anguibactina y Fe-enterobactina, constituyendo el único complejo de transducción de energía capaz de interaccionar con las proteínas receptoras asociadas a su transporte desde el medio externo hasta el espacio periplásmico.

Tabla IV-8: Efecto de la inactivación individual del sistema TonB1 y la inactivación simultánea de los sistemas TonB1 y TonB2 de *V. anguillarum* en la capacidad de utilización de diversas fuentes de hierro.

CEPA	FUENTE DE Fe					
	FAC	Ang	Ent	Fer	Hm	CAS ^a
<i>V. anguillarum</i> 775	+	+	+	+	+	1,9 ± 0,2
MS801 (<i>tonB2</i> ⁻)	+	-	-	+	+	2,9 ± 0,2
MS658 (<i>tonB1</i> ⁻ <i>tonB2</i> ⁻)	+	-	-	-	-	2,9 ± 0,2

(+) crecimiento alrededor de la fuente de hierro

(-) Ausencia de crecimiento alrededor de la fuente de hierro

^a Relación halo/tamaño colonia y error obtenido a partir de cinco experimentos independientes

Fuentes de hierro: FAC, Citrato férrico amónico; Ang, anguibactina; Ent, enterobactina; Fer, ferricromo; Hm, Hemina

2.4.3 Análisis funcional de los sistemas TonB1 y TonB2 en *E. coli* y *V. cholerae*

En un primer momento se trató de confirmar que los fenotipos observados en las cepas anteriores eran debidos a las mutaciones de los genes *tonB1* y *tonB2*, para lo cual se diseñaron ensayos de complementación con construcciones que incluían las copias salvajes de los genes modificados. En el caso del mutante *tonB1*::Cm^r la mutación del gen no conlleva ningún efecto en el transporte de las distintas fuentes de hierro ni diferencias en el fenotipo de la bacteria, de manera que no fue incluido en estos experimentos. Por su parte, para tratar de restaurar la funcionalidad del sistema TonB2 en las cepas MS658 y MS801, el *cluster exbB2exbD2TonB2* se liberó del plásmido pMS616 por digestión con los enzimas *XhoI*-*BamHI* y se subclonó en el vector pACYC177 (Fig. III-4; Material y Métodos). El resultado final fue la construcción pMS789, en la cual la expresión del sistema génico TonB2 queda bajo el control del promotor constitutivo del gen Kan^r. A continuación este plásmido se

transfirió por apareamiento triparental a los dos mutantes anteriores y las cepas resultantes se ensayaron en placa para determinar su capacidad de crecimiento alrededor de discos impregnados con las diferentes fuentes de hierro. Los resultados del bioensayo confirmaron la recuperación de la actividad del sistema TonB2 en el transporte de hemo y de todas las demás fuentes de hierro ensayadas (Tabla IV-9).

A pesar de que en presencia de un sistema TonB2 completo la mutación del gen *tonB1* no afecta al transporte del grupo hemo, ferricromo, enterobactina o anguibactina, decidimos probar si el *cluster* TonB1 de *V. anguillarum* era funcional en otras especies bacterianas. De este modo el cósmido pML1, que incluye los genes *tonB1exbB1exbD1*, se transfirió a *E. coli* KP1032, mutante del sistema TonB por inserción del gen de resistencia a Kan (*tonB::Kan^r*) (Larsen *et al.*, 1994b) y la cepa DHH11 de *V. cholerae*, en este caso doble mutante para los sistemas TonB1 y TonB2 (Occhino *et al.*, 1998).

La complementación de la cepa de *V. cholerae* se ensayó en presencia de ferricromo, hemo y enterobactina como fuentes de hierro, dando como resultado la recuperación de la capacidad de utilización tanto del hemo como del ferricromo. Sin embargo esta misma bacteria fue incapaz de crecer utilizando la enterobactina como fuente de hierro. Por otra parte en los ensayos realizados con el mutante de *E. coli* KP1032 complementado no se observó crecimiento alrededor del ferricromo o la enterobactina como fuentes de hierro, aunque sí se confirmó la participación del sistema TonB1 en la captación y transporte de la molécula de hemo (Tabla IV-9).

A partir del resultado obtenido con el sistema TonB1 de *V. anguillarum*, se hizo lo mismo para el sistema TonB2. Así los anteriores experimentos de complementación se repitieron utilizando el plásmido pMS789 que incluye el *cluster* *exbB2exbD2tonB2*. A diferencia de los resultados obtenidos con las correspondientes cepas parentales (*E. coli* W3110 y *V. cholerae* CA401), en el caso del mutante *tonB* de *E. coli* complementado, éste fue incapaz de transportar ni ferricromo ni enterobactina, mientras que en el caso del doble mutante *tonB1/tonB2* de *V. cholerae*, además de estos dos compuestos, tampoco se recuperó la capacidad de utilización de hemo. Según todos estos resultados, los genes *exbB2-exbD2-tonB2* de *V. anguillarum* parecen no ser capaces de restaurar el fenotipo TonB2 en las bacterias ensayadas, lo cual resulta sorprendente ya que el mutante de *E. coli* KP1032 puede ser complementado con el gen *tonB2* de *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998) y la similitud que existe entre las proteínas TonB2 de *V. anguillarum* y *V. cholerae* es relativamente alta (63%).

Tabla IV-9: Resumen de los ensayos de complementación de las cepas mutantes de *V. cholerae* y *E. coli* con los sistemas TonB1 y TonB2 caracterizados en *V. anguillarum*. El crecimiento con FAC se utilizó como control positivo.

CEPA	FUENTE DE Fe					
	FAC	Ang	Ent	Fer	Hm	CAS ^a
MS801 (<i>tonB2</i> ⁻) + pMS789	+	+	+	+	+	2,1 ± 0,1
MS658 (<i>tonB1</i> ⁻ <i>tonB2</i> ⁻) + pMS789	+	+	+	+	+	2,1 ± 0,1
<i>V. cholerae</i> CA401(wt)	+	ND	+	+	+	ND
<i>V. cholerae</i> DHH11 (<i>tonB1</i> ⁻ <i>tonB2</i> ⁻)	+	ND	-	-	-	ND
<i>V. cholerae</i> DHH11 + pML1	+	ND	-	+	+	ND
<i>V. cholerae</i> DHH11 + pMS789	+	ND	-	-	-	ND
<i>E. coli</i> W3110 (wt)	+	ND	+	+	-	ND
<i>E. coli</i> KP1032 (<i>tonB</i> ⁻)	+	ND	-	-	-	ND
<i>E. coli</i> KP1032 + pML1	+	ND	-	-	+	ND
<i>E. coli</i> KP1032 + pMS789	+	ND	-	-	ND	ND

(+) Crecimiento alrededor de la fuente de hierro.

(-) Ausencia de crecimiento alrededor de la fuente de hierro.

(ND) No determinado.

(wt) Tipo salvaje.

pMS789: Genes *exbB2-exbD2-tonB2* de *V. anguillarum*.

pML1: *cluster* de transporte de hemo que incluye el sistema *tonB1-exbB1-exbD1* de *V. anguillarum*.

Fuentes de hierro: FAC, Citrato férrico amónico; Ang, anguibactina; Ent, enterobactina; Fer, ferricromo; Hm, Hemina.

^a Relación halo/tamaño colonia y error obtenido a partir de cinco experimentos independientes.

2.4.4 Análisis funcional del complejo TonB-ExbB-ExbD en el serotipo O2 de *V. anguillarum*

Dentro de la especie *V. anguillarum* los serotipos O1 y O2 son los principales responsables de brotes de vibriosis en peces (Larsen *et al.*, 1994a) y cuya capacidad infectiva está directamente relacionada con la existencia de sistemas de captación de hierro de alta eficacia. Dentro del serotipo O2 y en algunas cepas del O1 que carecen del plásmido pJM1, se ha demostrado la producción del sideróforo vancrobactina, similar tanto en su estructura como en sus propiedades biológicas a la enterobactina y cuya síntesis y sistema de transporte

está codificado en el cromosoma bacteriano. También está comprobado como la cepa RV22 (serotipo O2) es incapaz de utilizar la anguibactina producida por la cepa 775, mientras que los sobrenadantes obtenidos de RV22 son, por el contrario, capaces de promover el crecimiento de mutantes derivados de la cepa 775 y deficientes en la producción de anguibactina (Conchas *et al.*, 1991; Lemos *et al.*, 1988).

Las diferencias entre ambos aislados, en cuanto a la capacidad de utilización de uno u otro sideróforo, sugiere diferencias importantes entre los sistemas de transporte del complejo Fe-sideróforo. Tal como se demostró en el apartado anterior, uno de los requisitos fundamentales para ese transporte es la presencia de un sistema TonB funcional y específico. Por esta razón, tomando como modelo esta cepa RV22 de *V. anguillarum*, se planteó un trabajo, similar al llevado a cabo previamente con la cepa 775, para estudiar la presencia o ausencia de los sistemas TonB1 y TonB2 caracterizados en el serotipo O1 y analizar las posibles diferencias, tanto a nivel de secuencia como a nivel funcional, entre los sistemas TonB de ambas cepas.

2.4.4.1 Aislamiento y secuenciación de los sistemas TonB1 y TonB2 en la cepa RV22

Suponiendo la existencia de una elevada similitud a nivel genético entre las cepas 775 y RV22 de *V. anguillarum*, se partió de la secuencia de los sistemas TonB1 y TonB2 caracterizados en la cepa del serotipo O1 para el diseño de cebadores que permitieran la amplificación de los *clusters tonB1-exbB1-exbD1* y *exbB2-exbD2-tonB2*, tomando como molde en este caso el DNA genómico de la cepa RV22. Las parejas de cebadores elegidas fueron FT-TonB1/PE-huvBCD para el sistema TonB1 y TolR-1/HP-2 para el TonB2 (Fig. IV-23A; Anexo II).

El resultado de la electroforesis confirmó la amplificación de una banda de 2,2 kb correspondiente al sistema TonB1, así como otra de 2,4 kb correspondiente al sistema TonB2 (Fig. IV-23B). El hecho de haber utilizado cebadores situados en las regiones adyacentes a ambos sistemas, sugiere, además, que tanto el sistema TonB1 como el TonB2 de la cepa RV22 comparten la misma organización espacial que la de la cepa 775. Ambos fragmentos se purificaron a partir del gel de agarosa y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO para su posterior secuenciación (plásmidos pSML60 y pSML61, respectivamente).

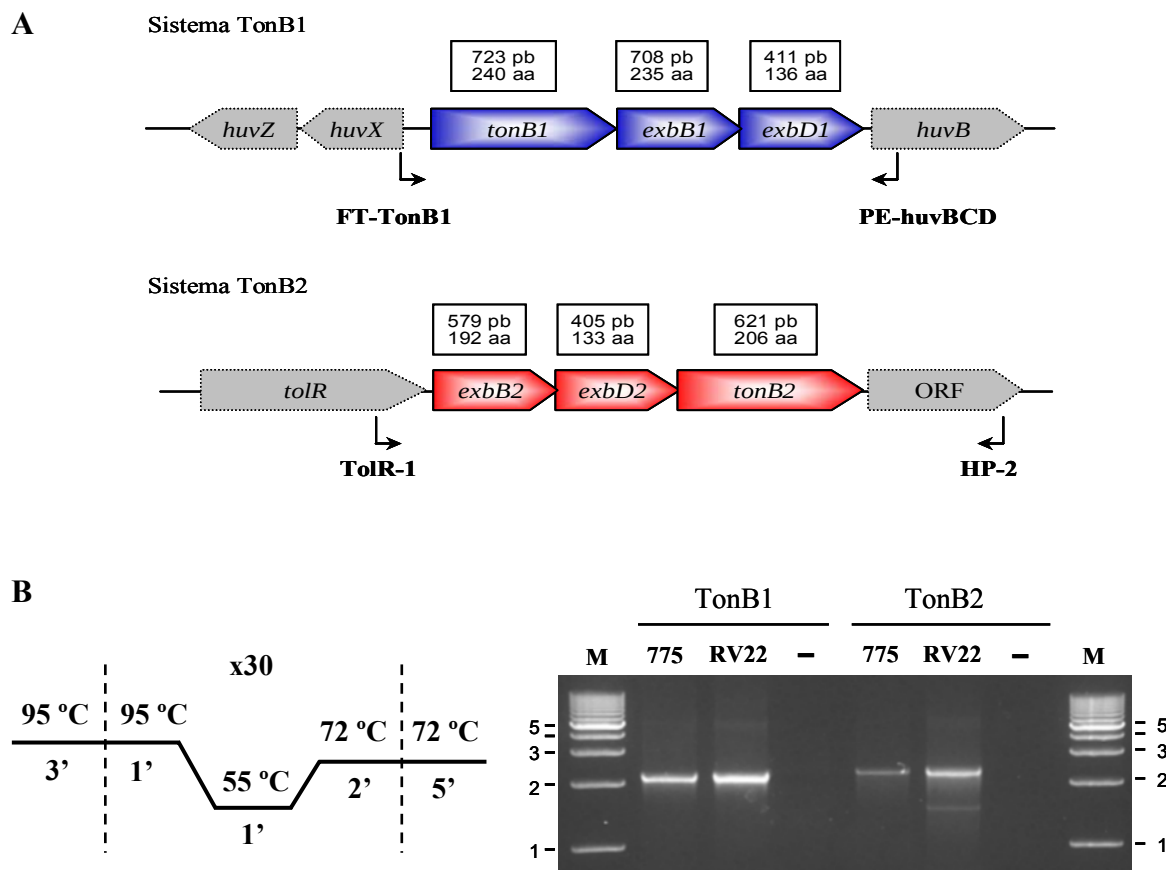


Figura IV-23: Aislamiento y caracterización de los sistemas TonB1 y TonB2 de la cepa RV22 de *V. anguillarum*. (A) Esquema de la organización genética del Sistema TonB1 y TonB2 caracterizado en la cepa 775 perteneciente al serotipo O1. Las flechas indican los cebadores utilizados en la amplificación de ambos sistemas tomando como molde el DNA genómico de la cepa RV22. (B) Condiciones de PCR y análisis electroforético del resultado de la amplificación de ambos sistemas TonB. –, control negativo de PCR; M, marcador de peso molecular (kb).

La secuenciación de ambos fragmentos confirmó la presencia de los tres componentes de cada uno de los sistemas TonB, así como la conservación en la organización genética de los *cluster*. Del alineamiento de las ORFs identificadas con las descritas previamente, destaca el elevado grado de similitud que existe entre ambos serotipos, llegando incluso a ser del 100% para las proteínas ExbD. Esto refuerza la posibilidad de que dicha similitud se extienda a las funciones de transporte asociadas a cada uno de los sistemas. A continuación se muestran los alineamientos entre la secuencia de nucleótidos de los componentes de cada sistema obtenidas de las cepas 775 y RV22:

» Sistema TonB1

tonB1

775	ATGGAAGTACCACGTGAATTTCTACTAGATATCTTGTGCTGGCAGTCTATCTCTCGCATTT	60
RV22	ATGGAAGTACAACGTGAATTTCTACTAGATATCTTGTGCTGGCAGCCTATCTCTCGCAATT	60

775	CACGCGGCGATCTTGTTCGTTGATGACGAATCAAAAAGTGTGGCCATGCCTGCGGGAAAT	120
RV22	CACGCGGCGATTTTGTGTTGACGACGAATCAAAAAGTGTGGCCATGCCTGCGGGAAAT	120

775	CAATCCACCTCAGTGTGCGATTAACTTTGTGGCTCAACCTCAAGCTCAGGTAGTACAAGAG	180
RV22	CAATCCACCTCAGTGTGCGATTAACTTTGTGGCTCAACCTCAAGCTCAGGTATTACAAGAG	180

775	CAGCAACAAAAACCCACCTCCAGAAAAGAGGCCAACAGGCCAAACAGCAAAAAAA	240
RV22	CAGCAACAAAAACCCACCTCCAGAAAAGAGGCCAACAGGCCAAACAGCAAAAAAA	240

775	GAGCCGCAAAAAGTGGTGCAAAAAAGAGCCTGTCAAAACCGGTAAAAGACAAACCGGCT	300
RV22	GAGCCGCAAAAAGTGGTGCAAAAAAGAGCCTGTCAAAACCGGTAGTAGACAAACAGCA	300

775	CCTAAATACCGACAAATCAGCACAAAGTGCAAACTCCTGTAAAGGAAGCTGTGACATCC	360
RV22	CCTAAATACCGACAAATCAGCACAAAGTGCAAACTCCTGTAAAGGAAGCGGTGACATCC	360

775	TCTGTAGAGAATGAAAAATAGCGCTGAATCGACACCGAAAAACGCGCCGCCCAAGCAGC	420
RV22	TCTGTAGAGAATGAAAAATAGTGCAGAAATCGACACCGAAAACTGCCGCCACCCCAAGCAGT	420

775	AGCGGCGCAACTAATCAACCGAAATTAGTCGATGCGCCGCTTTTTGTTACTCGCCAGCC	480
RV22	AATGGTGCAACTAATCAACCGAAATTAGTCGATGCGCCGCTTTTTGTTACTCGCCAGCC	480
* * *		
775	CCTCCTGTTTATCCAAGGCTTGACAAAAACGAGGAATTGAAGGGGTCGCTATGTATGAG	540
RV22	CCTCCTGTTTATCCAAGGCTTGACAAAAACGAGGTATTGAAGGGGTCGCTATGTATGAG	540

775	GTGTGGTTAGACGAAAAACGCGCCGCCAAATCAAAACAGGTTCTACTCTCTTCGTCGCGGCGCG	600
RV22	GTGTGGTTAGACGAAAAACGCGCCGCCAAATCAAAACAGGTTTTGCTCTCTTCGTCGCGGCGCG	600

775	GCGCTGCTAGATGAATCGGCTCTTAATGCCATCAAAACATGGAATTTCTCTCTCAAGTG	660
RV22	GCGCTGCTGGATGAATCGGCTCTTAATGCCATCAAAACATGGAATTTCTCTCTCAAGTG	660

775	GTGAACGGTGAAAAAATAGCCACCGAGTGCAAAATCCCAGTACGTTTTAAATTGGAAGGA	720
RV22	GTGAACGGTGAAAAAATAGCCACCGAGTGCAAAATCCCAGTACGTTTTAAATTGGAAGGA	720

775	TAA	723
RV22	TAA	723

exbB1

775 RV22	ATGGA ~~ACTACTTACTCAACTAGAACACA~~ ACTTGGCCTGATGGCCTGGCCTCTTTTTGTC 60 ATGGA ~~ATTACTTACTCAACTAGAACACA~~ ACTTGGCCTGATGGCCTGGCCTCTTTTTGTC 60 *****
775 RV22	TGCTCAGCACTTGGCACCATGATCATTACTGAACGGCTTTTCCAGTACTGCTTAGCCTT 120 TGCTCAGCACTTGGCACCATGATTATTACTGAACGGCTTTTCCAGTACTGCCGAGCCTT 120 *****
775 RV22	GGTGTGGAAAAAGGTGCGATCGGTAGTGCCTCAACCAAAATATCACCGACCAATACAGCG 180 GGTGTGGAAAAAGGTGCGATCGGTAGTACGCTCAACCAAAATATCACCGACCAATACAGCG 180 *****
775 RV22	CAAATTGAGGCGTTAGCCAGTGAAATTTTCCAGCAAGCGCCCATTTGCTTTATAAGGGGTT 240 CAAATTGAGACGCTAGCCAGTGAAATTTTCCAGCAAGCGCCCATTTGCTTTATAAGGGGTT 240 *****
775 RV22	GCCATGCTACTTGCTCATCACGATTTTCTCTAAAGGATTACGTGAAGATGCGGCGGGCATT 300 GCCATGCTACTTGCTCATCACGATTTTCTCTAAAGGATTACGTGAAGATGCGGCGGGCATT 300 *****
775 RV22	TGGTTGCAAGAAAAACGTCATCAACTGCAATCTGGACTGCGTATTTTATCTTTGATTGGT 360 TGGTTGCAAGAAAAACGTCATCAACTGCAATCTGGACTGCGTATTTTATCTTTGATTGGT 360 *****
775 RV22	GTGATCAGCCCGCTGCTAGGCTTACTTGGCACTGTGTTAGGTTTGATTGAAATGTTCAAA 420 GTGATCAGCCCGCTGCTAGGCTTACTTGGCACTGTGTTAGGTTTGATTGAAATGTTCAAA 420 *****
775 RV22	GGGGTGGCGCTCTCTTCTGGCAATATTACGCCAAACGACCTTGCGGATGGCCTAGGCATT 480 GGGGTGGCGCTCTCTTCTGGCAATATTACGCCAAACGACCTTGCGGATGGCCTAGGCATT 480 *****
775 RV22	GCGATGCGAACCACGGCTGCAGGTTTGTGATCGCACTTCCCGCAATTACCGGCGCTCAA 540 GCGATGCGAACCACGGCTGCAGGTTTGTGATCGCACTTCCCGCAATTACCGGCGCTCAA 540 *****
775 RV22	CTGCTTGGCGTATGGGCTGACAGAGTGATGGCAAACTTGAGCACACACTAAATTATGTC 600 TTGCTTGGCGTATGGGCTGACAGAGTGATGGCAAACTTGAGCGCACACTAAATTATGTC 600 *****
775 RV22	AACTTATGGCTCGAAGGTGTTTCTTTACAGCATGATTGCAACCACCAAAACAGAGCGGTGA 660 AACTTATGGCTCGAAGGTGTTTCTTTACAGCATGATTGCAACCACCAAAACAGAGCGGTGA 660 *****
775 RV22	GCTAAGTATGAAGACGTCTCTGACAATGATGTGGTTAATGCATCATGA 708 GCTAAGTATGAAGACGTCTCTGATAATGATGTGGTTAATGCATCATGA 708 *****

exbD1

775 RV22	ATGATTAAAGACACCGCACTCTCACTCATCCGCATTAATGCCAGATTTAACGCCATTGTTG 60 ATGATTAAAGACACCGCACTCTCACTCATCCGCATTAATGCCAGATTTAACGCCATTGTTG 60 *****
775 RV22	GATATCATTTTTATTGTCATGGTGTTTTTACTGCTTACAGCCGCAAGTTAAATTTGAGTCA 120 GATATCATTTTTATTGTCATGGTGTTTTTACTGCTTACAGCCGCGGTTAAATTTGAGTCA 120 *****
775 RV22	TTAGACGTTTCACTGCCAACACCGACTCACCCACCGTGAGTGAAGTGAACAAAGCAGTCA 180 TTAGACGTTTCACTGCCAACACCGACTCACCCACCGTGAGTGAAGTGAACAAAGCAGTCA 180 *****
775 RV22	ATCACAGTGAATCTTCTGGCGCACGAACCTTACTGGGCTATCGATGGCAAGCAGTATATC 240 ATCACAGTGAATCTTCTGGCGCACGAACCTTACTGGGCTATCGATGGCAAGCAGTATATC 240 *****
775 RV22	GATTGGAATAACTTCACATTGGCGTTGTTAGAACAAAGCAAAGCAGTGATCGCCCCATC 300 GATTGGAATAAATTCACATTGGCGTTGTTAGAGCAAAGCAAAGCAGTGATCGCCCCATC 300 *****
775 RV22	GTGATTGGCGCAGACAAAACCGCCGAAGTGCAGCAGTTGGTTAAATTGCTGGCGTTCTTG 360 GTGATTGGCGCAGACAAAACCGCCGAAGTGCAGCAGTTGGTTAAATTGCTGGCGTTCTTG 360 *****
775 RV22	CAAGACAATGGCATCGCTGCCACTCAGTTATTAAACCGACCATCCCCAATAG 411 CAAGACAATGGCATCGCTGCCACTCAGTTATTAAACCGACCATCCCCAATAG 411 *****

» Sistema TonB2

exbB2

775	ATGCCAAGCTTCAATGAGGAATGCGGCGTAATGAACAGCGTATTGCCAAGCGCACTGCTC	60
RV22	ATGCCAAGCTTCAATGAGGAATGCGGCGTAATGAACAGCGTATTGCCAAGCGCACTGCTC	60

775	AGCAATGACTGGCTAACAACTTGCAGCAGTTTATGCAGCAAGGGGGTATCGTCTTATGG	120
RV22	AGCAATGACTGGCTAACAACTTGCAGCAGTTTATGCAGCAAGGGGGTATCGTCTTATGG	120

775	TGGCTAGCTGGGGTGGTGGCGCTTTATTGGTTGTTGATCATCGAACGCGTACTGTTTGTG	180
RV22	TGGCTAGCTGGGGTGGTGGCGCTTTATTGGTTGTTGATCATCGAACGCGTACTGTTTGTG	180

775	GTATTGAGCTTTCCTAAATATCGAAAAGGGTGGTTAGAACAATGGCATCAACGCGCGGAA	240
RV22	GTGTTGAGCTTTCCTAAATATCGAAAAGGGTGGTTAGAACAATGGCATCAACGCGCGGAA	240
** *****		
775	CACCATTCATGGTATGCCCATGCCATTCGCGAGGGTTGGCTTGGTGAAAGCACAGCAGATG	300
RV22	CATCATTCATGGTATGCCCATGCCATTCGCGAGGGTTGGCTTGGTGAAAGCACAGCAGATG	300
** *****		
775	CTGCGCCACAACCTTAACATGATCAAACCTGCTCGTGACACTTTGCCCAATGTTAGGGCTG	360
RV22	CTGCGCCACAACCTTAACATGATCAAACCTGCTCGTGACACTTTGCCCAATGTTAGGGCTG	360

775	CTCGGCACAGTCCCGGAATGATCTCTGTATTTGATGTGATGGCAATCAAGGCAGTAGC	420
RV22	CTCGGCACAGTCCCGGAATGATCTCTGTATTTGATGTGATGGCAATCAAGGCAGTAGC	420

775	GATCCTAAATTGATGGCATCTGGCATTTTCATTGGCCACATTACCGACAATGGCCGGAATG	480
RV22	GATCCTAAATTGATGGCATCTGGCATTTTCATTGGCCACATTACCGACAATGGCCGGAATG	480

775	GTGCGGCCCTTGCGGGCATGTTTGTGCATGCTCGTCTTGCAAAAAAGTGTCATCTACTT	540
RV22	GTGCGGCCCTTGCGGGCATGTTTGTGCATGCTCGTCTTGCAAAAAAGTGTCATCTACTT	540

775	GAATTAATAATAGAAAAATCGTTAAGGAGTTTGCGAT	577
RV22	GAATTAATAATAGAAAAATCGTTAAGGAGTTTGCGAT	577

exbD2

775	ATGAGATTAGGCAGACGCCAACCAAGAAATGATGAAGCGCAGATAGACTTAACATCGATG	60
RV22	ATGAGATTAGGCAGACGCCAACCAAGAAATGATGAAGCGCAGATAGACTTAACATCGATG	60

775	CTCGACATCGTCTTTATCATGCTGATTTTTTTTCATTGTTACCAAGTTCATTGTTGCGTAA	120
RV22	CTCGACATCGTCTTTATCATGCTGATTTTTTTTCATTGTTACCAAGTTCATTGTTGCGTAA	120

775	TCAGGTGTTGAGGTTAACCCTCCTCAAGCTTCTCACGCGGTGAGTCAGAAAGATGCGGGT	180
RV22	TCAGGTGTTGAGGTTAACCCTCCTCAAGCTTCTCACGCGGTGAGTCAGAAAGATGCGGGT	180

775	ATTTTTGTCGCTATCAATGCATCCAATGATATTTACATCGACAAACGCTTGATTGATGTT	240
RV22	ATTTTTGTCGCTATCAATGCATCCAATGATATTTACATCGACAAACGCTTGATTGATGTT	240

775	GACCGTGTAGAGGCCACCCTAGAACATCTGTTGCTCGAACAAACGAGCGCGGCGTTAGTG	300
RV22	GACCGTGTAGAGGCCACCCTAGAACATCTGTTGCTCGAACAAACGAGCGCGGCGTTAGTG	300
** *****		
775	ATTCAAGCGGATGAACATGCTTATAACGGTACGGTTGTTAAAGTGATGGATGCGGCCAAA	360
RV22	ATTCAAGCGGATGAACATGCTTATAACGGTACGGTTGTTAAAGTGATGGATGCGGCCAAA	360

775	GGGGCCGGAGTGAAAAATATCGCATTTGGCGGCGGAGAAACGTTAA	405
RV22	GGGGCCGGAGTGAAAAATATCGCATTTGGCGGCGGAGAAACGTTAA	405

tonB2

775	ATGGGACGTTTACTGCTTGCTTTGCCAATTGCAGGAGCGATTTGCTGGCGCTGTTCAAGT	60
RV22	ATGGGACGTTTACTGCTTGCTTTGCCAATTGCAGGAGCGATTTGCTGGCGCTGTTCAAGT	60

775	TTTATGGCGTGATGTTGGATAACGGTAACCAACGCGCTGTAAAACCAACTCAAGCACTG	120
RV22	TTTATGGCGTGATGTTGGATAACGGTAACCAACGCGCTGTAAAACCAACTCAAGCACTG	120

775	CGATTTAACATGGTGATGATGGAACAAGAACACGATTTACAGCGTCGCCAACGTAGCGTT	180
RV22	CGATTTAACATGGTGATGATGGAACAAGAACACGATTTACAGCGTCGCCAACGTAGCGTT	180

775	CCGGAACTTTAAAGTTGCCTGAGCCGCCACCGCAAGCACAAAGTGACACAGTCACAACT	240
RV22	CCGGAACTTTAAAGTTGCCTGAGCCGCCACCGCAAGCACAAAGTGACACAGTCACAACT	240

775	ACCGCTACGGCCGCTACATCACTCACTAGTTTACCAGCTTTGGGTTTGATACAGCGCTT	300
RV22	ACCGCTACGGCCGCTACATCACTCACTAGTTTACCAGCTTTGGGTTTGATACAGCGCTT	300

775	AATGGGGTGGCGATTAGCGCACCAACCTTTGGTGATTTTGGCTCAAACAGCAAGCAATG	360
RV22	AATGGGGTGGCGATTAGCGCACCAACCTTTGGTGATTTTGGCTCAAACAGCAAGCAATG	360

775	CCGTTATATCGTGTCGAGCCGCTTTATCCAAGCCGAGCTCTAAAGCGAGGCGTAGAAGGT	420
RV22	CCGTTATATCGTGTCGAGCCGCTTTATCCAAGCCGAGCTCTAAAGCGAGGCGTAGAAGGT	420

775	TTCGTTACATTAAAGCTTTACCATTTGATACAACAGGAAAAGCCGTCGATATCAATGTCGTC	480
RV22	TTCGTTACATTAAAGCTTTACCATTTGATACAACAGGAAAAGCCGTCGATATCAATGTCGTC	480

775	GATGCCAATCCTAAACGTATGTTTGAGCGTGAAGCGATGCAAGCGCTGAAAAATGGAAG	540
RV22	GATGCCAATCCTAAACGTATGTTTGAGCGTGAAGCGATGCAAGCGCTGAAAAATGGAAG	540

775	TATCAACCTCAGATTGTCGACGGTAAAGCCATTGAGCAGCCGGGACAAACCGTGACTGTG	600
RV22	TATCAACCTCAGATTGTTGACGGCAAGCCATTGAGCAGCCGGGACAAACCGTGACTGTG	600

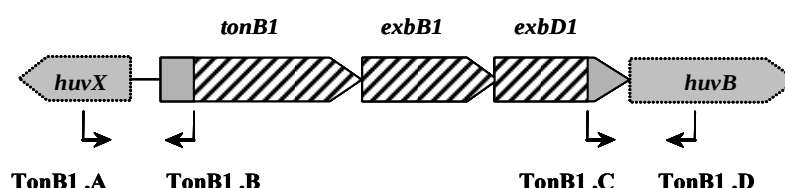
775	GAGTTTAAAATTGCCAAATGA	621
RV22	GAGTTTAAAATCGCCAAATGA	621

2.4.4.2 Papel del sistema TonB1 y TonB2 en la captación de distintas fuentes de hierro en la cepa RV22

Para determinar la función de cada uno de estos sistemas en la cepa RV22 de *V. anguillarum*, ambos se inactivaron mediante mutación por intercambio alélico sin afectar la expresión de los genes adyacentes y que pudieran formar parte del operón.

Durante la construcción de estos mutantes se deleccionó un fragmento que incluía la mayor parte de cada sistema, desde el aminoácido 24 de la proteína TonB1 hasta el residuo 112 de ExbD1, en el caso del sistema TonB1, y desde el aminoácido 238 de ExbB2 hasta la posición 674 de la proteína TonB2 para el correspondiente sistema TonB2 (Fig. IV-24). El procedimiento seguido fue el mismo que el utilizado previamente en la mutación de los genes del sistema de captación y transporte de hemo, partiendo de la amplificación de las secuencias adyacentes a la región deleccionada y clonaje de ambos fragmentos en el plásmido suicida pNidKan (Material y Métodos). Los cebadores utilizados para la mutación del sistema TonB1 (TonB1.A/TonB1.B y TonB1.C/TonB1.D) y sistema TonB2 (TonB2.A/TonB2.B y TonB2.C/TonB2.D) se recogen en el Anexo II.

Sistema TonB1



Sistema TonB2

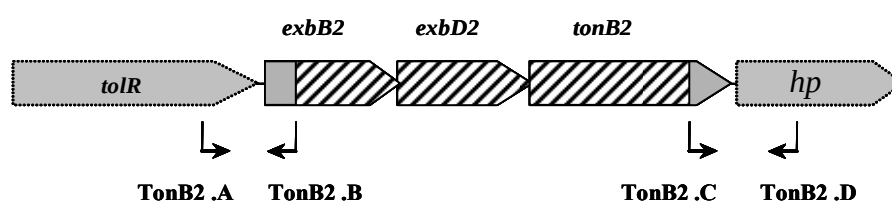


Figura IV-24: Esquema del diseño de las mutaciones cromosómicas de los sistemas TonB1 y TonB2 en la cepa RV22 de *V. anguillarum*. Las flechas indican los cebadores y las regiones amplificadas en la construcción de los plásmidos de recombinación. Las regiones rayadas dentro de cada gen representan el tamaño de la delección.

Las cepas mutantes seleccionadas y confirmadas por PCR con las parejas de cebadores TonB1.A/TonB1.D y TonB2.A/TonB2.D, respectivamente, fueron las siguientes:

-B249: Mutante cromosómico derivado de la cepa RV22 por delección del sistema TonB1

-B250: Mutante cromosómico derivado de la cepa RV22 por delección del sistema TonB2

Finalmente la cepa B250 también sirvió de base para la construcción de un doble mutante Δ TonB1/ Δ TonB2 mediante la transferencia, por conjugación, de la construcción Δ TonB1 clonada anteriormente en el plásmido suicida. Tras un doble evento de recombinación se seleccionó la cepa B259 confirmada, igualmente por PCR, como mutante para ambos sistemas (Fig. IV-25).

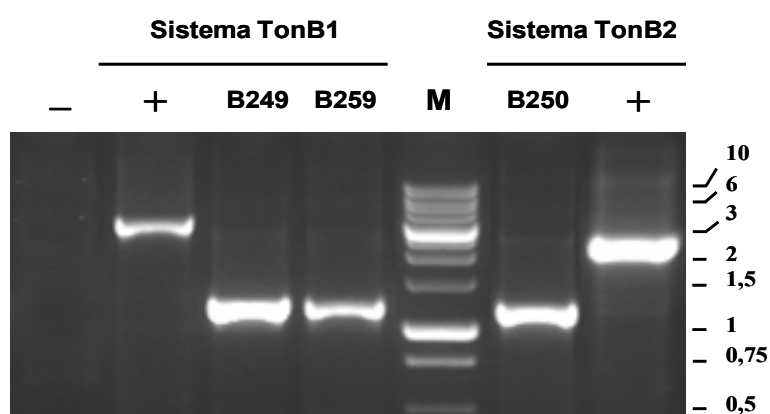


Figura IV-25: Confirmación por PCR de los mutantes cromosómicos derivados de la cepa de *V. anguillarum* RV22 para el sistema TonB1 (B249) y TonB2 (B250) y el doble mutante Δ TonB1/ Δ TonB2 (B259). (+) control positivo de PCR obtenido a partir de la cepa salvaje RV22; –, control negativo de PCR; M, marcador de peso molecular (kb).

Las cepas mutantes, junto con las salvajes, se ensayaron en medio CAS para analizar el efecto de las mutaciones sobre la producción de sideróforos. Según el resultado obtenido los mutantes B250 y B259 se comportan de manera similar a los mutantes analizados anteriormente y derivados de la cepa 775, de tal modo que sólo en el caso de la mutación del sistema TonB2 se hace evidente un efecto sobre la capacidad de transporte del sideróforo (Fig. IV-26).

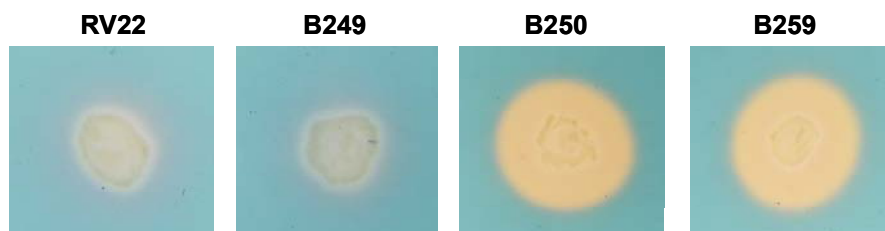


Figura IV-26: Determinación de producción de sideróforos en medio CAS de los mutantes del sistema TonB1 (B249), sistema TonB2 (B250) y el doble mutante Δ TonB1TonB2 (B259) derivados de la cepa salvaje RV22 de *V. anguillarum*.

Los mutantes se ensayaron, a continuación, en placas de CM9 para probar la capacidad de la bacteria para utilizar diferentes fuentes de hierro, como la Hemina y los sideróforos enterobactina, ferricromo y el propio sideróforo vancrobactina producido por la cepa RV22.

Los resultados obtenidos (Tabla IV-10) demuestran que tanto el sistema TonB1 como el TonB2 participan por igual en la obtención de hierro a partir de compuestos de hemo y a partir del ferricromo. Por otro lado, la inactivación del sistema TonB2 pone de manifiesto la especificidad de éste en la captación y transporte de complejos Fe-sideróforo, como la enterobactina y el propio sideróforo producido por la cepa salvaje. Todos estos resultados coinciden con los obtenidos en los ensayos anteriores con la cepa 775, por lo que, a nivel funcional, no existen diferencias entre los sistemas TonB de transducción de energía caracterizados en el serotipo O1 y O2.

Tabla IV-10: Efecto de la inactivación de los sistemas TonB1 y TonB2 en la cepa RV22 de *V. anguillarum* (serotipo O2) en la capacidad de utilización de diversas fuentes de hierro.

CEPA	FUENTE DE Fe				
	Fe ₂ (SO ₄) ₃	Hm	Vanc	Ent	Fer
<i>V. anguillarum</i> RV22	+	+	+	+	+
B249 (ΔTonB1)	+	+	+	+	+
B250 (ΔTonB2)	+	+	–	–	+
B259 (ΔTonB1ΔTonB2)	+	–	–	–	–

(+) crecimiento alrededor de la fuente de hierro

(-) Ausencia de crecimiento alrededor de la fuente de hierro

Fuentes de hierro: Fe₂(SO₄)₃; Hm, Hemina; Vanc, vancrobactina; Ent, enterobactina; Fer, ferricromo.

2.4.4.3 Contribución del sistema TonB a la virulencia de *V. anguillarum* RV22

Para determinar si los sistemas TonB1 y TonB2 tienen algún papel en la virulencia de la cepa RV22 de *V. anguillarum*, se hicieron ensayos de determinación de la LD₅₀ utilizando como modelo animal rodaballos jóvenes (*Scophthalmus maximus*). Las cepas ensayadas en este trabajo fueron la cepa RV22 de *V. anguillarum* y sus correspondientes mutantes B249 (Δ TonB1), B250 (Δ TonB2) y B259 (Δ TonB1 Δ TonB2). Para el experimento de cálculo de la LD₅₀ se inocularon, intraperitonealmente, un total de 10 peces por cepa tal como se describe

en Material y Métodos. En todos los casos el aislamiento en cultivo puro y su confirmación serológica permitieron establecer como única causa de la muerte la infección bacteriana por *V. anguillarum* serotipo O2 (Fig. IV-27).

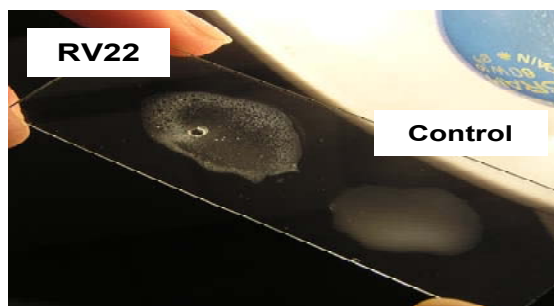


Figura IV-27: Confiración de la identidad de un aislado obtenido de riñón de uno de los peces infectados con la cepa *V. anguillarum* RV22 (Serotipo O2) mediante ensayo de aglutinación en portaobjetos.

La Figura IV-28A muestra los valores de LD_{50} obtenidos en cada uno de los ensayos según el método de Reed y Muench (1938). Aunque en el mutante individual del sistema TonB1 se podría esperar una cierta atenuación en cuanto a su virulencia respecto a la cepa salvaje, ésta no fue lo suficientemente amplia como para poder considerarla como una cepa no virulenta o con LD_{50} significativamente diferente a la cepa parental. Ya que la síntesis y utilización de sideróforos está considerada como un factor de virulencia fundamental en *V. anguillarum*, también sería de esperar que la mutación del sistema TonB2 (fundamental para la utilización de los complejos Fe-sideróforo) se viera reflejada de algún modo en la LD_{50} de la cepa B250. Sin embargo, aunque los resultados finales no permiten establecer la importancia del complejo TonB2-ExbB2-ExbD2 en la virulencia, cabe destacar que el desarrollo de la infección en este mutante fue más lento respecto a la cepa parental o la cepa mutante del sistema TonB1 (Fig. IV-28B), sugiriendo un posible papel del sistema TonB2 en el proceso de infección de esta cepa de *V. anguillarum*.

En el caso del doble mutante B259 existe una clara atenuación en la virulencia de la bacteria. En este caso la LD_{50} ($LD_{50} > 10^7$) supera, en al menos dos logaritmos, la establecida para la cepa salvaje RV22 ($LD_{50} = 10^5$). Según lo demostrado anteriormente la supresión de ambos sistemas TonB bloquea, a nivel del receptor de membrana externa, los dos mecanismos principales de obtención de hierro con los que cuenta *V. anguillarum*, como son la utilización de sideróforos y la obtención de hierro a partir del grupo hemo. Puesto que la transferrina y las hemoproteínas son las fuentes de hierro más abundantes dentro del hospedador, es evidente que el bloqueo simultáneo de ambos sistemas perjudica seriamente la capacidad de multiplicación del microorganismo dentro del pez.

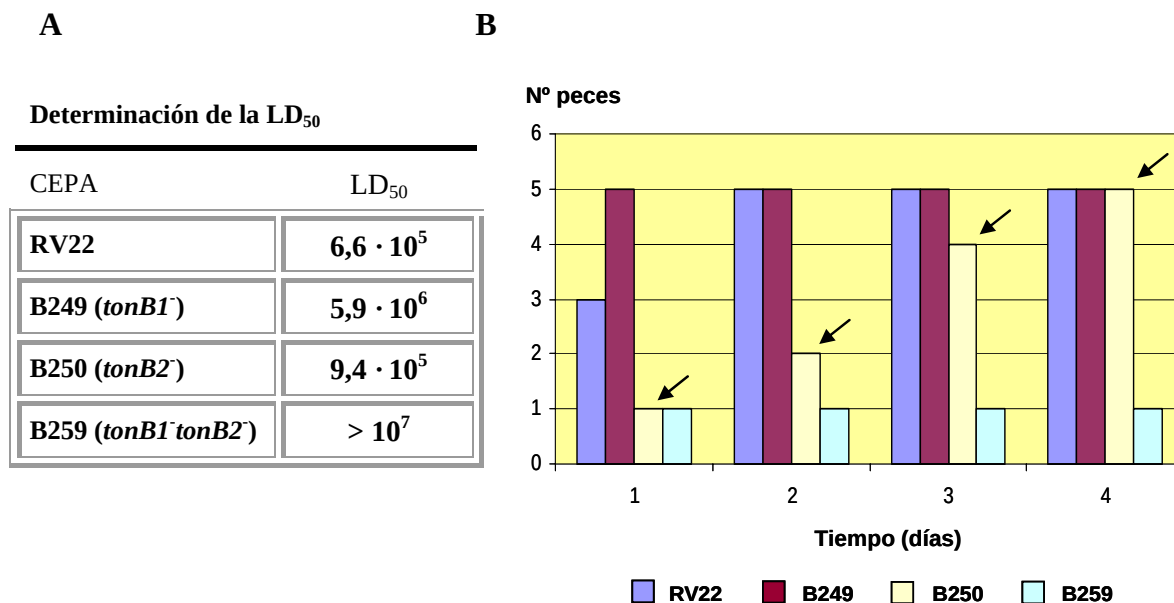


Figura IV-28: Ensayos de virulencia de la cepa RV22 y sus correspondientes mutantes para el sistema TonB1 (B249), sistema TonB2 (B250) y el doble mutante TonB1/TonB2 (B259). (A) Resultado de las LD₅₀ establecidas para cada una de las cepas ensayadas. (B) Gráfica de mortalidad acumulada en la que se muestra la mortalidad provocada por las distintas cepas de *V. anguillarum* a lo largo del experimento. Las flechas resaltan la evolución de la mortalidad causada por la cepa mutante para el sistema TonB2 relacionado directamente con la captación de sideróforos.

3. ORGANIZACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y REGULACIÓN DE LOS GENES ASOCIADOS A LA CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE HEMO

3.1 Determinación del número de unidades transcripcionales

Según el análisis de la organización genética del *cluster* descrito en el capítulo 1, adyacente al extremo 3' del gen *huvA* y en orientación opuesta se identificaron los genes *huvX* y *huvZ*. A continuación, y transcribiéndose en la misma hebra que *huvA*, se disponen los genes *tonB1*, *exbB1*, *exbD1*, *huvB*, *huvC* y *huvD*. Estas diferencias en cuanto a la orientación de los genes del sistema, así como la proximidad que existe entre determinadas secuencias de las ORFs, nos llevaron a pensar en su posible agrupamiento en unidades transcripcionales. Así, nos planteamos que podrían existir dos operones, uno formado por los genes *huvX-huvZ* y otro por *tonB1exbB1D1-huvBCD*, mientras que el gen *huvA* se transcribiría individualmente a partir de su propio promotor localizado en su extremo 5'.

Esta hipótesis de la existencia de tres unidades transcripcionales se ve apoyada por la existencia de dos zonas de secuencias palindrómicas dentro de la región intergénica *huvA-huvZ* que podrían actuar como terminadores de la transcripción del gen *huvA* y del operón *huvX-huvZ* respectivamente (Fig. IV-29). Por el contrario, entre las secuencias de los genes *tonB1*, *exbB1*, *exbD1*, *huvB*, *huvC* y *huvD* no se ha podido identificar ninguna otra región de estructura similar.

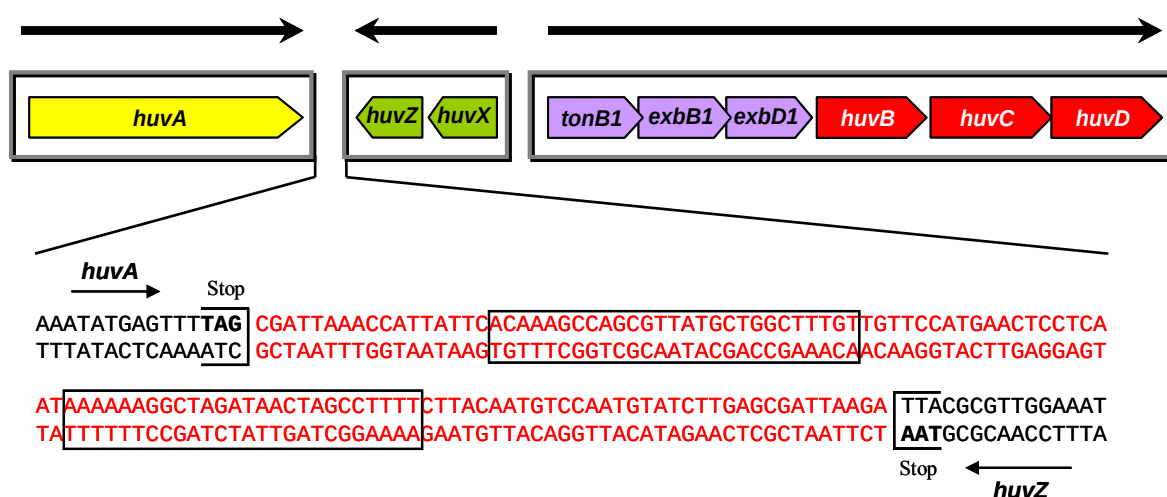


Figura IV-29: Organización transcripcional propuesta para el *cluster* génico descrito en *V. anguillarum*. Los 9 genes del sistema se agruparían en tres unidades transcripcionales: el gen *huvA* y los dos operones *huvXZ* y *tonB1exbB1D1-huvBCD*. Entre los genes *huvA* y *huvZ* se identificaron dos secuencias palindrómicas caracterizadas como terminadores del proceso de síntesis del mRNA. Las flechas indican el sentido de la transcripción.

Para la confirmación de esta hipótesis se diseñaron experimentos de Reverso-Transcripción (RT)-PCR, tal como se describe en Material y Métodos. El RNA total bacteriano, extraído de cultivos de la cepa H775-3 de *V. anguillarum*, se utilizó como molde en la obtención del cDNA correspondiente al mRNA producto de la transcripción de los operones *huvX-huvZ* y *tonB1exbB1D1-huvBCD*. Los oligonucleótidos empleados en las respectivas reacciones de reverso transcripción fueron RT-*huvZ* y RT-*huvD* (Anexo II).

3.1.1 Operón *huvXZ*

A partir del cebador RT-*huvZ*, homólogo al extremo 3' de *huvZ*, se sintetizó el cDNA correspondiente al mRNA producto de, al menos, la transcripción de este gen. Para comprobar si *huvX* también estaba incluido dentro del mismo transcrito, la muestra obtenida de la reacción de reverso-transcripción sirvió como molde para la amplificación por PCR de parte de la secuencia de cada uno de los posibles genes incluidos en la molécula de mRNA (Fig. IV-30A).

El análisis electroforético de los productos de amplificación obtenidos, confirmó la presencia de fragmentos de tamaño similar a los esperados para los genes *huvX* (394 pb) y *huvZ* (459 pb) (Fig. IV-30B), de manera que la expresión de ambos está dirigida por un promotor localizado en la región “corriente arriba” de *huvX*.

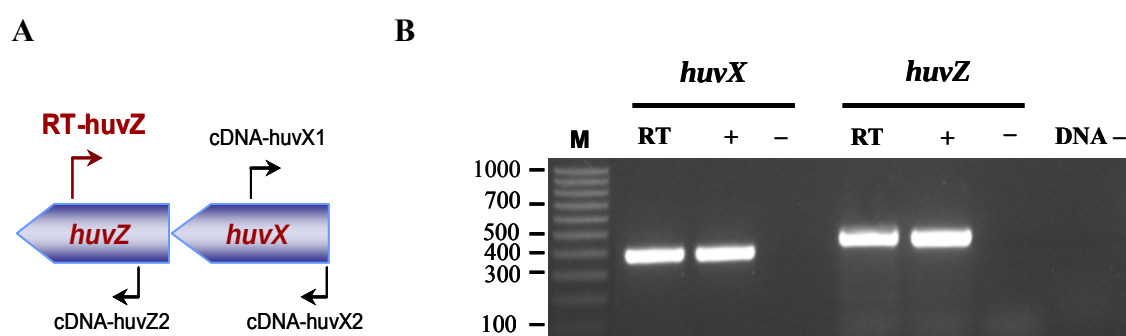


Figura IV-30: Confirmación de la transcripción conjunta de los genes *huvX* y *huvZ*. (A) Esquema de la organización genética de la región que engloba ambos genes. Las flechas indican la posición de los cebadores utilizados en la reacción de reverso transcripción (RT-*huvZ*) y los empleados en la PCR posterior. (B) Análisis electroforético de las reacciones de amplificación utilizando como molde el cDNA derivado del RNA mensajero producto de la transcripción del operón *huvXZ*. RT, amplificación del cDNA; +, control positivo de PCR; -, control negativo de PCR; DNA-, confirmación de la ausencia de DNA en la extracción del RNA total; M, marcador de peso molecular (pb).

3.1.2 Operón *tonB1exbB1D1-huvBCD*

A pesar de que la secuencia de nucleótidos sugiere que estos 6 genes se transcriben conjuntamente, resulta extraño que los genes que codifican un sistema TonB se dispongan en el mismo operón que los genes relacionados con el transporte específico de una determinada molécula. Sin embargo las recientes caracterizaciones en otras especies bacterianas de sistemas homólogos al *cluster* de transporte de hemo de *V. anguillarum*, ponen de manifiesto la existencia de regiones promotoras “corriente arriba” de *tonB1* a partir de las que se dirige la transcripción del resto de los genes del sistema (Juiz-Río *et al.*, 2005; Occhino *et al.*, 1998). Para comprobar si sucede lo mismo en *V. anguillarum*, se trató de detectar el mRNA producto de la co-transcripción de los genes *tonB1exbB1D1-huvBCD* mediante ensayos de RT-PCR utilizando un cebador homólogo al extremo 3' de *huvD* (RT-huvD), así como las posteriores reacciones de PCR para la amplificación de todos los genes que formarían parte del hipotético operón (Fig. IV-31A).

En todas las reacciones se detectaron fragmentos del tamaño esperado, demostrando que los genes que forman el sistema TonB1 (*tonB1*, *exbB1*, *exbD1*) y los genes de transporte *huvB*, *huvC* y *huvD* constituyen una única unidad transcripcional (Fig. IV-31B).

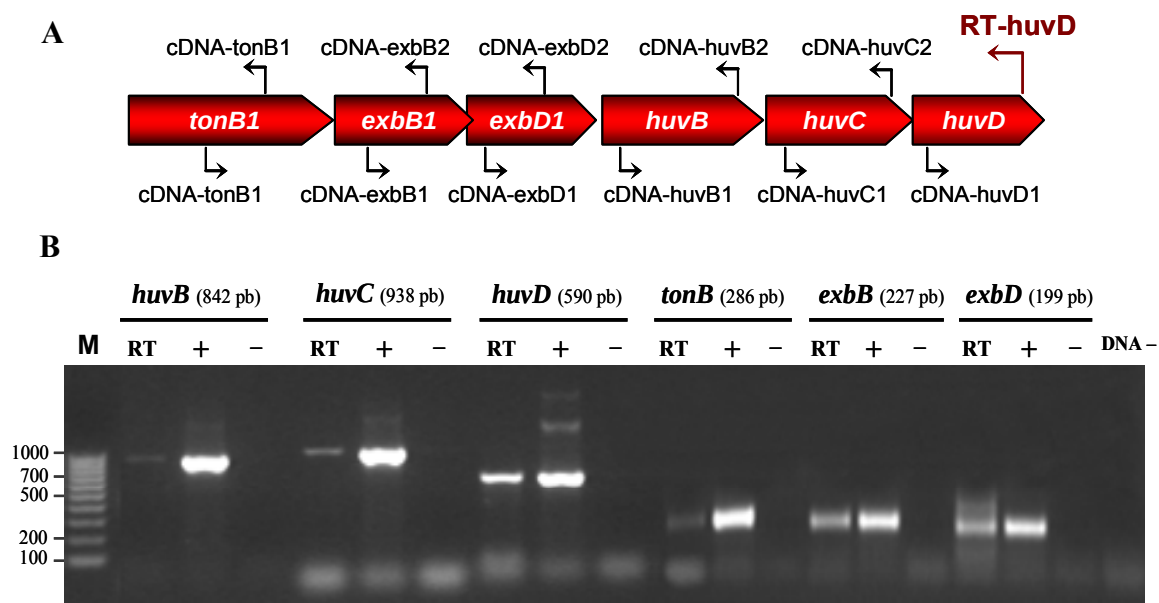


Figura IV-31: (A) Esquema del operón *tonB1exbB1D1-huvBCD*. Las flechas indican la posición de los cebadores utilizados en la reacción de reverso transcripción (RT-huvD) y los empleados en las respectivas amplificaciones por PCR. (B) Resultado de la RT-PCR a partir del cDNA producto del mRNA de la transcripción conjunta de los genes *tonB1*, *exbB1*, *exbD1*, *huvB*, *huvC* y *huvD*. Entre paréntesis se dan los tamaños esperados para cada uno de los fragmentos de amplificación. RT, amplificación del cDNA; +, control positivo de PCR; -, control negativo de PCR; DNA-, confirmación de la ausencia de DNA en la extracción del RNA total; M, marcador de peso molecular (pb).

3.1.3 Transcripción de los operones *huvXZ* y *tonB1exbB1D1-huvBCD* en los mutantes cromosómicos B106 ($\Delta huvX$) y B128 ($\Delta huvB$)

En apartados anteriores se describió el efecto que tenía sobre el crecimiento bacteriano la supresión de la mayor parte de la secuencia codificante de cada uno de los genes del sistema de utilización de hemo caracterizado en *V. anguillarum*. Asimismo, tal como se acaba de demostrar, todos estos genes, a excepción de *huvA*, están organizados en dos operones, transcritos a partir de sus respectivos promotores localizados dentro la región intergénica *huvX-tonB1*. Este nuevo dato acerca de su organización transcripcional, plantea la duda de si el fenotipo observado en cada uno de los mutantes diseñados anteriormente es el resultado de la delección individual de cada gen, o bien se trata de un efecto polar derivado del propio proceso de mutación.

Aunque la metodología elegida para introducir estas mutaciones cromosómicas trata de no alterar la pauta de lectura de los genes localizados “corriente abajo”, se diseñaron experimentos de RT-PCR para confirmar la expresión de las ORFs adyacentes e incluidas dentro del operón. De este modo las cepas mutantes B106 ($\Delta huvX$) y B128 ($\Delta huvB$) se utilizaron como punto de partida para la síntesis del cDNA producto de la transcripción de los operones *huvZX* (cebador RT-*huvZ*) y *tonB1exbB1D1-huvBCD* (cebador RT-*huvD*), así como la posterior detección por PCR de los genes *huvZ*, *huvX*, *huvB*, *huvC* y *huvD*, respectivamente. Según los resultados obtenidos (Fig. IV-32) la delección de los genes *huvX* y *huvB* no bloquea la transcripción de los genes localizados “corriente abajo”, de manera que el efecto sobre el crecimiento observado en cada una de las cepas mutantes es el resultado de la alteración de una única proteína.

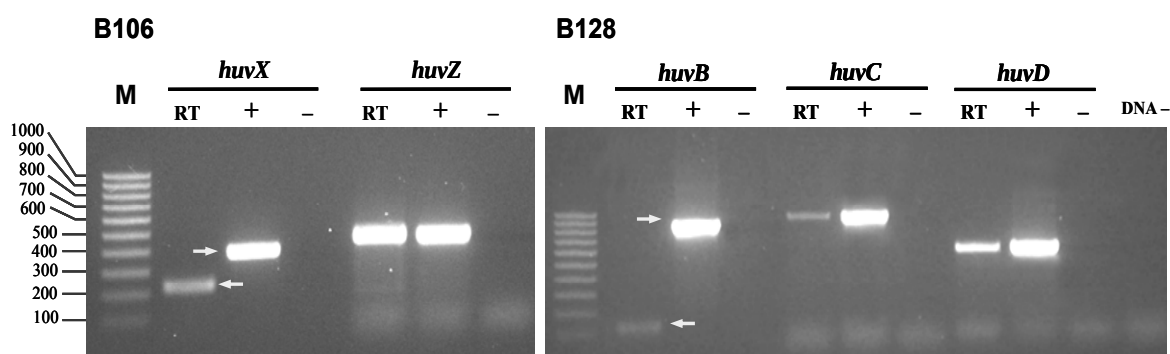


Figura IV-32: Confirmación por RT-PCR de la expresión de los genes adyacentes a las mutaciones cromosómicas de los genes *huvX* (B106) y *huvB* (B128). Las flechas resaltan la diferencia entre el tamaño del fragmento obtenido del cDNA producto de la transcripción del mutante por delección y la amplificación derivada del DNA genómico purificado de la cepa parental H775-3 y utilizada como control positivo de PCR (+). RT, amplificación del cDNA; –, control negativo de PCR; DNA–, confirmación de la ausencia de DNA en la extracción del RNA total; M, marcador de peso molecular (pb).

3.1.4 Operón *exbB2exbD2tonB2*

Las secuencias de los tres genes que forman el sistema TonB2 se solapan, sugiriendo también la transcripción conjunta de los tres componentes del sistema. Asimismo, la proximidad que existe entre la secuencia del gen *tolR* y *exbB2*, el solapamiento de la ORF *hp* con el gen *tonB2* y la identificación de una única secuencia palindrómica de terminación adyacente al extremo 3' de esta última ORF, llevó a pensar en la posible organización en operón incluyendo, además de los genes *exbB2-exbD2-tonB2*, las ORFs adyacentes que delimitan al sistema (Fig. IV-33A).

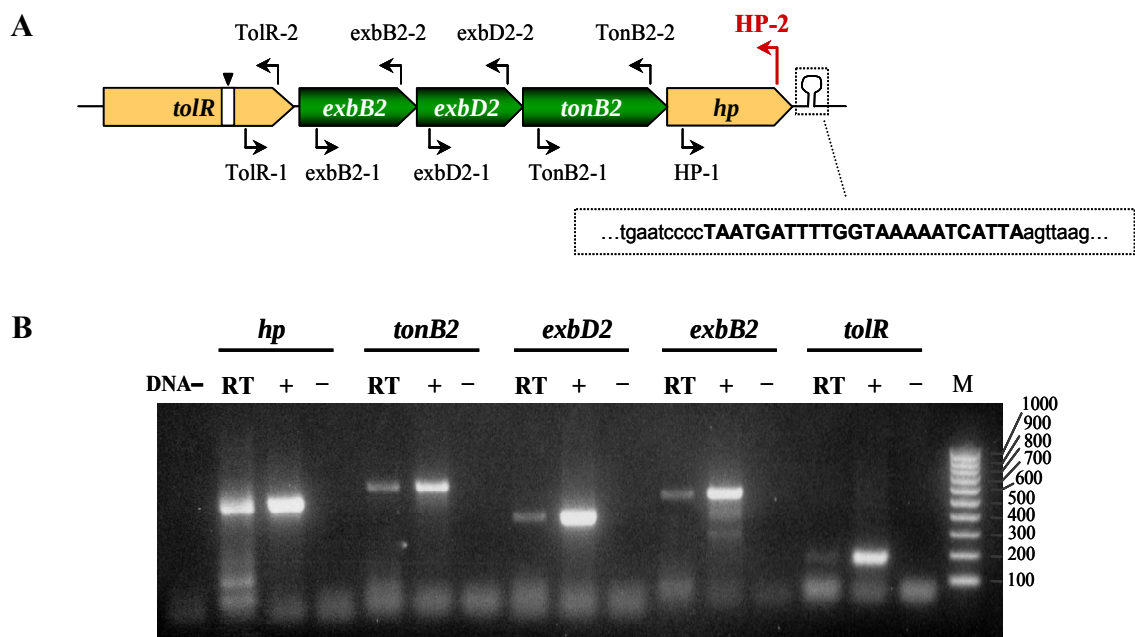


Figura IV-33: (A) Esquema de la organización genética del cluster que incluye al sistema TonB2 de *V. anguillarum* y condiciones de amplificación utilizadas en la RT-PCR. Las flechas indican los cebadores utilizados en la reacción de reverso transcripción (HP-2) y en la PCR posterior. El bucle final representa la región de terminación de la transcripción (en mayúscula y negrita). La punta de flecha indica el punto de inserción del transposón Tn10. (B) Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos a partir del cDNA derivado de la reacción de reverso-transcripción con el cebador HP-2. RT, amplificación del cDNA; +, control positivo de PCR; -, control negativo de PCR; DNA-, confirmación de la ausencia de DNA en la extracción del RNA total; M, marcador de peso molecular (pb).

Para probarlo, se sintetizó mediante RT-PCR el cDNA correspondiente al mRNA de este supuesto operón, partiendo de un cebador (HP-2, Anexo II) localizado dentro de la secuencia de la ORF de función desconocida. Finalmente el cDNA resultado de la reacción de reverso-transcripción se empleó como molde en reacciones de amplificación por PCR, utilizando cebadores homólogos a las regiones internas de los genes *tolR*, *exbB2*, *exbD2*, *tonB2* y *hp*. El resultado, mostrado en la Figura IV-33B, confirma la transcripción conjunta de los cuatro genes *tolR-exbB2exbD2tonB2-hp*. La región promotora se localizaría “corriente

arriba” de *tolR*, mientras que la transcripción finalizaría a unas 9 pb “corriente abajo” de la última ORF, en dónde se ha identificado una posible región terminadora de la transcripción.

3.2 Caracterización de los promotores del *cluster* de captación y transporte de hemo

Una vez definido el número de unidades transcripcionales, se trató de caracterizar de un modo más preciso cada una de las regiones promotoras del *cluster* de utilización de hemo (promotores de *huvA* y de los operones *huvXZ* y *tonB1exbB1D1-huvBCD*). Para ello se diseñaron experimentos de *primer extension* partiendo del RNA total purificado a partir de la cepa H775-3 de *V. anguillarum*.

3.2.1 Promotor de *huvA*

El cDNA correspondiente a la porción inicial del mRNA transcrito a partir del promotor de *huvA* se obtuvo mediante una reacción de reverso-transcripción utilizando los cebadores complementarios a la ORF, PE-*huvA*1 y PE-*huvA*2 (Anexo II). Estos cebadores se localizan, respectivamente, a 70 y 149 pb “corriente abajo” del primer codón ATG del gen. El tamaño exacto de los fragmentos de cDNA se estimó por electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando como marcador la reacción de secuenciación obtenida con los mismos cebadores que los empleados en la *primer extension* (Fig. IV-34A). El resultado de las reacciones derivadas de ambos cebadores puso de manifiesto, como inicio del proceso de transcripción, un residuo de Adenina localizado en la posición 64 “corriente arriba” del primer codón ATG de *huvA*. A partir de este punto y por homología con las secuencias consenso del promotor sigma-70 de *E. coli*, se identificaron las correspondientes regiones -10 (TCACAT) y -35 (TACACT) (Fig. IV-34B). Por otro lado, previamente Mazoy *et al.* (2003) indentificaron una posible zona de unión para la proteína Fur dentro de la secuencia del extremo 5' adyacente a *huvA*. Esta región (AATGATAGTAATTACCATT) comparte una identidad del 58% con la *Fur-box* consenso de *E. coli* (de Lorenzo *et al.*, 1987), mientras que posee identidades entre el 89 y el 94% con secuencias homólogas identificadas en otras especies del género *Vibrio* y dentro de los promotores de receptores de grupos hemo homólogos a *huvA* (Fig. IV-34C). Normalmente esta región *Fur-box*, característica de genes regulados por hierro, se localiza dentro de la propia región promotora, alrededor de las secuencias -10 y -35. Sin embargo en este caso la secuencia de unión a Fur se identificó a 6

pb “corriente abajo” del punto de inicio de la transcripción. Aunque es una situación poco frecuente, existen antecedentes de casos similares en genes como el gen *fur* de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Haraszthy *et al.*, 2002) o el gen *feuA* de *Bacillus subtilis* (Fuangthong y Helmann, 2003).

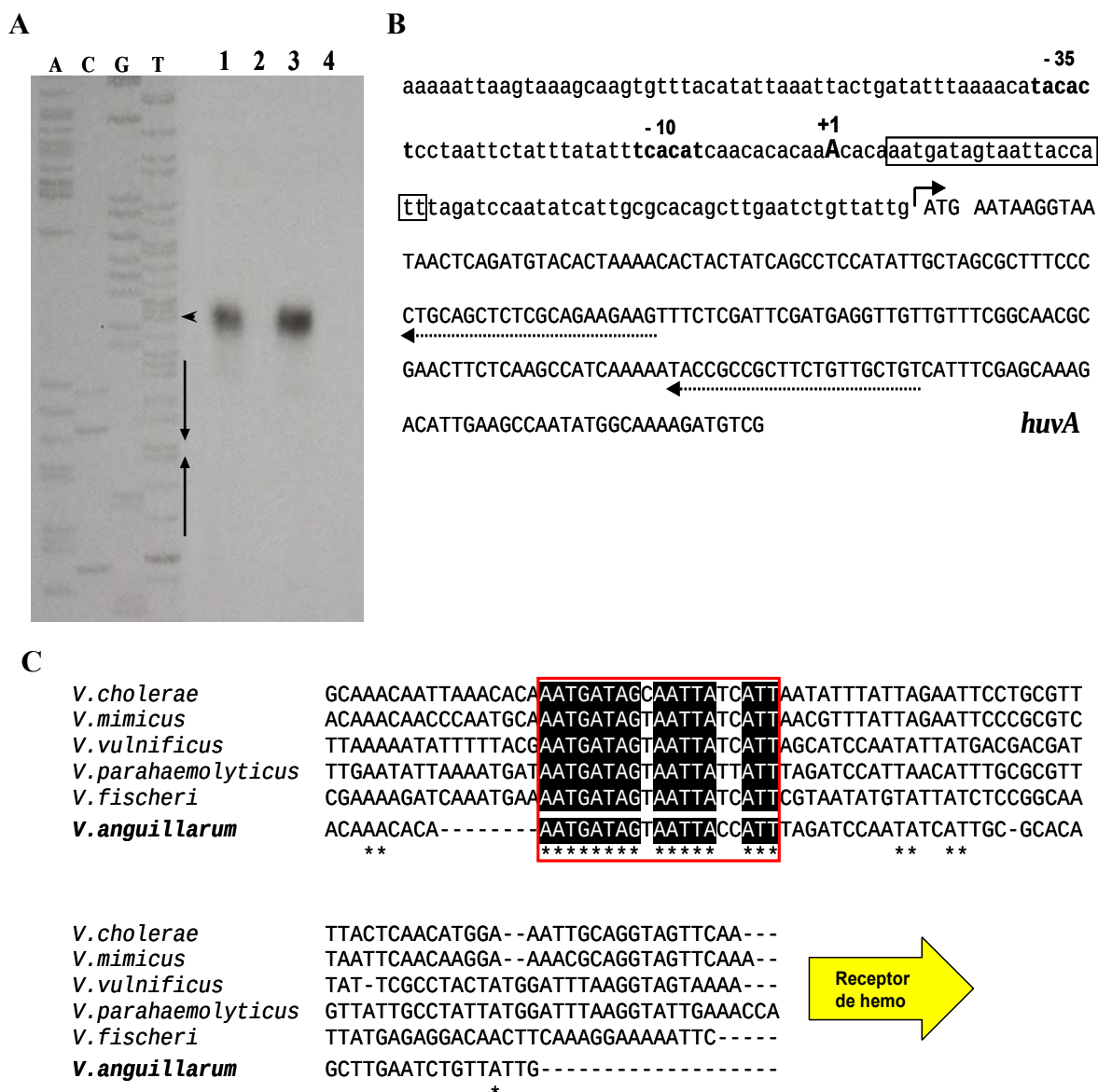


Figura IV-34: Caracterización de la región promotora del gen *huvA*. (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida de la reacción de *primer extension*. Los carriles 1 y 3 corresponden a las reacciones con los cebadores PE-*huvA*1 y PE-*huvA*2, mientras que 2 y 4 son el resultado de estas mismas reacciones partiendo de RNA obtenido en condiciones de exceso de hierro. La reacción de secuenciación utilizada como marcador se obtuvo con el cebador PE-*huvA*1. La punta de flecha indica el punto de inicio de la transcripción y las flechas opuestas delimitan la *Fur*-box. (B) Secuencia del promotor de *huvA*. La posición +1 se indica en letra capital mientras que las regiones -10 y -35 se indican en negrita. La secuencia correspondiente a la *Fur*-box está enmarcada. Las flechas discontinuas corresponden a los cebadores utilizados en las reacciones de Reverso-transcripción. El codón de inicio de la ORF está indicado por una flecha. (C) Alineamiento de las secuencias promotoras de los respectivos homólogos a *huvA* identificados en distintas especies del género *Vibrio*. La región enmarcada en rojo corresponde a la supuesta zona de unión del regulador Fur.

La detección de esta *Fur-box* sugiere un posible mecanismo de regulación de la expresión génica dependiente de los niveles de hierro en el medio circundante. Para probar esta hipótesis, se repitieron los ensayos de *primer extension* utilizando como molde el RNA total extraído de cultivos enriquecidos con FAC (Material y Métodos). Tal como se esperaba, en el supuesto de existir este tipo de regulación, tras el revelado de la reacción no se detectó señal de cDNA, apoyando la idea de un posible mecanismo de regulación negativa mediado por la proteína Fur.

3.2.2 Promotores divergentes de los operones *huvXZ* y *tonB1exbB1D1-huvBCD*

La distancia que separa los genes *huvX* y *tonB1* (283 pb) es suficiente como para poder albergar las secuencias promotoras de los operones *huvXZ* y *tonB1exbB1D1-huvBCD*. Para caracterizar esta región, se siguió la misma metodología que en el caso del gen *huvA* teniendo en cuenta que ambos operones poseen orientación contraria y se transcriben desde hebras opuestas.

Para la determinación del punto de inicio de la transcripción del operón *huvXZ* se emplearon dos cebadores localizados a 50 (PE-*huvX1*) y 103 pb (PE-*huvX2*) “corriente abajo” del inicio de la secuencia que codifica la proteína HuvX (Anexo II). Del análisis electroforético del cDNA resultante, se designó como posición +1 el residuo de Adenina situado a 185 pb “corriente arriba” del primer ATG del gen (Fig. IV-35A). Asimismo, continuando con la caracterización de este promotor, se identificaron sus correspondientes secuencias -10 y -35 (TCAAAT y TTATCA respectivamente), así como una *Fur-box* (AATAAGATCAATTATCAAT) que comparte el 52% de identidad con la secuencia consenso de unión a la proteína Fur (Fig. IV-35C).

Finalmente el cebador PE-TonB (Anexo II), situado en la posición 103 “corriente abajo” de la secuencia del gen *tonB1*, se utilizó para la caracterización de la región promotora del operón *tonB1exbB1D1-huvBCD*. Según el resultado de la *primer extension*, el punto de inicio de la transcripción corresponde a un residuo de Citosina localizado a 22 pb “corriente arriba” de la ORF (Fig. IV-35B). Junto con las típicas regiones -10 (TGATGT) y -35 (TTGATA), a 33 pb “corriente arriba” de la posición +1 también se caracterizó una secuencia de unión a Fur (GATAATGCAATTGATAATT; 68% de identidad con la secuencia consenso de *E. coli*), posiblemente implicada en su regulación transcripcional dependiente de los niveles de hierro (Fig. IV-35C).

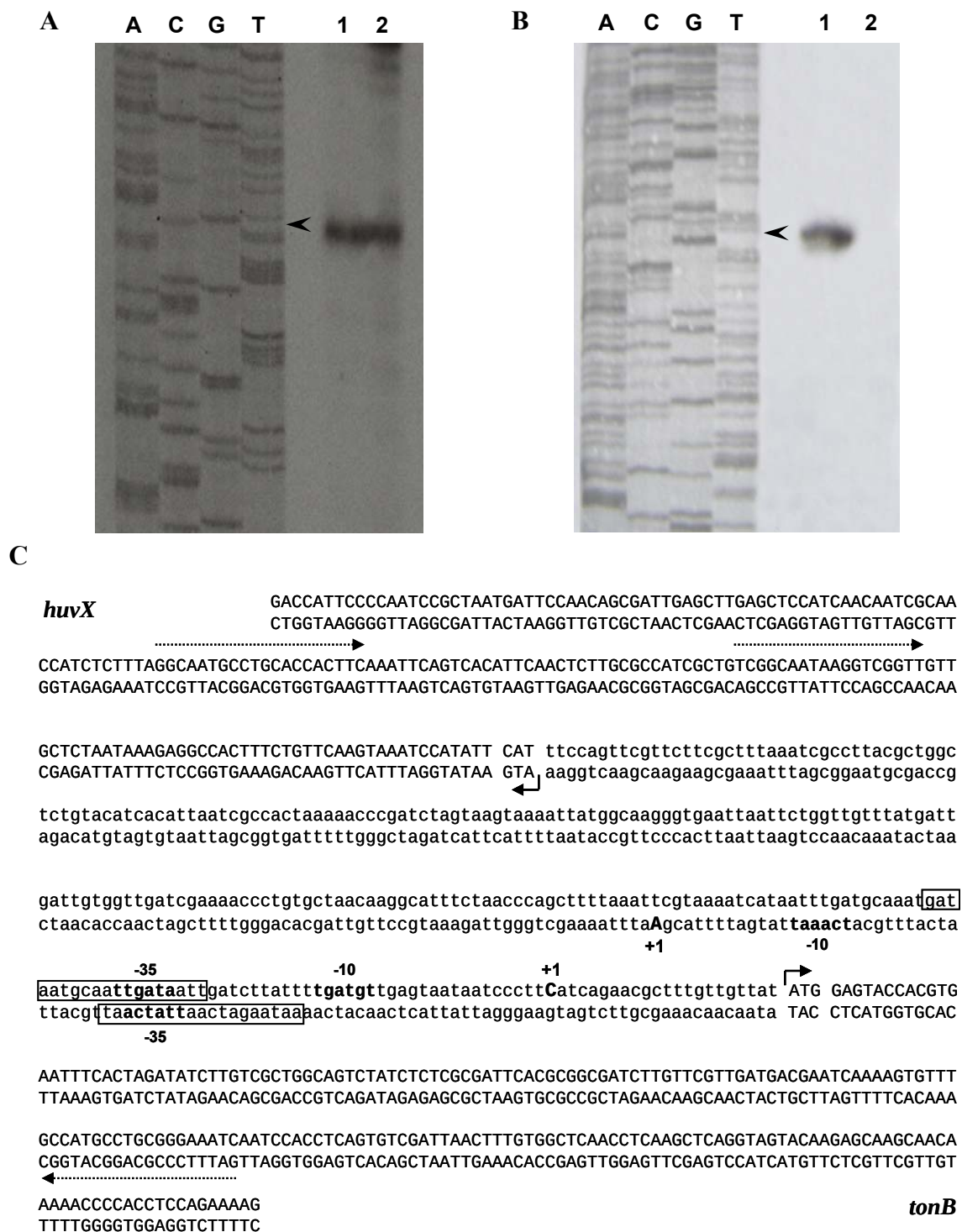


Figura IV-35: Caracterización de la región intergénica *huvX-tonB1*. En las figuras A y B la punta de flecha indica el punto de inicio de la transcripción (A) electroforesis en gel de poliácridamida de las reacciones de *primer extension* para el operón *huvXZ*. Los carriles 1 y 2 corresponden a las reacciones con los cebadores PE-*huvX1* y PE-*huvX2* respectivamente. (B) Determinación del punto de inicio de la transcripción para el operón *tonB1exbB1D1-huvBCD*. El carril 1 corresponde a la reacción a partir de RNA total purificado a partir de un cultivo control en medio CM9, mientras que el carril 2 del RNA total procedente de un cultivo con exceso de hierro. (C) Esquema de la región intergénica *huvX-tonB1* en dónde se localizan los promotores de ambos operones. La posición +1 se indica en letra mayúscula, mientras que las regiones -10 y -35 se resaltan en negrita. Las secuencias correspondientes a las *Fur-box* están enmarcadas. Las flechas discontinuas indican los cebadores utilizados en las reacciones de *primer extension*. El codón de inicio de cada ORF está indicado por una flecha.

Cabe destacar que las secuencias -35 del promotor de *huvX* y de *tonB1* se solapan en 5 de las 6 pb que forman cada una de estas regiones. Además ambas se incluyen dentro de sus respectivas secuencias de unión a Fur, de modo que el solapamiento total entre las regiones promotoras se extiende a un total de 10 pb.

Mediante el alineamiento de la región intergénica *huvX-tonB1* con la secuencia existente entre los genes *phuW* y homólogos y el gen *tonB1*, en *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* o *V. cholerae* se pudo comprobar como la zona de mayor homología correspondía a estas supuestas secuencias de unión a Fur, llegando a una identidad del 100%. La elevadísima conservación de estas secuencias de 19 pb dentro de la familia *Vibrionaceae* no hace más que apoyar la idea de su papel como puntos de interacción con la proteína Fur dentro del mecanismo de regulación de la expresión génica de ambos operones. Ya que la presencia de posibles secuencias de unión a Fur es indicativa de una posible regulación dependiente de hierro, se repitieron todos los ensayos partiendo del cultivo de la bacteria en presencia de un exceso de hierro mediante el suplemento con FAC. Igual que en el caso de la expresión de *huvA*, las reacciones no revelaron ninguna señal de transcripción, ni del operón *huvXZ* ni del operón *tonB1exbB1D1-huvBCD*, lo cual apoya claramente la regulación dependiente de hierro de ambos operones.

3.2.3 Región *exbD1-huvB*

Pese a que los ensayos de RT-PCR demostraron que los genes *huvB*, *huvC* y *huvD* se transcribían conjuntamente con el sistema *tonB1exbB1D1*, se planteó la posible existencia de promotores adicionales entre el sistema TonB1 y los genes *huvBCD*. Esta hipótesis se puso a prueba en ensayos de *primer extension* utilizando un cebador con homología a la secuencia localizada aproximadamente a 29 nucleótidos “corriente abajo” del inicio de la traducción de *huvB* (PE-*huvB*; Anexo II). En este caso no se obtuvo señal en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que sugiere que la región de DNA entre *exbD1* y *huvB* carece de actividad promotora.

3.3 Análisis transcripcional y regulación del sistema de transporte de hemo

Uno de los factores ambientales más importantes en la biología de numerosas especies bacterianas es la disponibilidad de hierro en el medio que rodea al microorganismo. Se ha visto como los niveles de este metal influyen, directa o indirectamente, sobre la expresión de muchos genes bacterianos, especialmente sobre aquellos implicados en la propia captación de hierro (Crosa, 1997). Los ensayos de *primer extension* anteriores confirmaron la existencia de una inhibición de la expresión génica mediada por la presencia de hierro en el medio (Fig. 34A; Fig. IV-35B). Tras estos resultados se planteó un estudio más profundo de la actividad transcripcional y regulación de los promotores del gen *huvA* y de los operones *huvXZ* y *tonB1exb1D1-huvBCD*.

3.3.1 Análisis de la expresión dependiente de hierro

Para confirmar el efecto de las concentraciones de hierro sobre la expresión del sistema génico, se diseñaron experimentos de RT-PCR partiendo de muestras de RNA total obtenidas de cultivos de la cepa H775-3 de *V. anguillarum* en condiciones de exceso y déficit de hierro.

El ambiente más restrictivo en hierro se alcanzó suplementando el medio CM9 con el quelante EDDA. Previamente, de igual modo que se había hecho con el 2,2'-dipiridil, se determinó su correspondiente CMI. Para ello, además del ensayo con las distintas concentraciones de EDDA, el experimento se repitió suplementando los cultivos con hemina (10 μ M) o hemoglobina (1 μ M). Los resultados obtenidos se resumen en la Figura IV-36 y delimitan la concentración mínima de EDDA en 3 μ M y a partir de la cual se bloquea el crecimiento bacteriano. A concentraciones iguales o superiores la adición de una nueva fuente de hierro, en este caso hemina o hemoglobina, permite recuperar los niveles normales de crecimiento, de lo que se deduce que esta sustancia quelante carece, además, de los efectos tóxicos observados anteriormente con el 2,2'-dipiridil.

Para llevar a cabo el cultivo bacteriano y con objeto de alcanzar al mismo tiempo unas condiciones limitantes de hierro y una densidad de células suficiente que permitiese la correcta purificación del RNA, el medio CM9 se suplementó con EDDA a una concentración final de 1,5 μ M. La adición de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ a una concentración de 40 μ M se utilizó para asegurar la presencia de un exceso de hierro durante el crecimiento bacteriano. En todos los ensayos de RT-PCR se partió siempre de la misma cantidad de RNA total.

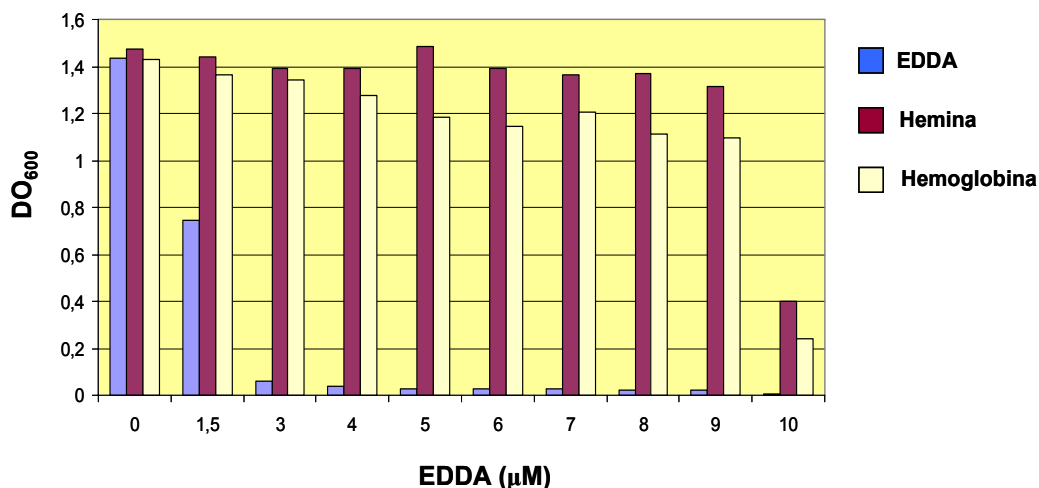


Figura IV-36: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de EDDA para la cepa H775-3 de *V. anguillarum*.

En las reacciones de reverso-transcripción de los operones se emplearon los cebadores RT-huvZ y RT-huvD utilizados anteriormente y para la detección de los mRNA transcritos se amplificaron las regiones internas de los genes *huvX* (cebadores VA-huvX1/cDNAhuvX2) y *tonB1* (cDNA-tonB1/cDNA-tonB2). En el análisis de la expresión del gen del receptor *huvA*, se utilizó el cebador RT-huvA para la obtención del cDNA correspondiente, mientras que la porción interna del gen amplificada durante la PCR se obtuvo con la pareja cDNA-huvA1/RT-huvA (Anexo II).

Los resultados obtenidos (Fig. IV-37) muestran, en los tres casos analizados, claras diferencias entre las muestras obtenidas a partir de cultivos con exceso y déficit de hierro. Así, en condiciones de exceso de este metal y respecto a las condiciones de cultivo con EDDA, la menor intensidad de la amplificación del cDNA sugiere una disminución en los niveles del mRNA de partida. El hierro, posiblemente, juegue un papel importante a nivel transcripcional, bloqueando o reduciendo los niveles de actividad promotora que inician el proceso de síntesis de dicho mRNA.

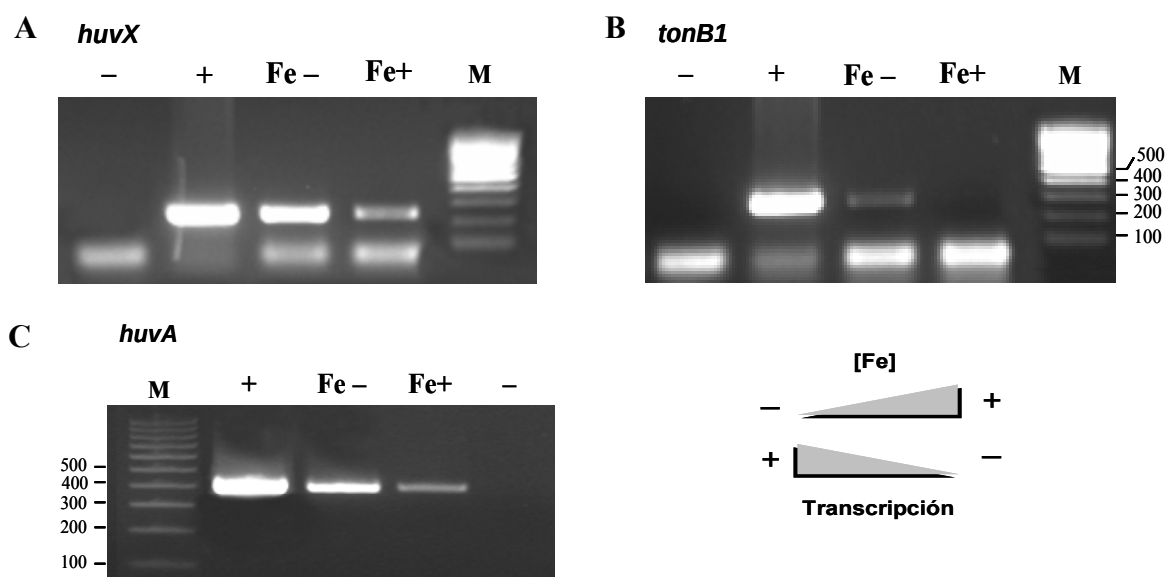


Figura IV-37: Efecto de los niveles de hierro sobre la transcripción del sistema de captación y transporte de hemo caracterizado en *V. anguillarum*. Resultado de la RT-PCR de los genes *huvX* (A), *tonB1* (B) y *huvA* (C). El incremento en la concentración de hierro presente en el medio de cultivo conlleva una reducción en los niveles de expresión génica. Fe-, condiciones de ausencia de hierro; Fe+, condiciones de exceso de hierro; M, marcador de peso molecular; +, control positivo de PCR; -, control negativo de PCR.

3.3.2 Análisis de la actividad promotora regulada por la proteína Fur

La identificación de posibles secuencias de unión a Fur dentro de las regiones promotoras caracterizadas, junto con los resultados experimentales obtenidos hasta el momento, llevan a pensar en la existencia de un mecanismo de regulación a nivel transcripcional, dependiente de los niveles de hierro y, probablemente, por mediación de la proteína Fur. De este modo, el siguiente paso en el análisis de la expresión génica del sistema de captación y transporte de hemo se centró en la cuantificación de estos niveles de expresión bajo distintas condiciones de disponibilidad de hierro y la determinación del grado de implicación de Fur en el control del proceso de transcripción.

Partiendo de la cepa H775-3 de *V. anguillarum* y tras amplificar por PCR las regiones promotoras adyacentes a los genes *huvA*, *huvX* y *tonB1*, estos fragmentos, de aproximadamente 400 pb, se clonaron en el plásmido específico para fusiones transcripcionales pHRP309 (Parales y Harwood, 1993) (Material y Métodos). En las construcciones resultantes, *phuvA::lacZ*, *ptonB::lacZ* y *phuvX::lacZ*, la expresión del gen *lacZ* incluido en el vector queda controlada por la región del DNA de *V. anguillarum* ligada a él. Para evitar posibles problemas de reconocimiento de las secuencias promotoras al realizar los ensayos en una especie bacteriana diferente a *V. anguillarum*, las fusiones se transfirieron por

conjugación de *E. coli* a la cepa H775-3 y a la cepa 775met11 de *V. anguillarum*. Esta última, derivada de la cepa 775, además de carecer del plásmido pJM1, posee una mutación en el codón de inicio del gen *fur*, lo que bloquea la traducción de la proteína y hace a la cepa deficiente en la síntesis de este regulador (Tolmasky *et al.*, 1994; Wertheimer *et al.*, 1994). Finalmente como control negativo y para descartar la posibilidad de que la bacteria posea actividad β -galactosidasa propia, que pudiese enmascarar los resultados de las fusiones, en todos los experimentos se incluyó el plásmido pHRP309 nativo, sin ningún promotor u otro fragmento clonado.

Las cepas de *V. anguillarum* derivadas del proceso de conjugación y utilizadas en los experimentos de determinación de niveles de expresión génica fueron las siguientes:

- **B191:** Cepa control (*V. anguillarum* H775-3 con el plásmido pHRP309)
- **B194:** H775-3 con el plásmido de fusión *phuvX::lacZ*
- **B197:** H775-3 con el plásmido de fusión *phuvA::lacZ*
- **B198:** H775-3 con el plásmido de fusión *ptonB::lacZ*
- **B204:** Cepa control (*V. anguillarum* 775met11 (*fur*⁻) con el plásmido pHRP309)
- **B201:** 775met11 con el plásmido de fusión *phuvA::lacZ*
- **B202:** 775met11 con el plásmido de fusión *ptonB::lacZ*
- **B203:** 775met11 con el plásmido de fusión *phuvX::lacZ*

La actividad β -galactosidasa de cada promotor se cuantificó bajo distintas condiciones de crecimiento, según la cantidad y la fuente de hierro disponible y siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos. Inicialmente todas las cepas se ensayaron en medio CM9 suplementado con EDDA 1,5 μ M (condiciones limitantes de hierro) y en medio CM9 con Fe₂(SO₄)₃ 40 μ M (condiciones de exceso de hierro). Por último, y también como control del experimento, las cepas se incubaron en medio mínimo CM9 sin ningún tipo de suplemento. En todos los casos la actividad β -galactosidasa de los plásmidos control (pHRP309) fue prácticamente nula.

Según los resultados obtenidos en las cepas derivadas de la H775-3 (Fig. IV-38A), los tres promotores alcanzan sus niveles máximos de expresión cuando las células se incuban en un medio dónde el hierro constituye el factor limitante. Por el contrario, los niveles más bajos de actividad transcripcional se obtuvieron en condiciones de exceso de hierro libre, de manera

que corroboran los resultados obtenidos en los experimentos de *primer extension* y RT-PCR a partir de muestras incubadas en presencia de un exceso de este metal. Analizando más detenidamente estos mismos resultados (Fig. IV-38A), los niveles de β -galactosidasa de las fusiones *phuvA::lacZ* y *phuvX::lacZ* descendieron de manera similar entre el ensayo con exceso de hierro y el cultivo control en medio mínimo CM9 (entre seis y siete veces), mientras que la expresión de la fusión transcripcional *ptonB::lacZ* disminuyó aproximadamente 4 veces. Por otro lado, la actividad de los tres promotores aumentó significativamente bajo la presencia del quelante de hierro EDDA. En este caso y respecto a la situación anterior, los niveles de transcripción para los promotores de *huvA*, *huvX* y *tonB1* se incrementaron en 38-, 19- y 12-veces respectivamente. Este patrón de expresión (mayor actividad en ausencia de hierro y descenso de la transcripción en presencia del mismo) confirma que los genes del sistema caracterizado en *V. anguillarum* H775-3 están controlados por la concentración de hierro disponible para la bacteria.

Las cepas derivadas del mutante *fur*⁻ se ensayaron en las mismas condiciones que las cepas derivadas de la cepa parental (Fig. IV-38B). En este caso no se detectó represión dependiente de las concentraciones de hierro en los promotores *huvX* y *tonB1*, de modo que los niveles de actividad β -galactosidasa fueron igual de elevados, tanto en condiciones de exceso como de defecto de hierro. Según esta observación, los promotores de los operones *huvXZ* y *tonB1exbB1D1-huvBCD* son constitutivos en ausencia de Fur *in vivo*, ya que apenas existen variaciones en cuanto a sus niveles de expresión (alrededor de 30.000 unidades para el promotor de *huvXZ* y 40.000 unidades para el promotor de *tonB1*) en las diferentes condiciones ensayadas. Además se demuestra la intervención directa de la proteína Fur en la regulación negativa del sistema, bloqueando a nivel transcripcional la expresión de los genes asociados a la captación y transporte de hemo.

Hay que destacar que en el promotor de *huvA* los niveles transcripcionales siempre fueron mayores que los de los promotores de *huvX* y *tonB1*. Esto contrasta con el resultado obtenido en la cepa parental, dónde, en el medio control y en presencia de un exceso de hierro, los niveles de actividad β -galactosidasa de la fusión *phuvA::lacZ* siempre fueron menores que la de los otros dos promotores. Tan sólo en condiciones de baja concentración de hierro, su expresión llega a superar los niveles de los otros dos.

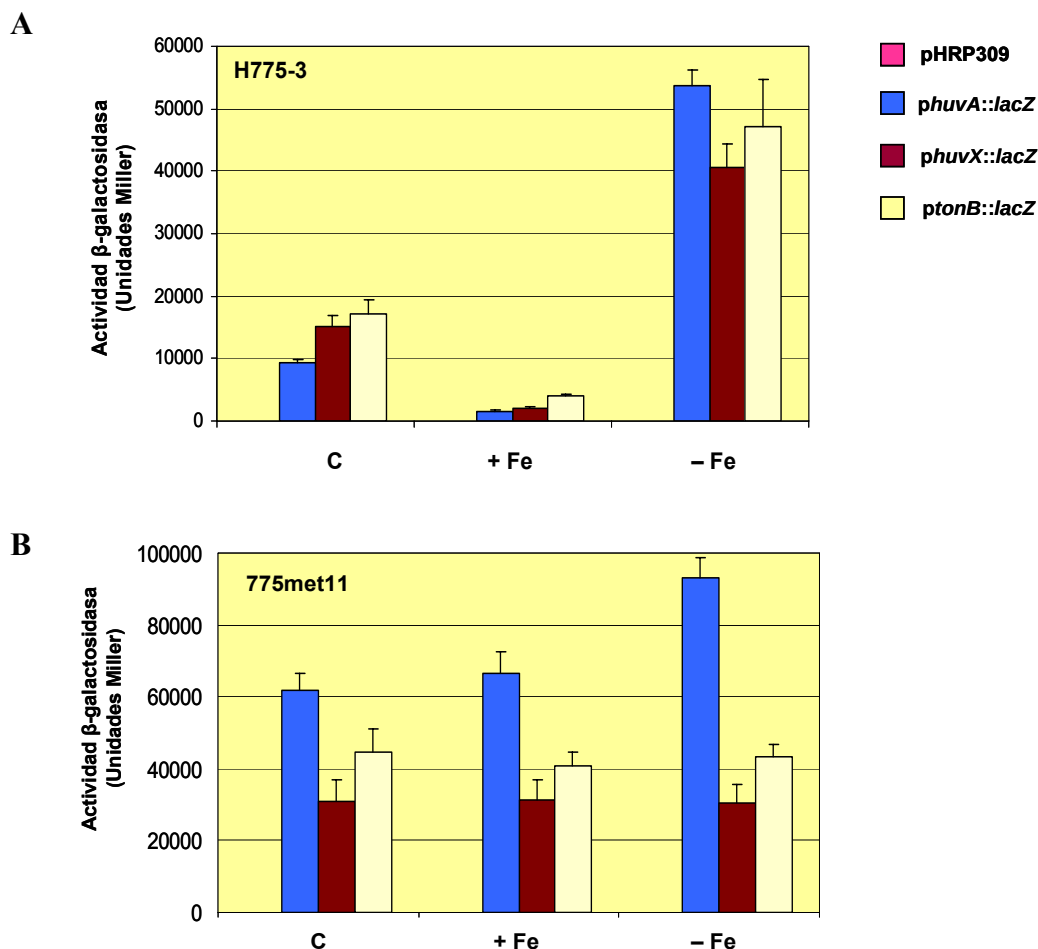


Figura IV-38: Resultado de los experimentos de fusiones transcripcionales de los promotores del gen *huvA* y de los operones *huvXZ* y *tonB1exbB1D1-huvBCD* en la cepa H775-3 (A) y el mutante isogénico 775met11 (B). C, cultivo control en medio CM9; +Fe, ensayo en condiciones de exceso de hierro; -Fe, ensayos en condiciones de ausencia de hierro libre.

La mayor actividad del promotor de *huvA* respecto al resto de promotores, en ausencia de Fur, podría explicarse a través de las características inherentes a la secuencia de esta región. Sin embargo no explicaría el incremento tan elevado en la actividad β -galactosidasa cuando el medio está suplementado con EDDA (de 60.000 a 90.000 unidades). Todo apunta a que de algún modo este promotor está estimulado cuando las concentraciones de hierro son muy bajas. El factor o factores que actúan exclusivamente sobre la expresión del receptor de grupos hemo aún están por determinar.

3.3.3 HuvX como posible regulador del operón *tonB1exbB1D1-huvBCD*

Continuando con el estudio de la actividad transcripcional y sus posibles mecanismos de regulación, el análisis de la región intergénica entre *huvX* y *tonB1* estableció la existencia de dos promotores que dirigían la expresión de los operones *huvXZ* y *tonB1exbB1D1-*

huvBCD, respectivamente. Ambas regiones se agrupan en una estructura típica de promotores divergentes y solapados. En general, la organización transcripcional de este tipo de secuencias constituye una clase de organización génica ampliamente representada en gran variedad de genomas bacterianos (Beck y Warren, 1988). Curiosamente en algunos casos, la transcripción de uno de los genes implicados codifica una molécula reguladora que puede actuar dentro de la propia unidad de transcripción, controlando la expresión del segundo transcrito asociado (Watnick *et al.*, 1998).

Hasta la fecha, dentro de los sistemas de captación y transporte de hemo, los homólogos del gen *huvX* son los únicos sin una función asignada, de modo que nos planteamos la hipótesis de que el producto de este gen podría actuar como regulador transcripcional de la expresión de *tonB1*. Así las fusiones transcripcionales *phuvX::lacZ* y *ptonB::lacZ* se ensayaron en el mutante B106 (Δ *huvX*), dando lugar a las cepas B215 y B216 respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos (Fig. IV-39), no existen diferencias significativas entre el mutante y la cepa parental, de modo que al producto de *huvX* no se le puede asignar ningún tipo de función reguladora sobre el operón *tonB1exbB1D1-huvBCD*.

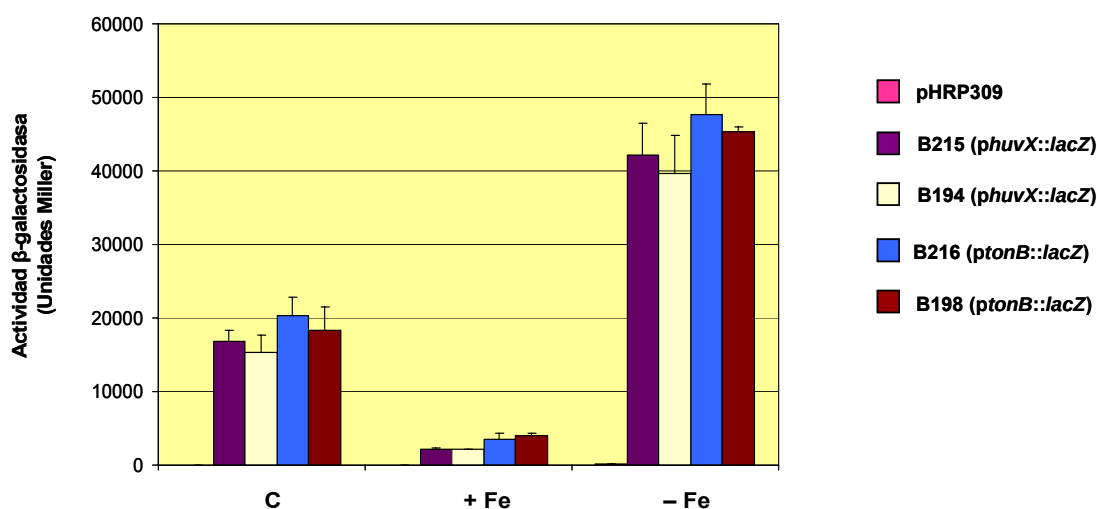


Figura IV-39: Comparación de los resultados obtenidos con las fusiones transcripcionales *phuvX::lacZ* y *ptonB::lacZ* en los ensayos con las cepas B194 y B198 (derivadas de *V. anguillarum* H775-3) y las cepas B215 y B216 (derivadas a su vez del mutante B106 (Δ *huvX*)). C, cultivo control en medio CM9; +Fe, ensayo en condiciones de exceso de hierro; -Fe, ensayo en condiciones de ausencia de hierro libre.

3.3.4 Grupo hemo como regulador transcripcional

La idea de que el grupo hemo y algunas hemoproteínas puedan actuar como activadores transcripcionales en la regulación de sistemas de captación de hierro ya había sido

previamente planteada por diversos autores (Kirby *et al.*, 2001; Schmitt, 1997; Vanderpool y Armstrong, 2003). Para probar esta hipótesis en el caso concreto de *V. anguillarum*, las construcciones *phuvA::lacZ*, *phuvX::lacZ* y *ptonB::lacZ* se ensayaron, tanto en la cepa H775-3 como en la 775met11, en un medio CM9 suplementado con EDDA 5 μ M y con hemina 10 μ M.

La adición de hemina, que bajo estas condiciones constituye la única fuente de hierro disponible, indujo un ligero incremento en la actividad de cada promotor respecto a las condiciones control (Fig. IV-40). Sin embargo este pequeño aumento de los niveles de actividad β -galactosidasa pudo ser inducido por la presencia de una cantidad de hemina insuficiente como para que se cubrieran todas las necesidades de hierro de la bacteria en crecimiento. De hecho, al repetir estos ensayos en el mutante *fur*, se alcanzaron niveles similares tanto en las condiciones con y sin hemina, lo que demuestra que la activación o represión del sistema de captación de hemo parece no ser dependiente de la propia molécula de hemo.

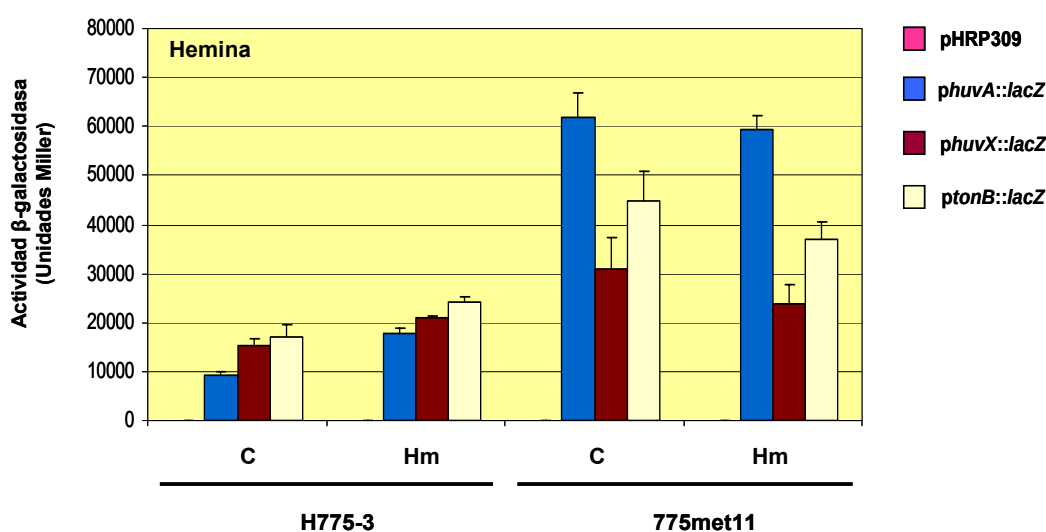


Figura IV-40: Resultado de los ensayos de las fusiones transcripcionales *phuvA::lacZ*, *phuvX::lacZ* y *ptonB::lacZ* en las cepas H775-3 y el mutante *fur* (775met11) para detectar el posible efecto regulador de la molécula de hemina sobre el sistema caracterizado en *V. anguillarum*. C, cultivo control en medio CM9; Hm, ensayo en condiciones de limitación de hierro libre con la molécula de Hemina como única fuente de hierro.

Por otro lado, según los resultados obtenidos del estudio de sistemas homólogos, el anillo porfirínico sólo puede actuar como regulador transcripcional siempre y cuando esté formando un complejo con el correspondiente átomo de Fe. Sin embargo en este trabajo también se quiso comprobar la posibilidad de que la propia molécula de protoporfirina IX, precursor del grupo hemo previo a la incorporación del catión metálico, poseyera algún tipo

de actividad inductora o represora. De este modo las fusiones transferidas a la cepa H775-3 se ensayaron en condiciones de exceso y limitación de hierro, pero siempre en presencia de protoporfirina IX (10 μ M). Los resultados indican que los niveles de expresión de los tres promotores no se ven afectados por la adición de este compuesto (Fig. IV-41), alcanzándose niveles de actividad β -galactosidasa similares a los obtenidos anteriormente en los ensayos solamente con la adición de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ o EDDA (Fig. IV-38A)

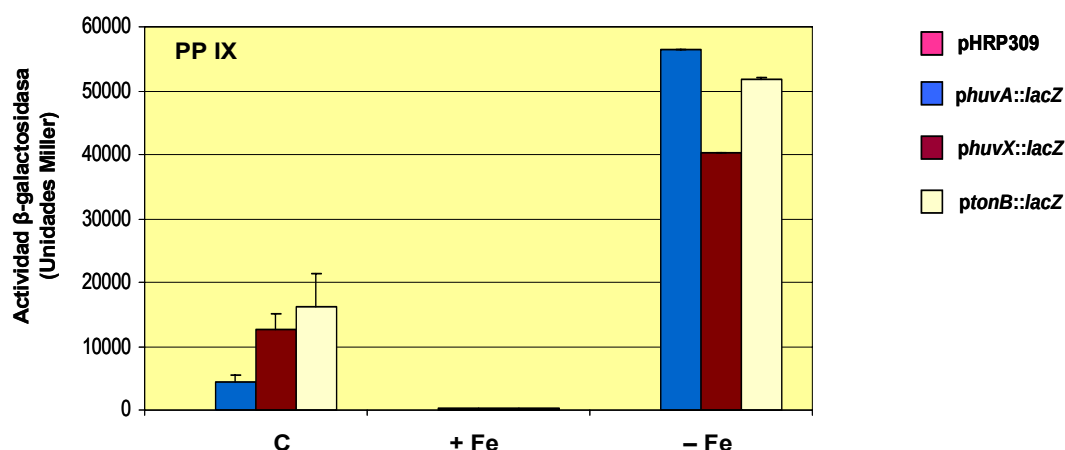


Figura IV-41: Resultado de los ensayos en la cepa H775-3 de las fusiones transcripcionales de los tres promotores caracterizados en el sistema de captación y transporte de hemo (*phuvA::lacZ*, *phuvX::lacZ* y *ptonB::lacZ*) en medio CM9 suplementado con Protoporfirina IX bajo condiciones de exceso y limitación de hierro. C, cultivo control en medio CM9; +Fe, ensayo en condiciones de exceso de hierro; -Fe, ensayo en condiciones de limitación de hierro libre.

3.3.5 Análisis de la actividad promotora de la región *exbD1-huvB*

Anteriormente se había establecido que la secuencia entre los genes *exbD1* y *huvB* carecía de actividad promotora. Sin embargo cabría la posibilidad de la existencia de un promotor secundario sin actividad aparente bajo las condiciones ensayadas. Por tanto dicha secuencia intergénica se amplificó y clonó en el vector pHRP309, del mismo modo que los promotores anteriores. El plásmido resultante (*phuvB::lacZ*) se ensayó en la cepa de *V. anguillarum* H775-3 (cepa B200) tanto en las condiciones control en medio CM9 como en condiciones de limitación y exceso de hierro. Según los niveles de actividad β -galactosidasa obtenidos, la actividad transcripcional de esta región es similar a la actividad de la cepa control (plásmido pHRP309), lo que indica que la secuencia localizada entre el sistema TonB y el gen *huvB* no tiene ningún tipo de actividad promotora y que los genes del operón *tonB1exbB1D1-huvBCD* se transcriben desde un único promotor localizado “corriente arriba” del gen *tonB1*.

3.4 Caracterización de un regulador transcripcional de la familia LysR

Aunque la proteína Fur es la primera proteína descrita como regulador de sistemas de captación de hierro, no es el único factor de control de la expresión génica. En muchas especies la expresión de los genes implicados en la captación de hierro requieren de una activación transcripcional que bien puede estar mediada por otro tipo de moléculas, como el hemo en el caso de *Porphyromonas gingivalis* (Genco *et al.*, 1994; Olczak *et al.*, 2005) o *Corynebacterium diphtheriae* (Schmitt, 1997), factores positivos como AngR y los factores TAF en *V. anguillarum* (Crosa, 1997; Wertheimer *et al.*, 1999), factores sigma de función extracitoplasmática, como en *Bordetella avium* (Kirby *et al.*, 2001), o activadores transcripcionales de la familia LysR, como en *V. cholerae* (Goldberg *et al.*, 1991). Normalmente tanto los reguladores negativos como los positivos actúan de manera coordinada controlando la entrada de hierro y su almacenaje.

De todos estos reguladores la familia LysR comprende el grupo más amplio dentro de los factores de regulación transcripcional en procariotas y están ampliamente representados en bacterias, *Archaea* y cloroplastos de algas (Pérez-Rueda *et al.*, 2004; Schell, 1993). La mayoría de estas moléculas se transcriben desde promotores divergentes, adyacentes a los genes sobre los que van a ejercer su función reguladora. Normalmente inducen la activación del proceso de transcripción en colaboración con una molécula que actúa como co-inductor (Schell, 1993). Sin embargo también es posible que el gen que codifica este regulador transcripcional se localice en una región alejada del punto de regulación (Klauck *et al.*, 1997; Sperandio *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2003). Este tipo de factores de regulación pueden formar un complejo mecanismo de regulación junto con la proteína Fur, dirigido al control de la expresión, a nivel transcripcional, de diversos genes implicados en multitud de procesos celulares y entre los que se encuentran los diferentes sistemas de captación de hierro. Así, en *V. vulnificus* se ha caracterizado el gen *hupR*, que codifica uno de estos reguladores y que regula la expresión del receptor de membrana externa para grupos hemo HupA (Litwin y Quackenbush, 2001).

En el apartado 1.2 de Resultados se describió la similitud en la organización espacial que existe entre los genes implicados en la captación de hemo de *V. anguillarum* y sistemas homólogos descritos en otras especies del género *Vibrio*. A pesar de que se han identificado genes homólogos a *hupR* “corriente arriba” del correspondiente receptor de hemo en *V. cholerae* (número de acceso Q9AQK6), *V. parahaemolyticus* (número de acceso Q87HS3), e

incluso en *V. mimicus* (número de acceso Q9KM14), al analizar la secuencia adyacente al gen *huvA* de *V. anguillarum* no se pudo identificar ninguna ORF relacionada con este tipo de reguladores. Sin embargo en los ensayos de actividad transcripcional en la cepa 775met11 (apartado 3.3.2) se puso de manifiesto que la actividad promotora del receptor de membrana externa se incrementaba significativamente en condiciones de ausencia de hierro respecto al resto de condiciones ensayadas. Por esta razón nos planteamos como hipótesis la existencia de un segundo mecanismo de regulación positiva mediado por un posible homólogo al gen *hupR* de *V. vulnificus* y que participaría en el control de la expresión del gen *huvA* descrito en *V. anguillarum*.

3.4.1 Clonaje y análisis de la secuencia del gen *huvR*

Para tratar de amplificar este segundo regulador del sistema de captación de hemo, se diseñaron cebadores de secuencia “degenerada” a partir del alineamiento múltiple entre las proteínas identificadas como homólogas de HupR pertenecientes a las especies de vibrios mencionadas anteriormente. A partir de las regiones más conservadas se diseñaron las parejas de cebadores: hutR5’1/hutR3’1 y hutR5’2/hutR3’2 (Fig. IV-42; Anexo II).

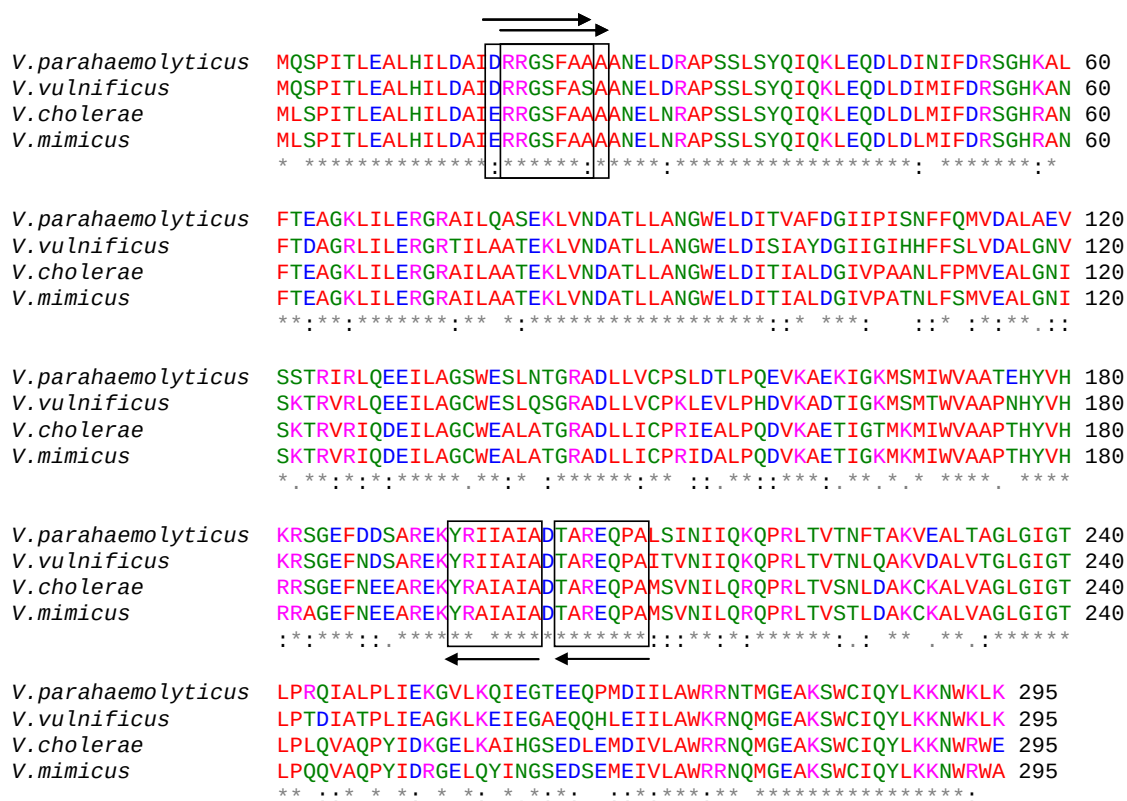


Figura IV-42: Alineamiento múltiple entre el regulador transcripcional para grupos hemo HupR descrito en *V. vulnificus* y sus posibles homólogos caracterizados en otras especies del género *Vibrio*. Las regiones conservadas a partir de las cuales se diseñaron los cebadores degenerados están enmarcadas. Las flechas indican la orientación de los oligonucleótidos.

Seguidamente se diseñó una PCR con gradiente de temperaturas para intentar establecer las condiciones óptimas de amplificación (Fig. IV-43A). En el análisis electroforético posterior sólo se detectó un fragmento de tamaño similar al esperado (570 pb) en las reacciones con la pareja de cebadores hutR5'2/hutR3'2 (Fig. IV-43B). Este producto de amplificación se purificó a partir del gel de agarosa y se clonó en el vector pGEM-T-*Easy* para dar lugar al plásmido pSML85.

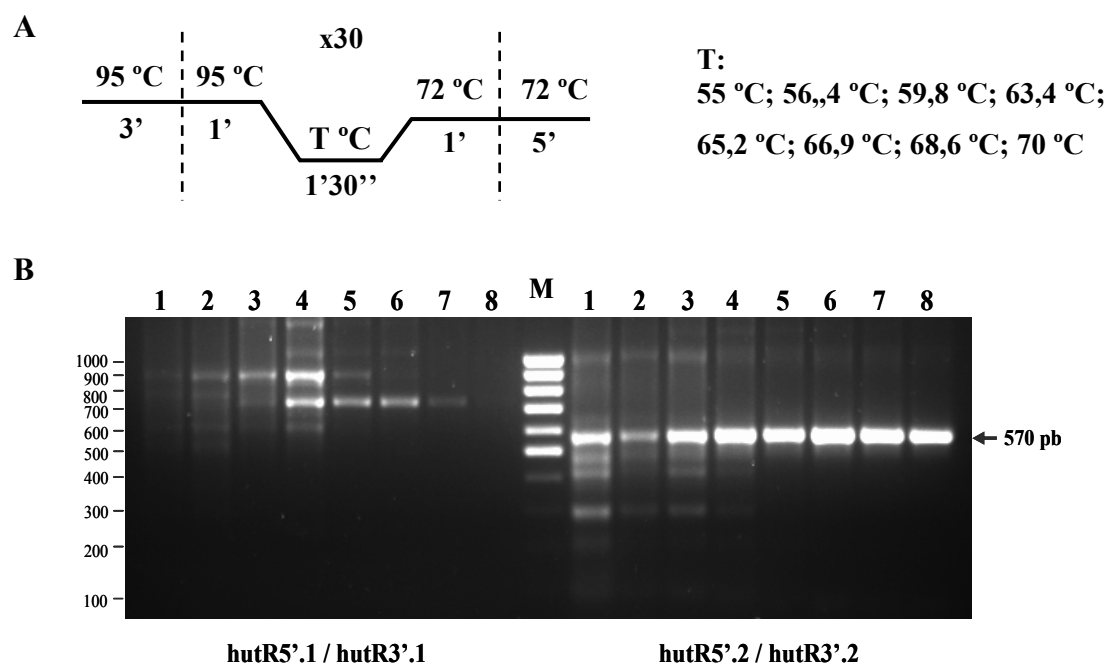
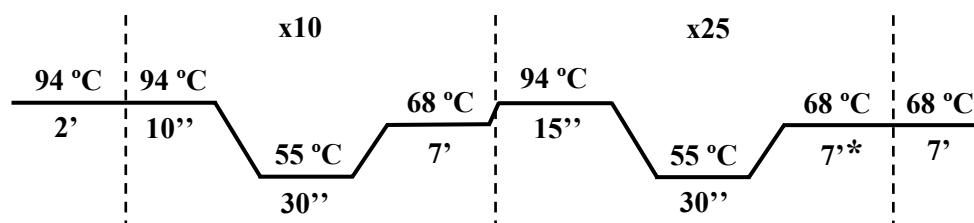


Figura IV-43: Resultado de la PCR con cebadores degenerados diseñados a partir del alineamiento entre secuencias homólogas al gen *hupR* de *V. vulnificus*. (A) condiciones de amplificación. (B) Análisis electroforético de los productos de amplificación obtenidos. Cada carril corresponde a una temperatura de hibridación: (1) 55 °C; (2) 56,4 °C; (3) 59,8 °C; (4) 63,4 °C; (5) 65,2 °C; (6) 66,9 °C; (7) 68,6 °C; (8) 70 °C. M, marcador de peso molecular (pb).

El inserto se secuenció con los cebadores universales M13-Forward y M13-Reverse y la secuencia obtenida se analizó en busca de posibles homólogos en la base de datos EMBL. La secuencia del inserto de pSML85 codifica una proteína parcial que comparte, aproximadamente, un 70% de identidad con la región central de la proteína HupR de *V. vulnificus*, así como sus correspondientes homólogos de *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*. Por la alta similitud con estas secuencias, la ORF caracterizada en *V. anguillarum* se denominó *huvR*.

La secuencia completa de los extremos 5' y 3' de este gen se obtuvo mediante PCR-Inversa (Material y Métodos). Para ello, tras digerir el DNA genómico de la cepa H775-3 de *V. anguillarum* con los enzimas de restricción *HindIII*, *PstI*, *BamHI*, *KpnI* y *BglII*, los

fragmentos originados se autoligaron y se utilizaron como molde en reacciones de amplificación con los cebadores huvR1 y huvR2 (Anexo II) homólogos a ambos extremos de la ORF. Las condiciones de tiempo y temperatura empleados fueron las siguientes:



* Incremento de 10 sg en cada ciclo

Como resultado, sólo se obtuvo amplificación en las reacciones llevadas a cabo con el DNA cortado con *Pst*I y *Hind*III (Fig. IV-44A). Ambos fragmentos, de aproximadamente 3 y 4 kb respectivamente, se purificaron y se clonaron en el vector pGEM-T-*Easy* dando lugar a los plásmidos pSML86 y pSML87. Finalmente éstos se secuenciaron hasta obtener la secuencia completa del gen *huvR*. Dentro de la secuencia de la región adyacente al extremo 3' de *huvR* se identificó una ORF parcial, caracterizada como una posible acetiltransferasa (Fig. IV-44B) y que está conservada, tanto en posición como en orientación, dentro del genoma de *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. mimicus*.

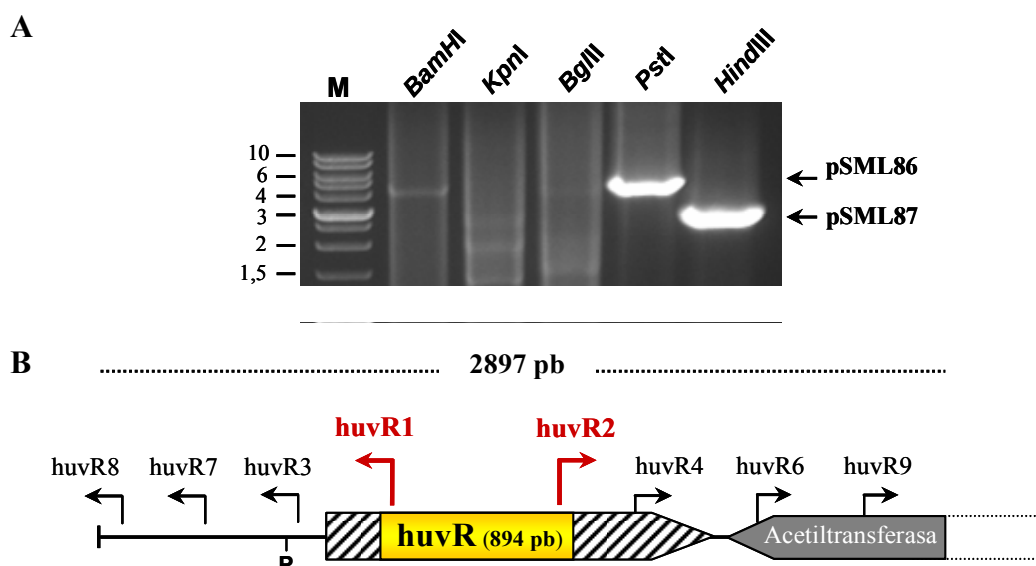


Figura IV-44: (A) Resultado de la PCR-Inversa a partir de la que se amplificaron las regiones adyacentes a la secuencia parcial del gen *huvR*. Los productos de amplificación obtenidos de las digestiones con *Pst*I y *Hind*III se clonaron y dieron lugar a los plásmidos pSML86 y pSML87 respectivamente. M, marcador de peso molecular (pb). (B) Esquema de la región caracterizada y que incluye la secuencia completa del regulador transcripcional *huvR* y la secuencia incompleta de una acetiltransferasa. Las flechas representan los cebadores empleados tanto en la PCR-Inversa (en rojo) como en las reacciones de secuenciación (Anexo II). P, diana de *Pst*I.

La ORF final codifica una proteína de 298 aminoácidos, con un peso molecular de 32,8 kDa. Al comparar esta secuencia de aminoácidos con secuencias presentes en las bases de datos y utilizando el algoritmo FASTA, se encontró que la proteína HuvR de *V. anguillarum* posee una elevada similitud con miembros de la familia LysR de reguladores transcripcionales, especialmente con la proteína HupR de *V. vulnificus* (77% de identidad) y sus correspondientes homólogos descritos en *V. parahaemolyticus* (81% identidad), *V. cholerae* (79% identidad) y *V. mimicus* (78% identidad) (Fig. IV-45).

Dentro de la proteína la zona más conservada entre HuvR y sus homólogos descritos coincidió con el extremo N-terminal, en dónde se identificó, además, una zona de estructura secundaria hélice-giro-hélice (H-T-H) (residuos 10-70), la cual constituiría el dominio de unión a DNA característico de este grupo de reguladores transcripcionales (Fig. IV-45). Asimismo HuvR mantiene conservadas las posiciones A27, S33, P36, S38, L46 y E48, y aunque la región central y C-terminal no son zonas tan conservadas dentro de esta familia, del alineamiento entre HuvR y sus homólogos también se podrían inferir los posibles dominios funcionales de reconocimiento/respuesta (residuos 92-171 y 196-206) y el correspondiente dominio C-terminal (residuos 239-290).

De la secuencia de nucleótidos localizada “corriente arriba” del gen, tan sólo cabe reseñar la presencia de una posible región de unión a la proteína Fur (GATGAAAATTACCATTTT) a 400 pb “corriente arriba” del codón de inicio de la traducción y que comparte un 73% de identidad con la *Fur-box* consenso de *E. coli*. Sin embargo, pese a la gran similitud de la ORF con sus homólogos asociados a receptores del grupo hemo, esta región adyacente al extremo 5' de *huvR* carece de cualquier parecido con las regiones promotoras identificadas en las otras especies bacterianas, ni tampoco se ha podido identificar ninguna ORF sobre la que HuvR pudiera ejercer su función reguladora.

<i>V. anguillarum</i>	MSILQSPITLEALHILDATDRRGSFAAAANELSRAPSSLSYQIQKLEQDLDTIFDRSGH	60
<i>V. cholerae</i>	---MLSPITLEALHILDATERRGSFAAAANELNRAPSSLSYQIQKLEQDLDMIFDRSGH	57
<i>V. parahaemolyticus</i>	---MQSPITLEALHILDATDRRGSFAAAANELDRAPSSLSYQIQKLEQDLDTINIFDRSGH	57
<i>V. mimicus</i>	---MLSPITLEALHILDATERRGSFAAAANELNRAPSSLSYQIQKLEQDLDMIFDRSGH	57
<i>V. vulnificus</i>	---MQSPITLEALHILDATDRRGSFASAAANELDRAPSSLSYQIQKLEQDLDMIFDRSGH	57
<i>E. coli</i>	-MAKERALTLEALRVMDATDRRGSFAAADELGRVPSALS YTMQKLEELDVVLFDRSGH	59
<i>Y. pestis</i>	-MARDRALTLEALRVMDATDRRGSFAAADELGRVPSALS YTMQKLEELDVVLFDRSGH	59
<i>V. anguillarum</i>	KATFTEAGLLILERGRAILSATEKLVNDATLLANGWELDLTVAFDGIPIHNFPPMVEAL	120
<i>V. cholerae</i>	RANFTEAGKLILERGRAILAAATEKLVNDATLLANGWELDTITIALDGIVPAANLPPMVEAL	117
<i>V. parahaemolyticus</i>	KALFTEAGKLILERGRAILQASEKLVNDATLLANGWELDTITAFDGIIPISNFFQMVDAAL	117
<i>V. mimicus</i>	RANFTEAGKLILERGRAILAAATEKLVNDATLLANGWELDTITIALDGIVPATNLFSMVEAL	117
<i>V. vulnificus</i>	KANFTDAGRLILERGRITLAAATEKLVNDATLLANGWELDISIAYDGIIGIHFFSLVDAL	117
<i>E. coli</i>	RTKFTNVGRMLLERGRVLLAADKLTTDAEALARGWETHLTIVTEALVPTPAFFPLIDKL	119
<i>Y. pestis</i>	RTKFTNVGRMLLERGRVLLAADKLTTDAEALARGWETHITIVSEALSPAWKLFFPLIDKL	119
<i>V. anguillarum</i>	GNVSKTRIRLQEEILAGCWESLSTDRADLLICPRIDTLP-QDVKAETIGTMSMVWVAASS	179
<i>V. cholerae</i>	GNISKTRVRIQDEILAGCWEALATGRADLLICPRIEALP-QDVKAETIGTMMKIWVAAPT	176
<i>V. parahaemolyticus</i>	AEVSSTRIRLQEEILAGSWESLNTGRADLLVCPSLDTLP-QEVKAETIGKMSMIWVAATE	176
<i>V. mimicus</i>	GNISKTRVRIQDEILAGCWEALATGRADLLICPRIDALP-QDVKAETIGKMSMIWVAAPT	176
<i>V. vulnificus</i>	GNVSKTRVRLQEEILAGCWESLQSGRADLLVCPKLEVLP-HDVKADTIGKMSMTWVAAPN	176
<i>E. coli</i>	AAKANTQLAIITEVLAGANERLEQGRADIVIAAPDMHFRSSSEINSRKLYTLMNVYVAAPD	179
<i>Y. pestis</i>	ALKANTQVSILTEVLAGAWERLEQGRADIVIAAPDMHFRASSEINSRKLYKVTSVYVASPD	179
<i>V. anguillarum</i>	HYAHKRSGAFDEEARQKYRVIAIADTARDQPAMSVNILQKQPRLTVTNFSAKCAALVEGL	239
<i>V. cholerae</i>	HYVHRRSGEFNEEAREKYRAIAIADTAREQPAMSVNILQKQPRLTVSNLDAKCKALVAGL	236
<i>V. parahaemolyticus</i>	HYVHKRSGEFDDSAAREKYRIIAIADTAREQPALSINIIQKQPRLTVTNFTAKVEALTAGL	236
<i>V. mimicus</i>	HYVHRRAGEFNEEAREKYRAIAIADTAREQPAMSVNILQKQPRLTVSTLDAKCKALVAGL	236
<i>V. vulnificus</i>	HYVHKRSGEFNDSAREKYRIIAIADTAREQPAITVNIIQKQPRLTVTNLQAKVDALVTGL	236
<i>E. coli</i>	HPIHQPEPELSEVTRVKYRGIAVADTARERPVLTVQLLDKQKQRLTVSTIEDKRRALLAGL	239
<i>Y. pestis</i>	HPIHQPEPELSELTRVKYRGIAVADTARERPVITVQLLDKQKQRLTVSTIEDKRRALLAGL	239
<i>V. anguillarum</i>	GIGTLPKQIAEPLIAAGKLVISGSEEKSMQIIMAWRRNMGEAKSWCVQYLLKKNWTL	298
<i>V. cholerae</i>	GIGTLPQVAQPYIDKGELKAHGSSELDMDIVLAWRRNQMGAEKSWCQIYLLKKNWRWE	295
<i>V. parahaemolyticus</i>	GIGTLPQRIALPLIEKGVLKQIEGTEEQPMDIILAWRRNTMGAEKSWCQIYLLKKNWKLK	295
<i>V. mimicus</i>	GIGTLPQQAQPYIDRGEIQYINGSEDSMEIIVLAWRRNQMGAEKSWCQIYLLKKNWRWA	295
<i>V. vulnificus</i>	GIGTLPQDIATPLIEAGKLEIEGAEQQHLEIILAWRRNQMGAEKSWCQIYLLKKNWKLK	295
<i>E. coli</i>	GVATMPYPMVEKDIAEGRIRVVSPESTSEIDIIIMAWRRDSMGAEKSWCLREIPKLFNGK	298
<i>Y. pestis</i>	GVATMPYEMVEKDIAAGRLRVIGPEYSREADIIMAWRRDSMGAEKSWCLREIPKLL-GK	297

Figura IV-45: Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de la proteína HuvR y secuencias homólogas depositadas en las bases de datos EMBL. Las regiones sombreadas indican los aminoácidos idénticos (negro) o similares (gris). El dominio hélice-giro-hélice de la región N-terminal que caracteriza a esta familia proteica, así como la posible región implicada en las funciones de reconocimiento/respuesta y el dominio C-terminal, se indican enmarcadas en rojo.

3.4.2 Análisis de la expresión de *huvR*

Aunque la *Fur-box* identificada en la región 5' de *huvR* está muy alejada de lo que podría ser considerado como región promotora de la ORF, se decidió analizar el efecto del hierro sobre los niveles de expresión de este gen. Para ello se diseñaron ensayos de RT-PCR tomando como muestra RNA total extraído de la cepa H775-3 de *V. anguillarum* previamente incubada en presencia y en ausencia de hierro. Tras la correspondiente reacción de reverso-

transcripción con el cebador *huvR4-rev* (Anexo II), el cDNA resultante se utilizó como molde para la amplificación de un fragmento interno de la secuencia de *huvR* con la pareja de cebadores *huvR1-rev/huvR1* (Fig. IV-46A; Anexo II). Simultáneamente se realizaron controles positivos del experimento con la detección del transcrito correspondiente al operón *huvXZ*.

Según el resultado obtenido no existen diferencias significativas entre las amplificaciones obtenidas de las muestras con y sin hierro, pudiéndose concluir que la transcripción del gen *huvR* no parece estar influida por los niveles de este metal presentes en el medio circundante (Fig. IV-46B).

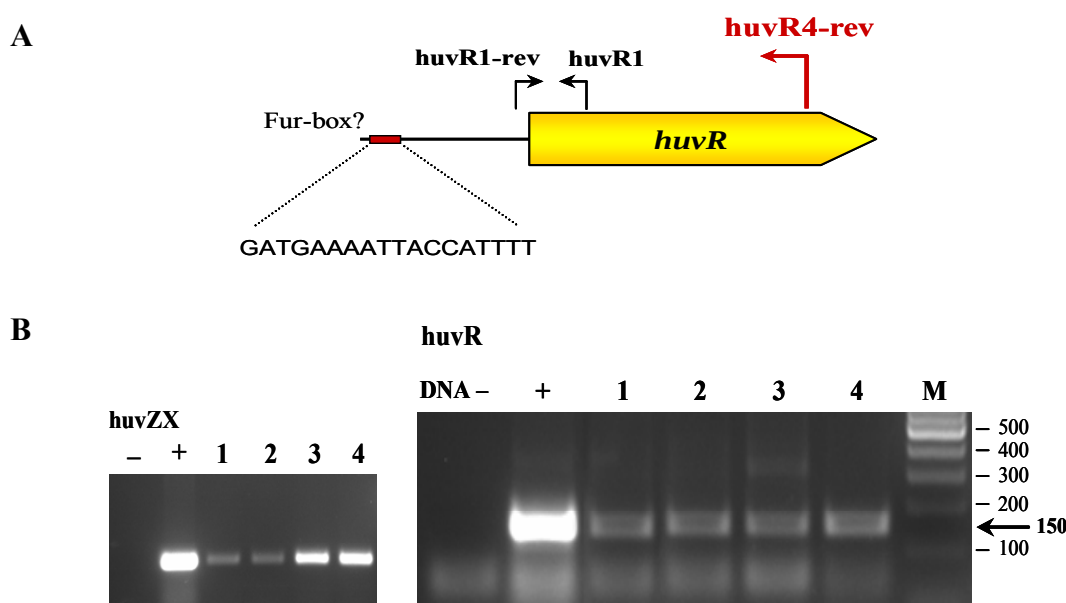


Figura IV-46: Detección del mRNA derivado de la transcripción del gen *huvR* bajo distintas condiciones de disponibilidad y fuentes de hierro. (A) Esquema del gen *huvR* con la supuesta región de unión a la proteína Fur. Las flechas indican la posición del cebador de la reacción de reverso-transcripción (*huvR4-rev*) y los empleados en la posterior amplificación por PCR. (B) Resultado de la RT-PCR. La RT-PCR del gen *huvXZ* se utilizó como control positivo de la reacción de reverso-transcripción. (1) RNA total a partir de un cultivo en medio control CM9; (2) RNA obtenido a partir de un cultivo con exceso de hierro; (3) RNA obtenido a partir de un cultivo con déficit de hierro; (4) RNA obtenido de un cultivo con EDDA 5 μ M + Hemina 10 μ M. DNA-, confirmación de la ausencia de DNA en la extracción del RNA total; +, control positivo de PCR; -, control negativo de PCR; M, marcador de peso molecular (pb).

3.4.3 Análisis de la influencia de HuvR sobre la expresión del receptor de grupos hemo HuvA

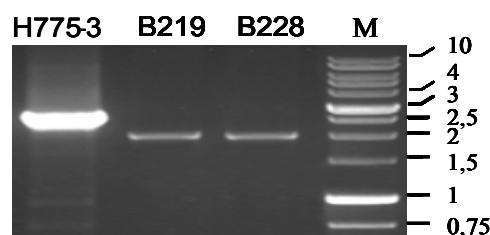
Hasta la fecha HupR de *V. vulnificus* es el único ejemplo de proteína de tipo LysR descrita como regulador positivo de la transcripción de un receptor de hemo, bajo condiciones de limitación de hierro y en presencia de hemina, que actúa como coinductor del proceso de

activación (Litwin y Quackenbush, 2001). Asimismo, los homólogos a este gen identificados en distintas especies del género *Vibrio*, también aparecen físicamente asociados en el cromosoma a los genes de sus correspondientes receptores de membrana externa para grupos hemo, los cuales se encuentran, a su vez, alejados del resto de genes implicados en el proceso de transporte de esta molécula. Sin embargo *V. anguillarum* representa la única excepción a este tipo de organización génica, de manera que el gen *huvA* del receptor está unido a los genes de transporte del sistema de captación de hemo formando un único *cluster*.

Según lo expuesto anteriormente, la secuencia descrita en *V. anguillarum*, tanto de la proteína HuvR como del gen que la codifica, posee un elevado porcentaje de similitud con el regulador HupR de *V. vulnificus* y sus respectivos homólogos. Al no estar adyacente al gen *huvA*, no es posible asignar a *huvR* un efecto concreto sobre el sistema de utilización de hemo. Sin embargo cabe pensar que, en el caso de la existencia de una función reguladora, la supresión de la expresión de *huvR* afectaría a la actividad transcripcional del promotor de *huvA*. Para comprobar esta hipótesis se diseñó un mutante por delección en el que se eliminó la mayor parte de la secuencia de nucleótidos codificante para la proteína HuvR (aminoácidos 20-279).

El proceso de mutación fue el mismo que el empleado en las mutaciones cromosómicas del sistema de utilización de hemo y se utilizó como molde el DNA genómico de la cepa H775-3 de *V. anguillarum*. Las regiones 5' y 3' del gen se amplificaron con los cebadores HuvR.A/HuvR.B y HuvR.C/HuvR.D (Anexo II). El plásmido resultante de la clonación de ambos fragmentos en pNidKan (pSML91) se transfirió por conjugación a las cepas H775-3 y 775met11 de *V. anguillarum*. Finalmente las cepas mutantes seleccionadas B219 (mutante H775-3 Δ *huvR*) y B228 (doble mutante de *V. anguillarum* *fur* Δ *huvR*) (Fig. IV-47) se conjugaron con el plásmido de fusión *phuvA::lacZ*, dando lugar a las cepas B222 y B231 respectivamente.

Figura IV-47: Confirmación por PCR de los mutantes Δ *huvR* derivados de las cepas H775-3 (B219) y el mutante 775met11 (B228). M, marcador de peso molecular (kb).



Los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron bajo condiciones de exceso y limitación de hierro, alcanzadas éstas mediante el suplemento del medio CM9 con $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 40 μM y el quelante de hierro libre EDDA a una concentración final de 1,5 μM , respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos (Fig. IV-48) en ninguno de los casos se observaron diferencias significativas entre las cepas parentales y sus respectivos mutantes $\Delta huvR$.

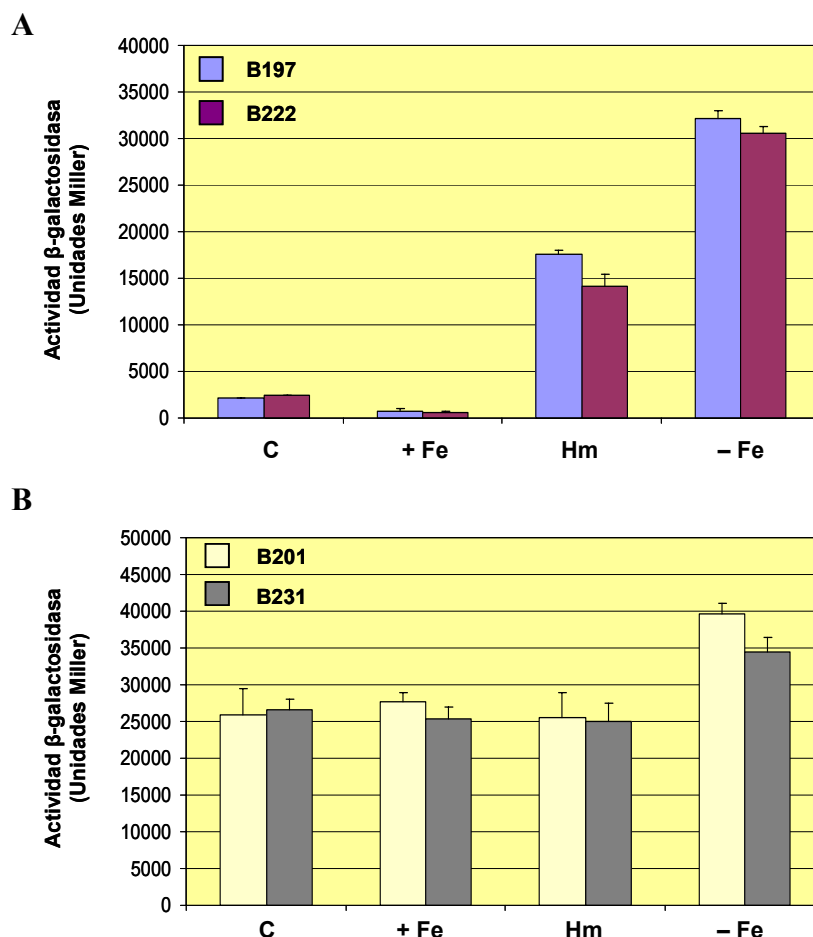


Figura IV-48: Comparación de la actividad transcripcional del promotor del gen *huvA* entre: (A) cepas: H775-3 (B197) y el mutante $\Delta huvR$ (B222); (B) cepa 775met11 (B201) y el doble mutante $\Delta huvR/fur$ (B231). Los resultados mostrados son la media ponderada de tres ensayos independientes realizados en condiciones control en medio CM9 (C), exceso de hierro (+Fe: $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 40 μM), Hemina como única fuente de hierro (Hm: EDDA 5 μM +Hemina 10 μM) y ausencia de hierro libre (-Fe: EDDA 1,5 μM).

Por último, para comprobar si es necesaria la presencia de un coinductor en la activación transcripcional del receptor de hemo, el medio se suplementó con hemina (10 μM) bajo condiciones de limitación de hierro libre (presencia de EDDA 5 μM). Tras determinar los niveles de expresión de la construcción *phuvA::lacZ* bajo estas nuevas condiciones, se puede concluir que, al contrario de lo que ocurre en *V. vulnificus*, la adición de hemina en *V.*

anguillarum no afecta de manera significativa a la actividad β -galactosidasa de la fusión.

Todos estos resultados sugieren que la proteína HuvR no está implicada directamente en el control de la expresión de *huvA*. Sin embargo en los ensayos con las cepas derivadas del mutante 775met11 *fur*⁻ se sigue observando el aumento de los niveles de actividad β -galactosidasa cuando el hierro constituye el factor limitante. Este efecto sobre la expresión de *huvA* reafirma la idea de la existencia de un segundo mecanismo de regulación que condiciona la actividad transcripcional del promotor incrementando los niveles de expresión génica en condiciones de ausencia de hierro.

4. VARIABILIDAD GENÉTICA EN EL SISTEMA DE CAPTACIÓN DE HEMO EN *V. anguillarum*

Inicialmente Sørensen y Larsen (1986) agruparon los aislados de *V. anguillarum* en 10 serogrupos basados en el antígeno “O”. Posteriormente el número de serotipos ha ido aumentando hasta llegar a los 23 actualmente descritos. De todos ellos tan sólo los serotipos O1 y O2, y en menor medida el O3, están considerados como patógenos, mientras que los demás grupos son descritos como cepas ambientales.

Como ya se explicó anteriormente, uno de los principales factores de virulencia que caracterizan a esta bacteria es su capacidad de obtener hierro del organismo infectado, para lo cual *V. anguillarum* se sirve principalmente de la síntesis de sideróforos. La producción de estas moléculas quelantes ha sido demostrada en los principales serotipos de la especie, incluso en aquellos considerados como no patógenos (Conchas *et al.*, 1991; Lemos *et al.*, 1988; Lemos *et al.*, 1991; Muiño *et al.*, 2001; Stork *et al.*, 2002). Todos estos trabajos también establecieron la existencia de una cierta variabilidad entre los distintos serotipos, en cuanto al mecanismo relacionado con la captación de hierro a través de sideróforos (Lemos *et al.*, 1988; Stork *et al.*, 2002).

Tal como se ha venido mostrando a lo largo del presente trabajo, la cepa H775-3 de *V. anguillarum* perteneciente al serotipo O1, cuenta con un sistema génico que consta de 9 genes asociados en una única región cromosómica e implicados en el proceso de captación y transporte de la molécula de hemo. Sin embargo, desconocíamos la presencia de este sistema de adquisición de hierro en otras cepas y serotipos de *V. anguillarum*. En trabajos previos ya se había puesto de manifiesto la capacidad de la hemina y la hemoglobina de promover el crecimiento *in vitro* de diversas cepas de *V. anguillarum*, independientemente de su serotipo u origen del aislado (Mazoy y Lemos, 1996; Rodríguez-Ares, 2000). Puesto que los mecanismos basados en la síntesis de sideróforos pueden ser diferentes entre cepas y serotipos, nos propusimos analizar la presencia del sistema de utilización de hemo en cepas diferentes a la H775-3 y, de este modo, determinar si la captación de hemo y su utilización como fuente de hierro constituyen una característica propia de especie.

4.1 Detección del *cluster* génico caracterizado en la cepa 775 en cepas incluidas en los serotipos O1 a O10

En el apartado 2 del presente capítulo de Resultados ha quedado demostrado que el sistema génico descrito participa directamente en el transporte de la molécula de hemo a través de la doble membrana bacteriana, desde el exterior hasta el interior celular. Dicho sistema incluye genes que codifican el receptor de membrana externa (HuvA), un sistema TonB1 asociado a la transducción de energía desde la membrana interna hasta la proteína receptora (TonB1-ExbB1-ExbD1), una proteína de transporte periplásmica de unión a hemo (HuvB) y los componentes de un sistema ABC de transporte, asociado a la membrana interna y compuesto por una permeasa (HuvC) y una proteína con actividad ATPasa (HuvD).

Es de esperar que si otras cepas de *V. anguillarum* tienen capacidad de utilizar compuestos de hemo como fuentes de hierro, seguramente posean un sistema similar, si no igual, al descrito inicialmente en la cepa H775-3. Para comprobar la presencia/ausencia de cada uno de los genes implicados en el transporte de hemo entre diferentes cepas de *V. anguillarum*, se diseñaron reacciones de PCR utilizando cebadores específicos para la amplificación de los genes *huvA*, *huvB*, y *huvCD*, así como para el operón *huvXZ*. Además, los resultados obtenidos para *huvA*, *huvB* y *huvCD* se confirmaron por hibridación DNA-DNA utilizando sondas específicas para cada uno de ellos. Las cepas analizadas, así como el serotipo al que pertenece cada una de ellas se muestran en la Tabla IV-11.

Las parejas de cebadores utilizadas en cada caso (Fig. IV-49; Anexo II) así como el tamaño esperado para los fragmentos de amplificación fueron los siguientes:

- » ***huvA*** (486 pb): Cebadores P3-1/HuvA-short3'.
- » **Operón *huvXZ*** (360 pb): Cebadores TonB.A/HuvA.D.
- » ***huvB*** (1000 pb): Cebadores VAhuvB-2/VAhuvC-1rev.
- » **Genes *huvC* y *huvD*** (1057 pb): Cebadores VAhuvC-1/HuvD.B.

Las condiciones de amplificación fueron las mismas para todas las reacciones:

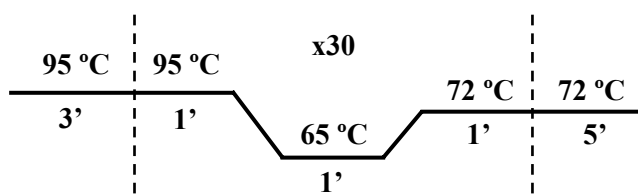


Tabla IV-11: Cepas de *V. anguillarum* analizadas en la determinación de la presencia del *cluster* de captación de hemo.

CEPAS	Serotipo	Origen
775	O1	<i>Oncorhynchus kisutch</i> , Estados Unidos
R82	O1	<i>Scophthalmus maximus</i> , España
TM-14	O1	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , España
96F	O1	<i>Morone saxatilis</i> , Estados Unidos
RV22	O2 β	<i>Scophthalmus maximus</i> , España
43F	O2 β	<i>Morone saxatilis</i> , Estados Unidos
ATCC ^a 43306	O2 α	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC 1481	O2 α	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
13A5	O3 A	Ambiental, España
ATCC 43307	O3 A	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Dinamarca
PT-493	O3 A	<i>Plecoglossus altivelis</i> , Japón
11008	O3 A	<i>Dicentrarchus labrax</i> , Francia
B.1.1. 2/4	O3 B	Ambiental, Dinamarca
ET-208	O3 B	<i>Anguilla japonica</i> , Japón
RPM 41.11	O4	<i>Scophthalmus maximus</i> , España
ATCC 43308	O4	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC 43309	O5	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC 43310	O6	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC 43311	O7	<i>Anguilla anguilla</i> , Dinamarca
ATCC 43312	O8	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC 43313	O9	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC 43314	O10	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca

^a Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va.

El fragmento de DNA empleado como sonda para la detección del gen *huvB* se obtuvo por amplificación con los mismos cebadores que los empleados en el análisis por PCR y utilizando como molde la cepa parental H775-3 (Fig. IV-49). Por otra parte, como sonda de hibridación para *huvA* se empleó un fragmento interno (1 kb) del gen, producto de la digestión del cósmido pML1 que contiene el sistema génico completo (apartado 1.1 de Resultados) con el enzima de restricción *HindIII*. En ambos casos, previamente a su transferencia a la membrana de nylon, el DNA genómico de cada cepa fue digerido con el enzima *BglIII*. Para la confirmación de la presencia de los genes *huvC* y *huvD*, el DNA genómico se cortó con *EcoRI* y se transfirió a la membrana de hibridación tal como se describe en Material y

Métodos. Como sonda se utilizó un único fragmento de DNA, de aproximadamente 1,7 kb, que incluía ambos genes (*huvCD*) y que se obtuvo por PCR con los cebadores VAhuvC-1 y HuvC.D (Fig. IV-49; Anexo II). Las condiciones de amplificación fueron las mismas que para la obtención de la sonda de *huvB*, a excepción de la temperatura de hibridación (65 °C) y el tiempo de elongación (2 min).

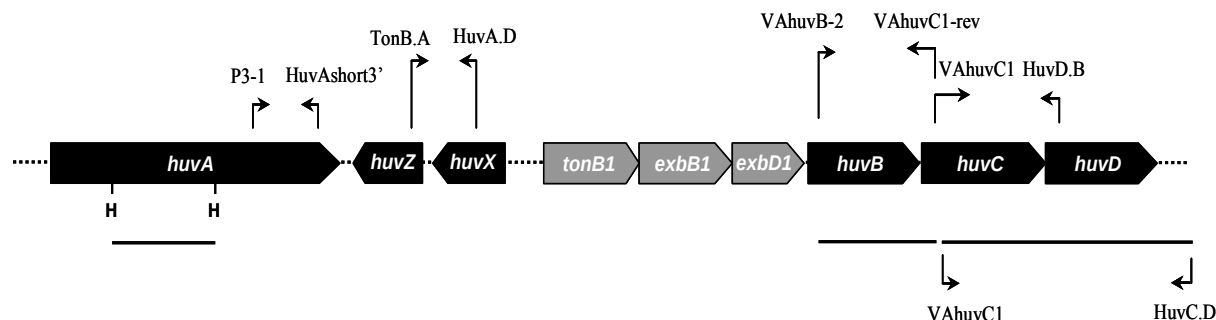


Figura IV-49: Mapa físico del sistema de captación de hemo caracterizado en la cepa H775-3 del serotipo O1 de *V. anguillarum*. Las flechas indican la posición y la dirección de los cebadores utilizados en la detección por PCR y en la amplificación de las sondas específicas para los genes *huvB* y *huvCD*. Las líneas horizontales delimitan la posición de las sondas de DNA. H, diana de *HindIII*.

Los resultados obtenidos (Fig. IV-50; Tabla IV-12) indican que los genes ensayados no están presentes en todas las cepas de *V. anguillarum*. Así, las cepas ATCC43306 (serotipo O2), todas las cepas del serotipo O3 (excepto 13A5 y B1.1.2/4), ATCC43308 (serotipo O4), ATCC43310 (serotipo O6), ATCC43311 (serotipo O7) y la cepa ATCC43314 (serotipo O10) son negativas para la presencia del gen *huvA* y positivas para los genes *huvXZ* y *huvBCD*.

Cabe destacar que todas las cepas incluidas dentro del O3 son negativas para la presencia de *huvA* y que, además, dos de ellas (13A5 y B1.1.2/4) resultaron también negativas para el operón *huvXZ* y los genes *huvBCD*. Ambas cepas, aisladas de agua de mar, representan los únicos aislados de *V. anguillarum* que no comparten ninguno de los genes del sistema de captación y transporte de hemo descrito en el serotipo O1. Por el contrario, todas las cepas del serotipo O1 analizadas hibridaron y amplificaron todos los genes del *cluster*, incluido el receptor de membrana externa, siendo por tanto homogéneas en cuanto al mecanismo de obtención de hemo.

Para el resto de cepas no se puede establecer una relación entre el serotipo y la presencia o ausencia de estos genes, aunque se confirma la amplia distribución de un sistema de captación de hemo y su utilización como fuente de hierro dentro de la especie.

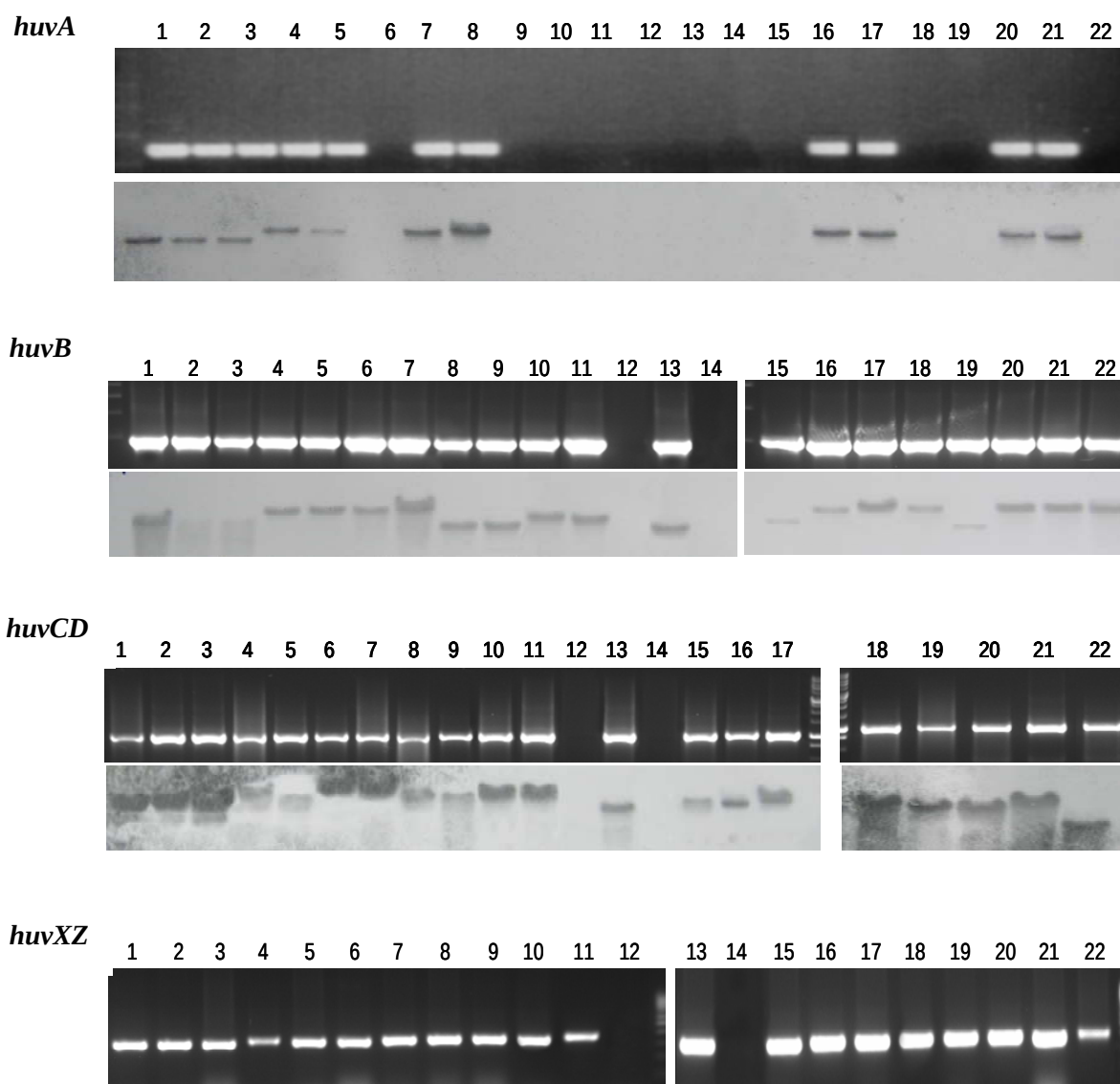


Figura IV-50: Resultados obtenidos en la detección por PCR y *Southern blot* de los genes *huvA*, *huvB*, *huvCD* y *huvXZ*. Las cepas a las que corresponden cada uno de los carriles es la siguiente: (1) 775; (2) R-82; (3) TM-14; (4) 96-F; (5) ATCC 14181; (6) RV22; (7) 43-F; (8) ATCC 43306; (9) 11008; (10) PT-493; (11) ATCC 43307; (12) 13A5; (13) ET-208; (14) B1.12/4; (15) ATCC 43380; (16) RPM 41.11; (17) ATCC 43309; (18) ATCC 43310; (19) ATCC 43311; (20) ATCC 43312; (21) ATCC 43313; (22) ATCC 43314.

Previamente se demostró como los genes *huvABCD* eran esenciales para la utilización de hemo en la cepa H775-3 perteneciente al serotipo O1 y que la mutación de cualquiera de ellos provocaba la pérdida de capacidad de crecimiento en presencia de hemina o hemoglobina como única fuente de hierro. En base a esta observación se puede decir que esta cepa posee un único sistema de captación de hemo, de manera que no existen genes adicionales y redundantes que puedan ser utilizados en sustitución de cualquiera de los genes mutados *huvABCD*. El hecho de que algunas cepas de *V. anguillarum*, no incluidas en el serotipo O1, carezcan de *huvA* o del conjunto de los cuatro genes *huvABCD* y, sin embargo,

sean capaces de utilizar compuestos de hemo como fuente de hierro (Rodríguez-Ares, 2000), apoya la idea de la existencia de genes adicionales capaces de realizar la misma función transportadora que los genes ensayados.

4.2 Presencia del sistema TonB1 y TonB2 en cepas de *V. anguillarum*, pertenecientes a serotipos O1 al O10

En general los sistemas TonB están relacionados con el transporte activo de sustancias a través de receptores específicos de membrana externa. Hasta el momento las principales funciones en las que participan estos complejos de transducción de energía están relacionadas con el transporte de distintas fuentes de hierro, como son el grupo hemo o el complejo Fe-sideróforo.

Hasta la fecha, los estudios existentes en relación a la capacidad de distintas cepas de *V. anguillarum* de utilizar compuestos de hemo como fuente de hierro (Mazoy y Lemos, 1991; Rodríguez-Ares, 2000), así como los resultados expuestos en el apartado anterior, sugieren que esta propiedad es una característica propia de la especie. Por esta razón sería lógico pensar que todas estas cepas comparten un sistema de transducción de energía homólogo al sistema TonB1 caracterizado en los serotipos O1 y O2. Del mismo modo, también se podría esperar que todos los aislados, capaces de sintetizar sideróforos a partir del sistema cromosómico o plasmídico, utilicen un complejo ExbB2-ExbD2-TonB2, equivalente al caracterizado previamente, durante el proceso de internalización de dicho sideróforo.

Las escasas diferencias observadas entre las secuencias de los sistemas TonB caracterizados en las cepas 775 (serotipo O1) y RV22 (serotipo O2) de *V. anguillarum* sugieren una situación similar entre el resto de cepas de diferentes serotipos. Para confirmarlo se trató de detectar la presencia de ambos sistemas por PCR y en cepas representativas de los serotipos O1 al O10 (Tabla IV-11). Los cebadores empleados en la detección del sistema TonB1 fueron HuvB.A/RVexbD1 (Anexo II), que dan lugar a un fragmento de 555 pb que abarca parte de la secuencia de los genes *exbB1* y *exbD1* (Fig. IV-51A). En el análisis de la presencia del sistema TonB2 se escogieron los cebadores ExbB2.1/TonB2.2 (Anexo II). En este caso, el producto de amplificación esperado (1.538 pb) abarca los genes *exbB2*, *exbD2* y *tonB2* (Fig. IV-51B).

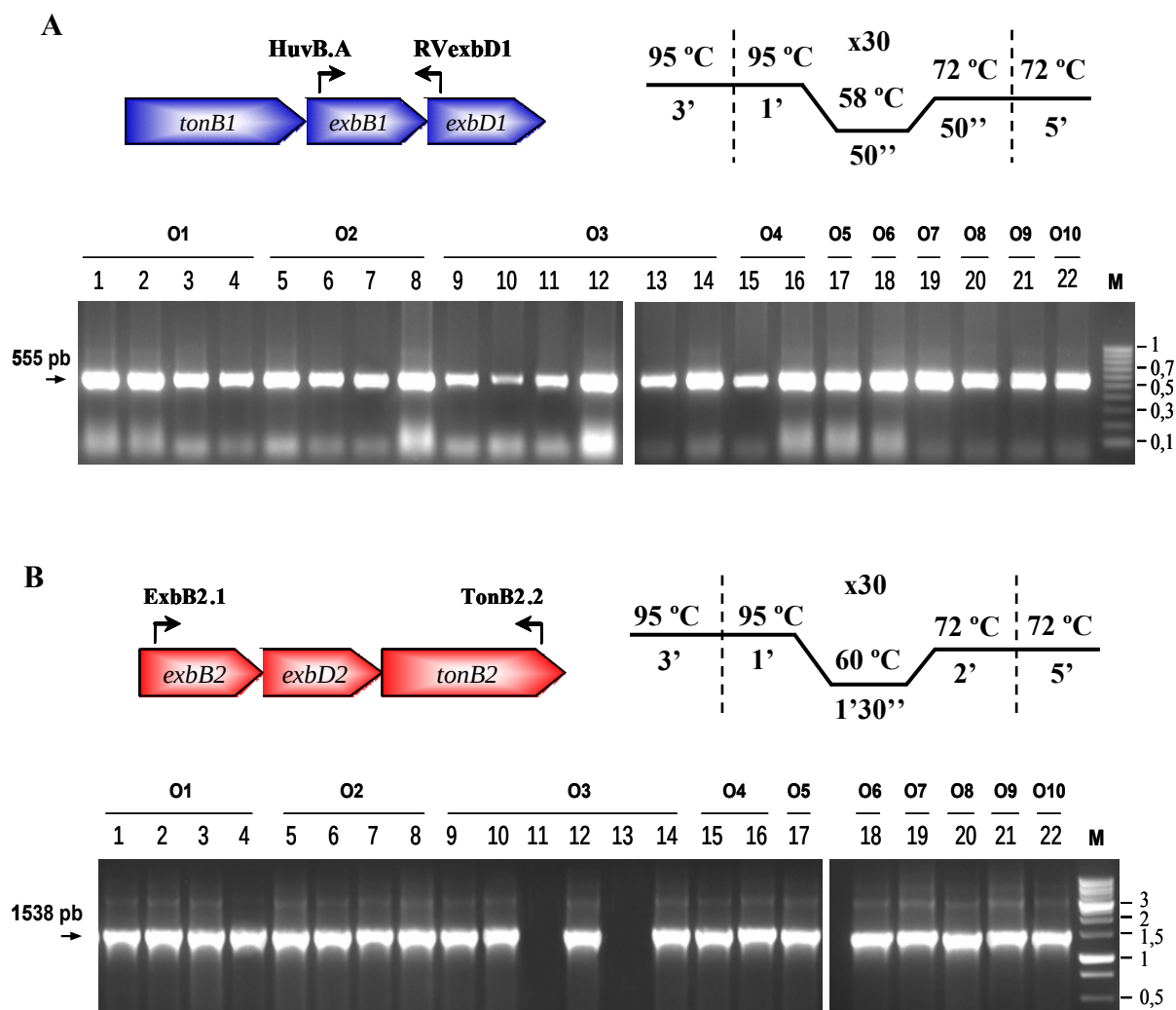


Figura IV-51: Esquema del fragmento amplificado, condiciones de PCR y resultado electroforético de la detección del sistema TonB1 (A) y TonB2 (B) en distintos aislados de *V. anguillarum* pertenecientes a serotipos del O1 al O10. Cepas: (1) 775; (2) R-82; (3) TM-14; (4) 96-F; (5) ATCC 14181; (6) ATCC 43306; (7) RV22; (8) 43-F; (9) PT-493; (10) 11008; (11) 13A5; (12) ET-208; (13) B1.12/4; (14) ATCC 43307; (15) ATCC 43308; (16) RPM 41.11; (17) ATCC 43309; (18) ATCC 43310; (19) ATCC 43311; (20) ATCC 43312; (21) ATCC 43313; (22) ATCC 43314; M, marcador de peso molecular (kb).

El resultado del análisis electroforético de las reacciones de amplificación reveló la presencia del sistema TonB1 en todos los aislados de la especie (Fig. IV-51A). Aunque, en base a estos resultados, se podría establecer una asociación entre la presencia de los genes *huvBCD* y el sistema TonB1 (Tabla IV-12), la detección de un fragmento de amplificación del tamaño esperado en las cepas 13A5 y B1.1.2/4 (negativas para los genes *huvBCD*) descarta la opción contraria. Por otra parte, los resultados obtenidos en la detección del sistema TonB2 de *V. anguillarum* confirmaron su presencia en casi todas las cepas analizadas (Tabla IV-12). En las cepas 13A5 y B1.1.2/4, igual que ocurría con los genes *huvA*, *huvXZ* y *huvBCD*, no fue posible amplificar ninguno de los componentes del sistema (Fig. IV-51B).

Las diferencias tan importantes a nivel genético detectadas entre estas dos cepas y el resto de aislados de *V. anguillarum* plantean numerosos interrogantes sobre los posibles mecanismos de obtención de hierro utilizados por los aislados 13A5 y B1.1.2/4 y abre nuevas posibilidades en cuanto a estudios de variabilidad intraespecífica en *V. anguillarum*.

En general, la detección de ambos sistemas TonB en aislados pertenecientes a 10 serotipos distintos de *V. anguillarum* sugiere la presencia, en todos ellos, de mecanismos de captación de hierro basados en la síntesis de sideróforos y, sobre todo, la existencia de un mecanismo de transporte activo de hemo desde el exterior celular hasta el citoplasma bacteriano.

Tabla IV-12: Presencia de los genes *huvA*, *huvXZ*, *huvB* y *huvCD*, así como los sistemas TonB1 y TonB2 en cepas representativas de los serotipos O1-O10 de *V. anguillarum*.

CEPAS (SEROTIPO)		<i>huvA</i>	<i>huvB</i>	<i>huvCD</i>	<i>huvXZ</i>	Sistema TonB1	Sistema TonB2
775	(O1)	+	+	+	+	+	+
TM-14	(O1)	+	+	+	+	+	+
R-82	(O1)	+	+	+	+	+	+
96-F	(O1)	+	+	+	+	+	+
ATCC ^a 14181	(O2 α)	+	+	+	+	+	+
ATCC 43306	(O2 α)	—	+	+	+	+	+
RV22	(O2 β)	+	+	+	+	+	+
43-F	(O2 β)	+	+	+	+	+	+
PT-493	(O3A)	—	+	+	+	+	+
13A5	(O3A)	—	—	—	—	+	—
ATCC 43307	(O3A)	—	+	+	+	+	+
ATCC 11008	(O3A)	—	+	+	+	+	+
B1.1.2/4	(O3B)	—	—	—	—	+	—
ET-208	(O3B)	—	+	+	+	+	+
RPM 41.11	(O4)	+	+	+	+	+	+
ATCC 43308	(O4)	—	+	+	+	+	+
ATCC 43309	(O5)	+	+	+	+	+	+
ATCC 43310	(O6)	—	+	+	+	+	+
ATCC 43311	(O7)	—	+	+	+	+	+
ATCC 43312	(O8)	+	+	+	+	+	+
ATCC 43313	(O9)	+	+	+	+	+	+
ATCC 43314	(O10)	—	+	+	+	+	+

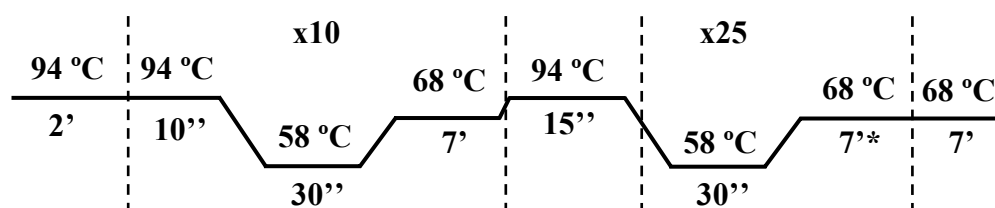
4.3 Identificación de un nuevo receptor de membrana externa

Puesto que todas las cepas de *V. anguillarum* analizadas parecen ser capaces de utilizar hemo como fuente de hierro, probablemente, en aquellos aislados carentes del receptor de membrana externa HuvA, exista uno o más receptores adicionales con función similar al descrito en la cepa H775-3 del serotipo O1 dentro del proceso de captación y transporte de hemo. En estos casos la secuencia de este nuevo receptor podría ser lo suficientemente diferente del caracterizado previamente como para que no sea posible la hibridación con la sonda de *huvA* o su amplificación por PCR con cebadores diseñados a partir de la secuencia de este gen.

4.3.1 Caracterización de la secuencia del gen *huvS*

El análisis por PCR de las cepas *huvA*-negativas, a excepción de las cepas 13A5 y B1.1.2/4, confirmó la presencia del resto de componentes que formaban parte del *cluster* de utilización de hemo. Además todos estos genes (*huvX*, *huvZ*, *tonB1*, *exbB1*, *exbD1* y *huvBCD*) comparten la misma posición y orientación que el sistema descrito para el serotipo O1. Esta alta conservación de la organización genética planteó la posibilidad de que ese nuevo receptor mantuviera conservada su localización cromosómica respecto a *huvA*. Si esto fuera así sería posible clonarlo analizando la región vecina al gen *huvZ*, ya que se esperaría que este homólogo a *huvA* mantuviera su localización adyacente a *huvZ* y en orientación contraria al mismo.

Para probar esta posibilidad, se diseñaron reacciones de PCR-Inversa con objeto de amplificar el DNA “corriente abajo” de *huvZ* y partiendo de la cepa negativa para *huvA* ET-208 (Serotipo O3). El DNA genómico se cortó con los enzimas de restricción *SacI*, *BssHII*, *EcoRI*, *KpnI* y *BglII*. Los fragmentos obtenidos en cada digestión se autoligaron, de manera que las reacciones de ligación sirvieron como molde para una reacción de amplificación con los cebadores cDNA_{huvZ2} y VA_{huvX1} (Fig. IV-52A; Anexo II). Las condiciones de tiempo y temperatura para la PCR fueron las siguientes:



* Incremento de 10 s en cada ciclo

Tan sólo se obtuvo amplificación en las reacciones de las digestiones con *Bss*III (5 kb), *Bgl*III (6 kb) y *Eco*RI (8 kb) (Fig. IV-52B). Estos fragmentos se purificaron a partir del gel de agarosa y se trataron de clonar en el plásmido pGEM-T-*Easy*. De los tres solamente la amplificación *Bss*III pudo ser clonada en el vector, dando lugar al plásmido denominado pSML88. El inserto se secuenció partiendo del cebador cDNAhuvZ2 y siguiendo siempre el mismo sentido de la secuencia. Todos los cebadores utilizados se recogen en el Anexo II.

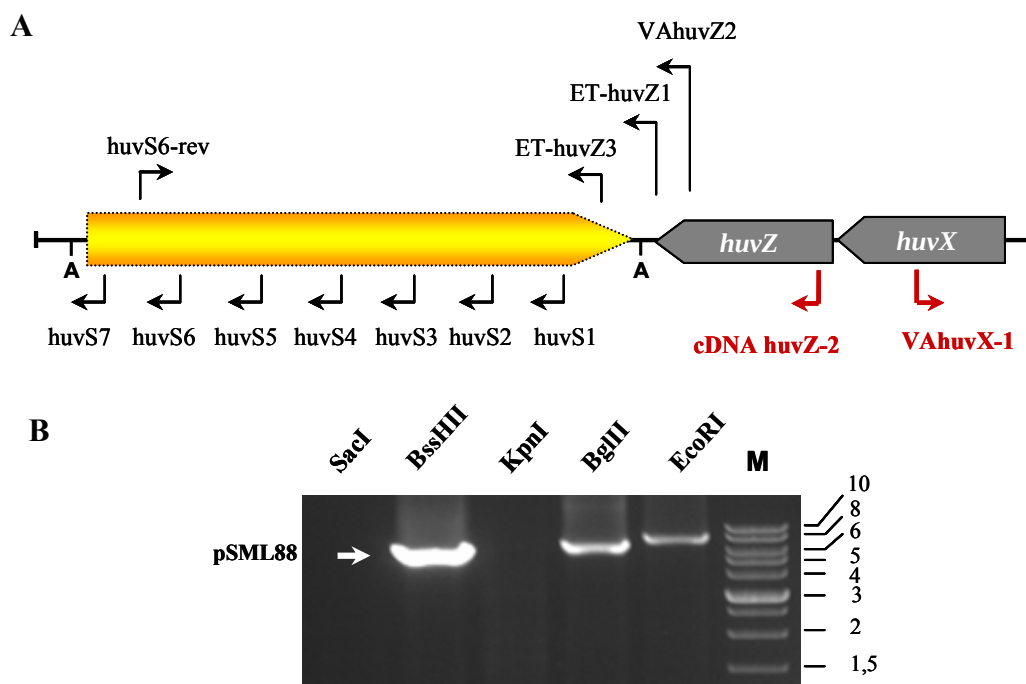


Figura IV-52: Caracterización de la región adyacente al gen *huvZ* en la cepa ET-208 de *V. anguillarum* (serotipo O3). (A) Esquema de la región amplificada. Las flechas indican los cebadores utilizados en la PCR Inversa (cDNAhuvZ-2/VAhuvX-1) y los empleados en las posteriores reacciones de secuenciación (Anexo II). A, *Apa*LI. (B) Electroforesis resultado de la PCR-Inversa. El producto de amplificación derivado de la digestión con *Bss*III se clonó y dio lugar al plásmido pSML88 (5kb). M, marcador de peso molecular (kb).

En la cepa ET-208 la región adyacente a *huvZ* está altamente conservada con la región intergénica *huvA-huvZ* del serotipo O1 hasta la posición 60 “corriente arriba” del codón de parada del gen. A partir de este punto las secuencias de ambas cepas difieren enormemente. Dentro de esta nueva secuencia se dedujo una ORF completa de 2.157 pb que codifica una proteína, que recibió el nombre de HuvS, de 719 aminoácidos y un peso molecular de 79,33 kDa. Las mayores similitudes de la secuencia aminoacídica se encontraron con el receptor de grupos hemo MhuA de *V. mimicus* (63% de identidad), el receptor de hemo de *V. fischeri* (59%) y el receptor de hemo HutA de *Photobacterium damsela* (47%).

La comparación entre la proteína HuvS y el receptor HuvA de *V. anguillarum* revela que poseen únicamente un 38% de identidad. Hay que destacar que los primeros 44 aminoácidos de ambos receptores son idénticos, mientras que la secuencia del resto de la molécula muestra una gran divergencia (Fig. IV-53).

187

HuvA	SIETQDSAKNDLLLKLQYQLSDAHRLEFFGEALHNKTDSDIAHSS-----Y 275
	: :. * * :.* * * * . * * * : . * : : . * * : *
HuvS	AQNPADSKLGNLLAKAFYQANDNHLGLTAEYNNKRYDEDELNNGYSIMPG-----FTY 289
MhuA	LTNPADTELGNLLAKAQYQANEDHFRGLTVEHYTKNYDEDELNNGYAIMP-----FVY 282
HutA(1)	AANPADAQIGNLLAKAFYQLNDSHRIGATVEYFTSQYDEELSQNGYSMMRSG-TPIITY 292
HutA(2)	AANPFDIASHNVLAKIFYQINDANRVGFTAEEYTPSADGRILSSDGKTISMRPPMPIMY 290
	* * * * :.* * * * : . * * * . * : . * : : * : *
HuvA	KNYHGQDTTKQYRLGIKHIWLADSAIADTITSRASWQSKEDNGLTHRFQPASSGRPPYTP 335
	: : . * * : : * : * * * * : : * : : * : : * : : * : : *
HuvS	TDNYNQDTNERLVRVGIHQWLMNTLLADSLDWSLNFQ--DSSALAKNYDTP----- 339
MhuA	SNNYNEDVNKRTRISLDHQWLMNTLLVDQSLVTLSTYQ--DSSTLNKNYDTP----- 332
HutA(1)	YDNYNKDTNTRLRVGLEHEWQANNLLFDLTLESKLVNQ--QTESLSENYDTSTG----- 343
HutA(2)	SNNRADDHDLRLGLEHEWLAELIAAFDSLEWKLNT--ESESKHNSYDKTN----- 340
	: * : * : * * : : * : : * : : * : : * : : * : : *
HuvA	ANADNQTKDYFYNEDEKIELETQLDKLVTLGQTEHNFIYGLSFASSDISNTNTELNSDPA 395
	: : : : : : * : : * * * * * : * * * * : * : : * : *
HuvS	--SNGRRLRERESSDQSIQFDGQLSKAVDLNGNLHEFTYGASYINNDFDLNTDYKLDAG 397
MhuA	--SSGARMRERDSADKAVQFDVQLNKLIDTGLSHDVTYGGSYLNNAFSLQNTDHLKYTG 390
HutA(1)	PYGSGRRMRERATDDSIQFDAQFDKIAEFGEFHQITYGVSRQNKFATENTDYKYDKG 403
HutA(2)	--YYGNRNRYRDGTDITQLDIQMKKELELANNRHEITYGVSGTNNTFDITYDYNLDKG 398
	* * * * : . * : : * * * : : * : : * * * : * * * : * *
HuvA	TPNQVLVYTPDATDQKIGLFVQDEITLLSGNLIVTPGLRYDSFSTDPGGST--TEPLVKF 453
	* . . * * * : * * * * : : : : * * * * * : * : * : *
HuvS	TSTPGSSGIPDATIVQWGLFLQDQAYFIQDRILITAGLRYDSFEATPSVDAGYTQSYEAN 457
MhuA	TSNGSTGVPDADIKWGLFAQDQMYFLDEQLITAGLRYDSFEATPKTDSAFTEYKPN 450
HutA(1)	TVGPGHTDMPDATMTQYGFIAQDQAFLEQLVLTAGLRYDSFKAEPETNEGFKTEYDPS 463
HutA(2)	TSKLGPEEVPKSKSEKRAVFVQDMFMLDEKLVTAGLRYDDYQAEPSDT-----LKD 453
	* * : * : : : * * * : : : : * * * * * : * * : *
HuvA	DDSALTSRLGALYRINNQHVSFAQVSQGFRAFNFTELYTYDNIAHRYVNDPNPYLKSET 513
	. * * * : * * * : : * : * * * * * : : * * * * : *
HuvS	KDSAFTARLGSVFHVNPNLAVFGQISQGFKAPTVYDLYFYFN---QGAIIDANPDLKAEK 514
MhuA	KDNAFTGKLGAHYHLQDNLAVFGQISQGFKAPTVYDLYFYFN---QGAIIEANPDLKAER 507
HutA(1)	QDNAFTAKLGSVYHINNNSVFLGQISQGFKAPTLQDMYFYFN---SGAVIDANPDLKAES 520
HutA(2)	KDSAFTGRLGAVYHFTDNFSTYQFTQGFRAPTIHELYYDKENLAHGYKVISNPNLKPEE 513
	: . * * * : * * : * . * : : * * * * * : : * * : * * * * *
HuvA	SLAYELGYRHNTNVSATEISAFYSYDDFIERVTT-----KKVNGITHYSYVNLSEATIK 568
	* * : * * * * : : : * * : * * : * * * : * * : * * : *
HuvS	SLSYELGLRGQNDSTNFEITTFYNEYTFITQSKT-----GKQGGKIDFTKENLDEVTIY 569
MhuA	SIAYEIGTRGNAYGNMEFALFVNDYKDFITQTKT-----GQSGGKDVISKYNIDEVQIY 562
HutA(1)	SISYEAGIRAQSNAAQLELIAFYNDYSDFINQQYLGKVVGGPNDGKEHYTKENIDSAEIY 580
HutA(2)	SDAVELGLRLNGHLGSAVSFVFNYYKNFIKDVTT-----YDSNNIQTITNENVDKAKIY 568
	* : * * * : . . * * : * * : * * : : : : * : * * *
HuvA	GIELSNQLKLDQLIGAPNGMSTRLAASYSKGED-GNGRPLNSVNPWNVVAALNYDDESTT 627
	* * * : : * * : : * * * * * : : * * * * * : * * * * *
HuvS	GAEFSSRIDLKAFNAPQGTYTRLAIYAEAGEDKKTGDALDSVAPLTSNVGLGLDRD--Q 627
MhuA	GAEFSSLTLLDTISPLPQGSYARLSIYAHGEDKATGKEIDTVAPLTSVLGLGYEQ--D 620
HutA(1)	GIEFSSTYLLDEAFNAPQGTYSKLSIYAEGRDKKTGAPIDSAPLTSNLGLGYDSVGYT 640
HutA(2)	GAELKTSIWLDEALNAPMGTYANFSVAYTRGEDKKTGRELDTVAPLTAVLGLGYDSPDEM 628
	* * : : * * * * * : : * * * * * : * * * * * : * * * *

HuvA	WGTSCLKNYTAAKSAGNINRDQLNSGTENQVELPSATIVDITAYFKPMQDVTITAGIFNL 687
	:*: *: :*: *: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*
HuvS	YGALLNVKMOVASK-----TDWQ--SNTNADAAGYTLIDLTAYYKPMQGLTIRAGLFNA 678
MhuA	FGSALNVKMOVASK-----NEWQ--VENNLDVAGYAVVDLAAYYVPVKDLTVRAGLFNL 671
HutA(1)	YGALLNINMVAGK-----DKWSNVGHENINVAGYTLVDLTAYYKPMKDLTLRGGLFNA 693
HutA(2)	WGGVVDVTMVATK-----DKWQ--EEDHFNTPGYTVVDMTTYYPSPKDLTVRAGLFNA 679
	:*. :*: :*: :*: :*. :*. :*. :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*
HuvA	TDKEYRWNDIRGKTNL-----DNDYSQAERNYAITAKYEF 723
	***: :*: :*: :*: :*. :*. :*. :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*
HuvS	LDKKYWLYSDLTGRTATGETFNIIDSKSQPRNWGLNVQYF 719
MhuA	FDKKYWNYSIDISGKTGT-ERFN-DYDTQPRNWGISLDYQF 710
HutA(1)	FDKQYWLNDMIGTESG--DDGIDPKAQAGRNWGIELDYKF 732
HutA(2)	FDKKYWQYQNVGDIIVG--KENFNCKTEPGRNWGVNVKYDF 718
	:***: ** *: :*: :*. :*. :*. :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*

Figura IV-53: Alineamiento entre las secuencias de la proteína HuvS y HuvA de *V. anguillarum* (alineamiento superior) y HuvS y los receptores de hemo identificados en *V. mimicus* (MhuA), *V. fischeri* (HutA(1)) y *P. damsela* (HutA(2)) (alineamiento inferior). Las secuencias características del receptor de membrana externa (*TonB-box*, *FRAP-box* y el residuo F terminal) se indican enmarcadas.

La secuencia nucleotídica de *huvA* y *huvS* está altamente conservada entre las posiciones 1 y 131, llegando a un 96% de identidad. Sin embargo, a partir de esta última posición las secuencias de ambos genes difieren considerablemente, de manera que la similitud entre ambas secuencias baja hasta el 52% (Fig. IV-54). La región promotora de *huvS* mantiene el mismo grado de conservación que la secuencia inicial del gen, de manera que es posible identificar la misma *Fur-box* que la establecida previamente para el promotor de *huvA* (AATGATAGTAATTACCATT), así como el residuo de Adenina identificado como punto de inicio de la transcripción. La presencia en *huvS* de la misma *Fur-box* caracterizada en el serotipo O1, apunta a que la transcripción de este nuevo receptor está también regulada por los niveles de Fe^{+3} .

“Corriente abajo” del codón de terminación de *huvS* se identificó una región de simetría que constituye un posible terminador de la transcripción (Fig. IV-54). La secuencia de esta zona está muy poco conservada entre las dos cepas de *V. anguillarum* analizadas. Sin embargo, en la región próxima al codón de parada de *huvZ* la secuencia de nucleótidos vuelve a estar altamente conservada y es prácticamente idéntica dentro de la secuencia codificante de *huvZ* (97%).

<i>huvA</i>	GCGCGCAGCTTTGCTTGCATCGTCAATGTGTTGGATCCTGATGTGATAGTGCTTGGTGGA 60
<i>huvS</i>	GCGCGCAGCTTTGCTTGCATCGTAAATGTGTTGGATCCTGATGTGATAGTGCTTGGCGGA 60

<i>huvA</i>	GGATTATCAAACGTAGCATCGCTGTATGTTGATCTGCCTCGGGCAACAGCGAACTATGTT 120
<i>huvS</i>	GGATTATCAAACGTAGCATCGCTGTATGTTGATCTACCGCGGGCAACAGCGAACTACGTT 120

huvA	TTTTCTGATAGTGCACAGATTGTGTTTACCCAAGCGAAATATGGTGACAGCAGCGGCATC	180
huvS	TTTTCTGATAGTGCACAGATTGTGTTTACCCAAGCAAAATATGGTGACAGCAGCGGCATC	180

huvA	CGTGGTGCAGCTTGGCTAGGTTTGAAGTACAGAAAAGTGATTAAAGTCACAACTTTAGTC	240
huvS	CGTGGTGCAGCTTGGCTAGGTTTGAAGTAGAAGAAAAGTGATTAAAGTCACAACTTTAGTC	240

huvA	ATCGAAAAATTAAGTAAAGCAAGTGTTTTACATATTAATTAAGTATTTAAACATAC	300
huvS	ATCGAAAAATTAAGTAAAGCAAGTGTTTTACATATCAAATGACTGATATTTAAACATAT	300

huvA	ACTCCTAATTCTATTTATATTTTACATCAACACACAAACACAAATGATAGTAATTACCAT	360
huvS	ACTCCTAATTCTATTTATATTTTACCCAGCACACAAACACAAATGATAGTAATTACCAT	360

huvA	TTAGATCCAATATCATTGCGCACAGCTTGAATCTGTTATTG	420
huvS	TTAGATCTAATATCATTGCGCACAGCTTGAATCTGTTATTG	420

huvA	AGATGTACACTAAACACTACTATCAGCCTCCATATTGCTAGCGCTTTCCCTGCAAGCTC	480
huvS	AGATGTACACTAAACACTACTATCAGCCTCCATATTGCTAGCGCTTTCCCTGCTGCTC	480

huvA	TGCGAGAAGAAAGTTTCTCGATTTCGATGAGGTTGTTGTTTCGGCAACGCGAACTTCTCAAG	540
huvS	TGCGAGAAGAAAGTTTCTCGATTTCGATGAGGTTGTTGTTTCGGCAACGCGAACCAGCAGA	540

huvA	CCATCAAAAATACCGCCGCTTCTGTTGCTGTCAATTCGAGCAAAAGACATTGAAGCCAATA	600
huvS	GTAAAAAAGATGTATCGTCATCCATTGAAGTATCTCCTCTTCTGAGATTGCAGAAGTAA	600
	* * * * *	
huvA	TGGCAAAAGATGTCGCAGCTATCCTTGAATATACCCCTGGAGTTTCAACCAATAGCTCAT	660
huvS	TGGCTGATAATATT-CAGCAAGCTCTAAATTCCACCCAGGTGTTGAAGCGGAAGGTAA	659
	* * * * *	
huvA	C-TCGCCAAGGTGTACAGACCATCAATATTCGCGGCGTAGAAGGTAAATCGAATCAAAATC	720
huvS	GGCCGCTTTGGAATAGCAGGATTTAATATTCGCGGCGATGGATGGAAGCCGTGTCAAAATG	719
	* * * * *	
huvA	ATGGTTGATGGAGTCACACAAGGACAAGCATTCGACGGAGGTCCTTACTCTTTTGT-CAA	780
huvS	ATGGTTGATGGTGT--ACAGCAACCTGTACCTTATA--ACCCTGGCGCAACTGAGCAA	773
	* * * * *	
huvA	TTCGAGCGCT--ATCAGTATCGATCCCGATATGGTAAAGAGTGTGAAGTCATCAAAGGT	838
huvS	CGAAATATCCAACGCAATAGAGATTGACACTCTACAAGCTATTGAAGTGAACAAAGGT	833
	* * * * *	
huvA	GCGGCGTCAAGCCTTCACGGCAGTGATGCCATTGGTGGTGTCTGCTTTTGACACCAAA	898
huvS	GCGTCATCTACACTGTATGGATCTGACGCTTAAAGTGGTGTGGTATTGCTACGCACTAAA	893
	* * * * *	
huvA	GATCCTCGTGATTTTCTTAAAGGAGACGCAACCACA-GGCGGACAAGCA--AAGCTTTTC	956
huvS	AATCCAGAAGACGTTCTCGTCACAGAAGGAAATGAGCAACGCTTCGGTATCAAGTCTGGT	953
	* * * * *	
huvA	TACTCTTCAGAAGATAAATCTTTAGTGAACATATTGCCATTGCAAAATA-GAAGTGGCAA	1016
huvS	TATACGTCCGCTAACGAGCAATTTAA-AACGACATTAAACGTTGGCAATGCGTCAAGATAA	1012
	* * * * *	
huvA	TTTAGAGACCTTGGTCGCCTATACTCGCCGTGATGGGCAAGAGCAACAAAAATTTTGCC--	1074
huvS	ACTGGAACCTTACTGATGGCAACTTATGCCAATGGCAGTGAGACCAAACCTCATGGCTC	1072
	* * * * *	
huvA	--GATCGTAAAGAAGATTATTCGATAGAGAC--TCAAGA-----TAGTGCAAAAAATG-	1123
huvS	AGGTTTCAGAAATCGAAGGCCCTGATCGCGGCGCTCAAAACCCGGCTGACTCCAAACTTGG	1132
	* * * * *	

<i>huvA</i>	- -ACTTGCTACTTAAGCTCCAATATCAACTGAGCGATGCTCACCGTTTGGAGTTCTTTGG	1181
<i>huvS</i>	CAACCTGTTGGCAAAAGCATTTTATCAAGCCAATGATAACCATCGACTTGGGCTAACCGC	1192
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TGAAGCACTGCATAACAAAACAGATTCTGATATCGCTCATTCCAGTTACAAAACTATCA	1241
<i>huvS</i>	CGA- - - -GTATTACAACAAACGGTATGATGAAGACGAGCTAACTATAACGGTTATTCT	1246
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TGGTCAAGATACAACGAAACAGTATCGCCT - TGGCATCAAAACACATTTGGCTAGCTGACT	1300
<i>huvS</i>	CA-TTATGCCCGGCTTTACCTATACCGATAACTACAACCAAGATACC - AATGAGCGTCTT	1304
	* * * * *	
<i>huvA</i>	C-TGCCATCGCAGA-CACCATCACTAGCCGAGCATCTTG- - -GCAAAGCAAAGAGATAA	1355
<i>huvS</i>	CGTGTCCGTTATAGAGCATCAATGGTTGATGAATACCCTGCTTGTGACTCTTTAGATTGG	1364
	* * * * *	
<i>huvA</i>	CGGCTTAACGCACCGTTTTCAGCCAGCATCGTCAGGAAGGCCCTCTTACACTCCAGCCAA	1415
<i>huvS</i>	TCATTGAATTTCCAAGATTCTAGCGCTCTCGCTAAGAACTACGACACA-ACGCCATCTAA	1423
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TGCGGACAAACCAACAAACCAAAGATTACTTCTATAATGAAGTAAAATTGAATTAGAAAC	1475
<i>huvS</i>	TG- - -GCCGCCGGTTACGTGAACGGGAATCATCAGATCAA- - -TCGATTCAATTTGATGG	1477
	* * * * *	
<i>huvA</i>	GCAACTGGATAAGTTAGTTACCTTAGGTCAAACCGAACATAACTTTATTTATGGTTTAAAG	1535
<i>huvS</i>	ACAGCTCTCCAAAGCCGTAGATCTCAATGGCAACCTTCATGAATTTACCTATGGTGCCAG	1537
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TTTTGCCAGTAGCGATATTTCAATACCAATACAGAACTCAACTGGATCCTGCAACGCC	1595
<i>huvS</i>	CTACATTAAACACGACTTCGACCTCGATAAATCTGACTATAAATTAGATGCAGGTACATC	1597
	* * * * *	
<i>huvA</i>	AAATCAAGTTTGGTTTATACACCGGATGCTACAGACCAAAAAATCGGCCTCTTTGTTCA	1655
<i>huvS</i>	GACCCCGGGTAGCTCTGGCATTCCTGATGCGACTATCGTGC AATGGGGGCTATTCTTACA	1657
	* * * * *	
<i>huvA</i>	AGATGAGATCACCCCTTTTGAGCGGTAAATTTGATTGTACACCAAGGCCTTCGTTATGATTC	1715
<i>huvS</i>	AGACCAAGCCTACTTCATCCAAGACCGTTTAAATTAACCGCTGGTCTTCGATACGATTC	1717
	* * * * *	
<i>huvA</i>	ATTTAGCACCGATCCCGGTGGTAGCACC- - -ACAGAACCTCTCGTTAAATT- -TGACGA	1769
<i>huvS</i>	TTTTGAAGCGACACCCAGCGTTGATGCTGGCTACACTCAGTCTTATGAAGCCAATAAGA	1777
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TTCAGCACTCACCAAGCGTCTTGGCGCACTGTACCGTATCAATAATCAACATTCAGTATT	1829
<i>huvS</i>	CAGCGCATTCAGTCTCGATTGGGTTCTGTTTTCCACGTCAATCCTAACCTAGCGGTATT	1837
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TGCTCAAGTCAGCCAAGGCTTCGGTGCCCTAACTTTACTGAGCTGTACTACACGTATGA	1889
<i>huvS</i>	TGGTCAAATTAGCCAAGGATTCAAGGCACCAACTGTTTACGACCTTTACTACTTCTATAA	1897
	* * * * *	
<i>huvA</i>	CAACATTGCTCACCGTTATGTGAACGATCCAAACCCATACCTTAAGTCAGAAACAAGCTT	1949
<i>huvS</i>	TCAGGGGGCA-ATCATT- - - - -GATGCGAATCCAGATCTTAAAGCAGAGAAAAGTTT	1948
	* * * * *	
<i>huvA</i>	GGCCTATGAATTGGGTTATCGTCACAATACAAACGTCTCGGCAACTGAAATTTCTGCATT	2009
<i>huvS</i>	GTCCTATGAACCTGGGCTACGTGGTCAAAATGACTCAACTAAATTTTGAATCACCACTT	2008
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TTATAGCGACTATGATGATTTTCATTGAACGAGTTACAACTAAGAAAGTGAA-CGGAAATAA	2068
<i>huvS</i>	CTATAACGAGTACACCGATTTTATT-ACTCAGTCAAGACAGGCAAGCAAGGTGGCAAGG	2067
	* * * * *	
<i>huvA</i>	CCCACTACTCCTATGTCAACTTAAGTGAAGCGACGATCAAGGGGATTGAATTTATCAATC	2128
<i>huvS</i>	ATATCTTTACCAAGAGAACTTGGATGAAGTCAAGATTTATGGTGGGAATTTAGCTCTC	2127
	* * * * *	

<i>huvA</i>	AATTAAATTGGATCAATTAAATTGGAGCCCCGAATGGTATGTCAACACGCCTAGCGGCAA	2188
<i>huvS</i>	GAATTGATTTAGATAAAGCGTTTAAATGCCCCACAAGGGACTTACACCCGTCTAGCCATTG	2187
	* * * * *	
<i>huvA</i>	GTTATAGCAAAGGTGAAGATGGTAACGGACGTCCATTGAACAGCGTAAACCCATGGAATG	2248
<i>huvS</i>	CTTATGCAGAGGGAGAAGATAAGAA-----AACAG-GTGATGCTTTAGATT-	2232
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TTGTGCGAGCACTAAATTATGATGATGAAAGTACCACTTGGGGTACTAGCCTGAAAGTTGA	2328
<i>huvS</i>	CAGTCGCGCCTCTAACCAGTAATGTAGG-----CTTAGGG--CTGGATCGCGACCAA	2282
	* * * * *	
<i>huvA</i>	ATTATACTGCTGCGAAGTACGCCGTAATATCAACCGTGACCACTTAATAGCGGTACAG	2368
<i>huvS</i>	TACGGAGCACTGCTTAATGTTAAGATGGTTGCAAGTAAGACGGACT-GGCAATCAAAATAC	2341
	* * * * *	
<i>huvA</i>	AAAACCAAGTTGAAGTGCAGAGTGCAGACATTGTCGATATCACCGCTTACTTTAAACCAA	2428
<i>huvS</i>	AAATGCAGAT---GCCGCTGTTTAT-ACACTTATCGATTTAACGGCCTACTATAAACCAA	2397
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TGCAAGATGTCACTATTACTGCGGGCATATTTAACTTAACCGACAAAGAGTACTACCGTT	2488
<i>huvS</i>	TGCAAGGCCTAACCATCCGCGCTGGTCTATTCAATGCACTCGATAAAAAATATTGGCTGT	2457
	* * * * *	
<i>huvA</i>	GGATGATATC-----CGCGGTAAAC-----AACTTAGATAACGA---CTACTCTC	2533
<i>huvS</i>	ATAGCGATCTACGGGCGAGATGCTACTGGCGAAACCTTTAACATCGATAGCAATCAC	2517
	* * * * *	
<i>huvA</i>	AAGCTGAGCGTAAGTATGCTATTACCGCTAAATATGAGTTTTAG-----	2585
<i>huvS</i>	AGCCTGGGCGTAAGTGGGGTTTAAATGTAGATTATCAATTCTAA CGTTCTCTCATCAA	2576
	* * * * *	
<i>huvA</i>	-----	2585
<i>huvS</i>	GCGTTCTCTTAACAAAGCCAAGCTCTACGCTTGGCTTTGTTTATCTACATTTCTCATAC	2636
<i>huvA</i>	-CGATTAAACCATTATTCACAAAGCCAGCGTTATGCTGGC- -TTTGTGTTCCATGAACT	2642
<i>huvS</i>	TCGATTAA-CGATC- -CCACGAAGTCACAGATAAATCATTAAGTACGTAACAACGGTAAAT	2696
	* * * * *	
<i>huvA</i>	CCTCAATAAAAAAGGCTAGATAAAGTAGCCTTTTCTTACAATGTCCAATGTATCTTGAGCG	2702
<i>huvS</i>	CACGATCAAAAAAGGCTAGATAAAGTAGCCTTTTCTTCCAATATCCAATGTATCTTGAGCG	2756
	* * * * *	
<i>huvA</i>	ATTAAGATTACGCGTTGGAAATTTTCTTATGCCCTTCATCAAGGTGCACAAAATCAACCA	2762
<i>huvS</i>	ATTAAGATTATGCGTTGGAAATTTTCTTATGCCCTTCATCAAGGTGCACAAAATCAACCA	2816
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TGTCATCACCAGACACTTGATACGCGCTGGCCAAAGCCTTTACATAAAGACCTTTTTTCTA	2822
<i>huvS</i>	TATCATCACCAGACACTTGATACGCGCTGGCCAAAGCCTTTACATAAAGACCTTTTTTCTA	2876
	* * * * *	
<i>huvA</i>	CTTTCAACTGGAATAAAGCAAAGTCTTGACGCTGGCTTAAGCCGTCAATGATCTCGCCAA	2882
<i>huvS</i>	CTTTCAACTGGAATAAAGCAAAGTCTTGACGCTGGCTTAAGCCGTCAATGATCTCGCCAA	2936
	* * * * *	
<i>huvA</i>	AACGAGCTTGCAATTTGGCCAATGACTTGCTGCCATAATGGCGTTTCACGTGGTACAACAC	2942
<i>huvS</i>	AACGAGCTTGCAATTTGACCAATGACTTGCTGCCATAATGCCGTTTCACGTGGTACGACAC	2996
	* * * * *	
<i>huvA</i>	TCGCAACGGCGTCAAACGTCAACCGTTGACGGGCAAAAATCTGTTTTGATGAGCCTTCGT	3002
<i>huvS</i>	TCGCAACGGCGTCAAACGTCAACCGTTGACGGGCAAAAATCTGTTTTGATGAGCCTTCGT	3056
	* * * * *	

Figura IV-54: Alineamiento entre la secuencia de nucleótidos de *huvA* y *huvS* (en color) y secuencias adyacentes 5' y 3'. La secuencia correspondiente a la *Fur-box* y la secuencia terminadora de la transcripción están enmarcadas. La flecha indica el punto de inicio de la ORF.

Con objeto de comprobar si *huvS* estaba presente en otras cepas de *V. anguillarum* se determinó su presencia mediante la amplificación por PCR con los cebadores *huvS3/huvS6-rev* (Anexo II). Los resultados demuestran que *huvS* está presente en las nueve cepas de *V. anguillarum* que resultaron negativas para *huvA* (Fig. IV-55). Por tanto el gen *huvS* está presente en 4 de los 6 aislados pertenecientes al serotipo O3, así como en cepas de los serotipos O2, O4, O8 y O10. Curiosamente las dos cepas del serotipo O3 que fueron negativas para los cuatro genes *huvABCD* también resultaron negativas para *huvS*.

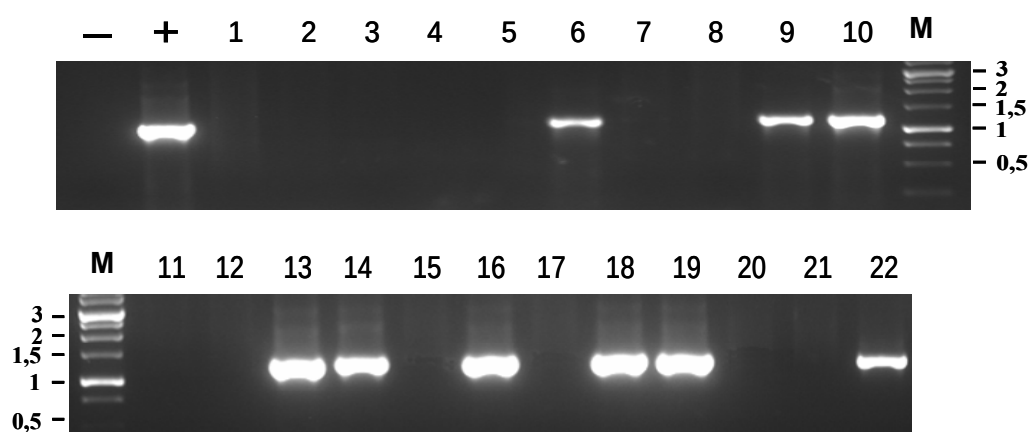


Figura IV-55: Determinación de la presencia del gen *huvS* en *V. anguillarum*, serotipos O1-O10. (1), 775; (2), R-82; (3), TM-14; (4), 96-F; (5), ATCC 14181; (6), ATCC 43306; (7), RV22; (8), 43-F; (9), PT-493; (10), 11008; (11), 13A5; (12), B1.12/4; (13), ET-208; (14), ATCC 43307; (15), ATCC 43380; (16), RPM 41.11; (17), ATCC 43309; (18), ATCC 43310; (19), ATCC 43311; (20), ATCC 43312; (21), ATCC 43313; (22), ATCC 43314. -, control negativo de PCR; +, control positivo de PCR. M, marcador de peso molecular (kb).

4.3.2 HuvS como receptor de membrana externa para el grupo hemo

El análisis de la secuencia de aminoácidos sugiere la posible función de la proteína HuvS como receptor de membrana externa para grupos hemo. Para comprobarlo se utilizó el gen *huvS*, previamente clonado, para la complementación de la cepa *E. coli* 101ESD ($\Delta(entC-entA)$) y la cepa B146 de *V. anguillarum* mutante para el receptor de grupos hemo *huvA*.

En la construcción de los plásmidos de complementación se emplearon los vectores pACYC177 y pMMB208. En el primer caso, el producto de la PCR-Inversa obtenido del DNA digerido con *BssHII* se cortó con el enzima de restricción *ApaLI*, que posee dos dianas en las regiones 5' y 3' adyacentes a la secuencia de *huvS*. El fragmento originado, de extremos cohesivos, se utilizó en una reacción de ligación con el plásmido pACYC177, linealizado a su vez con este mismo enzima. El plásmido resultante se denominó pSML92.

El segundo plásmido utilizado en los ensayos de complementación recibió el nombre de pSML93 y deriva del subclonaje del gen *huvS*, liberado del pSML92 por digestión doble *HindIII* / *PstI*, en el plásmido mobilizable pMMB208.

4.3.2.1 Complementación de la cepa 101ESD ($\Delta(entC-entA)$) de *Escherichia coli*

Previamente a los ensayos de complementación con la cepa *E. coli* 101ESD, ésta se transformó con el plásmido pSML33 (apartado 2.2 de Resultados) que incluye la secuencia completa de los genes *tonB1exbB1exbD1* y *huvBCD*. De este modo la bacteria obtiene todos los genes necesarios para la internalización de la molécula de hemo, aunque carece del receptor de membrana externa, fundamental en la utilización del hemo como fuente de hierro.

Tras su transformación con el plásmido pSML92, la cepa resultante (B220) se ensayó en placas de CM9 suplementado con 2,2'-dipiridil 200 μ M (Material y Métodos) para determinar su capacidad de crecimiento alrededor de discos impregnados en hemina o hemoglobina. Tras 48 horas de incubación a 37 °C, se detectaron halos de crecimiento alrededor de ambas fuentes de hierro (Fig. IV-56). Este resultado, además de confirmar la funcionalidad de la proteína HuvS como receptor de membrana específico para hemo, demuestra que este nuevo receptor de *V. anguillarum* puede sustituir eficazmente a HuvA en el modelo de complementación de *E. coli*.

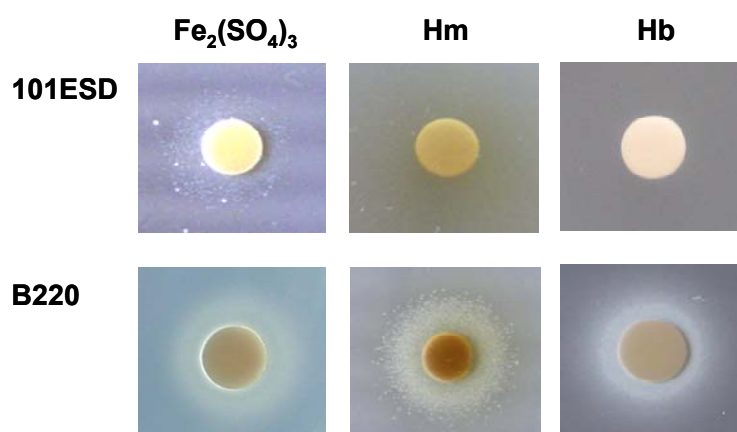


Figura IV-56: Resultado de los ensayos de crecimiento de *E. coli* 101ESD complementada con el gen del receptor de hemo *huvS* caracterizado en *V. anguillarum* (B220) alrededor de discos de hemina 5 mM (Hm) y hemoglobina 0,1 mM (Hb).

4.3.2.2 Complementación del mutante de *V. anguillarum* B146 ($\Delta huvA$)

Para determinar si el nuevo gen *huvS*, caracterizado en la cepa ET208, también era capaz de sustituir funcionalmente a *huvA* en la cepa H775-3 de *V. anguillarum*, el plásmido

pSML93 se introdujo por conjugación en el mutante B146 de *V. anguillarum* para el receptor de membrana externa. En esta cepa la delección del gen *huvA* bloquea el proceso de transporte del grupo hemo desde el exterior hasta el espacio periplásmico, de manera que la bacteria no puede crecer cuando la hemina o la hemoglobina son las únicas fuentes de hierro disponibles (apartado 2.1 de Resultados). La cepa mutante de *V. anguillarum* complementada con el plásmido pSML93 se denominó B230.

Las cepas B146, B230 y la cepa parental H775-3 se inocularon en medio líquido (CM9) con hemina 10 μ M o hemoglobina 1 μ M. Para conseguir que estos compuestos fueran la única fuente de hierro en el medio, éste se suplementó con el quelante de hierro libre EDDA (5 μ M). Bajo estas condiciones se siguió el crecimiento de cada una de las cepas midiendo la densidad óptica del cultivo a intervalos de 2 h (Fig. IV-57).

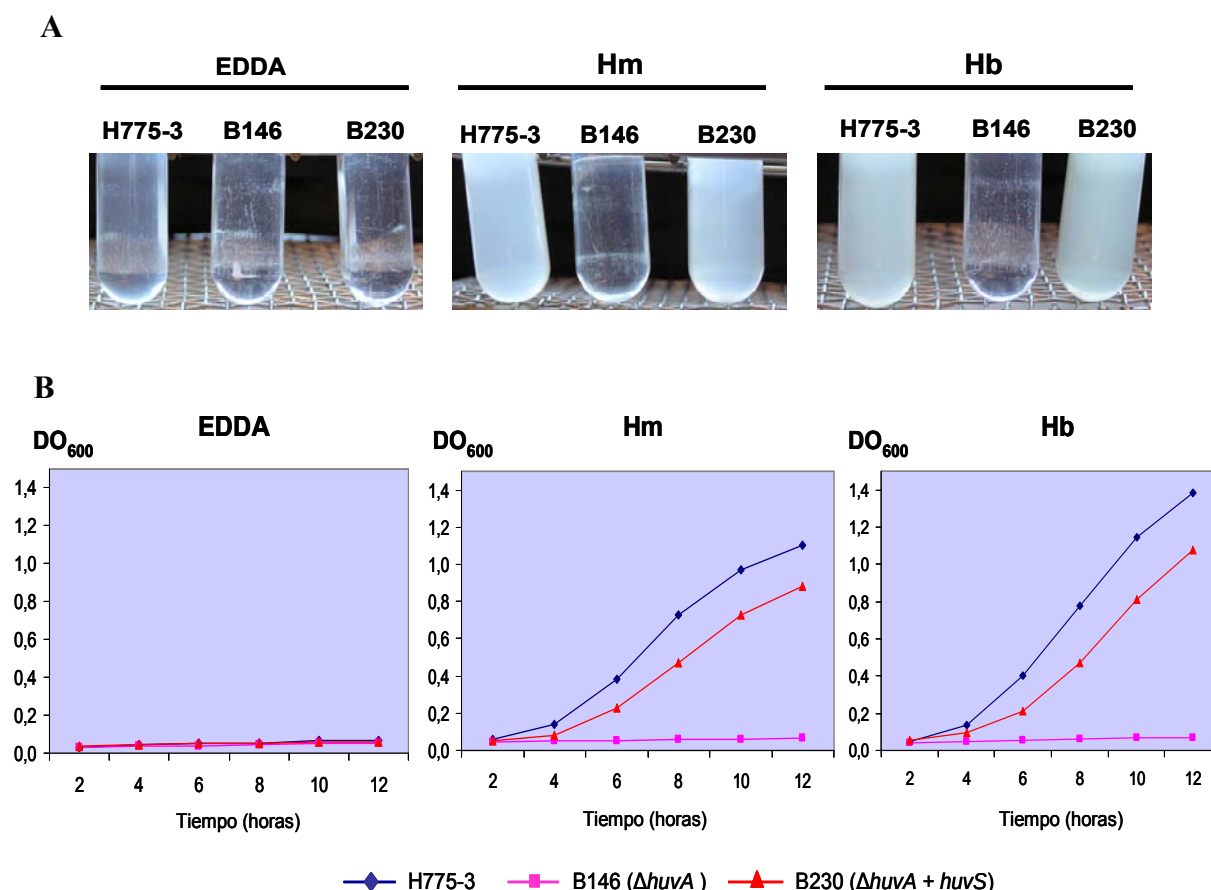


Figura IV-57: Resultado de la complementación del mutante Δ huvA, derivado de la cepa H775-3, con el receptor de membrana externa *huvS* caracterizado en la cepa ET-208 del serotipo O3 de *V. anguillarum*. (A) Comparación entre la capacidad de crecimiento en cultivo líquido de la cepa parental H775-3, el mutante B146 y la cepa B230 (mutante Δ huvA complementado con *huvS*) en presencia del quelante de hierro libre EDDA y en presencia de Hemina (Hm) y Hemoglobina (Hb) como únicas fuentes de hierro. (B) Curva de crecimiento de las cepas H775-3, B146 y B230 en cada una de las condiciones de crecimiento anteriores. Cada punto de la gráfica representa la media de tres experimentos independientes.

Según los resultados obtenidos el gen *huvS* fue capaz de restablecer el fenotipo salvaje del mutante Δ *huvA*, alcanzándose niveles de crecimiento próximos a los de la cepa parental. Por tanto se puede concluir que la complementación del mutante *huvA* de *V. anguillarum* con *huvS* confirma la función propuesta para HuvS como receptor de membrana externa para la captación de hemo y que es funcionalmente intercambiable con HuvA.

5. EL SISTEMA DE CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE HEMO EN EL DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO DE *V. anguillarum*

La heterogeneidad de la especie de *V. anguillarum* se pone de manifiesto con la existencia de 23 serogrupos diferentes, aunque sólo unos cuantos incluyen cepas virulentas (Pazos *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1995). Actualmente el diagnóstico de la vibriosis se basa, principalmente, en el estudio de las características fenotípicas de la bacteria aislada seguida por su confirmación serológica. Sin embargo también se han desarrollado diversos métodos moleculares dirigidos al diagnóstico e identificación rápida de *V. anguillarum* (González *et al.*, 2003; Martínez-Picado *et al.*, 1996). Existen, además, diversos sistemas comerciales diseñados para la detección de bacterias marinas, incluido *V. anguillarum*, y cuya eficacia en la detección de este patógeno a partir de muestras de tejidos ha sido ampliamente evaluada (González *et al.*, 2004).

Dentro de los métodos moleculares no comerciales, la amplificación por PCR es quizás la metodología que ha dado mejores resultados en la detección de *V. anguillarum*. Sin embargo uno de los principales problemas encontrados durante el desarrollo de estos protocolos de diagnóstico han sido los falsos positivos derivados de la amplificación inespecífica de especies próximas a este microorganismo, especialmente *V. ordalii*. Por esta razón sería de gran interés encontrar genes o secuencias exclusivas de la especie y que, además, estén representadas en todos sus serogrupos. Hasta el momento el único gen descrito que cumple estas condiciones es el gen *rpoN* que codifica el factor σ^{54} . Se trata de un gen presente en todos los aislados de *V. anguillarum* y con regiones de gran variabilidad respecto a genes homólogos identificados en otras especies del género *Vibrio* (González *et al.*, 2003).

En el presente trabajo nos planteamos probar la utilidad de los genes caracterizados como parte del sistema de transporte de hemo como posibles sistemas de identificación de *V. anguillarum*. Los alineamientos entre diversas especies del género *Vibrio* mostraron zonas de variabilidad entre la secuencia de los genes del operón TonB1 caracterizado en este trabajo y sus correspondientes homólogos identificados en otras especies bacterianas (Fig. IV-7, Fig. IV-8; apartado 1.1 de Resultados). Por esta razón, y debido a la confirmación de que dicho operón está presente en todas las cepas de *V. anguillarum* según los resultados descritos en el apartado anterior, se eligieron estos genes como base para el diseño de un protocolo de PCR dirigido a la identificación de *V. anguillarum*. Las especies bacterianas utilizadas en el presente estudio se muestran en la Tabla IV-13:

Tabla IV-13: Especies bacterianas utilizadas para el diseño de un protocolo de identificación por PCR.

ESPECIE	CEPA	ORIGEN
<i>Vibrio anguillarum</i>	775	<i>Onchorhynchus kisutch</i> ; USA
<i>Vibrio splendidus</i>	ATCC ^a 33125	Ambiental
<i>Vibrio ordalii</i>	NCMB ^b 2107	<i>Onchorhynchus kisutch</i> ; USA
<i>Vibrio natriegens</i>	ATCC 14084	Ambiental; USA
<i>Vibrio aestuarianus</i>	ATCC 35048	Ostra; USA
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC 33812	Ambiental
<i>Vibrio nereis</i>	ATCC 25917	Ambiental, USA
<i>Vibrio proteolyticus</i>	ATCC 15338	<i>Limnoria tripunctata</i>
<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920	Ambiental
<i>Vibrio pelagius</i> (<i>Listonella pelagia</i>)	NCBM 1900	Ambiental; USA
<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126	<i>Talorchestia</i> sp.; USA
<i>Vibrio metschnikovi</i>	ATCC 11170	Desconocido
<i>Vibrio fischeri</i>	ATCC 7744	Desconocido
<i>Vibrio vulnificus</i>	E-11	<i>Anguilla anguilla</i> ; España
<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25521	<i>Leiognathus equula</i> ; Tailandia
<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>damsela</i>	AZ 247.1	<i>Scophthalmus maximus</i> ; España
<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i>	DI-21	<i>Sparus aurata</i> ; España
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ACR 168-1	<i>Scophthalmus maximus</i> ; España
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	PC961-1	<i>Scophthalmus maximus</i> ; España

^a Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va. Estados Unidos^b Colección Nacional de Bacterias Marinas e Industriales, Aberdeen, Escocia, Reino Unido

Para tratar de conseguir un protocolo de PCR específico para la amplificación de la especie *V. anguillarum* se probaron distintas condiciones de concentración de $MgCl_2$ y temperatura de hibridación. Salvo estas dos variantes, el programa base de PCR fue el mismo que el empleado en el apartado 4.2 del presente capítulo de Resultados para la detección del sistema TonB1 en distintas cepas de *V. anguillarum* (Fig. IV-51A).

En la selección de la región más adecuada a amplificar, inicialmente se probaron cebadores que amplificaran independientemente los genes *tonB1* (cebadores TonB1.1/TonB1.2), *exbB1* (cebadores ExbB1.1/ExbB1.2) y *exbD1* (cebadores ExbD1.1/ExbD1) (Anexo II), tomando como molde alguna de las especies bacterianas mencionadas anteriormente (Tabla IV-13). De estas tres regiones amplificadas (Fig. IV-58) la

correspondiente al gen *exbD1* fue la que mostró una mayor especificidad bajo las condiciones ensayadas.

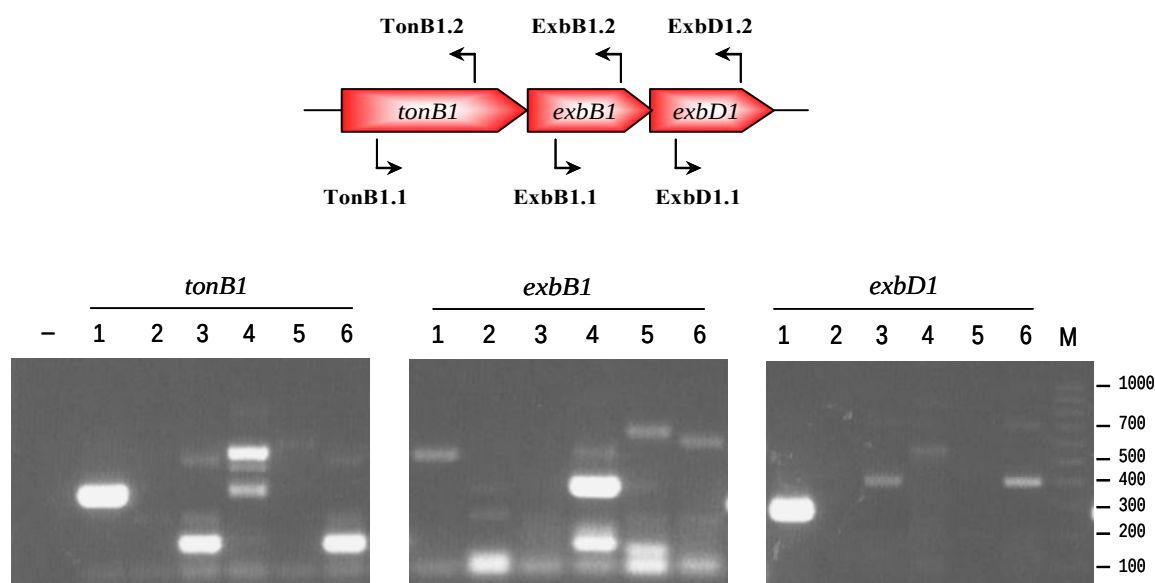


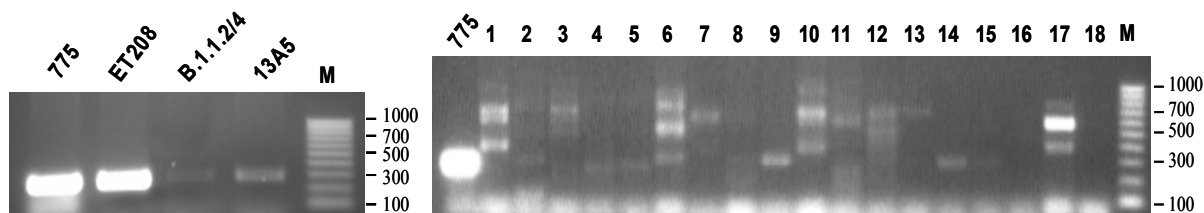
Figura IV-58: Esquema y resultado de la amplificación por PCR de los genes *tonB1* (cebadores TonB1/TonB2), *exbB1* (cebadores ExbB1/ExbB2) y *exbD1* (cebadores ExbD1/ExbD2) utilizando como molde el DNA genómico extraído de distintas especies bacterianas: Línea: (1) *V. anguillarum* (775), (2) *A. salmonicida* (3) *V. splendidus*; (4) *V. proteolyticus*; (5) *P. leiognathi* (6) *V. pelagius*. Las condiciones de concentración de $MgCl_2$ y temperatura de hibridación empleadas fueron 2 mM y 60 °C, respectivamente. –, control negativo de PCR; M, marcador de peso molecular (pb).

Para validar la especificidad de los cebadores ExbD1 y ExbD2, se diseñaron reacciones de amplificación a partir de 22 cultivos puros de *V. anguillarum* pertenecientes a diferentes serotipos (Tabla IV-11) así como otras 18 muestras correspondientes a diferentes especies bacterianas (Tabla IV-13). Se probaron distintas condiciones de PCR variando tanto la concentración de $MgCl_2$ (desde 4 hasta 1 mM) como la temperatura de hibridación (entre 65 y 69 °C).

Según los resultados obtenidos (Fig. IV-59) en condiciones de elevadas concentraciones de $MgCl_2$ (4 y 2 mM) las cepas de *V. anguillarum* analizadas dieron lugar a una única banda de amplificación de tamaño igual al esperado (276 pb). En las cepas 13A5 y B1.1.2/4, aunque se obtuvo amplificación del tamaño esperado, la banda no fue tan clara como en las muestras de los demás aislados (Fig. IV-59A). Bajo estas mismas condiciones también se obtuvieron fragmentos de PCR de tamaño similar al esperado en varios de los vibrios analizados, así como en las dos cepas de *Photobacterium damsela* (Fig. IV-59A, 59B). Por debajo de estas concentraciones tampoco se pudo obtener una detección específica

de la especie *V. anguillarum*, ya que continuaron apareciendo tenues bandas de amplificación en las dos muestras de *Photobacterium*. En estas condiciones, tampoco fue posible detectar el gen *exbD1* en las cepas 13A5 y B1.1.2/4 de *V. anguillarum* (Fig. IV-59C, 59D).

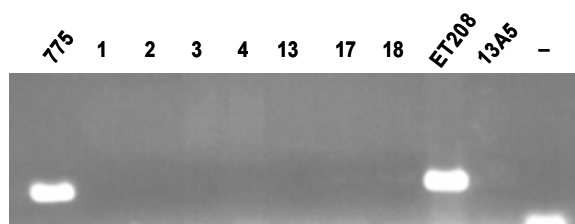
A



B



C



D

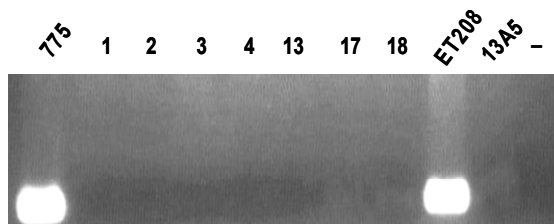


Figura IV-59: Resultado del análisis electroforético de las reacciones de PCR con los cebadores ExbD1/ExbD2 para establecer las condiciones óptimas de amplificación en la detección específica de *V. anguillarum*. (A) MgCl_2 4 mM + 69 °C de Temperatura de Hibridación. (B) MgCl_2 2 mM + 65 °C de Temperatura de Hibridación. (C) MgCl_2 1,5 mM + 68 °C de Temperatura de Hibridación. (D) MgCl_2 1 mM + 68 °C de Temperatura de Hibridación; Líneas: (1) *V. splendidus*; (2) *V. natriegens*; (3) *V. proteolyticus* (4) *V. pelagius*; (5) *V. fischeri*; (6) *V. nereis*; (7) *V. fluvialis*; (8) *V. aestuarianus*; (9) *V. harveyi*; (10) *V. metschnikovi*; (11) *V. ordalii*; (12) *V. campbellii*; (13) *A. salmonicida*; (14) *T. maritimum*; (15) *V. vulnificus*; (16) *P. leiognathi*; (17) *P. damsela* subsp *damsela*; (18) *P. damsela* subsp *piscicida*. Las cepas de *V. anguillarum* 775, ET208, 13A5 y B1.1.2/4 se utilizaron como controles positivos en las reacciones de amplificación. –, control negativo de PCR; M, marcador de peso molecular (pb).

Previamente en el apartado 4.2, la detección del sistema TonB1 en diferentes cepas de *V. anguillarum* se llevó a cabo mediante PCR con los cebadores HuvB.A y RVexbD1. Las cepas 13A5 y B1.1.2/4 también habían sido analizadas por este método, dando lugar a una banda de PCR igual de intensa que en las demás cepas analizadas (Fig. IV-51A). Por esta razón se hizo una nueva selección de los cebadores y la región a amplificar, escogiendo la

secuencia *exbB1-exbD1* delimitada por los cebadores mencionados anteriormente. Para tratar de validar esta nueva pareja de cebadores, inicialmente se diseñó una PCR con gradiente de temperaturas de hibridación desde 55 hasta 65 °C. La concentración de $MgCl_2$ utilizada fue 2 mM. Frente a la muestra de *V. anguillarum* (cepa 775) también se probaron las especies *V. fluvialis* (ATCC 33812) y *V. vulnificus* (A11). Según el resultado de la electroforesis (Fig. IV-60A) la temperatura de 65 °C parece ser óptima para la amplificación específica de *V. anguillarum*. Para su confirmación se repitieron estas mismas condiciones con todas las muestras anteriores, tanto de *V. anguillarum* como de las demás especies bacterianas (Fig. IV-60B, 60C).

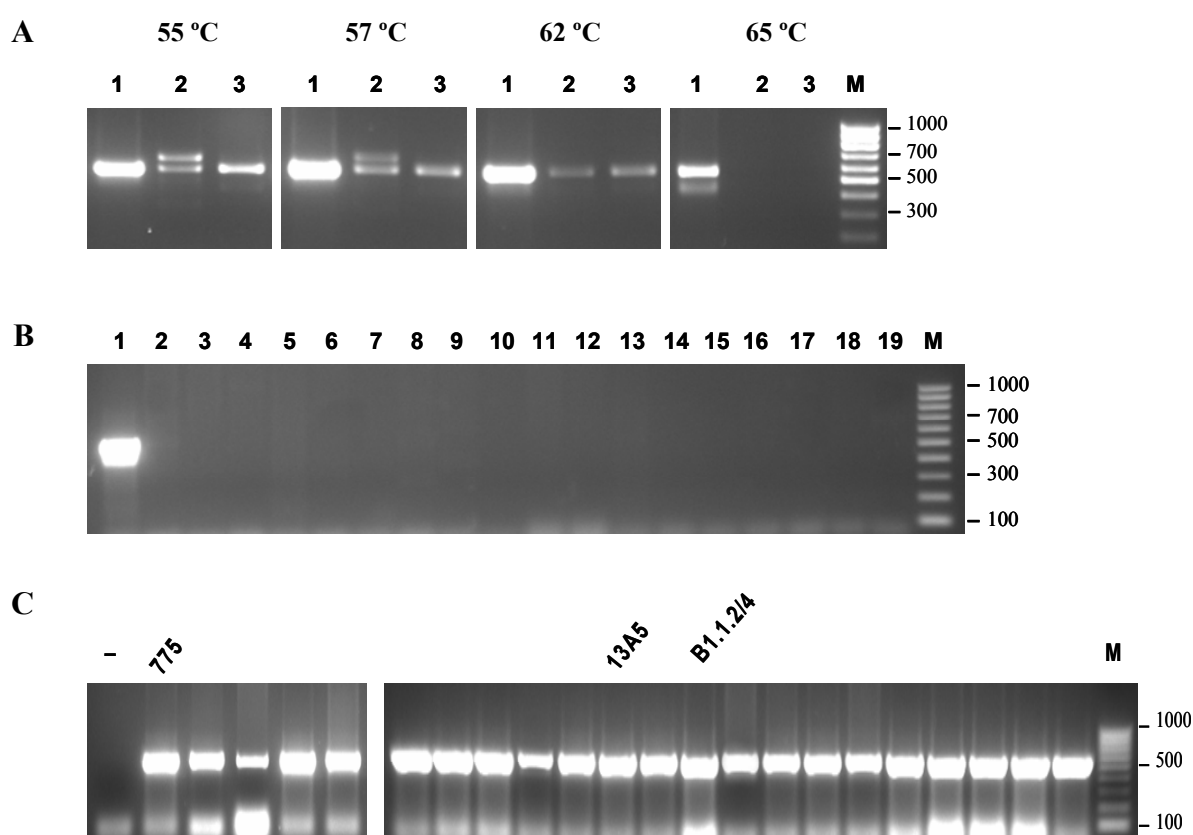


Figura IV-60: Resultado del análisis electroforético de las reacciones de PCR con los cebadores HuvB.A/RVexbD1 para establecer las condiciones óptimas de amplificación en la detección específica de *V. anguillarum*. (A) Amplificación de la región *exbB1-exbD1* bajo distintas temperaturas de hibridación. (B) Comprobación de la especificidad de la amplificación a 65°C y Cl_2Mg 2 mM con muestras obtenidas de distintas especies bacterianas. Líneas: (1) *V. anguillarum*; (2) *V. fluvialis*; (3) *V. vulnificus*; (4) *V. natriegens*; (5) *V. campbellii*; (6) *V. fischeri*; (7) *V. nereis*; (8) *V. splendidus*; (9) *V. aestuarianus*; (10) *V. harveyi*; (11) *V. metschnikovi*; (12) *V. proteolyticus*; (13) *V. pelagius*; (14) *V. ordalii*; (15) *A. salmonicida*; (16) *T. maritimum*; (17) *P. leiognathi*; (18) *P. damsela* subsp *damsela*; (19) *P. damsela* subsp *piscicida*. (C) Comprobación de la especificidad de la amplificación a 65°C y Cl_2Mg 2 mM con diversas cepas de *V. anguillarum*, incluidos los aislados 13A5 y B1.1.2/4. -, control negativo de PCR; M, marcador de peso molecular (pb).

Con estos cebadores y bajo estas condiciones se obtuvo una amplificación clara en todas las cepas ensayadas de *V. anguillarum*, incluidas las cepas 13A5 y B1.1.2/4, mientras que en ningún caso se obtuvieron productos de amplificación con ninguna de las demás especies bacterianas analizadas.

Para determinar la sensibilidad de la pareja de cebadores HuvB.A/RVexbD1 se sometió a amplificación el DNA extraído a partir de diferentes suspensiones bacterianas de la cepa 775 de *V. anguillarum* (de 5×10^1 a 5×10^8 células/ml). Simultáneamente, para determinar la eficacia de estos cebadores en la amplificación específica de *V. anguillarum* a partir de cultivos mixtos, estas diluciones se mezclaron con suspensiones de las especies *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* (DI-21), *A. salmonicida* (ACR 168-1), *V. vulnificus* (A11) y *V. ordalii* (NCBM 2107). En ambos casos, tanto en el cultivo puro como en el mixto, el límite de detección fue el mismo, en torno a 2×10^3 células/ml (Fig. IV-61), lo cual es considerado un límite excesivo si se compara con la detección de 1 a 10 células establecida para el gen *rpoN*. Pese a todo, teniendo en cuenta las concentraciones tan altas utilizadas (10^7 células/ml), parece claro que las demás especies bacterianas no interfieren en la sensibilidad de la PCR.

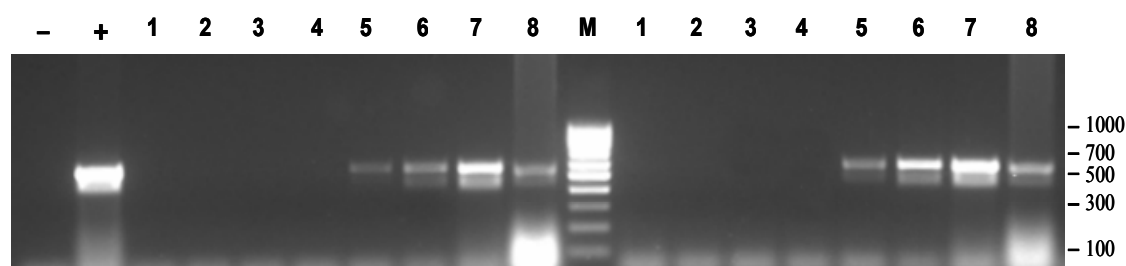


Figura IV-61: Límite de detección para la pareja de cebadores HuvB.A/RVexbD1 y las condiciones de PCR establecidas anteriormente utilizando diluciones del DNA extraído a partir de un cultivo puro de *V. anguillarum* (775) y un cultivo mixto de *V. anguillarum* junto a las especies *V. vulnificus*, *V. ordalii*, *A. salmonicida* y *P. damsela* subsp *piscicida*. Líneas de la 1 a la 8: 2×10^1 , 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 , 2×10^8 células/ml. +, control positivo de PCR; -, control negativo de PCR; M, marcador de peso molecular (pb).

Finalmente, para intentar reducir el límite de detección, se diseñó una nueva PCR basada en una ronda inicial de amplificación con los cebadores ExbB1/ExbD2. Esta amplificación, en condiciones menos restrictivas que las anteriores, genera un fragmento de un tamaño esperado de 968 pb y que incluye la región HuvB.A/RVexbD1. Es de esperar que el enriquecimiento de la muestra con este fragmento favorezca la amplificación, en una segunda ronda de PCR, del fragmento de 555 pb delimitado por los cebadores

HuvB.A/RVexbD1. Sin embargo el análisis electroforético del producto de esta segunda reacción no reveló un único producto de amplificación (Fig. IV-62).

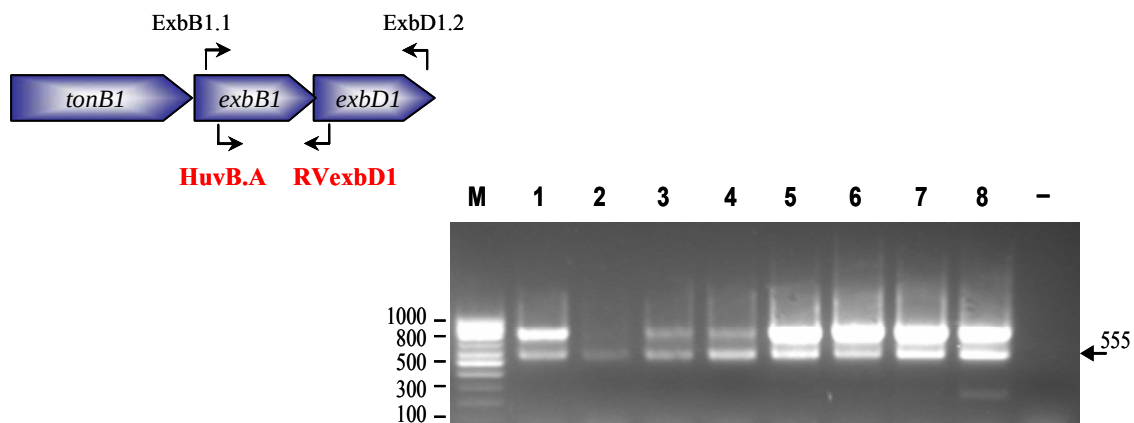


Figura IV-62: Resultado electroforético de PCR con los cebadores HuvB.A/RVexbD1 utilizando como molde el producto de amplificación obtenido de una PCR previa con los cebadores Exb1.1/ExbD1.2. Las muestras iniciales fueron diluciones del DNA extraído a partir de un cultivo puro de *V. anguillarum* 775. Líneas de la 1 a la 8: 2×10^1 , 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 , 2×10^8 células/ml. —, control negativo de PCR; M, marcador de peso molecular (pb).

Aunque los resultados obtenidos no parecen apoyar la idea de la utilización del sistema TonB1 como método de detección, es posible que un mayor ajuste de las condiciones de amplificación, tanto en la PCR única como utilizando una *Nested* PCR, permita en un futuro próximo desarrollar un protocolo adecuado para el diagnóstico rápido de *V. anguillarum* basado en la detección de genes relacionados con el transporte de hemo.

V. DISCUSIÓN

1. Caracterización del sistema de captación y transporte de hemo de *V. anguillarum*

La capacidad de utilizar el grupo hemo es una característica de muchas bacterias patógenas y ya que esta molécula es quizás la fuente más abundante de hierro dentro del organismo hospedador, no es raro que estos microorganismos hayan desarrollado mecanismos específicos para su captación, transporte y utilización.

La molécula de hemo, además de ser hidrofóbica, a pH fisiológico tiende a agregarse, lo cual, sumado a limitaciones de tamaño, hace que sea improbable su paso a través de la envuelta celular mediante canales formados por porinas. Por tanto, el proceso de adquisición implica la participación de diversas proteínas dirigidas a facilitar su transporte específico desde el medio externo hasta el citoplasma celular. En general todos estos sistemas de captación y transporte de hemo deben cumplir las siguientes características: la presencia constitutiva, o el incremento de su síntesis ante condiciones de falta de hemo, de un componente de membrana externa que establezca una interacción específica con dicha molécula; el transporte del grupo hemo a través de la pared celular; la presencia de una proteína de unión periplásmica que guíe al hemo, una vez se haya liberado del receptor de superficie, hasta el citoplasma; la existencia de componentes de transducción de energía; y mecanismos que regulen la expresión de todo el proceso de transporte (Lee, 1995).

Vibrio anguillarum ya había sido descrito previamente como un organismo capaz de utilizar hemina y diversas hemoproteínas como fuentes de hierro (Mazoy y Lemos, 1991; Mazoy y Lemos, 1996). Asimismo, los estudios llevados a cabo sobre un mutante del gen *huvA*, que codifica el receptor específico de membrana externa, apoyan la idea de la importancia de esta molécula en la virulencia de *V. anguillarum* (Mazoy *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta el momento apenas se conocía nada acerca del mecanismo molecular que dirige el transporte de hemo hasta el interior celular. En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización del sistema génico completo implicado en dicho proceso de internalización.

Los nueve genes descritos y caracterizados en este trabajo (*huvA*, *huvZ*, *huvX*, *tonB1*, *exbB1*, *exbD1*, *huvB*, *huvC* y *huvD*) se asocian en un único *cluster* y presentan grandes similitudes, tanto en su secuencia como en su organización genética, con sistemas de asimilación de hemo descritos en otras especies bacterianas, como *Plesiomonas shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001), *Photobacterium damsela* (Juiz-Río *et al.*, 2005) o diferentes

especies pertenecientes al género *Vibrio* (Chen *et al.*, 2003; Makino *et al.*, 2003; Occhino *et al.*, 1998).

Al comparar la organización genética de estos sistemas, *V. anguillarum* se caracteriza por la asociación entre el gen codificante para el receptor de membrana externa y el resto de los genes implicados en el transporte de la molécula. La posición de *huvA*, adyacente a *huvZ*, da lugar a una organización espacial inusual en otras especies de la familia *Vibrionaceae* en las que el receptor de membrana externa está separado del resto de los genes transportadores por cientos de kilobases (Chen *et al.*, 2003; Heidelberg *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2003). Además, el *cluster* génico descrito de *V. anguillarum* se diferencia de otros sistemas en la ausencia de un gen codificante para la coproporfirinógeno oxidasa asociado a los genes *huvXZ* y de un activador transcripcional, homólogo a miembros de la familia LysR, localizado adyacente al receptor de membrana externa.

Aunque las funciones asignadas a cada una de las proteínas codificadas por los genes descritos en *V. anguillarum* derivan del análisis de la secuencia y de la similitud con proteínas homólogas caracterizadas en otras especies bacterianas, para confirmar su implicación en el proceso de captación y transporte de hemo cada uno de ellos fue deleccionado, analizando posteriormente el efecto de dicha mutación sobre la capacidad de utilización de compuestos de hemo como fuentes de hierro.

1.1 Receptor de membrana externa HuvA

En general, en el organismo hospedador el hemo se encuentra unido a la hemoglobina, hemopexina, albúmina y lipoproteínas, siendo la hemoglobina la principal fuente de hemo circulante. Hasta el momento se han aislado y caracterizado diversas proteínas cuya función es la de unir la molécula de hemo, en sus diferentes formas, a la superficie bacteriana. Se trata de proteínas ancladas a la cara externa de la membrana de manera que su dominio de unión permanece accesible para facilitar la interacción con una molécula específica. Los principales métodos empleados para la identificación de estas proteínas son técnicas bioquímicas como la unión de ligandos y la cromatografía de afinidad. Sin embargo, desde el punto de vista genético, sólo se han caracterizado algunos de estos receptores.

Hasta el momento se sabe que existe una gran variedad de receptores de hemo en cuanto a su capacidad de unión a diferentes hemoproteínas. Así, se han descrito desde receptores que interactúan con un gran número de ligandos hasta aquellos que están

restringidos a unos pocos o incluso a uno solo. En el primer caso la mayoría de estos receptores de membrana externa reconocen específicamente el complejo formado por el hierro dentro del anillo tetrapirrólico, mientras que las interacciones proteína-ligando no se extienden al esqueleto proteico que rodea al grupo hemo. De este modo son capaces de unir y utilizar el hemo independientemente del tipo de hemoproteína a la que esté asociado. Este grupo es muy amplio e incluye receptores caracterizados en *Y. enterocolitica* (Bracken *et al.*, 1999), *C. diphtheriae* (Drazek *et al.*, 2000), *P. aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 2000), *S. marcescens* (Létoffé *et al.*, 2001), *Porphyromonas gingivalis* (Simpson *et al.*, 2000) o *V. cholerae* (Mey y Payne, 2001).

La cromatografía de afinidad permitió a Mazoy *et al.* (1996) detectar en diferentes cepas de *V. anguillarum* la existencia de proteínas de superficie que unían específicamente hemina o hemoglobina. Estos mismos autores observaron que la supresión del receptor HuvA, bloqueaba la utilización del hierro del grupo hemo pero no impedía la unión de ambos compuestos a la superficie de la célula (Mazoy *et al.*, 2003). Este efecto, detectado también en otras especies bacterianas como *V. vulnificus* (Miyoshi *et al.*, 1997), sugiere que la capacidad de unión al grupo hemo por parte de una proteína de membrana externa no implica necesariamente que ésta sea también responsable de su transporte desde el exterior hasta el interior celular. Posiblemente estas moléculas se localicen adyacentes a los receptores de membrana externa y su función sea facilitar la interacción entre el grupo hemo, o diversas hemoproteínas, y sus correspondientes receptores específicos. En especies como *N. meningitidis* (Stojiljkovic *et al.*, 1996), *N. gonorrhoeae* (Chen *et al.*, 1998) o *H. influenzae* (Cope *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 1999) se han caracterizado receptores de alta afinidad restringidos al uso de la hemoglobina y/o el complejo haptoglobina-hemoglobina como fuentes de hierro. Aunque se conoce poco acerca de la relación estructura-función en este tipo de receptores, se pueden establecer tres tipos de fases en la captación y transporte exclusivo de la hemoglobina: unión de la hemoglobina a través de un dominio específico expuesto hacia la superficie celular; la liberación de la molécula de hemo del esqueleto proteico; y, finalmente, el transporte del hemo a través del canal del receptor hasta el espacio periplásmico.

La especificidad en el reconocimiento y transporte de hemina y/o hemoglobina por parte de la proteína HuvA caracterizada en *V. anguillarum*, se determinó a partir de un mutante $\Delta huvA$ y el análisis de su capacidad de crecimiento aportando estas moléculas como únicas fuentes de hierro. Aunque normalmente la bacteria cuenta con un único sistema génico

asociado a la captación y transporte de hemo, en algunos casos, como *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 2000) o *V. cholerae* (Mey y Payne, 2001), se ha descrito la coexistencia de más de un receptor de membrana externa capaz de participar en la utilización de hemo como fuente de hierro. Los resultados obtenidos en el presente trabajo establecen que el receptor de membrana externa, HuvA, de *V. anguillarum*, además de ser el único implicado en la utilización de hemo como fuente de hierro, participa en su captación a partir de distintos compuestos, como la hemina o la hemoglobina. Aunque no se sabe exactamente cómo el receptor es capaz de interaccionar con el grupo hemo unido a diferentes proteínas, es posible que este reconocimiento dependa de las regiones del anillo porfirínico expuestas en la superficie de la molécula (Stojiljkovic y Perkins-Balding, 2002).

Los resultados expuestos también muestran un descenso en los niveles máximos de crecimiento de *V. anguillarum* cuando la hemoglobina es utilizada como única fuente de hierro. Esta diferencia entre el crecimiento en presencia de hemina o hemoglobina probablemente sea debido a la necesidad de liberar el grupo hemo de la hemoglobina previamente a su entrada a través del receptor HuvA. De hecho, para tener acceso a los reservorios de hemo, las bacterias patógenas pueden secretar hemolisinas (Fukui *et al.*, 2005), proteasas (Banerji *et al.*, 2005) o citotoxinas (Pelacic *et al.*, 1999). La producción de proteasas y hemolisinas por parte de *V. anguillarum* (Denkin y Nelson, 1999; Farrell y Crosa, 1991; Toranzo *et al.*, 1983b) podría estar implicada en la separación del grupo hemo del esqueleto proteico de la hemoglobina al que está asociado, proceso que podría constituir un paso limitante en la utilización de esta hemoproteína como fuente de hierro o porfirinas.

Por otra parte, los estudios de complementación realizados en cepas de *Escherichia coli* ayudaron a confirmar la codificación de la función de captación específica del grupo hemo para este gen *huvA*. Los ensayos llevados a cabo en la cepa EB53 mostraron que la proteína HuvA es suficiente para facilitar la utilización de los compuestos de hemo como fuente de porfirinas y que la molécula de hemo es transportada de forma intacta desde el exterior hasta el periplasma bacteriano, en dónde puede ser directamente incorporada a las distintas hemoproteínas que lo precisen. Un estudio similar con el gen *hugA* de *P. shigelloides*, que codifica el correspondiente receptor de hemo, estableció que este gen no es suficiente para permitir la complementación del mutante *hemA entB* de *E. coli* DHE-1 (Henderson *et al.*, 2001). En este caso, el hemo sólo pudo ser utilizado como fuente de porfirinas cuando, en el mismo experimento, también se incluía en *trans* el sistema de transducción de energía *tonB1-exbB1-exbD1*. Es posible que las proteínas TonB y ExbBD de

E. coli no sean capaces de sustituir a los homólogos de *P. shigelloides* para su adecuada interacción con el receptor de hemo HugA, probablemente por fallo en el reconocimiento de la *TonB-box* del receptor por parte de la proteína TonB. Sin embargo, en el caso de *V. anguillarum* el sistema TonB de *E. coli* sí puede sustituir de manera eficaz a sus homólogos TonB1-ExbB1-ExbD1.

1.2 Proteína periplásmica (HuvB) y sistema de transporte ABC (HuvC y HuvD)

Siguiendo con el análisis funcional de los genes que forman el sistema de captación y transporte de hemo en *V. anguillarum*, también se deleccionaron los genes *huvB*, *huvC* y *huvD*, posiblemente relacionados con el proceso de transporte de la molécula de hemo desde el periplasma hasta el citoplasma bacteriano. La inactivación de cualquiera de ellos conlleva una drástica reducción en los niveles de crecimiento de la bacteria en presencia de hemina como única fuente de hierro y confirma su importancia en el proceso de utilización de esta molécula. Este resultado contrasta con los resultados obtenidos en mutantes *hutB*, *hutC* o *hutD* de *V. cholerae*, los cuales mantienen la capacidad de crecimiento cuando la hemina se usa como única fuente de hierro (Occhino *et al.*, 1998). Es posible que *V. cholerae* posea otras proteínas transportadoras capaces de sustituir el papel fisiológico de HutB, HutC, o HutD, mientras que en *V. anguillarum* cada uno de estos genes es único y esencial para la captación y transporte de hemo.

Por otro lado, al estudiar los genes necesarios para permitir el uso de los compuestos de hemo como fuente de hierro en la cepa 101ESD de *E. coli*, se determinó que los genes *tonB1exbB1D1-huvBCD* junto con *huvA* son esenciales para la utilización del hemo por esta cepa de *E. coli*. De manera similar Occhino *et al.* (1998) establecieron que la utilización de hemina como fuente de hierro podía ser reconstituida en la cepa 1017 de *E. coli* (mutante *entF* derivado de la cepa HB101) con los genes *hutA*, *tonB1exbB1D1* y *hutBCD* de *V. cholerae*. Puesto que la complementación de la cepa *E. coli* EB53 no depende de la presencia del sistema TonB de *V. anguillarum* aportado en *trans*, se puede concluir que de todos los genes incluidos en el *cluster* génico caracterizado en *V. anguillarum*, tan sólo *huvA* y los genes *huvBCD* son cruciales para la complementación de la cepa 101ESD. Los resultados obtenidos en los ensayos de RT-PCR confirman la existencia de una única unidad transcripcional que incluye los genes *tonB1exbB1exbD1-huvBCD* con su promotor localizado “corriente arriba” del gen *tonB1*, lo que explicaría la necesidad de la presencia de los 6 genes en un único fragmento de DNA.

Los resultados obtenidos en estos ensayos de complementación muestran, por tanto, que la utilización de hemo como fuente de porfirinas en *E. coli* EB53 no depende de la presencia de los genes *huvBCD*, mientras que en la cepa 101ESD estos tres genes resultan fundamentales en la utilización del grupo hemo como fuente de hierro. Dicha observación es similar a la descrita previamente por Stojiljkovic y Hantke (1992) durante los ensayos de complementación de mutantes de *E. coli* (*hemA aroB*) con el receptor específico para el grupo hemo HemR de *Y. enterocolitica*. Según estos autores la utilización de compuestos de hemo como fuente de porfirinas requiere solamente de la participación del receptor específico de membrana externa, mientras que la posibilidad de utilizar estos mismos compuestos como fuentes de hierro implica la participación de un número mayor de genes. Cabe la posibilidad de que la hemina, una vez en el periplasma, sea incorporada directamente a los citocromos localizados en la membrana citoplasmática (Haddock, 1973), de manera que el proceso de transporte finalizaría una vez atravesada la membrana externa bacteriana. Sin embargo, la utilización del hierro de estos compuestos sólo sería posible siempre y cuando la molécula fuera transportada desde el espacio periplásmico hasta el citoplasma, donde se esperaría que proteínas adicionales estuvieran implicadas en la degradación del hemo para así liberar el átomo de hierro. Asimismo Stojiljkovic y Hantke (1992) también proponen que la diferencia entre la utilización del hemo como porfirina y como fuente de hierro es meramente cuantitativa, siendo mucho mayor la cantidad de hemo necesaria para satisfacer las necesidades celulares de hierro que la cantidad necesaria como fuente de porfirinas. Según esto, la cepa *E. coli* EB53 complementada con el receptor de membrana externa HuvA de *V. anguillarum* podría transportar pequeñas cantidades de hemo, utilizado como fuente de porfirinas, hacia el citoplasma bacteriano a través de una vía no específica de transportadores ABC. Sin embargo estas cantidades no serían suficientes para cubrir las necesidades celulares de hierro y, en este caso, resultaría fundamental la presencia adicional de un sistema transportador ABC específico para el grupo hemo (HuvBCD). Tampoco se puede descartar la posibilidad de que esta diferencia radique en la propia cepa bacteriana a complementar, de manera que la cepa EB53 posea un transportador de membrana interna no presente en la cepa 101ESD de *E. coli*.

1.3 Proteínas HuvX y HuvZ

Dos de los genes descritos dentro del *cluster* génico, *huvZ* y *huvX*, carecen de una función conocida, aunque son homólogos a genes asociados a sistemas similares de *V.*

cholerae, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *P. shigelloides*. Tras la mutación de ambos genes las cepas resultantes se sometieron a análisis para determinar su capacidad de crecimiento en presencia de hemo como única fuente de hierro disponible. Los resultados obtenidos demuestran que la supresión de la actividad de HuvX no impide la captación y utilización de hemo, de modo que los niveles de crecimiento del mutante se mantienen muy similares a los de la cepa parental. Por tanto cabe pensar que o *huvX* no está directamente implicado en el uso de hemo como fuente de hierro o su función no es esencial en dicho proceso. También es posible que *V. anguillarum* posea genes adicionales capaces de sustituir funcionalmente a *huvX* o incluso que las condiciones ensayadas no sean las adecuadas para detectar el efecto de la mutación de este gen sobre la utilización del hemo.

Por el contrario, al analizar el efecto de la mutación del gen *huvZ* se observa una drástica reducción en la capacidad de *V. anguillarum* de crecer con hemo como única fuente de hierro, indicando que este gen es, de algún modo, esencial para la utilización del átomo de hierro asociado al anillo porfirínico. Respecto a su posible función, existen algunas hipótesis derivadas del estudio de genes homólogos caracterizados en *V. cholerae* y *P. shigelloides*, aunque ninguna de ellas está completamente demostrada (Henderson *et al.*, 2001; Wyckoff *et al.*, 2004). Pese a que la secuencia de aminoácidos no revela ninguna región característica o conservada, su función podría estar relacionada con los últimos pasos de la ruta de utilización de hemo.

Una vez transportado hasta el interior celular, el hemo puede ser incorporado directamente a proteínas, degradado para la liberación del hierro o bien ser almacenado para futuros usos. Aunque en algunos casos se ha puesto de manifiesto la posible incorporación del hemo a citocromos u otras hemoproteínas, hasta el momento no se ha podido demostrar ni su almacenaje ni su degradación (Wyckoff *et al.*, 2004). Igualmente también quedaría por confirmar el proceso de transferencia del grupo hemo desde las proteínas de transporte asociadas a la membrana hasta las proteínas de destino localizadas en diversos puntos de la célula. Puesto que el hemo libre resulta tóxico y poco soluble en agua, no es muy probable que cantidades significativas de hemo difundan libremente a través del citoplasma. O bien las proteínas a las que el hemo se va a incorporar se desplazan hasta el sistema de transporte, o bien existe un segundo sistema transportador encargado del desplazamiento del hemo hasta las proteínas de unión. El homólogo de HuvZ identificado en *V. cholerae*, posee las propiedades esperadas para una proteína de transporte o de almacenaje (Wyckoff *et al.*, 2004) y este último papel está apoyado por la reducción en la capacidad de crecimiento de un

mutante *hutZ* en condiciones de limitación de hierro y con la hemina como única fuente de hierro. La propuesta de estos autores es que, en *V. cholerae*, HutZ podría funcionar como proteína de unión al hemo una vez finalizado su transporte a través de la envuelta celular, almacenándolo y previniendo su toxicidad para, posteriormente y en respuesta a algún tipo de señal celular, transferirse a aquellas hemoproteínas donde fuera requerido.

Otra posibilidad planteada inicialmente para la función de HuvZ y proteínas homólogas es la de poseer algún tipo de actividad hemo-oxigenasa. En algunos casos se ha descrito el proceso de descomposición oxidativa del hemo mediada por hemo-oxigenasas y que facilita la liberación del átomo de hierro. Hasta el momento, en bacterias existen muy pocos ejemplos de proteínas de este tipo y se limitan a la proteína HemO de *Neisseria meningitidis* (Zhu *et al.*, 2000), HmuO de *Corynebacterium diphtheriae* (Schmitt, 1997b) o PigA y BphO identificadas en *Pseudomonas aeruginosa* (Ratliff *et al.*, 2001; Wegele *et al.*, 2004). Una característica de todas estas hemo-oxigenasas es el bajo nivel de similitud que existe entre ellas (alrededor del 30%). Por este motivo, en un principio la falta de homología entre estas proteínas y los homólogos de HuvZ, identificados en *V. cholerae* o *P. shigelloides*, no fue razón suficiente para rechazar su posible actividad como enzima de degradación. Sin embargo los últimos resultados publicados con el gen *hutZ* de *V. cholerae* y que posee una similitud del 74% respecto a *huvZ* de *V. anguillarum*, descartan cualquier tipo de actividad hemo-oxigenasa (Wyckoff *et al.*, 2004).

1.4 Sistemas TonB y su papel en los mecanismos de captación de hierro en *V. anguillarum*

La mayoría de patógenos Gram-negativos capaces de utilizar el hemo como fuente de hierro se caracterizan por incluir en sus mecanismos de transporte receptores de membrana externa dependientes de un sistema TonB. Es evidente que, una vez que la molécula se une a su receptor específico, el grupo hemo ha de ser liberado de esta proteína y transportado hasta el interior celular a través de un proceso dependiente de energía y en el que resulta fundamental la participación del complejo TonB-ExbB-ExbD (Bracken *et al.*, 1999; Elkins *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1999).

Ya que la membrana externa bacteriana carece de un gradiente electroquímico y en el periplasma tampoco existen componentes de alta energía como el ATP, la importación de estos compuestos depende enteramente del gradiente electroquímico mantenido a través de la

membrana citoplasmática. El complejo TonB-ExbB-ExbD, utiliza la energía protón-motriz de la membrana interna de la célula para inducir la activación del receptor de membrana externa y así permitir el transporte de la molécula desde el exterior hasta el espacio periplásmico (Postle y Kadner, 2003). Mientras que ExbB y ExbD no son esenciales para la funcionalidad del complejo, puesto que el sistema análogo formado por TolQ y TolR sustituye parcialmente a ExbB/ExbD (Skare *et al.*, 1993), la proteína TonB es, claramente, el componente responsable del proceso de transducción de energía y su mutación bloquea el proceso de transporte a través de la membrana externa (Bell *et al.*, 1990; Jaskula *et al.*, 1994; Takase *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se describe la caracterización de dos sistemas TonB codificados dentro del genoma de *V. anguillarum*. La detección de ambos sistemas en cepas pertenecientes a los serotipos del O1 al O10 demuestra que su presencia es una característica propia de la especie. Además, el análisis funcional de ambos sistemas en dos cepas diferentes, pertenecientes a los serotipos O1 (cepa 775) y O2 (cepa RV22), revela que, además de la gran similitud en la secuencia, también comparten su participación en las mismas funciones.

Mientras que en la mayoría de los microorganismos está descrito un único sistema TonB, la existencia de varios sistemas en la misma célula (cada uno de ellos consistente en el gen *tonB*, con o sin los genes accesorios *exbBD*) se ha puesto de manifiesto a raíz del aumento del número de genomas secuenciados completamente y del estudio de los sistemas bacterianos implicados en la captación de hierro (Beddek *et al.*, 2004; Desai *et al.*, 2000; O'Malley *et al.*, 1999; Occhino *et al.*, 1998; Parkhill *et al.*, 2000; Zhao y Poole, 2000). En algunos de estos organismos uno o más genes *tonB* se localizan próximos a genes relacionados con sistemas específicos de captación de hierro, lo cual apoya la idea de la asociación entre un determinado sistema TonB y una función específica. Así, por ejemplo, en *Campylobacter jejuni* los genes *tonB1* y *tonB3* se localizan adyacentes a genes que codifican posibles receptores de sideróforos (Guerry *et al.*, 1997). En otros organismos, como la cepa PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, mientras uno de estos sistemas está claramente implicado en mecanismos de captación de hierro, el segundo sistema TonB caracterizado parece no ser esencial en esta función de transporte (Zhao y Poole, 2000). Finalmente, recientes estudios en *V. cholerae* acerca de sus correspondientes sistemas TonB1 y TonB2, apuntan a que ambos poseen diferentes afinidades según la fuente de hierro, aunque también existe una cierta redundancia en cuanto a sus funciones (Mey y Payne, 2001; Seliger *et al.*, 2001). En este sentido la mutación individual del sistema TonB1 o TonB2 permite a la bacteria seguir

utilizando ciertas fuentes de hierro (hemo, ferricromo o vibriobactina), lo que indica que los genes *tonB1*, *exbB1* y *exbD1* pueden sustituir funcionalmente a *tonB2*, *exbB2* y *exbD2* y viceversa. Al mismo tiempo el sistema TonB1 es el único capaz de mediar en el transporte del sideróforo schizokinina mientras que TonB2 facilita específicamente el transporte de enterobactina.

Tanto el sistema TonB1 como el sistema TonB2 de *V. anguillarum* (codificados por sus respectivos genes *tonB*, *exbB* y *exbD*) participan en la captación de distintas moléculas como aporte de hierro. Ambos sistemas son funcionales bajo condiciones estándar de laboratorio y permiten a *V. anguillarum* utilizar hemina y distintos sideróforos como fuentes de hierro. Aunque comparten determinadas funciones de transporte, los resultados mostrados en el presente estudio demuestran que los dos sistemas no son totalmente redundantes. En general el sistema TonB1 de *V. anguillarum* está implicado en el transporte de hierro asociado al ferricromo y al grupo hemo, mientras que los resultados obtenidos en los bioensayos establecen que el sistema TonB2, además de participar en el transporte de hierro a partir de estos dos compuestos, es esencial para el transporte del sideróforo enterobactina y del complejo Fe-sideróforo específico de la cepa de *V. anguillarum* ensayada (anguibactina o vancrobactina).

Considerándolo en el contexto de un análisis filogenético, la adquisición de un sistema TonB1 funcional y asociado al sistema de captación de hemo daría un significado de ventaja biológica a la capacidad de asimilar hierro a partir de esta molécula, favoreciendo el acceso a las fuentes de hemo dentro del hospedador. Además, ya que en el medio marino la elevada osmolaridad del ambiente puede provocar en la bacteria una expansión del espacio periplásmico (Nikaido, 2003), es probable que el mantenimiento del sistema TonB1 confiera algún tipo de ventaja a *V. anguillarum* durante su crecimiento en estas condiciones. Según lo propuesto por Seliger *et al.* (2001) en *V. cholerae*, el mayor tamaño de la proteína TonB1 podría estar relacionado con una mayor funcionalidad bajo condiciones de alta osmolaridad. El mayor tamaño de TonB1 respecto a TonB2, está limitado sobre todo al dominio rico en Prolinas localizado en el periplasma de la célula, de manera que Larsen *et al.* (1993) propusieron para esta región una función de expansión en algún momento del proceso de transducción de energía y que facilitaría el contacto con el receptor de membrana externa. Por todo esto y bajo estas condiciones de alta osmolaridad, la proteína TonB2 de *V. anguillarum*, de por sí más corta, no tendría capacidad de cubrir la distancia que separa la membrana citoplasmática y el receptor de membrana externa específico para el grupo hemo, por lo que

se hace indispensable la presencia de un sistema TonB1 capaz de interaccionar con el receptor e iniciar el transporte de la molécula de hemo hasta el espacio periplásmico. En el caso del transporte de los complejos Fe-sideróforo, es posible que las estructuras proteicas de sus correspondientes receptores mantengan más accesibles las regiones de interacción con la proteína TonB2, de manera que el segundo sistema caracterizado en *V. anguillarum* será capaz de mediar en su transporte independientemente de las condiciones de osmolaridad del medio externo.

Cabe destacar que a pesar de que el sistema TonB1 de *V. anguillarum* es capaz de complementar el doble mutante *tonB1-tonB2* de *V. cholerae*, esta complementación no es efectiva cuando se trata del sistema TonB2 de *V. anguillarum*. Además este segundo sistema también es incapaz de complementar un mutante de *E. coli*, el cual, sin embargo, sí puede utilizar el sistema TonB2 de *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998). La complementación con el sistema TonB1 de *V. anguillarum* sugiere, por tanto, un reconocimiento específico entre la proteína TonB y los receptores de membrana externa presentes en *V. cholerae* y *E. coli*. Sin embargo las proteínas TonB2 de las dos especies de *Vibrio* son muy similares (62% de identidad / 74% de similitud) y el alineamiento entre ambas secuencias no muestra grandes cambios en la secuencia de aminoácidos que permitan explicar las diferencias observadas en los ensayos de complementación.

Los principales determinantes de especificidad en la interacción proteína TonB-Receptor, residen en el dominio C-terminal del componente de transducción de energía y la región próxima a la *TonB-box* de las proteínas transportadoras (Mey y Payne, 2003). Del reconocimiento e interacción entre ambos depende el proceso de transferencia de energía y el inicio del transporte a través de los receptores específicos de membrana externa. La *TonB-box* es uno de los dominios funcionales más importantes dentro de los receptores TonB-dependientes, de manera que su mutación puede bloquear el transporte del sustrato, aunque sin afectar a la unión de éste con el receptor (Barnard *et al.*, 2001; Cadieux *et al.*, 2000). De los estudios recientes en *E. coli* y *V. cholerae*, se concluye que la interacción depende, en realidad, de los residuos que preceden a dicho dominio, mientras que la especificidad viene determinada por la conformación que adquiere esta región tras la unión del receptor a su ligando específico (Larsen *et al.*, 1999; Mey y Payne, 2003; Moeck y Coulton, 1998). En relación a estos trabajos, Seliger *et al.* (2001) observaron en *V. cholerae*, cómo la proteína TonB1 sólo está implicada en el reconocimiento de unos pocos transportadores y no es capaz de interaccionar con ningún receptor de *E. coli*. Es muy posible que la funcionalidad de la

proteína TonB1 de *V. anguillarum* dependa de la conformación adquirida por la región *TonB-box* de los receptores presentes en *E. coli* o *V. cholerae*. Igualmente la falta de funcionalidad del complejo TonB2-ExbB2-ExbD2 de *V. anguillarum*, podría explicarse en base a la incapacidad del extremo C-terminal de la proteína TonB2 de reconocer e interactuar con estas regiones presentes en el extremo N-terminal de las proteínas transportadoras.

Examinando las relaciones filogenéticas entre los polipéptidos predichos para el sistema TonB1 y TonB2 dentro de la familia *Vibrionaceae*, así como su comparación con los sistemas TonB de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *E. coli*, es evidente el agrupamiento de los sistemas descritos dentro del género *Vibrio* y la separación, en un grupo aparte, de los sistemas TonB caracterizados en las demás especies bacterianas. Hay que tener en cuenta que en *P. aeruginosa* la nomenclatura se ha invertido de manera que la secuencia de su correspondiente gen *tonB1* equivale, en realidad, al gen *tonB2* de *V. anguillarum* y viceversa.

1.4.1 Sistemas TonB y virulencia

Debido a su importancia como componentes fundamentales de los mecanismos de captación de hierro, los sistemas TonB podrían jugar un papel muy importante en la capacidad infectiva de algunos microorganismos patógenos, tal como se ha demostrado a partir de su estudio en especies como *V. cholerae* (Seliger *et al.*, 2001) o *P. aeruginosa* (Takase *et al.*, 2000). En el caso de *V. anguillarum*, y más concretamente de la cepa RV22, la mutación del sistema TonB1 no parece tener ningún efecto sobre la virulencia de la bacteria. Esta observación está de acuerdo con los datos obtenidos previamente *in vitro* por los que el sistema TonB2 es capaz de complementar la mutación Δ TonB1, posiblemente gracias a su interacción con el receptor de membrana externa HutA y facilitando así la captación y el transporte de la molécula de hemo.

Por otro lado, trabajos previos en la cepa 775 demostraron el papel fundamental del sistema de sideróforos en la virulencia de *V. anguillarum* y como la mutación o la pérdida de este sistema tiene un impacto muy importante sobre la capacidad infectiva de la bacteria (Wolf y Crosa, 1986). Pese a que la delección del sistema TonB2 en la cepa RV22 bloquea la capacidad de utilización de sideróforos *in vitro*, la LD₅₀ establecida para este mutante como resultado de los ensayos de infección en rodaballo expuestos en el presente trabajo, resultó muy similar a la obtenida con la cepa parental (10^5). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en cuanto a la evolución del proceso infectivo, de manera que el mutante para

este sistema TonB2 tarda más en desarrollarse y provocar la infección. Es muy posible que al mantener el sistema de captación de hemo intacto, éste pase a ser el mecanismo fundamental en la adquisición de hierro dentro del pez hospedador. A su vez, es evidente que la utilización de los compuestos de hemo como fuente de hierro depende directamente de la síntesis previa de hemolisinas o citotoxinas, que facilitan la liberación del hemo para que quede a disposición de la bacteria. Quizás, el retardo observado en la mortalidad de los peces infectados sea consecuencia del espacio de tiempo que existe entre la síntesis y secreción de esas exotoxinas y la liberación del grupo hemo para que pueda ser captado y utilizado por *V. anguillarum* como fuente de hierro.

Finalmente, la cepa obtenida de la mutación simultánea de los sistemas TonB1 y TonB2 está fuertemente atenuada en su virulencia, siendo incapaz de inducir ningún tipo de infección. En este caso la supresión de ambos sistemas bloquea tanto el mecanismo de captación de hemo como la utilización de sideróforos, pudiéndose concluir que la adquisición de hierro a través de ambos sistemas TonB-dependientes es esencial para la infección causada por *V. anguillarum*. Los ensayos de virulencia llevados a cabo en *V. cholerae* con mutantes de uno u otro sistema, permitieron establecer la importancia individual de cada uno de estos mecanismos en el proceso de obtención de hierro, concluyendo, además, que los máximos niveles de virulencia sólo se alcanzan con la expresión simultánea de ambos sistemas de captación y transporte (Henderson y Payne, 1994).

2. Regulación del sistema de captación y transporte de hemo en *V. anguillarum*

La organización genética de los sistemas relacionados con la captación y transporte de hemo es un aspecto ampliamente estudiado dentro del grupo de bacterias Gram-negativas. Sin embargo, poco se sabe acerca de su organización transcripcional y sistemas de regulación, siendo muy pocas las especies estudiadas en este aspecto, (King *et al.*, 2005; Nienaber *et al.*, 2001). El sistema descrito en *V. anguillarum* para la utilización de hemo, se caracteriza por la disposición de todos sus genes siguiendo una misma orientación, a excepción de *huvX* y *huvZ* que son transcritos desde la cadena opuesta. Asimismo, el análisis de la secuencia de nucleótidos determina que la mayor parte de estos genes se disponen solapados o muy próximos entre sí, sugiriendo la idea de la existencia de tres únicos promotores a partir de los cuales se transcriben todos los genes del sistema. Los ensayos de RT-PCR confirmaron dicha

organización y establecieron el agrupamiento de los nueve genes en tres únicas unidades transcripcionales: los operones *huvXZ* y *tonB1exbB1D1-huvBCD* y el gen *huvA* transcrito desde un promotor independiente. Hasta la fecha sólo se ha descrito una organización similar en *V. cholerae*, dónde además del operón formado por los genes *hutX* y *hutZ*, existe un segundo operón en el que los genes *tonB1*, *exbB1* y *exbD1* se co-transcriben junto a *hutB*, *hutC* y *hutD* (Occhino *et al.*, 1998; Wyckoff *et al.*, 2004). En especies como *V. parahaemolyticus* (O'Malley *et al.*, 1999), *Plesiomonas shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001), *Photobacterium damsela* (Juiz-Río *et al.*, 2005) o *Bradyrhizobium japonicum* (Nienaber *et al.*, 2001) se han descrito asociaciones similares entre los genes que forman el sistema TonB1 y genes relacionados con el transporte de la molécula de hemo.

Sin embargo, la distancia que separa las secuencias codificantes de *exbD1* y *huvB* es de 52 pb, suficiente como para poder ubicar un segundo promotor a partir del cual se expresen los genes *huvBCD* independientemente del sistema TonB1. En *V. vulnificus*, Lee *et al.* (2003) describieron la existencia de más de un promotor dentro del locus *putAP*, de manera que la transcripción de este operón puede dar lugar a dos transcritos de tamaños diferentes, el transcrito AP (RNA mensajero *putAP* policistrónico) y el transcrito A (de tamaño más corto y que codifica sólo para la proteína PutA). Para descartar una organización similar en *V. anguillarum* se determinó la actividad promotora de la región intergénica *exbD1-huvB*. Los resultados obtenidos con la fusión *huvB::lacZ* y el análisis por *primer extension*, así como la falta de una secuencia clara de terminación dentro de la región analizada, sugieren que la transcripción a partir del promotor de *tonB1* continúa a través de los genes *tonB1exbB1exbD1* y *huvBCD*, dando lugar a un único RNA mensajero policistrónico y que engloba estos 6 genes. Este resultado vuelve a confirmar los datos obtenidos en los ensayos de complementación, dónde era necesaria la presencia de un único fragmento de DNA que incluya los genes mencionados anteriormente para poder proporcionar a la cepa 101ESD de *E. coli* la capacidad de utilizar la hemina como fuente de hierro. Sin embargo esto no excluye la posibilidad de la presencia de secuencias promotoras adicionales entre *huvB-huvC* y *huvC-huvD*.

El sistema TonB tampoco tiene por qué estar implicado solamente en el proceso de transporte de hemo, sino que puede participar en el transporte activo de otros compuestos de hierro (Nikaido, 2003), o incluso de moléculas completamente diferentes como la maltosa (Neugebauer *et al.*, 2005). Esto podría explicar, al menos en parte, por qué todos los genes del sistema de captación y transporte de hemo no se transcriben conjuntamente como una única

unidad transcripcional, de manera que en función de las necesidades celulares de cada momento, se expresan unos u otros genes. Sin embargo, siguiendo lo propuesto para *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998), el hecho de que este sistema TonB1 forme parte de un operón con los genes *huvBCD* favorece la hipótesis de una adquisición simultánea de todos ellos durante el proceso evolutivo y, así, aumentar la eficacia en la utilización de la molécula de hemo por parte de la bacteria. De este modo, el microorganismo contaría con una ventaja selectiva durante el proceso de infección del hospedador, dónde la molécula de hemo constituye una de las fuentes de hierro más importantes y abundantes.

2.1 Análisis de las regiones promotoras: Identificación de *Fur-boxes*

Cada uno de los promotores del *cluster* de utilización de grupos hemo se analizó detalladamente, estableciendo el punto de inicio de la transcripción y caracterizando las secuencias más relevantes dentro de dicha región promotora. Tras determinar las posiciones +1 dentro de los promotores adyacentes a *huvA*, *huvX* y *tonB1*, las regiones -10 y -35 se identificaron en base a su homología con la secuencia consenso -10 (TATAAT) y -35 (TTGACA) establecida para los promotores sigma-70 de *E. coli*. Así las secuencias -10 (TCACT) y -35 (TCACAT) asignadas para el promotor de *huvA* comparten un 50% de identidad con dichas secuencias consenso. Por otro lado, las secuencias identificadas como las regiones -10 de *huvX* y *tonB1* (TCAAAT y AGTAAT respectivamente) poseen un 67% de identidad con los promotores reconocidos por el factor sigma-70 de la RNA polimerasa. Lo mismo ocurre con sus correspondientes secuencias -35 (TTATCA y TTGATA respectivamente) en donde la identidad llega a ser de un 67% para el promotor de *huvX* y 83% para el promotor de *tonB1*. La relativa similitud entre estos dominios del *cluster* de captación de hemo y las secuencias consenso de los promotores sigma-70 de *E. coli* sugiere que, probablemente, estas regiones promotoras sean reconocidas por el correspondiente homólogo de *V. anguillarum* para esta RNA polimerasa.

Dentro de las secuencias promotoras también fue posible identificar regiones relacionadas con la unión a la proteína Fur (*Ferric Uptake Regulator*). Esta molécula, descrita inicialmente en *E. coli* (Hantke, 1981), actúa como represor transcripcional de genes específicos a través de su unión a regiones concretas del DNA, denominadas *Fur-boxes* (de Lorenzo *et al.*, 1987), y en presencia de un exceso de hierro en el medio. Este mecanismo de regulación negativa es fundamental en el control de la expresión de genes asociados a la adquisición de hierro, en función de las necesidades celulares del metal.

La *Fur-box* identificada dentro de la región promotora de *huvA* posee una identidad del 58% respecto a la secuencia consenso. Se trata de una secuencia palindrómica en la que es posible identificar tres hexámeros dispuestos en la misma orientación (AATGAT-AGTAAT-TACCAT-T) y, a pesar de que la identidad entre la secuencia identificada en *huvA* y la *Fur-box* establecida en *E. coli* no es perfecta (tan sólo 11 de las 19 pb son idénticas, sobre todo la región central de la secuencia), hay que tener en cuenta que la secuencia consenso deriva del análisis de tan sólo unas pocas regiones promotoras. Del estudio de los promotores de los receptores de hemo identificados en distintas especies del género *Vibrio*, también se puede concluir que la región de mayor homología corresponde a la secuencia que engloba la *Fur-box* identificada en *V. anguillarum* (similitud alrededor del 90%). Esta observación, junto con el hecho de que muchos de los receptores de membrana caracterizados tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, implicados en procesos de captación de hierro están regulados al nivel transcripcional a través de la proteína Fur (Funahashi *et al.*, 2002; Heinrichs *et al.*, 1999; Jacobi *et al.*, 2001; Webster y Litwin, 2000), apoya el papel que pueda jugar esta secuencia identificada en el promotor de *huvA* durante el control de su expresión génica dependiente de los niveles de hierro.

Otra característica de esta *Fur-box* es que no se localiza inmediatamente después de las regiones -10 o -35, tal como sucede en la mayoría de los genes regulados por hierro, sino que se identificó a sólo 5 pb “corriente abajo” del punto de inicio de la transcripción. Aunque esta posición de las secuencias de unión a Fur no es habitual, el caso de *huvA* coincide con el descrito para el promotor del gen *fur* caracterizado en *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Haraszthy *et al.*, 2002). En esta bacteria la *Fur-box* se localiza a 8 pb “corriente abajo” del punto de inicio de la transcripción, pese a lo cual ha quedado demostrada no sólo la capacidad de unión del regulador a esta región del DNA, sino también el efecto represor que provoca dicha interacción sobre la transcripción del gen.

Por otra parte, el análisis de las secuencias promotoras de los genes *huvX* y *tonB1*, también permitió la identificación de posibles regiones de unión a este regulador transcripcional. Tanto la *Fur-box* de *huvX* (AATAAGATCAATTATCAAT) como la de *tonB1* (GATAATGCAATTGATAATT) son secuencias parcialmente palindrómicas que siguen el modelo clásico de repeticiones invertidas de 9 pb. Ambas se caracterizan por estar solapadas en 10 de las 19 pb que forman cada una de las secuencias. Igual que en el caso anterior, también es posible identificar la estructura en hexámeros característica de estas regiones de interacción con la proteína Fur, aunque su solapamiento plantea la posibilidad de

que, en realidad, sea solamente una de las secuencias caracterizadas la región implicada en el control transcripcional de ambos promotores. En este caso probablemente coincida con la *Fur-box* correspondiente al promotor de *tonB1*, puesto que es la más similar a la secuencia consenso (comparte 13 de las 19 pb). En cualquier caso, sean dos secuencias de unión solapadas o bien una sola, esta región podría estar relacionada con la regulación simultánea de ambos promotores.

La definición de la *Fur-box* como una sucesión de repeticiones cortas permite explicar la gran variación encontrada entre la secuencia de nucleótidos de distintos promotores y cómo, aparentemente, no existen bases esenciales en el proceso de interacción con Fur (Escolar *et al.*, 1999). Al analizar más detenidamente la región *huvX-tonB1*, se observa como el número de repeticiones NAT(A/T)AT puede extenderse en ambos sentidos aumentando la supuesta zona de interacción con la proteína reguladora. De hecho, los resultados obtenidos hasta el momento en ensayos de protección con DNasa, establecen que la región de unión a Fur corresponde a una secuencia no inferior a 31 pb, a pesar de que el tamaño del operador es, teóricamente, 19 pb (Escolar *et al.*, 2000). Según esto, las secuencias adyacentes, al estar configuradas como repeticiones de 6 pb, también podrían interaccionar específicamente con la proteína y explicaría por qué la zona de protección no está limitada a la *Fur-box* consenso. Al facilitar la aparición de contactos adicionales, se admite un mayor grado de divergencia dentro de las secuencias implicadas que se compensa con el aumento de la afinidad por la proteína. En último término, y junto con las variaciones en la concentración de hierro intracelular, la extensión de esta secuencia de unión da lugar a un amplio rango de respuestas que permiten un control más preciso de la expresión de los genes regulados.

Por último las *Fur-boxes* definidas para el control de los operones *huvXZ* y *tonB1exbBD1-huvBCD* se caracterizan por incluir las correspondientes regiones -35 de cada región promotora. Aunque Collado-Vides *et al.* (1991) propusieron que la capacidad represora de un regulador transcripcional depende de su punto de unión al DNA, siendo más efectivo cuanto más cerca esté de la secuencia -10, en el caso de los genes dependientes de Fur los dominios de regulación se localizan normalmente entre las regiones -10 y -35 sin perder capacidad de bloquear el acceso de la RNA polimerasa y, por tanto, el inicio de la transcripción (King *et al.*, 2005; Litwin y Quackenbush, 2001; Watnick *et al.*, 1998).

La disposición de los operones *huvXZ* y *tonB1exbBD1exbD1-huvBCD*, transcribiéndose a partir de cadenas opuestas de la doble hélice y con regiones promotoras solapadas, constituye un tipo de organización ampliamente representado en la naturaleza (Beck y

Warren, 1988; Yamada *et al.*, 2003). Normalmente en esta situación las regiones de unión a la RNA polimerasa están relativamente cercanas, lo que permite la interacción de distintas moléculas en un mismo punto de la secuencia del DNA y el inicio de la transcripción en ambos sentidos. Estas interacciones, bien sean interacciones proteína-proteína o interacciones derivadas de cambios en la topología del DNA e inducidas por la unión de la RNA polimerasa, pueden modificar la frecuencia de inicio de la transcripción de uno o de ambos promotores (Beck y Warren, 1988). En el caso de existir mecanismos de regulación específicos, las proteínas reguladoras también suelen unirse a una única región de control, facilitando la regulación coordinada o simultánea de ambas unidades de transcripción (Anisimov *et al.*, 2005; Watnick *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2002). Esta unión puede inducir la activación o represión de la expresión génica en ambas direcciones, o incluso la activación del proceso en un sentido mientras que, al mismo tiempo, se bloquea en sentido contrario. A su vez, estas unidades de transcripción divergentes podrían considerarse como más estables que otras unidades génicas durante los eventos de recombinación y translocación de información genética derivados de procesos evolutivos. La posición interna de los promotores facilitaría el movimiento de estos genes divergentes hasta nuevas ubicaciones, como una única unidad y sin pérdida de autonomía en su transcripción o regulación (Beck y Warren, 1988). En bacterias existen múltiples ejemplos de este tipo de organización, como la región *fepA-fes* de *E. coli* implicada en la síntesis de la enterobactina (Hunt *et al.*, 1994; Pettis *et al.*, 1988) o el loci *pvs-pvu* caracterizado en *V. parahaemolyticus* y también relacionado con la síntesis y transporte del sideróforo vibrioferrina (Tanabe *et al.*, 2003). En ambos casos los promotores divergentes están regulados a través de la interacción directa de la proteína Fur, y sus correspondientes secuencias de unión se localizan muy próximas dentro de la región intergénica.

2.2 Regulación de la expresión génica dependiente de Fur

En el presente trabajo, la regulación dependiente de hierro del gen que codifica el receptor de membrana externa para grupos hemo, *huvA*, se demostró mediante ensayos de *primer extension* y RT-PCR en condiciones de exceso y limitación de hierro. Asimismo, la cuantificación de la actividad transcripcional, a través de los ensayos de fusiones *lacZ* en el mutante *fur⁻775met11* de *V. anguillarum*, confirmó la implicación directa de la proteína Fur en la regulación. Aunque en el proceso de captación y transporte de hemo parece fundamental la unión previa de la molécula a proteínas adyacentes al receptor de membrana externa

(Mazoy y Lemos, 1996), según Mazoy *et al.* (2003) los fenotipos relacionados con esta unión, y detectados en distintas cepas de *V. anguillarum*, son independientes de los niveles de hierro. Se podría hablar, por tanto, de una contradicción entre la regulación dependiente de hierro del receptor de membrana externa y el carácter constitutivo de la fijación previa del sustrato a la superficie celular. Sin embargo, es posible que la unión establecida entre el grupo hemo y dichas proteínas sea inespecífica, lo que explicaría su independencia de los niveles de hierro que, a su vez, son determinantes para el proceso de transporte a través del receptor de membrana, desde el exterior hasta el citoplasma bacteriano.

Por otra parte la región intergénica *huvX-tonB1* de *V. anguillarum* posee una gran similitud con la región homóloga *hutW-tonB1* descrita en *V. cholerae*. En esta especie ha quedado claramente demostrada la regulación negativa, dependiente de Fur, que los niveles de hierro ejercen sobre la expresión génica de los operones *hutWXZ* y *tonB1exbBD1-hutBCD* (Mey *et al.*, 2005). En *V. anguillarum* nos planteamos la existencia de un mecanismo similar de control de la transcripción de los operones *huvXZ* y *tonB1exb1D1-huvBCD*. Gracias a los experimentos de *primer extension* y la detección de los RNA mensajeros producto de la transcripción de ambos operones, se pudo confirmar la diferencia de expresión en función de los niveles de hierro disponible. A su vez, la actividad promotora determinada en los ensayos de fusiones transcripcionales en la cepa H775-3 y el mutante *fur* 775met11, puso de manifiesto la participación de Fur en el control de la expresión génica de ambos operones. Las diferencias observadas entre los niveles de actividad β -galactosidasa de las fusiones *tonB::lacZ* y *huvX::lacZ* no pueden relacionarse con diferencias en la actividad represora de Fur sobre uno u otro promotor, ya que los patrones de expresión fueron los mismos en presencia y en ausencia de este factor de regulación. De hecho, la mayor expresión del promotor *tonB1* podría encontrar su explicación en características inherentes a la propia secuencia y que dotan a esta región de una mayor actividad transcripcional.

Finalmente, también sería de esperar que, en condiciones de ausencia de hierro, los niveles de actividad β -galactosidasa de los promotores de *huvX* y *tonB1* en el mutante *fur*⁻ y en la cepa H775-3 fuesen similares. Bajo estas condiciones, la proteína Fur se encuentra disociada del complejo con el Fe⁺², no tendría capacidad de unirse al DNA y por tanto no bloquearía el proceso de transcripción. Sin embargo, los resultados obtenidos en la cepa 775met11 (*fur*⁻) muestran unos niveles de expresión claramente superiores a los de la cepa parental. Es posible que, pese a la adición de EDDA como agente quelante de hierro, la cepa

H775-3 todavía contenga pequeños restos del regulador con capacidad de unión a sus correspondientes secuencias operadoras.

2.3 Otras posibilidades de regulación a nivel transcripcional

2.3.1 El hemo como posible factor de regulación

En términos generales, la disociación del complejo Fur-DNA bajo condiciones de ausencia de hierro es el único requerimiento en el inicio de la transcripción de los genes regulados por hierro. Sin embargo, para alcanzar los máximos niveles de expresión, ciertos sistemas relacionados con la captación de este metal necesitan la intervención de factores de regulación positivos. Así se puede hablar de tres tipos de activadores que controlan la expresión de genes implicados en el transporte de hierro: (i) Reguladores de tipo Ara-C (Beaumont *et al.*, 1998; Michel *et al.*, 2005); (ii) Sistemas de transducción de señales de dos componentes (Schmitt, 1999; Ulijasz *et al.*, 2004); (iii) Factores sigma de función extracitoplasmática (ECF) (Leoni *et al.*, 2000; Visca *et al.*, 2002). Todos ellos activan la transcripción génica en respuesta al descenso en los niveles de hierro y en presencia del compuesto de hierro a transportar.

Mientras que la expresión génica dependiente de hemo está ampliamente documentada en eucariotas (Wilks, 2002), en bacterias existen muy pocos datos acerca de la activación mediada por la molécula de hemo. Hasta el momento tan sólo se han identificado activadores que responden a los niveles de hemo en cuatro especies bacterianas, como son *C. diphtheriae*, *Serratia marcescens*, y dos especies diferentes de *Bordetella*. Los genes de transporte de hemo en *Bordetella pertussis* y *B. avium* están regulados por compuestos de hemo a través de cascadas de señales que requieren la participación de factores sigma ECF (King *et al.*, 2005; Vanderpool y Armstrong, 2004). La expresión del operón *has* de *Serratia marcescens*, implicado en la captación de hemo a través de la síntesis de hemóforos, también está regulada a través de factores sigma ECF (Rossi *et al.*, 2003). Finalmente la regulación del gen *hmuO*, que codifica la hemo-oxigenasa de *C. diphtheriae*, depende de un sistema de transducción de señales. Este sistema está compuesto por una kinasa (*chrS*) implicada en la detección de la molécula de hemo y en la transducción de la señal hasta el componente regulador del sistema (*chrA*), a su vez encargado de activar la transcripción génica (Schmitt, 1997a, 1999). Para establecer si la molécula de hemo participa de algún modo en la regulación del *cluster* génico caracterizado en *V. anguillarum*, se determinó la actividad promotora de las fusiones

huvA::lacZ, *huvX::lacZ* y *tonB1::lacZ* en condiciones de ausencia de hierro libre y con la hemina como única fuente de hierro disponible. Los resultados obtenidos, tanto en la cepa parental H775-3 como en el mutante *fur*⁻, sugieren que esta molécula no tiene efectos, directos o indirectos, sobre la expresión del sistema descrito en el presente trabajo.

Por otro lado, cuando una célula bacteriana se encuentra en condiciones de altas concentraciones de hierro, la necesidad anterior por la molécula de hemo exógeno puede llegar a transformarse en un requerimiento de protoporfirina IX. *Porphyromonas gingivalis* posee mecanismos específicos para el reconocimiento y transporte de esta molécula precursora, la cual, una vez en el interior celular, puede cubrir las necesidades celulares del grupo hemo como factor de crecimiento (Paramaesvaran *et al.*, 2003). Aunque en general la protoporfirina IX no influye en la captura y transporte de hemo (Lee, 1995), en *P. gingivalis* se ha observado un bloqueo de la unión específica de hemoglobina en presencia del anillo porfirínico. Ante la posibilidad de que la protoporfirina IX tuviera algún tipo de efecto sobre la expresión del sistema de transporte caracterizado en *V. anguillarum*, se analizó la expresión de los promotores del *cluster* en presencia de esta molécula. El resultado, similar al obtenido en los ensayos anteriores con hemina, demuestra claramente que la adición de protoporfirina IX tampoco afecta, al menos a nivel transcripcional, al sistema de captación y transporte de hemo descrito en *V. anguillarum*.

2.3.2 ¿Existen otros mecanismos adicionales de regulación?

De todos los resultados obtenidos, *Fur* podría considerarse el único factor de regulación que controla la expresión de este sistema de utilización de hemo. Sin embargo, los datos extraídos de los ensayos de la fusión transcripcional *huvA::lacZ* plantean serias dudas a este respecto. Aunque en presencia de hierro en el medio de cultivo, al ensayar la cepa parental H775-3 el promotor del receptor de membrana externa posee menores niveles de expresión que los promotores de *huvX* y *tonB1*, esta situación se invierte en condiciones de limitación de hierro, momento en el que la actividad transcripcional de *huvA* se incrementa considerablemente llegando a superar los niveles de los otros dos promotores. Estas diferencias resultan más evidentes en los ensayos con el mutante *fur* 775met11, ya que en todas las condiciones ensayadas la expresión de *huvA* siempre fue significativamente superior a la de las fusiones *huvX::lacZ* y *tonB::lacZ* y alcanzando sus máximos niveles en condiciones de limitación de hierro. En conjunto, todos estos datos sugieren que en ausencia del metal la expresión del receptor de membrana externa, *huvA*, está de alguna manera estimulada.

Aunque este incremento en los niveles de transcripción podría explicarse en base a una mayor actividad de transcripción/traducción intrínseca a la secuencia promotora de *huvA*, o incluso a una mayor estabilidad del RNA mensajero de *huvA* en la célula, también podría deberse a la existencia de un mecanismo de regulación positiva.

La existencia de genes adicionales que pudieran ejercer algún tipo de función reguladora sobre la expresión del receptor de membrana externa *huvA*, viene además sugerida por el mecanismo de regulación caracterizado en el sistema homólogo de captación de hemo de *V. vulnificus* (Litwin y Quackenbush, 2001). En esta bacteria, adyacente al gen del receptor de hemo *hupA*, se ha identificado un gen (*hupR*) con homología a reguladores transcripcionales de la familia LysR. Durante su caracterización se demostró el efecto activador que ejercía sobre la transcripción del receptor de membrana externa y cómo la propia molécula de hemo participa como coinductor en este proceso de regulación.

En el presente trabajo se describe la identificación y el clonaje del gen *huvR* a partir de la cepa H775-3 de *V. anguillarum* y cuyo producto también está relacionado con miembros de la familia LysR de reguladores transcripcionales. Este grupo de factores de regulación comprende una de las familias proteicas más amplias dentro de los organismos procariotas, evolucionando desde un antepasado común hasta las distintas subfamilias caracterizadas hoy en día. La mayoría de los miembros de la familia se corresponden con proteínas de unión al DNA que regulan positivamente la transcripción de genes específicos e implicados en una gran variedad de funciones. Normalmente se localizan adyacentes y en orientación contraria (promotores divergentes) a los genes sobre los que van a actuar (Schell, 1993), aunque en algunos casos también pueden regular sistemas génicos localizados en otras regiones del genoma (Sperandio *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2003). Las características comunes a las proteínas de esta familia son su tamaño, en torno a 276 y 350 residuos, la presencia de una estructura hélice-giro-hélice en el extremo N-terminal relacionada con la unión al DNA y, en algunos casos, el requerimiento de una pequeña molécula que actúa como coinductor en el proceso de regulación (Schell, 1993). Henikoff *et al.* (1988) propusieron que aquellas proteínas con un motivo H-T-H en su extremo N-terminal y una identidad superior al 20% con otros miembros de esta familia pueden ser definidas como reguladores transcripcionales de tipo LysR.

El gen *huvR* identificado en *V. anguillarum* codifica una proteína de 298 aminoácidos que, según el alineamiento de secuencias, contiene el motivo hélice-giro-hélice en su extremo N-terminal. Esta proteína comparte entre un 77 y un 81% de identidad con otros posibles

reguladores de tipo LysR de receptores de membrana externa asociados al transporte de hemo e identificados en distintas especies del género *Vibrio*.

Dentro de la región de DNA localizada “corriente arriba” de este gen, se identificó una posible *Fur-box* que comparte un 73% de identidad con la secuencia consenso de *E. coli*. Aunque el regulador Fur es la principal proteína reguladora que dirige la expresión de los genes regulados por hierro, también está demostrado que Fur puede ejercer su función de manera indirecta alterando la expresión de otros factores de regulación necesarios para la expresión de estos genes (Ernst *et al.*, 2005; Massé *et al.*, 2003). Para establecer el papel que juega esta proteína en la transcripción de *huvR* se diseñaron experimentos de RT-PCR que confirmaron la expresión constitutiva e independiente de la concentración de hierro de este regulador LysR. Cabe destacar que los bajos niveles de transcripción observados coinciden con niveles de expresión similares descritos en otros miembros de esta familia de activadores transcripcionales (Hedstrom *et al.*, 1986; Vasil *et al.*, 1998).

Como ya se mencionó anteriormente, los sistemas génicos implicados en la captación y transporte de hemo están muy conservados dentro del género *Vibrio*. Una de las pocas diferencias radica en la posición del receptor de membrana externa que, a excepción de *V. anguillarum*, se localiza asociado a un activador transcripcional de la familia LysR y alejado del resto de genes de transporte. El análisis de la secuencia de *V. anguillarum*, adyacente al codón de inicio de *huvR*, no reveló ningún posible gen orientado en sentido contrario y sobre el que la proteína HuvR pudiera ejercer su función reguladora. Por el contrario dentro de la secuencia adyacente al extremo 3' de la ORF se identificó una acetiltransferasa homóloga a otras caracterizadas en esta misma posición dentro del genoma de *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. mimicus* dando idea de una organización genética conservada entre distintas especies del género *Vibrio*.

La elevada similitud a nivel de secuencia entre *huvR* y sus homólogos descritos en otras especies del género *Vibrio* y asociados a receptores de membrana externa para el grupo hemo, plantea la posible implicación de la proteína HuvR de *V. anguillarum* en la regulación a nivel transcripcional y en *trans* del gen que codifica el receptor de hemo, *huvA*. Los resultados obtenidos en el análisis de la actividad promotora de *huvA* sugieren que, bajo condiciones de exceso de hierro, el represor Fur se une a su correspondiente *Fur-box* y bloquea la transcripción del receptor de membrana externa, lo que además evitaría la activación transcripcional por medio de un posible factor de regulación positivo. Sin embargo, cuando los niveles de hierro presentes en el medio son limitantes, el represor Fur pasa a su

estado inactivo, se libera el acceso de la RNA polimerasa a sus secuencias promotoras y se inicia la transcripción de *huvA*. Es de esperar que, bajo estas condiciones, HuvR actúe como un activador transcripcional de *huvA*, incrementando los niveles relativos de esta proteína con respecto a otros sistemas de captación de hierro y, por tanto, favoreciendo la utilización del grupo hemo ante otras posibles fuentes de hierro.

Pese a que todos los datos derivados del análisis de la secuencia apuntan al posible carácter regulador de HuvR sobre la transcripción del receptor de membrana externa, la delección de *huvR* no alteró en ningún caso los niveles de expresión de *huvA*, lo que sugiere que, al menos en *V. anguillarum*, este regulador transcripcional puede no ser funcional. De hecho *V. anguillarum*, con la ubicación de *huvA* adyacente al resto de genes relacionados con el transporte de hemo, constituye la excepción en la organización de este sistema génico dentro del género *Vibrio*. Es muy posible que los reordenamientos genéticos derivados del proceso de evolución y diferenciación entre especies a partir de un ancestro común en *Vibrionaceae*, resultaran en la translocación del receptor de membrana externa desde su ubicación original, contigua a *huvR*, hasta la posición adyacente a *huvZ*, produciendo la pérdida de funcionalidad de *huvR*.

Hay que tener en cuenta que este tipo de reguladores transcripcionales se unen a los promotores que regulan a través de secuencias parcialmente palindrómicas, de unas 15 pb, localizadas alrededor de la posición -65 (con respecto al gen regulado). Esta región de unión se caracteriza por el motivo conservado T-N₁₁-A. Además existe una segunda secuencia de interacción, en este caso próxima a la región -35 de unión a la RNA polimerasa y que normalmente requiere la presencia de la molécula coinductora como prerequisite para la activación de la transcripción (Goethals *et al.*, 1992). El análisis de la secuencia promotora de *huvA* no reveló ninguna de estas secuencias de interacción con la proteína reguladora. Por otra parte, la región de *V. vulnificus* “corriente arriba” de *hupA* y la secuencia promotora del receptor de membrana externa de *V. anguillarum* sólo mantienen cierta homología hasta la secuencia correspondiente a la zona de interacción con la proteína Fur, quedando fuera las secuencias de reconocimiento y activación identificadas en el promotor de *V. vulnificus* (Litwin y Quackenbush, 2001). Es posible que las secuencias de reconocimiento implicadas en la unión al DNA del factor de regulación HuvR y teóricamente próximas a la región promotora de *huvA* pudieran haberse perdido durante los reordenamientos del DNA que dan lugar a la exclusiva organización genética del sistema de utilización de hemo en *V. anguillarum*. Asimismo, en el supuesto de que fuera necesaria la intervención de la molécula

de hemo como coinductor, como es el caso de HupR, los resultados derivados de los ensayos en presencia y ausencia de hemina mostrarían algún tipo de diferencia significativa. Contrariamente a lo esperado, la presencia de la molécula de hemina como fuente de hierro no activa la transcripción del promotor de *huvA*, de manera que o bien HuvR no tiene capacidad de unirse a esta región promotora o bien es necesaria la intervención de otra molécula, aún por determinar, diferente al grupo hemo.

3. Variabilidad genética intraespecífica del sistema de captación de hemo en *V. anguillarum*

Tras la identificación inicial de *V. anguillarum* como agente causal de vibriosis, Sørensen y Larsen clasificaron la especie en 10 serogrupos según el antígeno O (Sørensen y Larsen, 1986). Posteriormente se han ido incluyendo nuevos serotipos hasta llegar a los 23 descritos hoy en día (Grisez y Ollevier, 1995; Pedersen *et al.*, 1999). De todos ellos los serotipos O1 y O2 y en menor medida el O3, están asociados a mortalidades de peces, mientras que en el resto se agrupan cepas ambientales sin aparente importancia como agentes infecciosos.

La capacidad de utilización de la hemina y la hemoglobina como fuentes de hierro en la especie *V. anguillarum* ya había sido puesta de manifiesto en trabajos anteriores, concluyendo que dicha habilidad era independiente del serotipo u origen del aislado (Mazoy y Lemos, 1996; Rodríguez-Ares, 2000). Dichos resultados sugieren, por tanto, que la utilización de este tipo de compuestos constituye una característica propia de esta especie. En el presente estudio la detección de los distintos componentes del sistema de captación y transporte de hemo, caracterizado en la cepa H775-3 del serotipo O1, en cepas pertenecientes a los serotipos del O1 al O10 confirma la idea propuesta anteriormente.

Los resultados obtenidos indican que todas las cepas del serotipo O1 contienen los genes caracterizados dentro del *cluster* de utilización de hemo, sugiriendo un contenido genético conservado. Asimismo el análisis de cepas del resto de serotipos no permite establecer una relación entre el serogrupo y la presencia o ausencia de cada uno de los genes analizados. Del mismo modo, debido a la amplia distribución del sistema, presente en cepas tanto virulentas como no virulentas, no puede considerarse como un marcador de virulencia,

aunque esto tampoco es razón suficiente como para rechazar su papel durante el proceso de infección.

Previamente se expuso que los genes *huvA*, *huvB*, *huvC* y *huvD* son esenciales para el crecimiento de la cepa H775-3 en presencia de compuestos de hemo como única fuente de hierro y confirma la ausencia de genes redundantes capaces de sustituir funcionalmente a cualquiera de los mencionados anteriormente. Todas las cepas analizadas, a excepción de las cepas 13A5 y B1.1.2/4 incluidas en el serotipo O3, son positivas para la presencia del operón *huvXZ* y los genes *huvBCD*, de manera que la única diferencia entre los aislados radica en la presencia o ausencia del receptor de membrana externa *huvA*. Sin embargo Mazoy y Lemos (1996) y, posteriormente, Rodríguez-Ares (2000), habían demostrado que estas cepas poseían capacidad de unión y utilización de hemina y hemoglobina como fuentes de hierro. Por todo ello, la ausencia de uno o de todos los genes de captación y transporte de hemo descritos en el presente trabajo sugiere la existencia en *V. anguillarum* de distintos sistemas génicos capaces de cumplir esta misma función.

Los resultados obtenidos a raíz de este planteamiento describen la caracterización del gen *huvS*, que codifica un nuevo receptor de grupos hemo y con homología a proteínas de membrana externa TonB-dependientes. La secuencia de nucleótidos “corriente arriba” del codón de inicio de esta nueva ORF muestra un 96% de identidad con la misma secuencia presente en *huvA*. Igualmente se identificó un posible sitio de unión a Fur con una coincidencia del 100% en la secuencia de la *Fur-box* descrita para el receptor caracterizado en la cepa H775-3. La presencia de la misma *Fur-box* en la región promotora pone de manifiesto el mismo mecanismo de regulación en la expresión de *huvS*, a nivel transcripcional y dependiente de los niveles de hierro, que la descrita y confirmada para *huvA*.

Explicar la diversidad en los repertorios génicos ha sido un problema fundamental de la biología moderna. Mientras que en eucariotas se cree que esta diversidad es el resultado, principalmente, de la duplicación y pérdida de genes, en el caso de los procariotas la transferencia lateral se considera el principal proceso implicado en la variación del contenido genético entre especies (Lerat *et al.*, 2005; Ochman *et al.*, 2000). Normalmente las bacterias adquieren estos genes a partir de otros organismos relacionados y, aunque muchos de los genes recién adquiridos se pierden, la mayoría de los que persisten en el genoma pasan a transmitirse verticalmente. Es evidente que las duplicaciones génicas, la pérdida de genes y su transferencia entre especies, modelan los genomas bacterianos, sin embargo no está clara la contribución exacta de cada uno de estos procesos (Lerat *et al.*, 2005).

La presencia de dos o más secuencias homólogas dentro de un único genoma puede ser el reflejo de la adquisición de una segunda copia génica a partir de otra especie bacteriana, más que por la duplicación del gen incluido previamente en el genoma de la bacteria (Lerat *et al.*, 2005; Ochman *et al.*, 2005). Asimismo, los procesos de recombinación homóloga entre el DNA transferido y el DNA del receptor también pueden dar lugar a nuevas secuencias, en el caso de que ambos fragmentos no sean idénticos (Hughes y Friedman, 2004). Aunque estas tasas de recombinación dependen de la similitud existente entre las secuencias y disminuyen considerablemente si los fragmentos de DNA implicados difieren en más del 10%, en determinadas circunstancias el proceso puede tener lugar aún cuando el porcentaje de diferencia sea más elevado (hasta un 20%) (Vulic *et al.*, 1997). En definitiva los procesos de transferencia lateral y recombinación han sido determinantes en la evolución y divergencia de la mayoría de especies bacterianas. En algunos casos dichos eventos son muy evidentes, como en la especie *Thermotoga maritima*, en cuyo genoma se pueden encontrar genes ortólogos tanto de eubacterias como de arqueas termófilas (Nelson *et al.*, 1999). Mientras que el 24% de las secuencias codificantes incluidas en el genoma de esta bacteria presentan su mayor similitud con proteínas de especies como *Methanococcus jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidis* o *Pyrococcus horikoshii*, en eubacterias como *Aquifex aeolicus* y *B. subtilis* la mayor similitud con proteínas de *Archaea* es tan sólo el 16% y el 7%, respectivamente, de sus secuencias codificantes. La similitud entre *T. maritima* y *Archaea* sería el resultado de una extensa transferencia lateral entre ambas líneas (Nelson *et al.*, 1999).

El hecho de que la secuencia de nucleótidos de *huvA* (cepa H775-3 del serotipo O1) y *huvS* (cepa ET-208 del serotipo O3) esté muy conservada en las regiones flanqueantes de la ORF pero con variaciones importantes dentro de la propia secuencia codificante, sugiere que al menos uno de los dos genes ha podido ser adquirido por transferencia lateral. La recombinación entre la región intergénica receptor-*huvZ* y la secuencia inicial de *huvA/huvS*, resultaría en el intercambio de la mayor parte de la secuencia del receptor de hemo. Quedaría por determinar el orden de adquisición de ambos genes dentro de la especie *V. anguillarum*. Las principales similitudes de ambos corresponden a homólogos caracterizados en especies del género *Vibrio*. A este respecto la diferencia básica entre *huvA* y *huvS* radica en la especie con la que comparten la mayor homología. Mientras que el gen que codifica el receptor de hemo de *V. vulnificus* es el más similar a *huvA* (69%), *huvS* por su parte, posee una mayor similitud con el gen *mhuA* de *V. mimicus* (63%). A pesar de que la comparación génica y sus distribuciones filogenéticas son muy útiles en la detección de los procesos de transferencia

lateral, las propias secuencias de DNA de los genes implicados también proporcionan las mejores pistas acerca de su origen. Así, las especies bacterianas poseen un amplio grado de variación en su contenido total G+C, pero dentro de una misma especie los genes son bastante similares con respecto a esta composición, patrones de codones y frecuencias de di- y trinucleótidos (Ochman *et al.*, 2000). Por esta razón aquellas secuencias recién incorporadas a un genoma bacteriano (adquiridas por transferencia horizontal), mantienen las características del genoma donador, lo que podría servir de ayuda en su diferenciación del DNA ancestro. Sin embargo en el caso de los receptores de hemo caracterizados en *V. anguillarum*, todas estas características son muy similares, no sólo entre ellos sino también con respecto a sus homólogos caracterizados en las posibles especies donadoras.

Ya que cada evento de transferencia implica la introducción de DNA en un único linaje, el rasgo adquirido quedará limitado a los descendientes de la cepa receptora, de manera que estará ausente en el genoma de otras cepas o especies relacionadas. Los resultados obtenidos en la detección de *huvA* y *huvS* en las distintas cepas de *V. anguillarum*, establecen que ambos genes no coexisten dentro de la misma célula, por lo que cada aislado sólo es positivo para uno de los dos receptores de hemo caracterizados. Esto lleva a plantear dos posibles líneas filogenéticas dentro de la especie, una de las cuales comprende todas aquellas cepas definidas por la presencia de *huvA*, mientras que la segunda línea agruparía las cepas *huvS* positivas. Igualmente la caracterización de dos cepas pertenecientes al serotipo O3 y negativas para todo el *cluster* descrito, podría considerarse como una nueva línea. Sin embargo es evidente la necesidad de estudios mucho más profundos, e incluyendo un mayor número de regiones génicas, para poder establecer relaciones de filogenia más precisas.

En general la capacidad de utilizar el hemo del hospedador podría proporcionar una cierta ventaja al patógeno durante el proceso de infección. Sin embargo estos mecanismos de adquisición de hierro no se considerarían como un factor de virulencia determinante salvo en casos como *Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus ducreyi*, en los que no se ha detectado la producción de sideróforos. En estas especies la captación de compuestos de hemo constituye la única forma de disponer de una fuente de hierro abundante y accesible dentro del organismo infectado (Lee, 1991; Tai *et al.*, 1993). En *V. anguillarum*, Mazoy *et al.* (2003) describieron la importancia del receptor de membrana externa HuvA en el proceso de captación de hemo y como su mutación influye negativamente en los niveles de virulencia de la cepa 775 ensayada. Tras caracterizar el gen *huvS*, se planteó la posible relación entre la presencia de uno u otro receptor y el grado de virulencia de la cepa, especialmente en aquellas

incluidas en los serotipos O2 y O3. De acuerdo con los resultados de virulencia de diferentes aislados de *V. anguillarum* obtenidos por Pazos *et al.* (1993), podría existir una correlación entre la presencia de *huvA* o *huvS* y la capacidad de promover la infección, puesto que las cepas más virulentas coinciden con aquellas que expresan el receptor HuvA. Sin embargo, los aislados ensayados son relativamente pocos, de manera que sería necesario el análisis de un número mayor de cepas para poder dar un resultado definitivo. Cabe destacar que las dos cepas carentes del sistema génico completo asociado a la captación y transporte de hemo, se corresponden con aislados ambientales con un nivel de virulencia muy bajo (Dosis letal 50% $>10^7$). Finalmente la presencia diferencial de sistemas de captación de hemo en distintas cepas de *V. anguillarum*, sugiere el posible uso de estos genes como marcadores epidemiológicos.

Dentro de las distintas especies del género *Vibrio* es dónde se pueden encontrar las mayores homologías con el sistema caracterizado en *V. anguillarum*, constituyendo un grupo muy homogéneo (O'Malley *et al.*, 1999) y sin poder rechazar la posibilidad de que, al igual que sucede en *V. cholerae*, alguno de sus miembros posea más de un receptor específico. Los resultados obtenidos en la caracterización del *cluster* asociado a *V. anguillarum* demuestran claramente que, dentro de una misma célula, no existen genes con funciones redundantes a los descritos previamente. Aunque también se demuestra la existencia de dos receptores de hemo diferentes dentro de la especie, su presencia en cepas distintas hace que sea una situación completamente diferente a la descrita en *V. cholerae*. Dicha diversidad también podría ser indicativa del proceso de divergencia que dio lugar a las diversas especies incluidas dentro del género.

4. Utilidad del sistema de captación de hemo en el diagnóstico y prevención de la vibriosis

Durante los últimos años se han desarrollado múltiples métodos de identificación, basados en el DNA, dirigidos a la identificación rápida de los principales patógenos bacterianos de peces (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004; Cepeda y Santos, 2000; Osorio *et al.*, 1999). A pesar de que se han descrito diversos protocolos para el diagnóstico molecular de la vibriosis causada por *V. anguillarum*, la heterogeneidad de esta especie ha limitado el desarrollo de un sistema eficiente para su detección (Hirono *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1995; Martínez-Picado *et al.*, 1996). Tan solo el método de diagnóstico propuesto por González *et*

al. (2003) y basado en la amplificación por PCR del gen *rpoN* permite la detección específica de *V. anguillarum* de forma rápida y con una gran sensibilidad.

Pese a que la utilización de compuestos de hemo como fuente de hierro constituye una característica de *V. anguillarum*, únicamente el sistema TonB1, caracterizado dentro del *cluster* de utilización de hemo descrito en este trabajo, está presente en todos los aislados analizados y pertenecientes a los serotipos del O1 al O10. Aunque existen muchas secuencias de DNA susceptibles de ser utilizadas en la identificación de *V. anguillarum*, hay que tener en cuenta que, además de la posible variabilidad intraespecífica, es posible que las escasas diferencias encontradas entre las secuencias de *V. anguillarum* y especies relacionadas, como *V. ordalii*, sean insuficientes para garantizar el diseño de cebadores completamente específicos para una única especie. Para probar la especificidad y posible aplicación del sistema TonB1 en el desarrollo de un método de diagnóstico molecular, se amplificó el fragmento *exbB1-exbD1* partiendo de diversas cepas de distintos serotipos de *V. anguillarum*, junto con otras especies bacterianas. Los ensayos de PCR confirmaron la especificidad de este fragmento para la identificación de *V. anguillarum*, no habiéndose detectado falsos positivos derivados de amplificaciones inespecíficas o de la amplificación de especies estrechamente relacionadas, especialmente *V. ordalii*.

Aunque los niveles de detección obtenidos en estos ensayos, a partir de cultivos de *V. anguillarum* tanto puros como mixtos, son relativamente altos, los resultados obtenidos son prometedores y es posible que futuros estudios de los genes relacionados con el transporte de hemo y un mayor ajuste de las condiciones de amplificación, permitan el desarrollo de un protocolo adecuado para el diagnóstico rápido de *V. anguillarum* basado en la detección de secuencias de este sistema de captación y transporte de hemo.

Por otra parte, el hecho de que algunas de las proteínas que forman el sistema descrito en este trabajo (en especial los receptores de membrana externa) se encuentren expuestos al medio, pudiendo actuar por tanto como antígenos, sugiere su posible utilización para el desarrollo y/o mejora de vacunas contra la vibriosis causada por *V. anguillarum*.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral aportan nuevos conocimientos acerca del mecanismo empleado por el patógeno de peces *Vibrio anguillarum* para la captación y el transporte de hemo desde el medio externo hasta el citoplasma celular y la utilización de esta molécula como fuente de hierro. Asimismo, los resultados mostrados apoyan trabajos anteriores acerca de la importancia de este sistema de obtención de hierro en la virulencia del microorganismo.

Las conclusiones concretas que se pueden extraer del trabajo realizado son:

1. El sistema de captación y transporte de grupos hemo de *V. anguillarum* está codificado por nueve genes agrupados en un *cluster* génico. De acuerdo con la homología que presenta con mecanismos similares descritos en diferentes especies bacterianas, este sistema estaría formado por: un receptor de membrana externa específico para grupos hemo (HuvA), un sistema TonB de transducción de energía (TonB1-ExbB1-ExbD1), una proteína periplásmica de transporte de hemo (HuvB), un sistema de transporte ABC asociado a la membrana interna celular (HuvC y HuvD) y dos proteínas de localización citoplasmática de función desconocida (HuvZ y HuvX). Cinco de los genes que codifican el sistema (*huvA*, *huvZ*, *huvB*, *huvC* y *huvD*) son esenciales para la utilización de hemo, tanto en su forma libre como asociada a hemoproteínas, como fuente de hierro.
2. La organización espacial de los genes que codifican este sistema en *V. anguillarum* posee características únicas que lo diferencian de sistemas homólogos descritos en otras especies de la familia *Vibrionaceae*. Especialmente, la asociación entre el gen que codifica el receptor de membrana externa, *huvA*, y el resto de genes implicados en el transporte de hemo, apunta a la probable existencia de reordenamientos genéticos derivados del proceso de evolución y diferenciación entre especies a partir de un ancestro común.
3. El *cluster* génico que codifica el sistema de utilización de hemo en *V. anguillarum* está organizado en tres unidades transcripcionales (gen *huvA*, operón *huvXZ* y operón *tonB1exbB1D1-huvBCD*), y su expresión depende de los niveles de hierro disponible en el medio circundante, de tal forma que los genes implicados en la utilización de hemo se expresan únicamente cuando los niveles de hierro son suficientemente bajos. La identificación en las regiones promotoras de secuencias de unión al regulador transcripcional Fur, así como los resultados de expresión obtenidos en un mutante *fur*-, ponen de manifiesto la participación de Fur en la regulación dependiente de hierro de todo el sistema.

4. La expresión del gen *huvA*, que codifica el receptor de membrana externa, parece estar además regulada positivamente por un mecanismo independiente del regulador Fur, ya que aún en ausencia de éste, su expresión se incrementa notablemente en condiciones de déficit de hierro. Dicho incremento en los niveles de transcripción es además independiente de los niveles de hemo, así como de la proteína HuvR, miembro de la familia LysR de activadores transcripcionales, caracterizada en este trabajo.
5. Los experimentos de complementación de diversas cepas de *Escherichia coli* indican que el mecanismo aquí descrito permite a la célula bacteriana, no sólo la adquisición de hemo como fuente de hierro, sino que también le puede servir para la utilización del grupo hemo como fuente de porfirinas. Dichos experimentos demuestran, por otro lado, que la molécula de hemo llega intacta hasta el citoplasma y que no es degradada durante el proceso de transporte a través de las membranas celulares.
6. Además del sistema TonB1, caracterizado como parte del *cluster* génico que codifica la utilización de hemo, *V. anguillarum* posee un segundo sistema TonB (TonB2, compuesto por los genes *tonB2*, *exbB2* y *exbD2*). Ambos sistemas pueden actuar indistintamente como parte del mecanismo de captación y utilización de hemo como fuente de hierro, aunque el sistema TonB2 es específico para el transporte de hierro mediante sideróforos, tanto mediante anguibactina (en cepas del serotipo O1) como de vancrobactina (en cepas del serotipo O2).
7. Los experimentos de mutagénesis de los sistemas TonB1 y TonB2 y las posteriores infecciones experimentales sugieren que ambos sistemas, y por ende, los mecanismos de transporte de hierro en los que participan, tanto la captación de hemo como el basado en la síntesis de sideróforos, juegan un papel relevante en la virulencia de *V. anguillarum*, ya que aunque el bloqueo de uno de los mecanismos disminuye sólo ligeramente el grado de virulencia, el bloqueo de ambos mecanismos simultáneamente conlleva una drástica reducción de la capacidad infectiva de la bacteria.
8. El sistema de captación y transporte de hemo caracterizado en *V. anguillarum* muestra una notable variabilidad intraespecífica, aunque sin aparente relación con el serotipo u origen del aislado. La caracterización de dos receptores de membrana externa, HuvA y HuvS, muy diferentes en su secuencia aminoacídica, aunque funcionalmente intercambiables y no coexistentes en la misma célula, sugiere la posible existencia de dos líneas filogenéticas dentro de la especie, o bien la existencia de eventos de transferencia génica

horizontal. Por otra parte, la descripción de cepas con capacidad de utilización de hemo pero carentes de cualquiera de los genes involucrados en el transporte de hemo aquí descritos, sugiere la existencia de mecanismos adicionales relacionados con la obtención de esta molécula y su utilización como fuente de hierro.

9. Debido a la mencionada variabilidad intraespecífica, el sistema TonB1 es el único componente del mecanismo de captación y transporte de hemo, que está presente en todas las cepas de *V. anguillarum* analizadas en el presente trabajo. Estos resultados sugieren que la detección de dicho sistema podría ser la base para el diseño de métodos de diagnóstico rápido para la identificación de *V. anguillarum* mediante técnicas de PCR.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Actis, L.A., Tolmasky, M.E., y Crosa, J.H. (1999) Vibriosis. *Fish Diseases and Disorders*. Vol. 3. Woo, P.T.K. y Bruno, D.W. (eds): CAB Intern., Publ., UK, pp. 523-558.
- Adhikari, P., Kirby, S.D., Nowalk, A.J., Veraldi, K.L., Schryvers, A.B., y Mietzner, T.A. (1995) Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport operon. *J Biol Chem* **270**: 25142-25149.
- Adone, R., Piccininno, G., Pistola, C., Bianchi, R., y Ciuchini, F. (1996) Detection of *Vibrio anguillarum* by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay performed with monoclonal antibodies. *J Vet Med B* **43**: 579-584.
- Ahmer, B.M., Thomas, M.G., Larsen, R.A., y Postle, K. (1995) Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *J Bacteriol* **177**: 4742-4747.
- Ahn, S.H., Han, J.H., Lee, J.H., Park, K.J., y Kong, I.S. (2005) Identification of an iron-regulated hemin-binding outer membrane protein, HupO, in *Vibrio fluvialis*: effects on hemolytic activity and the oxidative stress response. *Infect Immun* **73**: 722-729.
- Akakura, R., y Winans, S.C. (2002a) Constitutive mutations of the OccR regulatory protein affect DNA bending in response to metabolites released from plant tumors. *J Biol Chem* **277**: 5866-5874.
- Akakura, R., y Winans, S.C. (2002b) Mutations in the *occQ* operator that decrease OccR-induced DNA bending do not cause constitutive promoter activity. *J Biol Chem* **277**: 15773-15780.
- Alice, A.F., López, C.S., y Crosa, J.H. (2005) Plasmid- and chromosome-encoded redundant and specific functions are involved in biosynthesis of the siderophore anguibactin in *Vibrio anguillarum* 775: a case of chance and necessity? *J Bacteriol* **187**: 2209-2214.
- Alsina, M., Martínez-Picado, J., Jofre, J., y Blanch, A.R. (1994) A medium for presumptive identification of *Vibrio anguillarum*. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1681-1683.
- Althaus, E.W., Outten, C.E., Olson, K.E., Cao, H., y O'Halloran, T.V. (1999) The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **38**: 6559-6569.
- Amor, P.A., y Mutharia, L.M. (1995) Cloning and expression of *rfb* genes from *Vibrio anguillarum* serotype O2 in *Escherichia coli*: Evidence for cross-reactive epitopes. *Infect and Immun* **63**: 3537-3542.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K., y Rodríguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215-237.

- Angelidis, P. (2006) Immersion booster vaccination effect on sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. *J Anim Physiol Anim Nutr* **90**: 46-49.
- Anisimov, R., Brem, D., Heesemann, J., y Rakin, A. (2005) Molecular mechanism of YbtA-mediated transcriptional regulation of divergent overlapping promoters *ybtA* and *irp6* of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Lett* **250**: 27-32.
- Aoki, T., Hirono, I., Decastro, T., y Kitao, T. (1989) Rapid identification of *Vibrio anguillarum* by colony hybridization. *J Appl Ichthyol* **5**: 67-73.
- Arroyo, C.M., Kirby, S.D., Werrlein, R.J., McCarthy, R.L., Moran, T.S., y keeler, J.R. (1994) Reactive oxygen species produced in metal-catalyzed oxidation of bis(trifluoromethyl)disulfide and protection by ZE. *J Toxicol Environ Health* **41**: 329-344.
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Toranzo, A.E., Beaz, R., y Romalde, J.L. (2004) Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. *Dis Aquat Organ* **62**: 75-83.
- Bagg, A., y Neilands, J.B. (1987) Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* **51**: 509-518.
- Baichoo, N., y Helmann, J.D. (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**: 5826-5832.
- Banerji, S., Bewersdorff, M., Hermes, B., Cianciotto, N.P., y Flieger, A. (2005) Characterization of the major secreted zinc metalloprotease-dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **73**: 2899-2909.
- Barnard, T.J., Watson, M.E., Jr., y McIntosh, M.A. (2001) Mutations in the *Escherichia coli* receptor FepA reveal residues involved in ligand binding and transport. *Mol Microbiol* **41**: 527-536.
- Bauer, M.E., y Welch, R.A. (1996) Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **64**: 167-175.
- Beaumont, F.C., Kang, H.Y., Brickman, T.J., y Armstrong, S.K. (1998) Identification and characterization of *alcR*, a gene encoding an AraC-like regulator of alcaligin siderophore biosynthesis and transport in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* **180**: 862-870.
- Beck, C.F., y Warren, R.A. (1988) Divergent promoters, a common form of gene organization. *Microbiol Rev* **52**: 318-326.

- Beddek, A.J., Sheehan, B.J., Bosse, J.T., Rycroft, A.N., Kroll, J.S., y Langford, P.R. (2004) Two TonB systems in *Actinobacillus pleuropneumoniae*: their roles in iron acquisition and virulence. *Infect Immun* **72**: 701-708.
- Belanger, M., Begin, C., y Jacques, M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun* **63**: 656-662.
- Bell, P.E., Nau, C.D., Brown, J.T., Konisky, J., y Kadner, R.J. (1990) Genetic suppression demonstrates interaction of TonB protein with outer membrane transport proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 3826-3829.
- Bengoechea, J.A., Najdenski, H., y Skurnik, M. (2004) Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. *Mol Microbiol* **52**: 451-469.
- Berman, H.M., Battistuz, T., Bhat, T.N., Bluhm, W.F., Bourne, P.E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G.L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J.D., y Zardecki, C. (2002) The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 899-907.
- Bibb, L.A., King, N.D., Kunkle, C.A., y Schmitt, M.P. (2005) Analysis of a heme-dependent signal transduction system in *Corynebacterium diphtheriae*: deletion of the *chrAS* genes results in heme sensitivity and diminished heme-dependent activation of the *hmuO* promoter. *Infect Immun* **73**: 7406-7412.
- Boesen, H.T., Pedersen, K., Larsen, J.L., Koch, C., y Ellis, A.E. (1999) *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: role of O-antigen structure of lipopolysaccharide. *Infect Immun* **67**: 294-301.
- Bolinches, J., Lemos, M.L., Fouz, B., Cambra, M., Larsen, J.L., y Toranzo, A.E. (1990) Serological relationships among *Vibrio anguillarum* strains. *J Aquat Anim Health* **2**: 12-20.
- Bordas, M.A., Balebona, M.C., Rodríguez-Maroto, J.M., Borrego, J.J., y Moriñigo, M.A. (1998) Chemotaxis of pathogenic *Vibrio* strains towards mucus surfaces of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl Environ Microbiol* **64**: 1573-1575.
- Bosch, M., Garrido, E., Llagostera, M., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I., y Barbe, J. (2002) *Pasteurella multocida* *exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiol Lett* **210**: 201-208.
- Boukhalfa, H., y Crumbliss, A.L. (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* **15**: 325-339.

- Bowden, T.J., Menoyo-Luque, D., Bricknell, I.R., y Wergeland, H. (2002) Efficacy of different administration routes for vaccination against *Vibrio anguillarum* in atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol* **12**: 283-285.
- Bracken, C.S., Baer, M.T., Abdur-Rashid, A., Helms, W., y Stojiljkovic, I. (1999) Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *J Bacteriol* **181**: 6063-6072.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braun, V., y Braun, M. (2002) Active transport of iron and siderophore antibiotics. *Curr Opin Microbiol* **5**: 194-201.
- Bruns, C.M., Nowalk, A.J., Arvai, A.S., McTigue, M.A., Vaughan, K.G., Mietzner, T.A., y McRee, D.E. (1997) Structure of *Haemophilus influenzae* Fe(+3)-binding protein reveals convergent evolution within a superfamily. *Nat Struct Biol* **4**: 919-924.
- Bruns, C.M., Anderson, D.S., Vaughan, K.G., Williams, P.A., Nowalk, A.J., McRee, D.E., y Mietzner, T.A. (2001) Crystallographic and biochemical analyses of the metal-free *Haemophilus influenzae* Fe³⁺-binding protein. *Biochemistry* **40**: 15631-15637.
- Bullen, J.J., y Griffiths, E. (1999) *Iron and Infection: Molecular, physiological and clinical aspects*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Butterton, J.R., Choi, M.H., Watnick, P.I., Carroll, P.A., y Calderwood, S.B. (2000) *Vibrio cholerae* VibF is required for vibriobactin synthesis and is a member of the family of nonribosomal peptide synthetases. *J Bacteriol* **182**: 1731-1738.
- Cadieux, N., y Kadner, R.J. (1999) Site-directed disulfide bonding reveals an interaction site between energy-coupling protein TonB and BtuB, the outer membrane cobalamin transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10673-10678.
- Cadieux, N., Bradbeer, C., y Kadner, R.J. (2000) Sequences changes in the Ton Box region of BtuB affect its transport activities and interaction with TonB protein. *J Bacteriol* **182**: 5954-5961
- Carniol, K., y Gilmore, M.S. (2004) Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 8161-8163.
- Cepeda, C., y Santos, Y. (2000) Rapid and low-level toxic PCR-based method for routine identification of *Flavobacterium psychrophilum*. *Int Microbiol* **3**: 235-238.

- Cipriano, R.C., Pyle, J.B., Starliper, C.E., y Pyle, S.W. (1985) Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by the Dot Blot assay. *J Wildlife Dis* **21**: 211-218.
- Clarke, T.E., Tari, L.W., y Vogel, H.J. (2001) Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr Top Med Chem* **1**: 7-30.
- Clarke, T.E., Braun, V., Winkelmann, G., Tari, L.W., y Vogel, H.J. (2002) X-ray crystallographic structures of the *Escherichia coli* periplasmic protein FhuD bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. *J Biol Chem* **277**: 13966-13972.
- Colquhoun, D.J., y Sorum, H. (2002) Cloning, characterisation and phylogenetic analysis of the fur gene in *Vibrio salmonicida* and *Vibrio logei*. *Gene* **296**: 213-220.
- Collado-Vides, J., Magasanik, B., y Gralla, J.D. (1991) Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **55**: 371-394.
- Conchas, R.F., Lemos, M.L., Barja, J.L., y Toranzo, A.E. (1991) Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2956-2962.
- Coote, J.G. (1992) Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **8**: 137-161.
- Cope, L.D., Thomas, S.E., Latimer, J.L., Slaughter, C.A., Muller-Eberhard, U., y Hansen, E.J. (1994) The 100 kDa haem:haemopexin-binding protein of *Haemophilus influenzae*: structure and localization. *Mol Microbiol* **13**: 863-873.
- Cope, L.D., Yogev, R., Muller-Eberhard, U., y Hansen, E.J. (1995) A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemopexin by *Haemophilus influenzae* type b. *J Bacteriol* **177**: 2644-2653.
- Cope, L.D., Hrkál, Z., y Hansen, E.J. (2000) Detection of phase variation in expression of proteins involved in hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin binding by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **68**: 4092-4101.
- Correa, N.E., Lauriano, C.M., McGee, R., y Klose, K.E. (2000) Phosphorylation of the flagellar regulatory protein FlrC is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization. *Mol Microbiol* **35**: 743-755.
- Coulton, J.W., Mason, P., y Allatt, D.D. (1987) *fhuC* and *fhuD* genes for iron (III)-ferrichrome transport into *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**: 3844-3849.
- Crosa, J.H. (1980) A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature* **284**: 566-568.

- Crosa, J.H., y Hodges, L.L. (1981) Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775. *Infect Immun* **31**: 223-227.
- Crosa, J.H. (1997) Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 319-336.
- Crosa, J.H., y Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 223-249.
- Chen, C.J., Elkins, C., y Sparling, P.F. (1998) Phase variation of hemoglobin utilization in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **66**: 987-993.
- Chen, C.Y., Wu, K.M., Chang, Y.C., Chang, C.H., Tsai, H.C., Liao, T.L., Liu, Y.M., Chen, H.J., Shen, A.B., Li, J.C., Su, T.L., Shao, C.P., Lee, C.T., Hor, L.I., y Tsai, S.F. (2003) Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res* **13**: 2577-2587.
- Chen, Q., Actis, L.A., Tolmasky, M.E., y Crosa, J.H. (1994) Chromosome-mediated 2,3-dihydroxybenzoic acid is a precursor in the biosynthesis of the plasmid-mediated siderophore anguibactin in *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **176**: 4226-4234.
- Chen, Q., y Crosa, J.H. (1996) Antisense RNA, Fur, iron, and the regulation of iron transport genes in *Vibrio anguillarum*. *J Biol Chem* **271**: 18885-18891.
- Dassa, E., y Bouige, P. (2001) The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol* **152**: 211-229.
- Datsenko, K.A., y Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6640-6645.
- de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M., y Neilands, J.B. (1987) Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J Bacteriol* **169**: 2624-2630.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R., y Scarlato, V. (2001) The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **42**: 1297-1309.
- Denkin, S.M., y Nelson, D.R. (1999) Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3555-3560.
- Denkin, S.M., y Nelson, D.R. (2004) Regulation of *Vibrio anguillarum* *empA* metalloprotease expression and its role in virulence. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4193-4204.

- Desai, P.J., Garges, E., y Genco, C.A. (2000) Pathogenic *Neisseriae* can use hemoglobin, transferrin, and lactoferrin independently of the *tonB* locus. *J Bacteriol* **182**: 5586-5591.
- Devesa, S., Toranzo, A.E., y Barja, J.L. (1985) First report of vibriosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in Northwestern Spain. *Fish and Shellfish Pathology*. A.E. Ellis, e. (ed). London: Academic Press, pp. 131-140.
- Di Lorenzo, M., Stork, M., Tolmasky, M.E., Actis, L.A., Farrell, D., Welch, T.J., Crosa, L.M., Wertheimer, A.M., Chen, Q., Salinas, P., Waldbeser, L., y Crosa, J.H. (2003) Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *J Bacteriol* **185**: 5822-5830.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., y Helinski, D.R. (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 7347-7351.
- do Vale, A., Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Ellis, A.E., y Toranzo, A.E. (2002) Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. *Dis Aquat Organ* **48**: 109-115.
- Drazek, E.S., Hammack, C.A., y Schmitt, M.P. (2000) *Corynebacterium diphtheriae* genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters. *Mol Microbiol* **36**: 68-84.
- Dubrac, S., y Touati, D. (2000) Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* **182**: 3802-3808.
- Eberspacher, B., y Braun, V. (1980) Involvement of cytochromes in the uptake of ferrichrome by *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* **7**: 61-64.
- Elkins, C., Totten, P.A., Olsen, B., y Thomas, C.E. (1998) Role of the *Haemophilus ducreyi* Ton system in internalization of heme from hemoglobin. *Infect Immun* **66**: 151-160.
- Ernst, F.D., Homuth, G., Stoof, J., Mader, U., Waidner, B., Kuipers, E.J., Kist, M., Kusters, J.G., Bereswill, S., y van Vliet, A.H. (2005) Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J Bacteriol* **187**: 3687-3692.
- Escolar, L., Perez-Martín, J., y de Lorenzo, V. (1998) Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* **283**: 537-547.

- Escolar, L., Pérez-Martín, J., y de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**: 6223-6229.
- Escolar, L., Perez-Martín, J., y de Lorenzo, V. (2000) Evidence of an unusually long operator for the fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 24709-24714.
- Farrell, D.H., Mikesell, P., Actis, L.A., y Crosa, J.H. (1990) A regulatory gene, *angR*, of the iron uptake system of *Vibrio anguillarum*: similarity with phage P22 cro and regulation by iron. *Gene* **86**: 45-51.
- Farrell, D.H., y Crosa, J.H. (1991) Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum*. *Biochemistry* **30**: 3432-3436.
- Ferguson, A.D., y Deisenhofer, J. (2004) Metal import through microbial membranes. *Cell* **116**: 15-24.
- Freter, R., Obrien, P.C.M., y Macsai, M.S. (1981) Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vivo studies. *Infect Immun* **34**: 234-240.
- Fuangthong, M., y Helmann, J.D. (2003) Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 6348-6357.
- Fukui, T., Shiraki, K., Hamada, D., Hara, K., Miyata, T., Fujiwara, S., Mayanagi, K., Yanagihara, K., Iida, T., Fukusaki, E., Imanaka, T., Honda, T., y Yanagihara, I. (2005) Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a bacterial reversible amyloid toxin. *Biochemistry* **44**: 9825-9832.
- Funahashi, T., Moriya, K., Uemura, S., Miyoshi, S., Shinoda, S., Narimatsu, S., y Yamamoto, S. (2002) Identification and characterization of *pvuA*, a gene encoding the ferric vibrioferrin receptor protein in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **184**: 936-946.
- García, T., Otto, K., Kjelleberg, S., y Nelson, D.R. (1997) Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1034-1039.
- Genco, C.A., Odusanya, B.M., y Brown, G. (1994) Binding and accumulation of hemin in *Porphyromonas gingivalis* are induced by hemin. *Infect Immun* **62**: 2885-2892.
- Genco, C.A., y Dixon, D.W. (2001) Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* **39**: 1-11.
- Ghigo, J.M., Létoffé, S., y Wandersman, C. (1997) A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 3572-3579.

- Giraud, E., Douet, D.G., Le Bris, H., Bouju-Albert, A., Donnay-Moreno, C., Thorin, C., y Pouliquen, H. (2006) Survey of antibiotic resistance in an integrated marine aquaculture system under oxolinic acid treatment. *FEMS Microbiol Ecol* **55**: 439-448.
- Goethals, K., Van Montagu, M., y Holsters, M. (1992) Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1646-1650.
- Goldberg, J.B., y Ohman, D.E. (1984) Cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a gene involved in the production of alginate. *J Bacteriol* **158**: 1115-1121.
- Goldberg, M.B., Boyko, S.A., y Calderwood, S.B. (1991) Positive transcriptional regulation of an iron-regulated virulence gene in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1125-1129.
- González, S.F., Osorio, C.R., y Santos, Y. (2003) Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples. *Dis Aquat Organ* **55**: 109-115.
- González, S.F., Osorio, C.R., y Santos, Y. (2004) Evaluation of the AQUARAPID-Va, AQUAEIA-Va and dot-blot assays for the detection of *Vibrio anguillarum* in fish tissues. *J Fish Dis* **27**: 617-621.
- Gray-Owen, S.D., y Schryvers, A.B. (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* **4**: 185-191.
- Grifantini, R., Sebastian, S., Frigimelica, E., Draghi, M., Bartolini, E., Muzzi, A., Rappuoli, R., Grandi, G., y Genco, C.A. (2003) Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9542-9547.
- Grisez, L., y Ollevier, F. (1995) Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 4367-4373.
- Gualerzi, C.O., y Pon, C.L. (1990) Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**: 5881-5889.
- Gudding, R., Lillehaug, A., y Evensen, O. (1999) Recent developments in fish vaccinology. *Vet Immunol Immunop* **72**: 203-212.
- Guerry, P., Perez-Casal, J., Yao, R., McVeigh, A., y Trust, T.J. (1997) A genetic locus involved in iron utilization unique to some *Campylobacter* strains. *J Bacteriol* **179**: 3997-4002.

- Gulig, P.A., Bourdage, K.L., y Starks, A.M. (2005) Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol* **43**: 118-131.
- Haddock, B.A. (1973) The reconstitution of oxidase activity in membranes derived from a 5-aminolaevulinic acid-requiring mutant of *Escherichia coli*. *Biochem J* **136**: 877-884.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**: 95-98.
- Halliwell, B., y Gutteridge, J.M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**: 1-14.
- Hantke, K. (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* **182**: 288-292.
- Haraszthy, V.I., Lally, E.T., Haraszthy, G.G., y Zambon, J.J. (2002) Molecular cloning of the *fur* gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **70**: 3170-3179.
- Hedstrom, R.C., Funk, C.R., Kaper, J.B., Pavlovskis, O.R., y Galloway, D.R. (1986) Cloning of a gene involved in regulation of exotoxin A expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **51**: 37-42.
- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C., y Fraser, C.M. (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**: 477-483.
- Heinrichs, J.H., Gatlin, L.E., Kunsch, C., Choi, G.H., y Hanson, M.S. (1999) Identification and characterization of SirA, an iron-regulated protein from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **181**: 1436-1443.
- Henderson, D.P., y Payne, S.M. (1993) Cloning and characterization of the *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin. *Mol Microbiol* **7**: 461-469.
- Henderson, D.P., y Payne, S.M. (1994a) *Vibrio cholerae* iron transport systems: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems. *Infect Immun* **62**: 5120-5125.
- Henderson, D.P., y Payne, S.M. (1994b) Characterization of the *Vibrio cholerae* outer membrane heme transport protein HutA: sequence of the gene, regulation of

- expression, and homology to the family of TonB-dependent proteins. *J Bacteriol* **176**: 3269-3277.
- Henderson, D.P., Wyckoff, E.E., Rashidi, C.E., Verlei, H., y Oldham, A.L. (2001) Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. *J Bacteriol* **183**: 2715-2723.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., y Wallace, J.C. (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6602-6606.
- Higgins, C.F. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism: an overview. *Res Microbiol* **152**: 205-210.
- Higgs, P.I., Larsen, R.A., y Postle, K. (2002) Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol Microbiol* **44**: 271-281.
- Hiney, M.P., y Smith, P.R. (1998) Validation of Polymerase Chain Reaction-based techniques for proxy detection of bacterial fish pathogens: Framework, problems and possible solutions for environmental applications. *Aquaculture* **162**: 41-68.
- Hirono, I., Masuda, T., y Aoki, T. (1996) Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microb Pathog* **21**: 173-182.
- Hirsch, P.R., y Beringer, J.E. (1984) A physical map of pPH1JI and pJB4JI. *Plasmid* **12**: 139-141.
- Hong, M., y Payne, S.M. (1997) Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance. *Mol Microbiol* **24**: 779-791.
- Hornung, J.M., Jones, H.A., y Perry, R.D. (1996) The *hmu* locus of *Yersinia pestis* is essential for utilization of free haemin and haem--protein complexes as iron sources. *Mol Microbiol* **20**: 725-739.
- Hughes, A.L., y Friedman, R. (2004) Patterns of sequence divergence in 5' intergenic spacers and linked coding regions in 10 species of pathogenic bacteria reveal distinct recombinational histories. *Genetics* **168**: 1795-1803.
- Hunt, M.D., Pettis, G.S., y McIntosh, M.A. (1994) Promoter and operator determinants for Fur-mediated iron regulation in the bidirectional *fepA-fes* control region of the *Escherichia coli* enterobactin gene system. *J Bacteriol* **176**: 3944-3955.

- Ito, H., Ito, H., Uchida, I., Sekizaki, T., y Terakado, N. (1995) A specific oligonucleotide probe based on 5S ribosomal-RNA sequences for identification of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Vet Microbiol* **43**: 167-171.
- Jacobi, C.A., Gregor, S., Rakin, A., y Heesemann, J. (2001) Expression analysis of the yersiniabactin receptor gene *fyuA* and the heme receptor *hemR* of *Yersinia enterocolitica* *in vitro* and *in vivo* using the reporter genes for green fluorescent protein and luciferase. *Infect Immun* **69**: 7772-7782.
- Jansen, R., Briaire, J., Kamp, E.M., Gielkens, A.L., y Smits, M.A. (1993) Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin III (*ApxIII*) gene. *Infect Immun* **61**: 947-954.
- Jaskula, J.C., Letain, T.E., Roof, S.K., Skare, J.T., y Postle, K. (1994) Role of the TonB amino terminus in energy transduction between membranes. *J Bacteriol* **176**: 2326-2338.
- Juiz-Río, S., Osorio, C.R., y Lemos, M.L. (2004) Identification and characterisation of the fur genes in *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* and ssp. *damsela*. *Dis Aquat Organ* **58**: 151-156.
- Juiz-Río, S., Osorio, C.R., y Lemos, M.L. (2005) Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of *hutA* pseudogenes. *Arch Microbiol* **183**: 347-358.
- Kammler, M., Schon, C., y Hantke, K. (1993) Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 6212-6219.
- Karunakaran, T., Madden, T., y Kuramitsu, H. (1997) Isolation and characterization of a hemin-regulated gene, *hemR*, from *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **179**: 1898-1908.
- Khursigara, C.M., De Crescenzo, G., Pawelek, P.D., y Coulton, J.W. (2005) Deletion of the proline-rich region of TonB disrupts formation of a 2:1 complex with FhuA, an outer membrane receptor of *Escherichia coli*. *Protein Sci* **14**: 1266-1273.
- Kim, I., Stiefel, A., Plantor, S., Angerer, A., y Braun, V. (1997) Transcription induction of the ferric citrate transport genes via the N-terminus of the FecA outer membrane protein, the Ton system and the electrochemical potential of the cytoplasmic membrane. *Mol Microbiol* **23**: 333-344.
- King, N.D., Kirby, A.E., y Connell, T.D. (2005) Transcriptional control of the *rhuIR-bhuRSTUV* heme acquisition locus in *Bordetella avium*. *Infect Immun* **73**: 1613-1624.

- Kirby, A.E., Metzger, D.J., Murphy, E.R., y Connell, T.D. (2001) Heme utilization in *Bordetella avium* is regulated by RhuI, a heme-responsive extracytoplasmic function sigma factor. *Infect Immun* **69**: 6951-6961.
- Kirby, A.E., King, N.D., y Connell, T.D. (2004) RhuR, an extracytoplasmic function sigma factor activator, is essential for heme-dependent expression of the outer membrane heme and hemoprotein receptor of *Bordetella avium*. *Infect Immun* **72**: 896-907.
- Kitatsukamoto, K., Oyaizu, H., Nanba, K., y Simidu, U. (1993) Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S ribosomal RNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* **43**: 8-19.
- Klauck, E., Bohringer, J., y Hengge-Aronis, R. (1997) The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Mol Microbiol* **25**: 559-569.
- Knauf, V.C., y Nester, E.W. (1982) Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* **8**: 45-54.
- Koster, M., van Klompenburg, W., Bitter, W., Leong, J., y Weisbeek, P. (1994) Role for the outer membrane ferric siderophore receptor PupB in signal transduction across the bacterial cell envelope. *Embo J* **13**: 2805-2813.
- Köster, W. (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* **152**: 291-301.
- Larsen, J.L., Pedersen, K., y Dalsgaard, I. (1994a) *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. *J Fish Dis* **17**: 259-267.
- Larsen, M.H., y Boesen, H.T. (2001) Role of flagellum and chemotactic motility of *Vibrio anguillarum* for phagocytosis by and intracellular survival in fish macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **203**: 149-152.
- Larsen, M.H., Larsen, J.L., y Olsen, J.E. (2001) Chemotaxis of *Vibrio anguillarum* to fish mucus: role of the origin of the fish mucus, the fish species and the serogroup of the pathogen. *FEMS Microbiol Ecol* **38**: 77-80.
- Larsen, R.A., Wood, G.E., y Postle, K. (1993) The conserved proline-rich motif is not essential for energy transduction by *Escherichia coli* TonB protein. *Mol Microbiol* **10**: 943-953.
- Larsen, R.A., Thomas, M.G., Wood, G.E., y Postle, K. (1994b) Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation (delta V17) by a missense mutation in ExbB. *Mol Microbiol* **13**: 627-640.

- Larsen, R.A., Thomas, M.G., y Postle, K. (1999) Proton-motive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol Microbiol* **31**: 1809-1824.
- Larsen, R.A., y Postle, K. (2001) Conserved residues Ser(16) and His(20) and their relative positioning are essential for TonB activity, cross-linking of TonB with ExbB, and the ability of TonB to respond to proton motive force. *J Biol Chem* **276**: 8111-8117.
- Larsen, R.A., Letain, T.E., y Postle, K. (2003) In vivo evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**: 211-218.
- Lavrrar, J.L., Christoffersen, C.A., y McIntosh, M.A. (2002) Fur-DNA interactions at the bidirectional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **322**: 983-995.
- Lavrrar, J.L., y McIntosh, M.A. (2003) Architecture of a fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* **185**: 2194-2202.
- Le, T.X., Munekage, Y., y Kato, S. (2005) Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Sci Total Environ* **349**: 95-105.
- Lee, B.C. (1991) Iron sources for *Haemophilus ducreyi*. *J Med Microbiol* **34**: 317-322.
- Lee, B.C. (1995) Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol Microbiol* **18**: 383-390.
- Lee, J.H., Park, N.Y., Lee, M.H., y Choi, S.H. (2003) Characterization of the *Vibrio vulnificus* *putAP* operon, encoding proline dehydrogenase and proline permease, and its differential expression in response to osmotic stress. *J Bacteriol* **185**: 3842-3852.
- Lemos, M.L., Salinas, P., Toranzo, A.E., Barja, J.L., y Crosa, J.H. (1988) Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **170**: 1920-1925.
- Lemos, M.L., Mazoy, R., Conchas, R.F., y Toranzo, A.E. (1991) Presence of an iron uptake mechanisms in environmental non-pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *Bull Eur Ass Fish Pathol* **11**: 150-152.
- Leoni, L., Orsi, N., de Lorenzo, V., y Visca, P. (2000) Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 1481-1491.
- Leoni, L., Ambrosi, C., Petrucca, A., y Visca, P. (2002) Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth-promoting *Pseudomonas* B10. *FEMS Microbiol Lett* **208**: 219-225.
- Lerat, E., Daubin, V., Ochman, H., y Moran, N.A. (2005) Evolutionary origins of genomic repertoires in bacteria. *PLoS Biol* **3**: e130.

- Letain, T.E., y Postle, K. (1997) TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **24**: 271-283.
- Létoffé, S., Ghigo, J.M., y Wandersman, C. (1994a) Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9876-9880.
- Létoffé, S., Ghigo, J.M., y Wandersman, C. (1994b) Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter. *J Bacteriol* **176**: 5372-5377.
- Létoffé, S., Deniau, C., Wolff, N., Dassa, E., Delepelaire, P., Lecroisey, A., y Wandersman, C. (2001) Haemophore-mediated bacterial haem transport: evidence for a common or overlapping site for haem-free and haem-loaded haemophore on its specific outer membrane receptor. *Mol Microbiol* **41**: 439-450.
- Létoffé, S., Delepelaire, P., y Wandersman, C. (2004) Free and hemophore-bound heme acquisitions through the outer membrane receptor HasR have different requirements for the TonB-ExbB-ExbD complex. *J Bacteriol* **186**: 4067-4074.
- Lin, W., Fullner, K.J., Clayton, R., Sexton, J.A., Rogers, M.B., Calia, K.E., Calderwood, S.B., Fraser, C., y Mekalanos, J.J. (1999) Identification of a vibrio cholerae RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1071-1076.
- Litwin, C.M., Boyko, S.A., y Calderwood, S.B. (1992) Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae fur* gene. *J Bacteriol* **174**: 1897-1903.
- Litwin, C.M., y Calderwood, S.B. (1993) Cloning and genetic analysis of the *Vibrio vulnificus fur* gene and construction of a fur mutant by in vivo marker exchange. *J Bacteriol* **175**: 706-715.
- Litwin, C.M., Rayback, T.W., y Skinner, J. (1996) Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence. *Infect Immun* **64**: 2834-2838.
- Litwin, C.M., y Byrne, B.L. (1998) Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization: regulation of expression and determination of the gene sequence. *Infect Immun* **66**: 3134-3141.
- Litwin, C.M., y Quackenbush, J. (2001) Characterization of a *Vibrio vulnificus* LysR homologue, HupR, which regulates expression of the haem uptake outer membrane protein, HupA. *Microb Pathog* **31**: 295-307.

- Loosmore, S.M., Yang, Y.P., Coleman, D.C., Shortreed, J.M., England, D.M., Harkness, R.E., Chong, P.S., y Klein, M.H. (1996) Cloning and expression of the *Haemophilus influenzae* transferrin receptor genes. *Mol Microbiol* **19**: 575-586.
- Macdonell, M.T., y Colwell, R.R. (1985) Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for 2 new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst Appl Microbiol* **6**: 171-182.
- Mahenthiralingam, E., y Speert, D.P. (1995) Nonopsonic phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages and polymorphonuclear leukocytes requires the presence of the bacterial flagellum. *Infect Immun* **63**: 4519-4523.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., y Iida, T. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**: 743-749.
- Martínez-Picado, J., Alsina, M., Blanch, A.R., Cerda, M., y Jofre, J. (1996) Species-specific detection of *Vibrio anguillarum* in marine aquaculture environments by selective culture and DNA hybridization. *Appl Environ Microbiol* **62**: 443-449.
- Martinsen, B., Oppegaard, H., Wichstrom, R., y Myhr, E. (1992) Temperature-dependent in vitro antimicrobial activity of 4-Quinolones and Oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 1738-1743.
- Massé, E., y Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4620-4625.
- Massé, E., Escorcía, F.E., y Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **17**: 2374-2383.
- Mazoy, R., y Lemos, M.L. (1991) Iron-binding proteins and heme compounds as iron sources for *Vibrio anguillarum*. *Curr Microbiol.* **23**: 221-226.
- Mazoy, R., y Lemos, M.L. (1996) Identification of heme-binding proteins in the cell membranes of *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiol Lett* **135**: 265-270.
- Mazoy, R., Vázquez, F., y Lemos, M.L. (1996) Isolation of heme-binding proteins from *Vibrio anguillarum* using affinity chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **141**: 19-23.
- Mazoy, R., Osorio, C.R., Toranzo, A.E., y Lemos, M.L. (2003) Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Arch Microbiol* **179**: 329-338.

- McGee, K., Horstedt, P., y Milton, D.L. (1996) Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **178**: 5188-5198.
- Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E., y Ausubel, F.M. (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**: 114-122.
- Mey, A.R., y Payne, S.M. (2001) Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Mol Microbiol* **42**: 835-849.
- Mey, A.R., y Payne, S.M. (2003) Analysis of residues determining specificity of *Vibrio cholerae* TonB1 for its receptors. *J Bacteriol* **185**: 1195-1207.
- Mey, A.R., Wyckoff, E.E., Kanukurthy, V., Fisher, C.R., y Payne, S.M. (2005) Iron and Fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of Fur in virulence. *Infect Immun* **73**: 8167-8178.
- Michel, L., Gonzalez, N., Jagdeep, S., Nguyen-Ngoc, T., y Reimmann, C. (2005) PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol Microbiol* **58**: 495-509.
- Milton, D.L., Norqvist, A., y Wolfwatz, H. (1992) cloning of a metalloprotease gene Involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **174**: 7235-7244.
- Milton, D.L., O'Toole, R., Horstedt, P., y Wolf-Watz, H. (1996) Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **178**: 1310-1319.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mills, M., y Payne, S.M. (1997) Identification of *shuA*, the gene encoding the heme receptor of *Shigella dysenteriae*, and analysis of invasion and intracellular multiplication of a *shuA* mutant. *Infect Immun* **65**: 5358-5363.
- Miyoshi, S., Inami, Y., Moriya, Y., Kamei, T., Rahman, M.M., Yamamoto, S., Tomochika, K., y Shinoda, S. (1997) Characterization of a mutant of *Vibrio vulnificus* for heme utilization. *FEMS Microbiol Lett* **148**: 101-106.
- Moeck, G.S., y Coulton, J.W. (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* **28**: 675-681.
- Morales, V.M., Backman, A., y Bagdasarian, M. (1991) A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* **97**: 39-47.

- Morton, D.J., Whitby, P.W., Jin, H., Ren, Z., y Stull, T.L. (1999) Effect of multiple mutations in the hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding proteins, HgpA, HgpB, and HgpC, of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* **67**: 2729-2739.
- Muiño, L., Lemos, M.L., y Santos, Y. (2001) Presence of high-affinity iron uptake systems in fish-isolated and environmental strains of *Vibrio anguillarum* serotype O3. *FEMS Microbiol Lett* **202**: 79-83.
- Myhr, E., Larsen, J.L., Lillehaug, A., Gudding, R., Heum, M., y Hastein, T. (1991) Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2750-2757.
- Neilands, J.B. (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**: 26723-26726.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Venter, J.C., y Fraser, C.M. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**: 323-329.
- Neugebauer, H., Herrmann, C., Kammer, W., Schwarz, G., Nordheim, A., y Braun, V. (2005) ExbBD-dependent transport of maltodextrins through the novel MalA protein across the outer membrane of *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **187**: 8300-8311.
- Nienaber, A., Hennecke, H., y Fischer, H.M. (2001) Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Microbiol* **41**: 787-800.
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 593-656.
- Norqvist, A., Norrman, B., y Wolfwatz, H. (1990) Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun* **58**: 3731-3736.
- Norqvist, A., y Wolfwatz, H. (1993) Characterization of a novel chromosomal virulence locus involved in expression of a major surface flagellar sheath antigen of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun* **61**: 2434-2444.
- O'Malley, S.M., Mouton, S.L., Occhino, D.A., Deanda, M.T., Rashidi, J.R., Fuson, K.L., Rashidi, C.E., Mora, M.Y., Payne, S.M., y Henderson, D.P. (1999) Comparison of the heme iron utilization systems of pathogenic Vibrios. *J Bacteriol* **181**: 3594-3598.

- O'Toole, R., Milton, D.L., y WolfWatz, H. (1996) Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Mol Microbiol* **19**: 625-637.
- O'Toole, R., Lundberg, S., Fredriksson, S.A., Jansson, A., Nilsson, B., y Wolf-Watz, H. (1999) The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. *J Bacteriol* **181**: 4308-4317.
- O'Toole, R., von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P.E., y Wolf-Watz, H. (2004) Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microb Pathogenesis* **37**: 41-46.
- Occhino, D.A., Wyckoff, E.E., Henderson, D.P., Wrona, T.J., y Payne, S.M. (1998) *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol Microbiol* **29**: 1493-1507.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., y Groisman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Ochman, H., Lerat, E., y Daubin, V. (2005) Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 6595-6599.
- Ochsner, U.A., y Vasil, M.L. (1996) Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4409-4414.
- Ochsner, U.A., Johnson, Z., y Vasil, M.L. (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**: 185-198.
- Olczak, T., Simpson, W., Liu, X., y Genco, C.A. (2005) Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 119-144.
- Olsen, J.E., y Larsen, J.L. (1993) Ribotypes and plasmid contents of *Vibrio anguillarum* strains in relation to serovar. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3863-3870.
- Olsson, J.C., Joborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S., y Conway, P.L. (1996) Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*? *J Fish Dis* **19**: 225-234.
- Olsson, J.C., Joborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S., y Conway, P.L. (1998) Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. *J Fish Dis* **21**: 1-9.

- Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R., y Milton, D.L. (2000) Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **182**: 2326-2328.
- Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L., y Romalde, J.L. (1999) 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2942-2946.
- Osorio, C.R., y Toranzo, A.E. (2002) DNA-based diagnostics in sea-farming. *Recent Advances in Marine Biotechnology (Seafood safety and human health)*. Vol. 7. Co., O.I.P. (ed). New Delhi, India, pp. 253-310.
- Ottemann, K.M., y Miller, J.F. (1997) Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol* **24**: 1109-1117.
- Palm, R.C., Landolt, M.L., y Busch, R.A. (1998) Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ* **33**: 157-166.
- Panek, H., y O'Brian, M.R. (2002) A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* **148**: 2273-2282.
- Panina, E.M., Mironov, A.A., y Gelfand, M.S. (2001) Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **29**: 5195-5206.
- Paquelin, A., Ghigo, J.M., Bertin, S., y Wandersman, C. (2001) Characterization of HasB, a *Serratia marcescens* TonB-like protein specifically involved in the haemophore-dependent haem acquisition system. *Mol Microbiol* **42**: 995-1005.
- Parales, R.E., y Harwood, C.S. (1993) Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram- bacteria. *Gene* **133**: 23-30.
- Paramaesvaran, M., Nguyen, K.A., Caldon, E., McDonald, J.A., Najdi, S., Gonzaga, G., Langley, D.B., DeCarlo, A., Crossley, M.J., Hunter, N., y Collyer, C.A. (2003) Porphyrin-mediated cell surface heme capture from hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **185**: 2528-2537.
- Paranjpye, R.N., Lara, J.C., Pepe, J.C., Pepe, C.M., y Strom, M.S. (1998) The type IV leader peptidase/N-methyltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for adherence to HEp-2 cells and virulence in iron-overloaded mice. *Infect Immun* **66**: 5659-5668.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van

- Vliet, A.H., Whitehead, S., y Barrell, B.G. (2000) The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* **403**: 665-668.
- Pazos, F., Santos, Y., Magariños, B., Bandín, I., Nuñez, S., y Toranzo, A.E. (1993) Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum*-related organisms. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2969-2976.
- Pearson, W.R. (2000) Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. *Methods Mol Biol* **132**: 185-219.
- Pedersen, K., Gram, L., Austin, D.A., y Austin, B. (1997) Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* serogroup O1 strains compared to plasmids, outer membrane protein profiles and siderophore production. *J Appl Microbiol* **82**: 365-371.
- Pedersen, K., Grisez, L., van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F., y Larsen, J.L. (1999) Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Curr Microbiol* **38**: 183-189.
- Pellicic, V., Reyrat, J.M., Sartori, L., Pagliaccia, C., Rappuoli, R., Telford, J.L., Montecucco, C., y Papini, E. (1999) *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin associated with the bacteria increases epithelial permeability independently of its vacuolating activity. *Microbiology* **145**: 2043-2050.
- Pérez-Rueda, E., Collado-Vides, J., y Segovia, L. (2004) Phylogenetic distribution of DNA-binding transcription factors in bacteria and Archaea. *Comput Biol Chem* **28**: 341-350.
- Perry, R.D., Shah, J., Bearden, S.W., Thompson, J.M., y Fetherston, J.D. (2003) *Yersinia pestis* TonB: role in iron, heme, and hemoprotein utilization. *Infect Immun* **71**: 4159-4162.
- Pettis, G.S., Brickman, T.J., y McIntosh, M.A. (1988) Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *fepA-fes* enterobactin region. Identification of a unique iron-regulated bidirectional promoter. *J Biol Chem* **263**: 18857-18863.
- Postle, K., y Kadner, R.J. (2003) Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol* **49**: 869-882.
- Quadri, L.E. (2000) Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases. *Mol Microbiol* **37**: 1-12.
- Ratledge, C., y Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**: 881-941.

- Ratliff, M., Zhu, W., Deshmukh, R., Wilks, A., y Stojiljkovic, I. (2001) Homologues of neisserial heme oxygenase in gram-negative bacteria: degradation of heme by the product of the *pigA* gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 6394-6403.
- Reed, L.J., y Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* **27**: 493-497.
- Rehnstam, A.S., Norqvist, A., Wolfwatz, H., y Hagstrom, A. (1989) Identification of *Vibrio anguillarum* in fish by using partial 16S-rRNA sequences and a specific 16S-rRNA oligonucleotide probe. *Appl Environ Microbiol* **55**: 1907-1910.
- Renauld-Mongenie, G., Lins, L., Krell, T., Laffly, L., Mignon, M., Dupuy, M., Delrue, R.M., Guinet-Morlot, F., Brasseur, R., y Lissolo, L. (2004) Transferrin-binding protein B of *Neisseria meningitidis*: sequence-based identification of the transferrin-binding site confirmed by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol* **186**: 850-857.
- Rodkhum, C., Hirono, I., Crosa, J.H., y Aoki, T. (2005) Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout. *Microb Pathogenesis* **39**: 109-119.
- Rodkhum, C., Hirono, I., Stork, M., Lorenzo, M., Crosa, J.H., y Aoki, T. (2006) Putative virulence-related genes in *Vibrio anguillarum* identified by random genome sequencing. *J Fish Dis* **29**: 157-166.
- Rodríguez-Ares, I. (2000) Utilización de grupos hemo como fuente de hierro en cepas de *Vibrio anguillarum* serotipos O3, O4 y O5. Tesis de Licenciatura: Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela.
- Rose, R.E. (1988) The nucleotide sequence of pACYC177. *Nucleic Acids Res.* **16**: 356-356.
- Rossi, M.S., Fetherston, J.D., Létoffé, S., Carniel, E., Perry, R.D., y Ghigo, J.M. (2001) Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **69**: 6707-6717.
- Rossi, M.S., Paquelin, A., Ghigo, J.M., y Wandersman, C. (2003) Haemophore-mediated signal transduction across the bacterial cell envelope in *Serratia marcescens*: the inducer and the transported substrate are different molecules. *Mol Microbiol* **48**: 1467-1480.
- Rouault, T.A. (2004) Microbiology. Pathogenic bacteria prefer heme. *Science* **305**: 1577-1578.
- Ruby, E.G., Urbanowski, M., Campbell, J., Dunn, A., Faini, M., Gunsalus, R., Lostroh, P., Lupp, C., McCann, J., Millikan, D., Schaefer, A., Stabb, E., Stevens, A., Visick, K., Whistler, C., y Greenberg, E.P. (2005) Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*:

- a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 3004-3009.
- Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M., y Christen, R. (1994) Phylogenetic Analysis and Assessment of the Genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* Deduced from small-subunit ribosomal-RNA Sequences. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 416-426.
- Sambrook, J., y Rusell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuelsen, O.B. (1997) Efficacy of bath-administered flumequine and oxolinic acid in the treatment of vibriosis in small Atlantic halibut. *J Aquat Anim Health* **9**: 127-131.
- Samuelsen, O.B., y Bergh, O. (2004) Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* **235**: 27-35.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Santos, Y., Pazos, F., Bandín, I., y Toranzo, A.E. (1995) Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2, and O3. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2493-2498.
- Sauter, A., Howard, S.P., y Braun, V. (2003) In vivo evidence for TonB dimerization. *J Bacteriol* **185**: 5747-5754.
- Schell, M.A. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**: 597-626.
- Schiewe, M.H., Trust, T.J., y Crosa, J.H. (1981) *Vibrio-Ordalii*-Sp-Nov a causative agent of vibriosis in fish. *Curr Microbiol* **6**: 343-348.
- Schild, S., Lamprecht, A.K., Fourestier, C., Lauriano, C.M., Klose, K.E., y Reidl, J. (2005) Characterizing lipopolysaccharide and core lipid A mutant O1 and O139 *Vibrio cholerae* strains for adherence properties on mucus-producing cell line HT29-Rev MTX and virulence in mice. *Int J Med Microbiol* **295**: 243-251.
- Schmitt, M.P. (1997a) Transcription of the *Corynebacterium diphtheriae* *hmuO* gene is regulated by iron and heme. *Infect Immun* **65**: 4634-4641.
- Schmitt, M.P. (1997b) Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J Bacteriol* **179**: 838-845.

- Schmitt, M.P. (1999) Identification of a two-component signal transduction system from *Corynebacterium diphtheriae* that activates gene expression in response to the presence of heme and hemoglobin. *J Bacteriol* **181**: 5330-5340.
- Schryvers, A.B., y Stojiljkovic, I. (1999) Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **32**: 1117-1123.
- Schwyn, B., y Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**: 47-56.
- Seliger, S.S., Mey, A.R., Valle, A.M., y Payne, S.M. (2001) The two TonB systems of *Vibrio cholerae*: redundant and specific functions. *Mol Microbiol* **39**: 801-812.
- Serkin, C.D., y Seifert, H.S. (2000) Iron availability regulates DNA recombination in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **37**: 1075-1086.
- Sexton, R., Gill, P.R., Jr., Dowling, D.N., y O'Gara, F. (1996) Transcriptional regulation of the iron-responsive sigma factor gene *pbrA*. *Mol Gen Genet* **250**: 50-58.
- Simpson, W., Olczak, T., y Genco, C.A. (2000) Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **182**: 5737-5748.
- Skare, J.T., Ahmer, B.M., Seachord, C.L., Darveau, R.P., y Postle, K. (1993) Energy transduction between membranes. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J Biol Chem* **268**: 16302-16308.
- Smith, A., Hooper, N.I., Shipulina, N., y Morgan, W.T. (1996) Heme binding by a bacterial repressor protein, the gene product of the ferric uptake regulation (*fur*) gene of *Escherichia coli*. *J Protein Chem* **15**: 575-583.
- Sørensen, U.B., y Larsen, J.L. (1986) Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl Environ Microbiol* **51**: 593-597.
- Sperandio, V., Li, C.C., y Kaper, J.B. (2002) Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun* **70**: 3085-3093.
- Staudenmaier, H., Van Hove, B., Yaraghi, Z., y 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*. *J Bacteriol* **171**: 2626-2633.

- Stevens, M.K., Porcella, S., Klesney-Tait, J., Lumbley, S., Thomas, S.E., Norgard, M.V., Radolf, J.D., y Hansen, E.J. (1996) A hemoglobin-binding outer membrane protein is involved in virulence expression by *Haemophilus ducreyi* in an animal model. *Infect Immun* **64**: 1724-1735.
- Stojiljkovic, I., y Hantke, K. (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *Embo J* **11**: 4359-4367.
- Stojiljkovic, I., y Hantke, K. (1994) Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **13**: 719-732.
- Stojiljkovic, I., Hwa, V., de Saint Martin, L., O'Gaora, P., Nassif, X., Heffron, F., y So, M. (1995) The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol Microbiol* **15**: 531-541.
- Stojiljkovic, I., Larson, J., Hwa, V., Anic, S., y So, M. (1996) HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. *J Bacteriol* **178**: 4670-4678.
- Stojiljkovic, I., y Perkins-Balding, D. (2002) Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA Cell Biol* **21**: 281-295.
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Welch, T.J., Crosa, L.M., y Crosa, J.H. (2002) Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* **48**: 222-228.
- Stroeher, U.H., Jedani, K.E., y Manning, P.A. (1998) Genetic organization of the regions associated with surface polysaccharide synthesis in *Vibrio cholerae* O1, O139 and *Vibrio anguillarum* O1 and O2: a review. *Gene* **223**: 269-282.
- Struyve, M., Moons, M., y Tommassen, J. (1991) Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* **218**: 141-148.
- Tai, S.S., Lee, C.J., y Winter, R.E. (1993) Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **61**: 5401-5405.
- Takase, H., Nitnai, H., Hoshino, K., y Otani, T. (2000) Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa* *tonB* gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infect Immun* **68**: 4498-4504.
- Tanabe, T., Funahashi, T., Nakao, H., Miyoshi, S., Shinoda, S., y Yamamoto, S. (2003) Identification and characterization of genes required for biosynthesis and transport of the siderophore vibrioferrin in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **185**: 6938-6949.

- Thompson, D.K., Beliaev, A.S., Giometti, C.S., Tollaksen, S.L., Khare, T., Lies, D.P., Neilson, K.H., Lim, H., Yates, J., 3rd, Brandt, C.C., Tiedje, J.M., y Zhou, J. (2002) Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (*fur*) mutant of *Shewanella oneidensis*: possible involvement of *fur* in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. *Appl Environ Microbiol* **68**: 881-892.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Thompson, J.M., Jones, H.A., y Perry, R.D. (1999) Molecular characterization of the hemin uptake locus (*hmu*) from *Yersinia pestis* and analysis of *hmu* mutants for hemin and hemoprotein utilization. *Infect Immun* **67**: 3879-3892.
- Tolmasky, M.E., Actis, L.A., Toranzo, A.E., Barja, J.L., y Crosa, J.H. (1985) Plasmids mediating iron uptake in *Vibrio anguillarum* strains isolated from turbot in Spain. *J Gen Microbiol* **131**: 1989-1997.
- Tolmasky, M.E., Wertheimer, A.M., Actis, L.A., y Crosa, J.H. (1994) Characterization of the *Vibrio anguillarum fur* gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. *J Bacteriol* **176**: 213-220.
- Toranzo, A.E., Barja, J.L., Potter, S.A., Colwell, R.R., Hetrick, F.M., y Crosa, J.H. (1983a) Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay. *Infect Immun* **39**: 1220-1227.
- Toranzo, A.E., Barja, J.L., Colwell, R.R., Hetrick, F.M., y Crosa, J.H. (1983b) Hemagglutinating, hemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the atlantic coast. *FEMS Microbiol Lett* **18**: 257-262.
- Toranzo, A.E., y Barja, J.L. (1990) A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the Northwest of Spain. *Dis Aquat Organ* **9**: 73-82.
- Toranzo, A.E., y Barja, J.L. (1993) Virulence factors of bacteria pathogenic for cold water fish. *Annu Rev Fish Dis* **3**: 5-36.
- Toranzo, A.E., Santos, Y., y Barja, J.L. (1997) Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. *Fish Vaccinology* **90**: 93-105.
- Toranzo, A.E., Magariños, B., y Romalde, J.L. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246**: 37-61.

- Torarinsson, E., Klenk, H.P., y Garrett, R.A. (2005) Divergent transcriptional and translational signals in *Archaea*. *Environ Microbiol* **7**: 47-54.
- Touati, D. (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**: 1-6.
- Tsolis, R.M., Baumler, A.J., Heffron, F., y Stojiljkovic, I. (1996) Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun* **64**: 4549-4556.
- Ulijasz, A.T., Andes, D.R., Glasner, J.D., y Weisblum, B. (2004) Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J Bacteriol* **186**: 8123-8136.
- Valle, O., Dorsch, M., Wiik, R., y Stackebrandt, E. (1990) Nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA from *Vibrio anguillarum*. *Syst Appl Microbiol* **13**: 257-257.
- Vanderpool, C.K., y Armstrong, S.K. (2003) Heme-responsive transcriptional activation of *Bordetella bhv* genes. *J Bacteriol* **185**: 909-917.
- Vanderpool, C.K., y Armstrong, S.K. (2004) Integration of environmental signals controls expression of *Bordetella* heme utilization genes. *J Bacteriol* **186**: 938-948.
- Vasil, M.L., Ochsner, U.A., Johnson, Z., Colmer, J.A., y Hamood, A.N. (1998) The *fur*-regulated gene encoding the alternative sigma factor PvdS is required for iron-dependent expression of the LysR-type regulator *ptxR* in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**: 6784-6788.
- Vik-Mo, F.T., Bergh, O., y Samuelsen, O.B. (2005) Efficacy of orally administered flumequine in the treatment of vibriosis caused by *Listonella anguillarum* in Atlantic cod *Gadus morhua*. *Dis Aquat Organ* **67**: 87-92.
- Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J., y Lamont, I.L. (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* **45**: 1177-1190.
- Vulic, M., Dionisio, F., Taddei, F., y Radman, M. (1997) Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9763-9767.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., y Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**: 945-951.
- Wandersman, C., y Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**: 611-647.

- Wang, R.F., y 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., y Leung, K.Y. (1998) Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in *Vibrio*-fish epithelial cell interactions. *Microbiology* **144**: 2987-3002.
- Watanabe, T., Fujihara, H., y Furukawa, K. (2003) Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J Bacteriol* **185**: 3575-3582.
- Watnick, P.I., Butterton, J.R., y Calderwood, S.B. (1998) The interaction of the *Vibrio cholerae* transcription factors, Fur and IrgB, with the overlapping promoters of two virulence genes, *irgA* and *irgB*. *Gene* **209**: 65-70.
- Webster, A.C., y Litwin, C.M. (2000) Cloning and characterization of *vuuA*, a gene encoding the *Vibrio vulnificus* ferric vulnibactin receptor. *Infect Immun* **68**: 526-534.
- Wegele, R., Tasler, R., Zeng, Y., Rivera, M., y Frankenberg-Dinkel, N. (2004) The heme oxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **279**: 45791-45802.
- Welch, T.J., Chai, S., y Crosa, J.H. (2000) The overlapping *angB* and *angG* genes are encoded within the trans-acting factor region of the virulence plasmid in *Vibrio anguillarum*: essential role in siderophore biosynthesis. *J Bacteriol* **182**: 6762-6773.
- Wertheimer, A.M., Tolmasky, M.E., Actis, L.A., y Crosa, J.H. (1994) Structural and functional analyses of mutant Fur proteins with impaired regulatory function. *J Bacteriol* **176**: 5116-5122.
- Wertheimer, A.M., Verweij, W., Chen, Q., Crosa, L.M., Nagasawa, M., Tolmasky, M.E., Actis, L.A., y Crosa, J.H. (1999) Characterization of the *angR* gene of *Vibrio anguillarum*: essential role in virulence. *Infect Immun* **67**: 6496-6509.
- Wilks, A. (2002) Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxid Redox Signal* **4**: 603-614.
- Winkelmann, G. (2002) Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans* **30**: 691-696.
- Wolf, M.K., y Crosa, J.H. (1986) Evidence for the Role of a Siderophore in Promoting *Vibrio anguillarum* Infections. *J Gen Microbiol* **132**: 2949-2952.

- Wyckoff, E.E., Stoebner, J.A., Reed, K.E., y Payne, S.M. (1997) Cloning of a *Vibrio cholerae* vibriobactin gene cluster: identification of genes required for early steps in siderophore biosynthesis. *J Bacteriol* **179**: 7055-7062.
- Wyckoff, E.E., Valle, A.M., Smith, S.L., y Payne, S.M. (1999) A multifunctional ATP-binding cassette transporter system from *Vibrio cholerae* transports vibriobactin and enterobactin. *J Bacteriol* **181**: 7588-7596.
- Wyckoff, E.E., Schmitt, M., Wilks, A., y Payne, S.M. (2004) HutZ is required for efficient heme utilization in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **186**: 4142-4151.
- Xia, Y.J., Huang, W.Q., Huang, B.C., Jin, X.H., y Zhang, R.Q. (2002) Production and characterisation of monoclonal anti-idiotypic antibody to *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immun* **12**: 273-281.
- Xia, Y.J., Wen, W.B., Huang, W.Q., y Huang, B.C. (2005) Development of a phage displayed disulfide-stabilized Fv fragment vaccine against *Vibrio anguillarum*. *Vaccine* **23**: 3174-3180.
- Yamada, M., Kabir, M.S., y Tsunedomi, R. (2003) Divergent promoter organization may be a preferred structure for gene control in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **6**: 206-210.
- Yamamoto, K., Ogasawara, H., Fujita, N., Utsumi, R., y Ishihama, A. (2002) Novel mode of transcription regulation of divergently overlapping promoters by PhoP, the regulator of two-component system sensing external magnesium availability. *Mol Microbiol* **45**: 423-438.
- Zhao, Q., y Poole, K. (2000) A second *tonB* gene in *Pseudomonas aeruginosa* is linked to the *exbB* and *exbD* genes. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 127-132.
- Zheleznova, E.E., Crosa, J.H., y Brennan, R.G. (2000) Characterization of the DNA- and metal-binding properties of *Vibrio anguillarum fur* reveals conservation of a structural Zn(2+) ion. *J Bacteriol* **182**: 6264-6267.
- Zhu, W., Wilks, A., y Stojiljkovic, I. (2000) Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the *hemO* gene of *Neisseriae* is a heme oxygenase. *J Bacteriol* **182**: 6783-6790.
- Zhu, Y., Ma, Y., Shao, M y Zhang, Y. (2004) Screening and iron supply optimization of plasmid pEIB1 cured strain of *Vibrio anguillarum* MVAV6201. *High Technology Lett* **14**: 64-67.

VIII. ANEXOS

Anexo I

Cepas bacterianas y plásmidos utilizados durante el desarrollo del presente trabajo. En ambos casos se especifica la principal aplicación de las cepas o plásmidos derivados de este estudio.

CEPAS		
	Características	Origen/Referencia
<i>Vibrio anguillarum</i>		
R82	Serotipo O1	<i>Scophthalmus maximus</i> , España
ATCC 43305	Serotipo O1	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Dinamarca
TM-14	Serotipo O1	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , España
96F	Serotipo O1	<i>Morone saxatilis</i> , USA
RV22	Serotipo O2 β	<i>Scophthalmus maximus</i> , España
43F	Serotipo O2 β	<i>Morone saxatilis</i> , USA
ATCC 43306	Serotipo O2 α	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC 1481	Serotipo O2 α	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
13A5	Serotipo O3 A	Ambiental, España
ATCC 43307	Serotipo O3 A	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Dinamarca
PT-493	Serotipo O3 A	<i>Plecoglossus altivelis</i> , Japón
11008	Serotipo O3 A	<i>Dicentrarchus labrax</i> , Francia
B.1.1. 2/4	Serotipo O3 B	Ambiental, Dinamarca
ET-208	Serotipo O3 B	<i>Anguilla japonica</i> , Japón
RPM 41.11	Serotipo O4	<i>Scophthalmus maximus</i> , España
ATCC 43308	Serotipo O4	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC43309	Serotipo O5	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC43310	Serotipo O6	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC43311	Serotipo O7	<i>Anguilla anguilla</i> , Dinamarca
ATCC43312	Serotipo O8	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC43313	Serotipo O9	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
ATCC43314	Serotipo O10	<i>Gadus morhua</i> , Dinamarca
775	Serotipo O1. Incluye el plásmido de virulencia pJM1 que codifica el sistema de captación de hierro mediante el sideróforo anguibactina; Rif ^r	<i>Oncorhynchus kisutch</i> , USA (Crosa, 1980)

H775-3	Cepa no virulenta derivada de la cepa 775, deficiente en la biosíntesis de anguibactina por curación del plásmido pJM1; Amp ^r	(Crosa, 1980)
775met11	Cepa derivada de la 775, deficiente en la biosíntesis de la proteína Fur y carente del pJM1; Rif ^r	(Tolmasky <i>et al.</i> , 1994)

Mutantes

B106	Mutante Δ huvX derivado de la cepa H775-3	Tesis
B111	Mutante Δ huvZ derivado de la cepa H775-3	Tesis
B117	Mutante Δ huvC derivado de la cepa H775-3	Tesis
B122	Mutante Δ huvD derivado de la cepa H775-3	Tesis
B128	Mutante Δ huvB derivado de la cepa H775-3	Tesis
B146	Mutante Δ huvA derivado de la cepa H775-3	Tesis
B154	Mutante Δ huv- derivado de la cepa H775-3	Tesis
B210	Mutante Δ huv- derivado de la cepa 775	Tesis
B219	Mutante Δ huvR derivado de la cepa H775-3	Tesis
B228	Mutante Δ huvR derivado de la cepa 775met11	Tesis
B249	Mutante del sistema TonB1 derivado de la cepa RV22	Tesis
B250	Mutante del sistema TonB2 derivado de la cepa RV22	Tesis
B259	Doble mutante del sistema TonB1/TonB2 derivado de la cepa RV22	Tesis
MS533	Mutante del sistema TonB1 por <i>Lambda-Red</i> (<i>tonB1::Cm^r</i>) derivada de la cepa 775	M.Stork
MS801	Mutante <i>tonB2::Kan^r</i> a partir de la cepa 775	M. Stork
MS658	Doble mutante <i>tonB1::Cm^r</i> / <i>tonB2::Kan^r</i> derivado de la cepa 775	M. Stork
B230	Mutante B146 (Δ huvA) complementado con el gen <i>huvS</i>	Tesis

Cepas para ensayos de Fusiones Transcripcionales

B191	Cepa H775-3 con el plásmido pHRP309; Gm ^r	Tesis
B194	Cepa H775-3 con el plásmido <i>phuvX::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B197	Cepa H775-3 con el plásmido <i>phuvA::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B198	Cepa H775-3 con el plásmido <i>ptonB1::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B200	Cepa H775-3 con el plásmido <i>phuvB::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B201	Cepa 775met11 con el plásmido <i>phuvA::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B202	Cepa 775met11 con el plásmido <i>ptonB1::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B203	Cepa 775met11 con el plásmido <i>phuvX::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B204	Cepa 775met11 con el plásmido pHRP309; Gm ^r	Tesis
B215	Cepa mutante B106 con el plásmido <i>phuvX::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B216	Cepa mutante B106 con el plásmido <i>phuvB::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B222	Cepa mutante B219 con el plásmido <i>phuvA::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B224	Cepa mutante B219 con el plásmido pHRP309; Gm ^r	Tesis
B231	Cepa mutante B228 con el plásmido <i>phuvA::lacZ</i> ; Gm ^r	Tesis
B234	Cepa mutante B228 con el plásmido pHRP309; Gm ^r	Tesis

<i>Vibrio cholerae</i>		
DHH11	cepa derivada de la cepa CA401 mutante del sistema TonB1 y TonB2	(Occhino <i>et al.</i> , 1998)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5a	Hospedador de clonación	Stock de Laboratorio
S17-1- λ pir	Cepa de clonación, lisogenizada con el bacteriófago λ pir (hospedadora para plásmidos π), y cepa donadora en procesos de conjugación	Stock de Laboratorio
EB53	Cepa deficiente en la biosíntesis de porfirinas (<i>aroB hemA</i>)	(Eberspacher and Braun, 1980)
101ESD	Cepa derivada de HB101, deficiente en la biosíntesis de enterobactina Δ (<i>entC-entA</i>)	J. H. Crosa
KP1032	Cepa derivada de la W3110 mutante para el sistema TonB (<i>tonB::Kan^r</i>)	(Larsen <i>et al.</i> , 1994)
B220	Cepa 101ESD complementada con el gen <i>huvS</i> de <i>V. anguillarum</i>	Tesis
Otros		
<i>Vibrio splendidus</i>	ATCC ^a 33125	Ambiental
<i>Vibrio ordalii</i>	NCIMB 2107	<i>Onchorchynchus kisutch</i> , USA
<i>Vibrio natriegens</i>	ATCC 14084	Ambiental, USA
<i>Vibrio aestuarianus</i>	ATCC 35048	Ostra, USA
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC 33812	Ambiental
<i>Vibrio nereis</i>	ATCC 25917	Ambiental, USA
<i>Vibrio proteolyticus</i>	ATCC 15338	<i>Limnoria tripunctata</i>
<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920	Ambiental
<i>Vibrio pelagius</i> (<i>Listonella pelagia</i>)	NCBM ^b 1900	Ambiental, USA
<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126	<i>Talorchestia</i> sp., USA
<i>Vibrio metschnikovi</i>	ATCC 11170	Desconocido
<i>Vibrio fischeri</i>	ATCC 7744	Desconocido
<i>Vibrio vulnificus</i>	E-11	<i>Anguilla anguilla</i> , España
<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25521	<i>Leiognathus equula</i> , Tailandia
<i>Photobacterium damsela</i> subs <i>damsela</i>	AZ 247.1	<i>Scophthalmus maximus</i> , Galicia
<i>Photobacterium damsela</i> subs <i>piscicida</i>	DI-21	<i>Sparus aurata</i> , España
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ACR 168-1	<i>Scophthalmus maximus</i> , España
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	PC961-1	<i>Scophthalmus maximus</i> , España

PLÁSMIDOS

	Características	Referencia
<i>Vectores de clonación y plásmidos generales</i>		
pVK100	Cósmido de clonación; Tet ^r Kan ^r	(Knauf and Nester, 1982)
pML1	Fragmento de 21 kb procedente de una librería génica de la cepa H775-3 en el cósmido pVK100; Tet ^r	(Mazoy <i>et al.</i> , 2003)
pGEM-T-Easy	Vector de clonación específico para productos de PCR; Amp ^r	Promega
pCR2.1-TOPO	Vector de clonación específico para productos de PCR; Kan ^r Amp ^r	Invitrogen
pWKS30	Vector de clonación; Amp ^r	(Wang and Kushner, 1991)
pACYC177	Vector de clonación; Amp ^r Kan ^r	(Rose, 1988)
pUC118	Vector de clonación; Amp ^r	Stock del Laboratorio
pMMB208	Vector de clonación; Cm ^r	(Morales <i>et al.</i> , 1991)
pRK2013	Plásmido “ <i>helper</i> ” utilizado en los apareamientos triparentales; Kan ^r	(Ditta <i>et al.</i> , 1980)
pTW-MEV	Plásmido suicida; <i>oriR6K</i> , <i>sacB</i> , Amp ^r	(Welch <i>et al.</i> , 2000)
pKEK229	Plásmido suicida derivado del pCVD442; <i>oriR6K</i> , <i>sacB</i> , Amp ^r	(Correa <i>et al.</i> , 2000)
pNidKan	pKEK229 con un fragmento <i>PstI</i> - <i>PstI</i> de 1,5 kb que contiene el gen Kan ^r del plásmido pKAN π ; Kan ^r	Tesis
pHRP309	Plásmido con el gen <i>lacZ</i> sin promotor para las fusiones transcripcionales; Gm ^r	(Parales and Harwood, 1993)
pPH1JI	Plásmido con el <i>oriRP4</i> , incompatible con pML1; Gm ^r	(Hirsch and Beringer, 1984)
pKD46	Plásmido con los genes γ , β y <i>exo</i> que codifican para el sistema Red de recombinación del fago λ	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD3	Plásmido con el gen de resistencia a cloranfenicol que sirve de molde para la obtención del producto de PCR en la recombinación <i>Lambda-Red</i> ; Cm ^r	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCAR124	Fragmento <i>Apa</i> LI de pML1 con parte de la secuencia del gen <i>huvC</i> y <i>huvD</i> clonados en pACYC177; Kan ^r	Tesis
pSML60	Sistema TonB1 de la cepa RV22 de <i>V. anguillarum</i> , amplificado por PCR y clonado en el vector pCR21-TOPO	Tesis
pSML61	Sistema TonB2 de la cepa RV22 de <i>V. anguillarum</i> , amplificado por PCR y clonado en el vector pCR2.1-TOPO	Tesis
pMS616	Sistema TonB2 de la cepa 775 de <i>V. anguillarum</i> amplificado por PCR y clonado en el plásmido pCR2.1-TOPO; Kan ^r , Amp ^r	M. Stork
pSML85	Fragmento interno del gen <i>huvR</i> obtenido por PCR y clonado en pGEM-T-Easy; Amp ^r	Tesis
pSML86	Gen <i>huvR</i> obtenido por PCR-Inversa a partir de la digestión con <i>PstI</i> y clonado en pGEM-T-Easy; Amp ^r	Tesis

pSML87	Gen <i>huvR</i> obtenido por PCR-Inversa a partir de la digestión con <i>HindIII</i> y clonado en pGEM-T-Easy; Amp ^r	Tesis
pSML88	Gen <i>huvS</i> obtenido por PCR-Inversa a partir de la digestión con <i>BssHII</i> y clonado en pGEM-T-Easy; Amp ^r	Tesis

Construcciones para la obtención de mutantes

pSML16	Copia mutante del gen <i>huvZ</i> clonado en el plásmido pNidKan; Kan ^r	Tesis
pSML17	Copia mutante del gen <i>huvX</i> clonado en el plásmido pNidKan; Kan ^r	Tesis
pSML20	Copia mutante del gen <i>huvC</i> clonado en el plásmido pNidKan; Kan ^r	Tesis
pSML21	Copia mutante del gen <i>huvB</i> clonado en el plásmido pNidKan; Kan ^r	Tesis
pSML26	Copia mutante del gen <i>huvD</i> clonado en el plásmido pNidKan; Kan ^r	Tesis
pSML30	Copia mutante del gen <i>huvA</i> clonado en el plásmido pNidKan; Kan ^r	Tesis
pSML31	Copia mutante del sistema <i>huv</i> - clonado en el plásmido pNidKan; Kan ^r	Tesis
pSML91	Copia mutante del gen <i>huvR</i> clonado en el plásmido pNidKan; Kan ^r	Tesis
pSML104	Copia mutante del sistema TonB1 de la cepa RV22 de <i>V. anguillarum</i> clonado en el plásmido pNidKan; Kan ^r	Tesis
pSML105	Copia mutante del sistema TonB2 de la cepa RV22 de <i>V. anguillarum</i> clonado en el plásmido pNidKan; Kan ^r	Tesis
pMS645	Gen <i>tonB2</i> inactivado por inserción del gen Kan ^r y clonado en pTW-MEV; Kan ^r	M. Stork

Construcciones para ensayos de Fusiones Transcripcionales

phuvA::lacZ	Región promotora de <i>huvA</i> clonada en el vector pHRP309; Gm ^r	Tesis
ptonB1::lacZ	Región promotora de <i>tonB1</i> clonada en el vector pHRP309; Gm ^r	Tesis
phuvX::lacZ	Región promotora de <i>huvX</i> clonada en el vector pHRP309; Gm ^r	Tesis
phuvB::lacZ	Región promotora de <i>huvB</i> clonada en el vector pHRP309; Gm ^r	Tesis

Construcciones para ensayos de complementación

pSML11	Fragmento <i>EcoRV</i> del pML1 con la secuencia completa de los genes <i>huvZX</i> clonada en pWKS30; Amp ^r	Tesis
pSML23	Fragmento de PCR de 9 kb que incluye el sistema completo de captación de hemo de <i>V. anguillarum</i> H775-3 y clonado en el vector pWKS30; Amp ^r	Tesis

pSML32	Fragmento <i>PstI-EcoRI</i> de pSML23 con los genes <i>huvBCD</i> clonados en pWKS30; Amp ^r	Tesis
pSML33	Fragmento <i>SacI-ApaI</i> del pSML23 que incluye los genes <i>tonB1exbB1D1</i> y <i>huvBCD</i> clonados en pWKS30; Amp ^r	Tesis
pSML34	Fragmento <i>SacI-HindIII</i> del pML1 con los genes <i>tonB1exbB1D1</i> clonados en pWKS30; Amp ^r	Tesis
pCAR115	Gen <i>huvA</i> amplificado por PCR y clonado en el vector pWKS30; Amp ^r	Tesis
pCAR121	Fragmento <i>ApaLI</i> de pML1 con el gen <i>huvA</i> clonado en el vector pACYC177; Kan ^r	Tesis
pCAR126	Fragmento <i>ApaLI</i> de pML1 con los genes completos <i>huvX</i> , <i>tonB1exbB1D1</i> y <i>huvB</i> y parte de la secuencia de <i>huvZ</i> y <i>huvC</i> , clonado en pACYC177; Kan ^r	Tesis
pCAR179	Gen <i>huvZ</i> amplificado por PCR a partir de la cepa B06 y clonado en pWKS30; Amp ^r	Tesis
pCAR181	Gen <i>huvX</i> amplificado por PCR y clonado en pWKS30; Amp ^r	Tesis
pMS789	Sistema <i>tonB2</i> de la cepa 775 clonado en pACYC177; Amp ^r	M. Stork
pSML92	Fragmento <i>ApaLI</i> con el gen <i>huvS</i> clonado en el vector pACYC177; Kan ^r	Tesis
pSML93	Fragmento <i>ApaLI</i> con el gen <i>huvS</i> clonado en el vector pMMB208; Cm ^r	Tesis

Anexo II

Cebadores utilizados durante el desarrollo del presente trabajo.

Tipo de análisis	Cebador	Secuencia de Nucleótidos (5'-3')	Tm °C
Secuenciación del <i>cluster</i> de captación de hemo de <i>V. anguillarum</i> H775-3			
	VA-huvZ1	CTCACATTTCGGACGGCCTTC	61
	VA-huvZ2	TGATATGGTTGATTTTGTGC	58
	VA-huvX1	AAGGCGCTTTCACCTCAAAT	53
	VA-tonB3	CACCGTTCACCACTTGAGGA	59
	VA-tonB4	TGGTTTGGGCTTGTGGCTC	59
	VA-tonB5	TAGTGGCGATTAATGTGATG	58
	VA-exbB	CCAAGTAAGCCTAGCAGCGGGCTG	68
	VA-exbB2	CAAGCGCCCATTGCTTTATAA	65
	VA-exbBrev	CAGCCCGCTGCTAGGCTTACTTGG	68
	VA-exbD1	TTAAGACACCGCACTCTCACT	61
	VA-exbD2	CGTTGTTAGAACAAAGCAAAG	59
	VA-huvB1	ACGTCACCTTGTTTCAGCGGCTG	70
	VA-huvB2	GAACGGATTATCAGTGCGGGC	69
	VA-huvB3	TGCAATCCATACCGACGTTA	64
	VA-huvBrev	ATCATCACCATCGATGGCCAC	69
	VA-huvC1	TTGTTGGTCGGCGCAATTTT	69
	VA-huvC2	GCATTGACTACCTTGTTGGT	59
	VA-huvC3	CTTGTGCGCTGTGACCTTAC	63
	VA-huvC1rev	AAAATTGCGCCGACCAACAA	69
	VA-huvD1	TATATTACTGGCTTGGATCG	56
	VA-huvD2	TTCTTCCTCAGCAAAGTACG	59
	VA-huvD3	ATTAGCACACCAAGAACAGT	56
	VA-huvD4	CCAATGGTCTACCCCATCTA	61
	pML1.102	GCTGGCTTTGTTGTTCCATGA	56
	M13-Forward	GTTTTCCAGTCACGAC	56
	M13-Reverse	CAGGAAACAGCTATGACCAT	59

Secuenciación gen *huvR* de *V. anguillarum* H775-3

Cebadores degenerados

hutR5'.1	MGNMGNGGNWSNTTYGC	55
hutR3'.1	ARNARRTCNGCNCNKCC	48
hutR5'.2	AGAGGCAGCTTTGCDKCDGC	66
hutR3'.2	GCTGGTGTGTCRCGHGCTGT	65

Cebadores específicos

huvR1	CGATGATGGTGCACGGCTTAG	69
huvR1rev	CTCGTTATTGCATACTCACT	54
huvR1-rev2	CTAAGCCGTGCACCATCATC	65
huvR2	GATTGCTGATTGCCCACG	67
huvR3	TCTTTCTTAACCATGACCGC	61
huvR4	CAGCGGATCTGAAGAAAAAT	60
huvR4rev	ATTTTCTTCAGATCCGCTG	61
huvR6	GAAACGCCAATAATACTCTC	55
huvR7	CGGTGTTTAACAACGCACCG	68
huvR8	TTTCAGCTCCTCGTCGGTGA	68
huvR9	GCTAAAACCGGGTGAATATC	60

Secuenciación gen *huvS* de *V. anguillarum* ET208

ET208-huvZ1	CATTGACGGCTTAAGCCAGC	66
huvS1	TAGACCAGCGCGGATGGTTA	67
huvS2	TCAAAATTAGTTGAGTCATT	51
huvS3	CGAAGACCAGCGGTAAATAT	60
huvS4	ATCAACCATTGATGCTCTAT	56
huvS5	TTAGCGGACGTATAACCAGA	59
huvS6	ACGGCTTCCATCCATGCCGC	> 72
huvS7	TATGTAAACACTTGCTTTA	50
huvS6-rev	GCTCTCGCAGAAGAAGTTTC	61

Secuenciación Sistemas TonB1/TonB2 de *V. anguillarum* RV22

RVTB1	GTGTTTGCCATGCCTGCGG	68
RVTB1-2	GTCGGGCGCGGCGCTGCTGG	> 72
RVexbD1	TATCCAACAATGGCGTTAA	55
RVTolR	TAGCTGGGGTGGTGGCGCT	69
RVHP	CTAATGCAAATTGCTGTGC	55
RVHP-2	TGTCACCTTGCTTGCGGTG	64

Construcción mutantes cromosómicos^a

<i>huvA</i> extremo 5'	HuvA.A	GCTCTAGAAAGCTTTATCAACAATTGATT	64
	HuvA.B	TCCCCCGGGGAAAGCTTTGCTTGTCGCC	> 72
<i>huvA</i> extremo 3'	HuvA.C	TCCCCCGGGAACGACTACTCTCAAGCTGAG	> 72
	HuvA.D	GCGAATTCTGGGTAAAGAGGGCGAGTTAC	> 72
<i>huvZ</i> extremo 3'	HuvZ.A	GCTCTAGAGCTTCCGTGCCCTAACTTTA	> 72
	HuvZ.B	GCGGATCCGACGGCTTAAGCCAGCTGCAA	> 72

<i>huvZ</i> extremo 5'	HuvZ.C	GCGGATCCGACGTGCGGGTTCACCTCCAA	> 72
	HuvZ.D	GCGAATTCATGATTTTACGAATTTAAAA	64
<i>huvX</i> extremo 3'	HuvX.A	GCTCTAGATGTCGATATCACCCTTACTT	68
	HuvX.B	GCGGATCCCTTTATGGGACGTGAAAGTCAT	> 72
<i>huvX</i> extremo 5'	HuvX.C	GCGGATCCCATTCCTCCCAATCCGCTAATGA	> 72
	HuvX.D	GCAAGCTTGCATCGACTAATTCGGTTGA	> 72
<i>huvB</i> extremo 5'	HuvB.A	GCTCTAGACAAGCGCCCATTCGTTTATAA	> 72
	HuvB.B	GCGGATCCGTCATTGGAGTGCAGCACGAG	> 72
<i>huvB</i> extremo 3'	HuvB.C	GCGGATCCGCTCTCGTCGGCGGGTTAGGC	> 72
	HuvB.D	GCGAATTCGTGAGTAAGAGTGCACCAAGT	> 72
<i>huvC</i> extremo 5'	HuvC.A	GCTCTAGACACGCTTTTAAAAACCGTATG	68
	HuvC.B	GCGGATCCGTCATTGGAGTGCAGCACGAG	> 72
<i>huvC</i> extremo 3'	HuvC.C	GCGGATCCATTGTGACTGCGCTGGTGGGT	> 72
	HuvC.D	GCGAATTCGCATTATAGCGAAGGGACGCG	> 72
<i>huvD</i> extremo 5'	HuvD.A	GCTCTAGACTTGTGGTCGGCGCAATTTT	> 72
	HuvD.B	GCGGATCCCTTTGCTAACTCATTCGGTTG	> 72
<i>huvD</i> extremo 3'	HuvD.C	GCGGATCCTCGTCGCTTGTGCGCCGACAT	> 72
(cebador utilizado para el diseño del mutante de todo el sistema)	HuvD.C2	TCCCCCGGGTCGTCGCTTGTGCGCCGACAT	> 72
	HuvD.D	GCGAATTCGCTCGATCAGTGATGCGGTAT	> 72
<i>huvR</i> extremo 5'	HuvR.A	GCGGATCCTCTGATATTGACACCTTTAT	69
	HuvR.B	GCGAATTCATCGCATCTAAAATATGAAG	69
<i>huvR</i> extremo 3'	HuvR.C	GCGAATTCATGGGCGAAGCAAAGTCGTGG	> 72
	HuvR.D	GCAAGCTTCGTATCCTTCCGCTAATGTT	> 72
^b Mutación <i>Lamda-Red</i> gen <i>tonB1</i> de la cepa 775	tonB1LR1	TAATAATCCCTTCATCAGAACGCTTTGTTGT - TATATGGAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	70
	tonB1LR2	AATTTCCATTGTTTGATGGCATTAAAGAGCCG - ATTCATCTACATATGAATATCCTCCTTAG	66
Sistema TonB2 de la cepa 775	exbB2U1	GCAGCGTAGAAGCGTTGGAG	58
	tonB2L1	AATGGCTTGAGTGAGGTTCT	53
Sistema TonB1 de la cepa RV22, extremo 5'	TonB1.A	GCTCTAGAGTTCTTGACGAAACTCTTGGA	66
	TonB1.B	GCGGATCCCTTCGTCATCAACGAACAAGAT	> 72
Sistema TonB1 de la cepa RV22, extremo 3'	TonB1.C	GCGGATCCAAAACCGCCGAAGTGCAGCAG	> 72
	TonB1.D	GCAAGCTTGACGAGAGCGTGCCCATCGAT	> 72
Sistema TonB2 de la cepa RV22, extremo 5'	TonB2.A	GCTCTAGAACAAAGAGCAAAATCGCAGC	71
	TonB2.B	GCGGATCCCAACAAACAGTACGCGTTTCGAT	> 72
Sistema TonB2 de la cepa RV22, extremo 3'	TonB2.C	GCGGATCCATGCAAGCGCTGAAAAAATGG	> 72
	TonB2.D	GCCTGCAGGTATTAAGTGGTGTCACGGT	> 72

Amplificación génica para la complementación en *E. coli*

HuvA-5'	GCGAATTCTGGTGACAGCAGCGGCATCC	67
HuvA-Eco-3'	GCGAATTCTAGGAGTTCATGGAACAACAAAGCC	64
PX3	GCCTTTTCTTACAATGTCC	48

Ensayos de RT-PCR^c

Operón *huvXZ*

Detección gen <i>huvZ</i>	RT- <i>huvZ</i>	TTATGCCCTTCATCAAGGT	57
	cDNA- <i>huvZ</i> 2	CCAAGAGTTTCGTCAAGAAC	55
Detección gen <i>huvX</i>	cDNA- <i>huvX</i> 1	GCTCACTAAAGAAACCAAAG	52
	cDNA- <i>huvX</i> 2	GGATTTACTTGAACAGAAAG	49

Operón *tonB1exbBD1-huvBCD*

Detección gen <i>huvD</i>	RT- <i>huvD</i>	TAGACCATTTGGGAAATCCAT	57
	cDNA- <i>huvD</i> 1	GCTTACTTCGGTGTTCGCA	64
Detección gen <i>huvC</i>	cDNA- <i>huvC</i> 1	AATATCAGCTTCAGTGACAG	50
	cDNA- <i>huvC</i> 2	AAATACTTTGCCTTTTGT	51
Detección gen <i>huvB</i>	cDNA- <i>huvB</i> 1	CACAAATCTCTTCTCATTG	51
	cDNA- <i>huvB</i> 2	AGGATAGAGCAATGCGTTA	55
Detección gen <i>exbD1</i>	cDNA- <i>exbD</i> 1	TCACTGCCAACAACCGACTC	57
	cDNA- <i>exbD</i> 2	ACTTCGGCGGTTTTGTCTGC	58
Detección gen <i>exbB1</i>	cDNA- <i>exbB</i> 1	ACTGCTTAGCCTTGGTGTGG	57
	cDNA- <i>exbB</i> 2	CCAGAATGCAGTTGATGACG	54
Detección gen <i>tonB1</i>	cDNA- <i>tonB</i> 1	AAACCCACCTCCAGAAAAG	54
	cDNA- <i>tonB</i> 2	TGGGCGAGTAACAAAAGACG	55

Operón *tolR-tonB2exbBD2-hp*

Detección gen <i>tolR</i>	TolR-1	TTATTAGCCGCGATTGCACC	63
	TolR-2	TAATAATAGTGAATCGCAG	51
Detección gen <i>exbB2</i>	ExbB2-1	TAATGAACAGCGTATTGCCA	58
	ExbB2-2	TTAATTCAAGTAGATGACAC	45
Detección gen <i>exbD2</i>	ExbD2-1	GACGCCAACCAAGAAATGAT	60
	ExbD2-2	CGCCAATGCGATATTTTCA	62
Detección gen <i>tonB2</i>	TonB2-1	TTACTGCTTGCTTTGCCAA	58
	TonB2-2	TTTGTCCTCGGCTGCTCAAT	64
Detección gen <i>hp</i>	HP-1	TGTTATCGGCTCGCTCTCTT	60
	HP-2	GTATTAAGTGGTGTCACGGT	52

Gen *huvA*

Detección gen <i>huvA</i>	RT- <i>huvA</i>	AAGGCTTGACGCCGCACCTT	72
	cDNA- <i>huvA</i> 1	CATATTGCTAGCGTTTCCC	63

Ensayos de *Primer Extension*

Promotor <i>huvA</i>	PE-huvA1	CTTCTTCTGCGAGAGCTGCA	62
	PE-huvA2	GACAGCAACAGAAGCGGCGG	69
Promotor <i>huvX</i>	PE-huvX1	TGTCGGCAATAAGGTCGGTT	63
	PE-huvX2	GGCAATGCCTGCACCACTTC	66
Promotor <i>tonB1</i>	PE-tonB	GATTTCCTCGCAGGCATGGC	55
Región intergénica <i>exbD1-huvB</i>	PE-huvB	GATGAAGAGCGTTATGGCAA	59

Ensayos de Fusiones Transcripcionales^d

Promotor <i>huvA</i>	FT-huvA1	GCGGTACCTATCAACAATTGATTGATCAA	67
	FT-huvA2	GCCCCGGGTAGTGTTTTAGTGATCATCTG	70
Promotor <i>huvX</i>	FT-huvXZ1	GCGGTACCGAGGTGGATTGATTTCCTCGCAG	< 72
	FT-huvXZ2	GCCCCGGGCATATTCATTTCCAGTTCGTT	< 72
Promotor <i>tonB1</i>	FT-TonB1	GCGGTACCATCAACAATCGCAACCATCTC	< 72
	FT-TonB2	GCCCCGGGTACTCCATATAACAACAAAG	71
Región intergénica <i>exbD1-huvB</i>	FT-huvBCD1	GCGGTACCTCATTTTTATTGTCATGGTGT	68
	FT-huvBCD2	GCCCCGGGTGTGTCATCGTGTGTACTC	< 72

Detección de *V. anguillarum*

Detección <i>tonB1</i>	TonB1.1	AAGCTCAGGTAGTACAAGAG	50
	TonB1.2	AGGGGCTGGGCGAGTAACA	60
Detección <i>exbB1</i>	ExbB1.1	TTGGCCTGATGGCCTGGCCT	63
	ExbB1.2	CGCTCTTGTTTGGTGGTGGC	59
Detección <i>exbD1</i>	ExbD1.1	CTCACTCATCCGCATTAATG	51
	ExbD1.2	GGGGCGATCACTCGCTTTGC	61

^a Las dianas de restricción para *XbaI* (TCTAGA), *BamHI* (GGATCC), *HindIII* (AAGCTT), *EcoRI* (GAATTC), *PstI* (CTGCAG) y *SmaI* (CCCGGG) se indican subrayadas dentro de la secuencia de los cebadores.

^b La porción del cebador en cursiva corresponde a los extremos del gen de resistencia al Cloranfenicol utilizado para mutagenizar el gen *tonB1* de *V. anguillarum*.

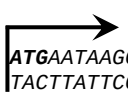
^c Los cebadores utilizados en la obtención del cDNA a partir del RNA mensajero se muestran en cursiva.

^d Las dianas de restricción para *KpnI* (GGTACC) y *SmaI* (CCCGGG) incluidas dentro de la secuencia de los cebadores se indican subrayadas

Anexo III

Secuencias de nucleótidos de las regiones caracterizadas en el presente trabajo. Las ORFs incluidas en dichas secuencias se indican en cursiva. Los codones de inicio de traducción se indican en negrita y los codones de final de lectura están subrayados. Las flechas indican la dirección de la transcripción de las diferentes ORFs.

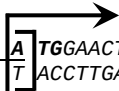
» Secuencia de nucleótidos de la región génica que incluye los genes implicados en la captación y transporte de hemo de *V. anguillarum* H775-3.

1	AAGCTTTATCAACAATTGATTGATCAAATGGCGCGCAGCTTTGCTTGATCGTCAATGTGTTGGATCCTGATGTGATAGT	80
1	TTCGAAATAGTTGTTAACTAACTAGTTTACCGCGCGTCGAAACGAACGTAGCAGTTACACAACCTAGGACTACACTATCA	80
81	GCTTGGTGGAGGATTATCAAACGTAGCATCGCTGTATGTTGATCTGCCTCGGGCAACAGCGAACTATGTTTTTCTGATA	160
81	CGAACCACCTCCTAATAGTTTGCATCGTAGCGACATACAACCTAGACGGAGCCGTTGTCGCTTGATACAAAAAGACTAT	160
161	GTGCACAGATTGTGTTTACCCAAGCGAAATATGGTGACAGCAGCGGCATCCGTGGTGCAGCTTGGCTAGGTTTGAAGTAG	240
161	CACGTGTCTAACACAAATGGGTTCGCTTTATACCACTGTCGTCGCCGTAGGCACACGTCGAACCGATCCAACTTGATC	240
241	CAGAAAGTGATTAAAGTCACAACTTTAGTCATCGAAAAATTAAGTAAAGCAAGTGTTTTACATATTAAATTACTGATATT	320
241	GTCTTTCACTAATTTCAAGTGTTGAAATCAGTAGCTTTTAAATTCATTTCGTTACAAAAATGTATAATTTAATGACTATAA	320
321	TAAACATACACTCCTAATTCTATTTATATTTACATCAACACACAAACACAAATGATAGTAATTACCATTTAGATCCAA	400
321	ATTTTGTATGTGAGGATTAAGATAAATATAAAGTGATGTTGTGTGTTGTGTTTACTATCATTAAATGGTAAATCTAGGTT	400
401	TATCATTGCGCACAGCTTGAATCTGTTATTG	480
401	ATAGTAACGCGTGTGCAACTTAGACAATAAC	480
		
401	ATGAATAAGGTAATAACTCAGATGTACACTAAACACTACTATCAGCCT	480
401	TACTATTCCATTATTGAGTCTACATGTGATTTTGTGATGATAGTCGGA	480
481	CCATATTGCTAGCGCTTTCCCCTGCAGCTCTCGCAGAAGAAGTTTCTCGATTGATGAGGTTGTTGTTTCGGCAACGCGA	560
481	GGTATAACGATCGCGAAAGGGGACGTCGAGAGCGTCTTCTTCAAAGAGCTAAGCTACTCCAACAACAAAGCCGTTGCGCT	560
561	ACTTCTCAAGCCATCAAAAATACCGCCGCTTCTGTTGCTGTCAATTTGAGCAAAAGACATTGAAGCCAATATGGCAAAAGA	640
561	TGAAGAGTTTCGGTAGTTTTATGGCGGCGAAGACAACGACAGTAAAGCTCGTTTCTGTAACCTCGGTTATACCGTTTTCT	640
641	TGTCGCAGCTATCCTTGAATATACCCCTGGAGTTTCAACCAATAGCTCATCTCGCCAAGGTGTACAGACCATCAATATTC	720
641	ACAGCGTCGATAGGAACCTATATGAGGACCTCAAAGTTGGTTATCGAGTAGAGCGGTTCCACATGTCTGGTAGTTATAAG	720
721	GCGGCGTAGAAGGTAATCGAATCAAAATCATGGTTGATGGAGTCACACAAGGACAAGCATTGACGGAGGTCCTTACTCT	800
721	CGCCGCATCTTCCATTAGCTTAGTTTTAGTACCAACTACCTCAGTGTGTTCTGTTCTGTAAGCTGCCTCCAGGAATGAGA	800

801	TTTGTCAATTCGAGCGCTATCAGTATCGATCCCGATATGGTAAAGAGTGTGAAAGTCATCAAAGGTGCGGGCTCAAGCCT	880
801	AAACAGTTAAGCTCGCGATAGTCATAGCTAGGGCTATACCATTTCTCACAACCTTCAGTAGTTTCCACGCCGCAAGTTCCGA	880
881	TCACGGCAGTGATGCCATTGGTGGTGTGTCGTCGCTTTTGACACCAAAGATCCTCGTGATTTCTTAAAGGAGACGCAACCA	960
881	AGTGCCGCTCACTACGGTAACCACCACAGCAGCGAAAAGTGTGGTTTCTAGGAGCACTAAAGGAATTTCTCTGCGTTGGT	960
961	CAGGCGGACAAGCAAAGCTTTCTACTCTTCAGAAGATAAACTTTTCAGTGAACATATTGCCATTGCAAATAGAAGTGGC	1040
961	GTCCGCCGTGTTCTGTTTCGAAAGGATGAGAAAGTCTTCTATTTAGAAAGTCACCTGTATACGGTAACGTTTATCTTCACCG	1040
1041	AATTTAGAGACCTTGGTCGCCTATACTCGCCGTGATGGGCAAGAGCAACAAAATTTTGCCGATCGTAAAGAAGATTATTC	1120
1041	TTAAATCTCTGGAACGACGCGGATAGAGCGGCACTACCCGTTCTCGTTGTTTTAAACGGCTAGCATTTCTTCTAATAAG	1120
1121	GATAGAGACTCAAGATAGTGCAAAAAATGACTTGCTACTTAAGCTCCAATATCAACTGAGCGATGCTCACCGTTTGGAGT	1200
1121	CTATCTCTGAGTTCTATCACGTTTTTACTGAACGATGAATTCGAGGTTATAGTTGACTCGCTACGAGTGGCAACCTCA	1200
1201	TCTTTGGTGAAGCACTGCATAACAAAACAGATTCTGATATCGCTCATTCCAGTTACAAAACTATCATGGTCAAGATACA	1280
1201	AGAAACCACTTCGTGACGTAATTGTTTTGTCTAAGACTATAGCGAGTAAGGTCAATGTTTTTGATAGTACCAGTTCTATGT	1280
1281	ACGAAACAGTATCGCCTTGGCATCAAACACATTTGGCTAGCTGACTCTGCCATCGCAGACACCATCACTAGCCGAGCATC	1360
1281	TGCTTTGTCTATAGCGGAACCGTAGTTTGTGTAACCGATCGACTGAGACGGTAGCGTCTGTGGTAGTGATCGGCTCGTAG	1360
1361	TTGGCAAAGCAAAGAAGATAACGGCTTAACGCACCGTTTTTCAGCCAGCATCGTCAGGAAGGCCCTCCTTACACTCCAGCCA	1440
1361	AACCGTTTCGTTTCTTCTATTGCCGAATTGCGTGGCAAAAGTCGGTCGTAGCAGTCCTTCCGGAGGAATGTGAGGTCGGT	1440
1441	ATGCGGACAACCAACAAACCAAGATTACTTCTATAATGAAGATAAAATTGAATTAGAAACGCAACTGGATAAGTTAGTT	1520
1441	TACGCCGTGTTGGTTGTTTGGTTTCTAATGAAGATATTACTTCTATTTTAACTTAATCTTTGCGTTGACCTATTCAATCAA	1520
1521	ACCTTAGGTCAAACCGAACATAAATTTATTTATGGTTTAAAGTTTTGCCAGTAGCGATATTTCAAATACCAATACAGAACT	1600
1521	TGGAATCCAGTTTGGCTTGTATTGAAATAAATAACAAATTCAAAACGGTCATCGCTATAAAGTTTATGGTTATGTCTTGA	1600
1601	CAACTCGGATCCTGCAACGCCAAATCAAGTTTTGGTTTATACACCGGATGCTACAGACCAAAAAATCGGCCTCTTTGTTT	1680
1601	GTTGAGCCTAGGACGTTGCGGTTTAGTTCAAACCAAAATATGTGGCCTACGATGCTGGTTTTTTAGCCGGAGAAACAAG	1680
1681	AAGATGAGATCACCCTTTTGAGCGGTAATTTGATTGTACACCAGGCCCTTCGTTATGATTCAATTTAGCACCGATCCCGGT	1760
1681	TTCTACTCTAGTGGGAAAACTCGCCATTAAACTAACAGTGTGGTCCGGAAGCAATACTAAGTAAATCGTGGCTAGGGCCA	1760
1761	GGTAGCACCACAGAACCCTCTCGTTAAATTTGACGATTCAGCACTCACCAGCCGTCTTGCGCACTGTACCGTATCAATAA	1840
1761	CCATCGTGGTGTCTTGGAGAGCAATTTAACTGCTAAGTCGTGAGTGGTCGGCAGAACCAGTACATGGCATAGTTATT	1840
1841	TCAACATTCAGTATTTGCTCAAGTCAGCCAAGGCTTCGGTGCCCTAACTTTACTGAGCTGTACTACACGTATGACAACA	1920
1841	AGTTGTAAAGTCATAAACGAGTTCAAGTCGGTTCCGAAGGCACGGGGATTGAAATGACTCGACATGATGTGCATATCTGTTGT	1920
1921	TTGCTCACCGTTATGTGAACGATCCAAACCCATACCTTAAGTCAGAAACAAGCTTGGCCTATGAATTGGGTTATCGTCAC	2000
1921	AACGAGTGGCAATACACTTGCTAGGTTTGGGTATGGAATTCAGTCTTTGTTTGAACCGGATACTTAACCCAATAGCAGTG	2000

2001	AATACAAACGTCTCGGCAACTGAAATTTCTGCATTTTATAGCGACTATGATGATTTTCATTGAACGAGTTACAACATAAGAA	2080
2001	TTATGTTTGCAGAGCCGTTGACTTTAAAGACGTAAAAATATCGCTGATACTACTAAAGTAAC TTGCTCAATGTTGATTCTT	2080
2081	AGTGAACGGAATAACCCACTACTCCTATGTCAACTTAAGTGAAGCGACGATCAAAGGGATTGAATTATCAAATCAATTAA	2160
2081	TCAC TTGCCTTATTGGGTGATGAGGATACAGTTGAATTCAC TTGCTGCTAGTTTCCCTAACTTAATAGTTTAGTTAATT	2160
2161	AATTGGATCAATTAATTGGAGCCCCGAATGGTATGTCAACACGCCTAGCGGCAAGTTATAGCAAAGGTGAAGATGGTAAC	2240
2161	TTAACCTAGTTAATTAACCTCGGGGCTTACCATACAGTTGTGCGGATCGCCGTTCAATATCGTTTCCACTTCTACCATTG	2240
2241	GGACGTCCATTGAACAGCGTAAACCCATGGAATGTTGTGCGAGCACTAAATTATGATGATGAAAGTACCACTTGGGGTAC	2320
2241	CCTGCAGGTAAC TTGTCGCATTTGGGTACCTTACAACAGCGTCGTGATTTAATACTACTACTTTTCATGGTGAACCCCATG	2320
2321	TAGCCTGAAAGTTGAATTATACTGCTGCGAAAGTCAGCCGGTAATATCAACCGTGACCAACTTAATAGCGGTACAGAAAACC	2400
2321	ATCGGACTTCAACTTAATATGACGACGCTTCAGTCGGCCATTATAGTTGGCACTGGTTGAATTATCGCCATGCTTTTGG	2400
2401	AAGTTGAACTGCCGAGTGCGACCATTGTGATATCACCGCTTACTTTAAACCAATGCAAGATGTCAC TATTACTGCGGGC	2480
2401	TTCAACTTGACGGCTCACGCTGGTAACAGCTATAGTGCGCAATGAAATTTGGTTACGTTCTACAGTGATAATGACGCCCG	2480
2481	ATATTTAACTTAACCGACAAAGAGTACTACCGTTGGAATGATATCCGCGGTAAACAAACTTAGATAACGACTACTCTCA	2560
2481	TATAAATTGAATTGGCTGTTTCTCATGATGGCAACCTTACTATAGGCGCCATTTTGTGTTGAATCTATTGCTGATGAGAGT	2560
2561	AGCTGAGCGTAACTATGCTATTACCGCTAAATATGAGTTT TAGCGATTAAACCATTATTACAAAGCCAGCGTTATGCTG	2640
2561	TCGACTCGCATTGATACGATAATGGCGATTTATACTCAAAATC GCTAATTTGGTAATAAGTGTTTCGGTCGCAATACGAC	2640
2641	GCTTTGTTGTTCCATGAACCTCCTCAATAAAAAAGGCTAGATAACTAGCCTTTTTCTTACAATGTCCAATGTATCTTGAGCG	2720
2641	CGAAACAACAAGGTACTTGAAGAGTTATTTTTCCGATCTATTGATCGGAAAAGAATGTTACAGGTTACATAGAACTCGC	2720
2721	ATTAAGA TTACGCGTTGGAATTTTCTTATGCCCTTCATCAAGGTGCACAAATCAACCATGTATCACCAGACACTTGA	2800
2721	TAATTCT AATGCGCAACCTTTAAAGAATACGGGAAGTAGTTCACGTGTTTTAGTTGGTACAGTAGTGGTCTGTGAAC T	2800
2801	TACGCTGCGCCAAAGCCTTTTCACATAAAGACCTTTTTCTACTTTCAACTGGAATAAAGCAAAGTCTTGCACTGGCTTAA	2880
2801	ATGCGGACCGGTTTCGGAAAGTGATTTCTGGA AAAAGATGAAAGTTGACCTTATTTTCGTTTCAGAACGTCGACCGAATT	2880
2881	GCCGTCAATGATCTCGCCAAAACGAGCTTGCAATTTGGCCAATGACTTGCTGCCATAATGGCGTTTCACGTGGTACAACAC	2960
2881	CGGCAGTTACTAGAGCGGTTTTGCTCGAACGTAAACCGGTTACTGAACGACGGTATTACCGCAAAGTGCAACCATGTTGTG	2960
2961	TCGCAACGGCGTCAAACGTCAACCGTTGACGGGCAAAAATCTGTTTTGATGAGCCTTCGTCTGCAATCATCATCAAGGAG	3040
2961	AGCGTTGCCGAGTTTGCA GTTGGCAACTGCCCGTTTTAGACAAAAC TACTCGGAAGCAGACGTTAGTAGTAGTTCC TC	3040
3041	ACGTGCGGGTTACCTCCAAGTTACGCGCATGACGAGCGATGTGCGAAATCAGCACAAAGTAACCTTCTTGTTTTGTAC	3120
3041	TGCACGCCCAAGTGAGGTTCAATGCGCGTACTGCTCGCTACACGCTTAGTCGTGTTTCATTGGAAGAACCAAAACATG	3120
3121	AAATGGCGCGTAGCTCACATTCGGACGGCCTTCAGCGTCCACTGTAGCCAATTGCAATGTACGACGTTCTTGACGAAACT	3200
3121	TTTACC GCGCATCGAGTGTAAGCCTGCGGGAAGTCGCAAGGTGACATCGGTTAACGTTACATGCTGCAAGAACTGCTTTGA	3200

3201	CTTGGATTTTCAGGTTCCAATCGTCCTTGTAAATCGCTCTTGTGTTGATCTGCTGATCCAT	GACTTTCCTCCTCGACCCTTTTCG	3280
3201	GAACCTAAAGTCCAAGGTTAGCAGGAACATTAGCGGAGAACAACTAGACGACTAGGTA	CTGAAAGAGGAGCTGGGAAAGC	3280
huvZ ←			
3281	CATTGCGTTTCAGGGCTTATCGTTATATCAATA	TTATTGGTTGGAATGAACGCTTGTGTTAGTAGCTTTAAACGTCGAC	3360
3281	GTAACGCAAGTCCGAATAGCAATATAGTTAT	AATAACCAACCTTACTTGCAGAACACATCACGAAATTTTGCACGCTG	3360
3361	TTGCTCTGCAATCAGTTCGCGCTTTTCATCTCGGCCTAGATAAAATTTTAAAAATGTTATCGCCTTGCTCACTAAAGAAAC		3440
3361	AACGAGACGTTAGTCAAGCGCGAAAAGTAGAGCCGGATCTATTTAAATTTTACAATAGCGGAACGAGTGATTTCTTTG		3440
3441	CAAAGTAATGACTTTTCAGTCCCATAAAAGGCTTGCTGACTAAAGCAACGTTGGATGGATTCCAACTTTAAGTGGCCG		3520
3441	GTTTCATTACTGAAAGTGCAGGGTATTTTCCGAACGACTGATTTTCGTTGCACAACTACCTAAGGTTGAAATTCACCGGC		3520
3521	TGTAACCTCGCCCTCTTTACCCATCAAGTTATAATAGCCACGAGCCAACCTTCCCTTTTGAAAAAGGCGCTTTCACTTCAAA		3600
3521	ACATTGAGCGGGAGAAATGGGTAGTTCAATATTATCGGTGCTCGGTTGAAGGGAAAACCTTTTCCGCGAAAAGTGAAGTTT		3600
3601	TATAGAGCCAAAAGAGTGGACAATCGTTGTGACCATTCCCCAATCCGCTAATGATTCCAACAGCGATTGAGCTTGAGCTC		3680
3601	ATATCTCGGTTTTCTCACCTGTTAGCAACACTGGTAAGGGGTTAGGCGATTACTAAGGTTGTCGCTAACTCGAACTCGAG		3680
3681	CATCAACAATCGCAACCATCTCTTTAGGCAATGCCTGCACCACTTCAAATTCAGTCACATTCAACTCTTGCGCCATCGCT		3760
3681	GTAGTTGTTAGCGTTGGTAGAGAAATCCGTTACGGACGTGGTGAAGTTTAAGTCAGTGTAAGTTGAGAACGCGGTAGCGA		3760
3761	GTCGGCAATAAGGTCGGTTGTTGCTCTAATAAAGAGGCCACTTTCTGTTCAAGTAAATCCATATTCAT	TTCCAGTTCGTT	3840
3761	CAGCCGTTATTTCAGCCAACAACGAGATTATTTCTCCGGTGAAGACAAAGTTCAATTTAGGTATAAGTA	AAGGTCAAGCAA	3840
huvX ←			
3841	CTTCGCTTTAAATCGCCTTACGCTGGCTCAGTACATCACATTAATCGCCACTAAAAACCGATCTAGTAAGTAAAATTAT		3920
3841	GAAGCGAAATTTAGCGGAATGCGACCGAGTCAATGTAGTGTAATTAGCGGTGATTTTTGGGCTAGATCATTTATTTAATA		3920
3921	GGCAAGGGTGAATTAATTCAGGTTGTTTATGATTGATTGTGTTGATCGAAAACCTGTGCTAACAAGGCATTTCTAACC		4000
3921	CCGTTCCCACTTAATTAAGTCCAACAATACTAACTAACCACTAGCTTTTGGGACACGATTGTTCCGTAAGGATTGG		4000
4001	CAGCTTTTAAATTCGTAATCATAATTTGATGCAAATGATAATGCAATTGATAATTGATCTTATTTTATGTTGAGTAA		4080
4001	GTCGAAAATTTAAGCATTTTAGTATTAACTACGTTTACTATTACGTTAACTATTAAC TAGAATAAACTACAACCTATT		4080
tonB1 →			
4081	TAATCCCTTCATCAGAACGCTTTGTTGTTAT	ATGGAGTACCACGTGAATTTCACTAGATATCTTGTGCTGGCAGTCTAT	4160
4081	ATTAGGGAAGTAGTCTTGCGAAACAACAATA	TACCTCATGGTGCCTTAAAGTGATCTATAGAACAGCGACCGTCAGATA	4160
4161	CTCTCGCGATTACGCGGCGATCTTGTTCGTTGATGACGAATCAAAAGTGTTTGCCATGCCGCGGGAAATCAATCCACC		4240
4161	GAGAGCGCTAAGTGCGCCGCTAGAACAAGCAACTACTGCTTAGTTTTTCACAAACGGTACGGACGCCCTTTAGTTAGGTGG		4240
4241	TCAGTGTCGATTAACTTTGTGGCTCAACCTCAAGCTCAGGTAGTACAAGAGCAAGCAACAAAAACCCACCTCCAGAAAA		4320
4241	AGTCACAGCTAATTGAAACACCGAGTTGGAGTTGAGTCCATCATGTTCTCGTTGTTTGGGGTGGAGGTCCTTTT		4320
4321	GAGAGCCAACAAGCCCAACAGCAAAAAAGAGCCGCAAAAAAGTGGTGCAGAAAAAGAGCCTGTCAAAACCGGTAAAAAG		4400
4321	CTCTCGGTTGTTGCGGGTTTGGTCGTTTTTCTCGGCCTTTTACCACGCTTTTTCTCGGACAGTTTTGGCCATTTTT		4400
4401	ACAAACCGGCTCCTAAAAATACCGACAAAATCAGCACAAAGTGCAAACTCTGTAAAGGAAGCTGTGACATCCTCTGTAGAG		4480
4401	TGTTTGGCCGAGGATTTTATGGCTGTTTTAGTCGTGTTACGTTTGAGGACATTTCTTCGACACTGTAGGAGACATCTC		4480

4481	AATGAAAATAGCGCTGAATCGACACCGAAAACCGCCGCCGCCCAAGCA6CAGCGGCGCAACTAATCAACCGAAATTAGT	4560
4481	TTACTTTTATCGCGACTTAGCTGTGGCTTTTGGCGGCGGCGGGTTCGTCGTCGCCGCTTGATTAGTTGGCTTTAATCA	4560
4561	CGATGCGCCGCTCTTTTGTACTCGCCAGCCCTCCTGTTTATCCAAGGCTTGACAAAAACGAGGAATTGAAGGGGTCG	4640
4561	GCTACGCGGCAGAAAACAATGAGCGGGTCGGGGAGGACAAATAGGTTCCGAACGTGTTTTGCTCCTTAACCTCCCCAGC	4640
4641	CTATGTATGAGGTGTGGTTAGACGAAAACGGCCGCCAAATCAAACAGGTTCTACTCTCTTCGTCGGGCGCGGCGCTGCTA	4720
4641	GATACATACTCCACACCAATCTGCTTTTGGCGGCGGTTAGTTTGTCCAAGATGAGAGAAGCAGCCGCGCGCGACGAT	4720
4721	GATGAATCGGCTCTTAATGCCATCAAACAATGGAAATTCCTCCTCAAGTGGTGAACGGTGAAAAAATAGCCACCGAGT	4800
4721	CTACTTAGCCGAGAATTACGGTAGTTTGTACCTTTAAGAGAGGAGTTACCACTTGCCACTTTTTTATCGGGTGGCTCA	4800
4801	GCAAAATCCAGTACGTTTTAAATTGGAAGGATA	4880
4801	CGTTTAGGGTCATGCAAAATTTAACCTTCCTAT	4880
 exbB1		
4881	GCCTCTTTTTGTCTGCTCAGCACTTGGCACCATGATCATTACTGAACGGCTTTTCCAAGTACTGCTTAGCCTTGGTGTG	4960
4881	CGGAGAAAAACAGACGAGTCGTGAACGCTGGTACTAGTAATGACTTGCCGAAAAGGTTGATGACGAATCGGAACCAAC	4960
4961	GAAAAGGTGCGATCGGTAGTGC6CTCAACCAAATATCACCGACCAATACAGCGCAAATTGAGGCGTTAGCCAGTGAATTT	5040
4961	CTTTTCCACGCTAGCCATCACGCGAGTTGGTTATAGTGGCTGGTTATGTCGCGTTTAACTCCGCAATCGGTCACTTAA	5040
5041	TCCAGCAAGCGCCCATTTGCTTTATAAAGGGGTTGCCATGCTACTTGCTCATCACGATTTCTCTAAAGGATTACGTGAAGA	5120
5041	AGGTCGTTGCGGGTAACGAAATATTTCCCCAACGGTACGATGAACGAGTAGTGCTAAAGAGATTTCTAATGCACTTCT	5120
5121	TGCGGCGGGCATTTGGTTGCAAGAAAAACGTATCAACTGCATTCTGGACTGCGTATTTTATCTTTGATTGGTGTGATCA	5200
5121	ACGCCGCCCGTAAACCAACGTTCTTTTTGCAGTAGTTGACGTAAGACCTGACGCATAAAATAGAACTAACCACACTAGT	5200
5201	GCCCCGTGCTAGGCTTACTTTGGCACTGTGTTAGGTTTGATTGAAATGTTCAAAGGGGTGGCGCTCTCTTCTGGCAATATT	5280
5201	CGGGCGACGATCCGAATGAACCGTGACACAATCCAACTAATTTACAAGTTTCCCCACGCGAGAGAAGACCGTTATAA	5280
5281	ACGCCAAACGACCTTGGCGGATGGCTAGGCATTGCGATGCGAACCACGGCTGCAGGTTTGTGATCGCACTTCCGCAAT	5360
5281	TGCGGTTTGTGGAACGCTACCGGATCCGTAAACGCTACGCTTGGTGCCGACGTCCAAACGACTAGCGTGAAAGGGCGTTA	5360
5361	TACCGGCGCTCAACTGCTTGGCGTATGGGCTGACAGAGTGATGGCAAACTTGAGCACACACTAAATTATGTCAACTTAT	5440
5361	ATGGCCGCGAGTTGACGAACCGCATACCCGACTGTCTCACTACCGTTTTGAACGTCGTGTGATTTAATACAGTTGAATA	5440
5441	GGCTCGAAGGTGTTTTCTTTACAGCATGATTGCACCACCAACAAGAGCGGGTAGCTAAGTATGAAGACGTCTCTGACAAT	5520
5441	CCGAGCTTCCACAAAGAAATGTCGTACTAACGTGGTGTTTGTCTCGCCCATCGATTCACTTCTGCAAGAGACTGTTA	5520
5521	GATGTGGTTAATGCATC	5600
5521	CTACACCAATTACGTAG	5600
 exbD1		
5521	GATGTGGTTAATGCATC	5600
5521	CTACACCAATTACGTAG	5600
5601	ATCATTTTTATTGTCATGGTGTGTTTTACTGCTTACAGCCGAGTTAAATTTGAGTCATTAGACGTTTCACTGCCAACAAC	5680
5601	TAGTAAAAATAACAGTACCACAAAAATGACGAATGTCGGCGTCAATTTAACTCAGTAATCTGCAAAGTGACGGTGTGTTG	5680

5681	CGACTCACCCACCGTGAGTGAAGTGAACAAGCAGTCAATCACAGTGAATCTTCTGGCGCACGAACCTTACTGGGCTATCG	5760
5681	GCTGAGTGGGTGGCACTCACTTCACTTGTTCGTCAAGTTAGTGTCACTTAGAAGACCGCGTGTGGAATGACCCGATAGC	5760
5761	ATGGCAAGCAGTATATCGATTGGAATAACTTTCACATTGGCGTTGTTAGAACAAGCAAAGCGAGTGATCGCCCCATCGTG	5840
5761	TACCGTTCGTCATATAGCTAACCTTATTGAAGTGTAAACCGCAACAATCTTGTTTCGTTTCGCTCACTAGCGGGGTAGCAC	5840
5841	ATTGGCGCAGACAAAACCGCCGAAGTGCAGCAGTTGGTTAAATTGCTGGCGTTCTTGCAAGACAATGGCATCGCTGCCAC	5920
5841	TAACCGCGTCTGTTTTGGCGGCTTCACGTCGTCAACCAATTTAACGACCGCAAGAACGTTCTGTTACCGTAGCGACGGTG	5920
5921	TCAGTTATTAACCGACCATCCCCAATAG	] CCTATTTCATACACGCTTTTAAAAACCGTATGATTTTCATGAGTACAACACG [A 6000
5921	AGTCAATAATTGGCTGGTAGGGGTTATC	
	GGATAAGTATGTGCGAAAAATTTTGGCATACTAAAAGTACTCATGTTGTGC	6000
	→ huvB	
6001	TGACACACAAATCTCTTTCTCATTGGCTTGTGCCATAACGCTCTTCATCTTATCACCTTGGCTCTGCGCGCAAGAACGG	6080
6001	ACTGTGTGTTTAGAGAAAGAGTAACCGAACAACGGTATTGCGAGAAGTAGAATAGTGAACCGAGACGCGCTTCTTGCC	6080
6081	ATTATCAGTGCGGGCGAGCGGGTGACCGAAATCCTCGTTGCGTTAGGCGCACAAAAATAACTTGTGCGGTGATGTAC	6160
6081	TAATAGTCACGCCCGTGCGCCACTGGCTTTAGGAGCAACGCAATCCGCGTGTATTGTAACAACGCCAGCTACAGTG	6160
6161	CAGTGAAATTCCAAACGATCTTGCTCTCCCAAAATCGGTTATCATCGCCAATTATCCGCAGAAGGATTATTAGCCTTAG	6240
6161	GTCACTTTAAGGTTTGCTAGAACGAGAGGGTTTTAGCCAATAGTAGCGGTTAATAGGCGTCTTCTTAATAATCGGAATC	6240
6241	CACCAACACAATTGATTGGTTCTAGTGAAATGGGGCCAGAAAGCACATTGCAACAGCTTAAAGGCGCTGGCGTTAACGTC	6320
6241	GTGGTTGTGTTAACTAACCAAGATCACTTTACCCCGGTCTTCGTGTAACGTTGTCGAATTTCCGCGACCGCAATTGCAG	6320
6321	GAGGTGGTGAATGATGAATCCACACCACAGGGGTTGTTGGCACGCATTGACCAATCGCGACGCTCGCTGATGCAAAGCC	6400
6321	CTCCACCACTTACTACTTAGGTGTGGTGTCCCAACAACCGTGCGTAACCTGTTAGCGCTGCGAGCGACTACGTTTCGG	6400
6401	TCAAGCTAAAGCGCTCAAACAGCAAGTTCAAAGCACAAATAGCGGCGTTAACCCACCATCAATCTACCCACAAGACTCCGA	6480
6401	AGTTCGATTTTCGCGAGTTTGTGCTCAAGTTTCGTGTTATCGCCGCAATTGGGTGGTAGTTAGATGGGTGTTCTGAGGCT	6480
6481	AAAAAGTGCTATTTCTTCTTATCCACGAAGGAAGAGCAGCCAACGTAGCGGGCAGTGACACCACGCCAAACAGCATTATT	6560
6481	TTTTTCACGATAAAGAAGAATAGGTGCTTCCTCTCGTCGGTTGCATGCCCCGCTCACTGTGGTGCGGTTTGTGTAATAA	6560
6561	GAGTTGGCTGGCGCGGTTAACCCAGCCGCTGAACAAGTGACGTCTTATAAACCCTGTCGATGGAAGCGATAATTGAGAT	6640
6561	CTCAACCGACCGCGCCAATTGGGTGCGCGACTTGTTCACTGCAGAAATTTGGTGACAGCTACCTTCGCTATTAACTCTA	6640
6641	GCAACCGGACGTGATTTTAGTCAGTGGCCGCGAGTTATGAAAACTCGGAGGAGCAGACGCCATTTTGCAATCCATACCGA	6720
6641	CGTTGGCCTGCACTAAAATCAGTCACCGGCGTCAATACTTTTGAGCCTCCTCGTCTGCGGTAAAACGTTAGGTATGGCT	6720
6721	CGTTAGTAGCAACTCCGGCTGGGATAAATAAGCAGATCATCACCATCGATGGCCACGCTCTCGTCGGCGGGTTAGGCCTT	6800
6721	GCAATCATCGTTGAGGCCGACCCTATTTATTCTGTCTAGTAGTGGTAGCTACCGGTGCGAGAGCAGCCGCCAATCCGGAA	6800
6801	AAAAGCTTGGCTGAAGCGCAACGTCTAAACGCATTGCTCTATCCTTAA	] GGAGCTTATTTTGTACGTCATCTCTCAAAAA
6801	TTTTCGAACCGACTTCGCGTTGCAGATTTGCGTAACGAGATAGGAATT	
	CCTCGAATAAAACAATGCAGTAGAGAGTTTTT	6880

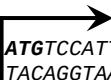
		huvC	
6881	ATGTGGTGAATGCAACGCTGTTAGTTTTGGTAATCTTAGTGAGCCTCTATTCTGTCACCGTTGGTCCA	ATGAATATCAGC	6960
6881	TACACCACCTTACGTTGCGACAATCAAAACCATTAGAATCACTCGGAGATAAGACAGTGGCAACCAGGT	TACTTATAGTCG	6960
6961	TTCAGTGACAGCATAAAAAGTCTCGTGCTGCACTCCAATGACATTGCCGCGCACATCAATTTAGTCATCCACGAGATACG		7040
6961	AAGTCACTGTCGTATTTTTAGAGCACGACGTGAGGTTACTGTAACGGCGCGTGTAGTTAAATCAGTAGGTGCTCTATGC		7040
7041	CTTTCCGCGGACCCTGCTCTGCTTGTGGTCGGCGCAATTTTGGCGCTGTGCGGAACGGTGATGCAAGGCTTGTTCGTA		7120
7041	GAAAGGCGCCTGGGACGAGACGAACAACGAGCCGCTTAAACCGCGACACGCCCTTGCCACTACGTTCCGAACAAAGCAT		7120
7121	ATCCATTAGCTGAGCCTGGCATTATCGGTGTTTCGGCAAGTTACGCCCTCGGAGCCGCACTTGCGATTGTGCTATTCGCC		7200
7121	TAGGTAATCGACTCGGACCGTAATAGCCACAAAGCCGTCCAAGTCGGGAGCCTCGGCGTGAACGCTAACACGATAAGCGG		7200
7201	AATTTAGCGCTGTTTTCCAACCCGTGGATGAGCACTGCGGTGGTACCTATTTTTGCCTTTTAGGGGGTGCATTGACTAC		7280
7201	TTAAATCGCGACAAAAGGTTGGGCACCTACTCGTGACGCCACCATGGATAAAAAACGGAAAAATCCGCCACGTAAGTATG		7280
7281	CTTGTTGGTTTACCGATTAGGCACAGTAAATTTGGTACTTCCGTCACCATCATGCTACTCGCAGGCGTCGCCATCAGCG		7360
7281	GAACAACCAATGGCTAATCCGTGGTCATTTAAACCATGAAGGCAGTGGTAGTACGATGAGCGTCCGCAAGCGGTAGTCGC		7360
7361	CGCTATCGGGGGCGGGTATTGGCTATTTGAATTATGTTGCAGACGATCAAAATGCTACGCGATCTCTCATTGTGGTCAATG		7440
7361	GCGATAGCCCCGCCATAACCGATAAACTTAATACAACGCTGCTAGTTTACGATGCGCTAGAGAGTAACACCAAGTTAC		7440
7441	GGATCACTGGCGGGTGCAAACTGGCAAAATATTCTCTTGTGCGCTGTGACCTTACTGCTGCTGCTGCTGTTTCTCTCG		7520
7441	CCTAGTGACCGCCACGTTTGACCGTTTTATAAGAGAACACGCGACACTGGAATGACGACGACGAGCAGACAAAGAGAGC		7520
7521	TCAAGCGATGGCGCTCAACGCATTATTACTTGGCGAGTCTGAAGCGCGTCATCTAGGCATTTCTGTGCAACGGCTTAAAC		7600
7521	AGTTCGCTACCGCGAGTTGCGTAATAATGAACCGCTCAGACTTCGCGCAGTAGATCCGTAAAGACACGTTGCCGAATTTG		7600
7601	GTTCAATGATTTTACTCAGCGCACTCGGCGTTGGAGTGACCGTCAGCGCGGTGGGTATGATTGGTTTTATCGGTTTAGTC		7680
7601	CAAGTTACTAAATGAGTCGCGTGAGCCGCAACCTCACTGGCAGTCGCGCCACCCATACTAACCAAAATAGCCAAATCAG		7680
7681	ATCCCTCATCTAGGCCGGATGCTGGTTGGCCCGATCACCGTAGTTTGATCCCCATTTAGCTTTACTTGGTGCACTCTT		7760
7681	TAGGGAGTAGATCCGGCCTACGACCAACCGGGGCTAGTGGCATCAAACTAGGGGTAAAGTCGAAATGAACACGTGAGAA		7760
7761	ACTCACTGTCGCCGATATGTTTGGCCGTATAGCAGTGGCACCTGCGGAGCTGCCTGTGCGGATTGTGACTGCGCTGGTGG		7840
7761	TGAGTGACAGCGGCTATACAAACGGGCATATCGTCACCGTGGACGCCCTGACGGACAGCCCTAACACTGACGCGACCAAC		7840
		huvD	
7841	GTGCACCTTTCTTCTTTATCTTCTGTTTCAACAAAAAGGCAAAATATT	TTGA	7920
7841	CACGTGGAAAGAAGGAAATAGAAGACAAAGTTGTTTTCCGTTTCATAA	AACT	7920
7921	ATATATCGGTTACATTTGGCCATCGAACCATTTTGGATAAGATTGATATTGAGATTTTTTCAGGTCAAGTCACGGCGTTA		8000
7921	TATATAGCCAATGTAAACCGGTAGCTTGGTAAACCTATTCTAACTATAACTCTAAAAAAGTCCAGTTCAAGTCCGCAAT		8000
8001	CTTGGCCCCAATGGTGCTGGAAGAAAGTACCTTGCTGAAAATACTCAGCGGTGAAATCTCATCAACAGGCAAAATGGCTTA		8080
8001	GAACCGGGGTTACCACGACCTTTTTCATGGAACGACTTTTATGAGTCGCCACTTTAGAGTAGTTGTCCGTTTTACCGAAT		8080

8081	CTTCGGTGTTCCGCAAGCGCTGTGGCAACCGAATGAGTTAGCAAAGCACTTGGCTATTCTTCCTCAGCAAAGTACGTTGA	8160
8081	GAAGCCACAAGGCGTTTCGCGACACCGTTGGCTTACTCAATCGTTTCGTGAACCGATAAGAAAGGAGTCGTTTCATGCAACT	8160
8161	GCTTTCTTTTATCGCTCAAGAAGTGGTGGAATTAGGCGCACTGCCATTAAATTTAAGCCACCAACAAGTCAGTGAAGTG	8240
8161	CGAAAGGAAAAATAGCGAGTTCTTCACCACCTTAATCCGCGTGACGGTAATTTAAATTCGGTGGTTGTTCACTCACTTCAC	8240
8241	GCACTACACTACATGCAACAAACCGATATCAGCGATAGAGCGAACAATCTCTACCCGGCTTTATCGGGTGGTGAAAAACA	8320
8241	CGTGATGTGATGTACGTTGTTTGGCTATAGTCGCTATCTCGCTTGTTAGAGATGGGCCGAAATAGCCCACCACCTTTTTGT	8320
8321	ACGTTTACATCTGGCGCGGGTATTAACCTCAACTTCACCCTCCGGTGACAAAAAATCCTGATGCTGGATGAACCAACGT	8400
8321	TGCAATGTAGACCGCGCCCATAAATTGAGTTGAAGTGGTGAGGCCACTGTTTTTTTAGGACTACGACCTACTTGGTTGCA	8400
8401	CAGCATTAGATCTGGCTCACCAGCACAATACACTGCGCATTGCACGTTCAATAGCACACCAAGAACAGTGCGCTGTTGTA	8480
8401	GTCGTAATCTAGACCGAGTGGTCGTGTTATGTGACGCGTAACGTGCAAGTAATCGTGTGGTTCTTGTCACGCGACAACAT	8480
8481	GTCGTGCTGCACGATCTCAACCTTGCGGCTCAATATGCAGATCGCATGGTGATGCTGCACAATGGCAAACCTGGTTTGTGA	8560
8481	CAGCACGACGTGCTAGAGTTGGAACGCCGAGTTATACGTCTAGCGTACCCTACGACGTGTTACCGTTTGACCAAACT	8560
8561	TGCGCCACCTTTGGGAAGCGCTCAATGCAGAAAGGATTGAGCAGGTATATGGCTACTCGTCGCTTGTCGCCGCACATCCAA	8640
8561	ACGCGGTGGAACCTTCGCGAGTTACGTCTTTCCTAACTCGTCCATATACCGATGAGCAGCGAACAGCGGCGTGAGGTT	8640
8641	CCATGGATTTCCAATGGTCTACCCCATCTAA	8720
8641	GGTACCTAAAGGGTTACCAGATGGGGTAGATT	8720
8721	AATGCGCCCCAATTCTTTATATCGTTTTTTAAAGGTACCCCATGAGTCAGTACGTCGTCGTGCACTCTATAAGTTTGT	8800
8721	TTACGCGGGGTTAAGAAATATAGCAAAAAATTTCCATGGGGTACTCAGTCATGCAGCAGACACGTGAGATATTCAAACA	8800
8801	TGAACCTCAATCACTACCAAGAGCTGCAAGCACCGCTTCTTGAACCTAATGGAGGAAAACCAAATTCGTGGCACGCTATTAT	8880
8801	ACTTGAGTTAGTGATGTTCTCGACGTTCTGTGGCGAAGAACTTGATTACCTCCTTTTGTTTTAAGCACCGTGCGATAATA	8880
8881	TAGCCAGTGAAGGAATTAACGGCACCGTGGCATCAACACGCAAGGGATAGATGTGCTACTGGCTTGCTTGATGCTGAA	8960
8881	ATCGGTCACCTTCCTTAATTGCCGTGGCACCGTAGTTGTGCGTTTCCCTATCTACACGATGACCGAACCGAACTACGACTT	8960
8961	CCGAACCTGAAAGGTACTGTTTACAAAGAATCACAAGCCTCAGAGCAGCCATTTAACCGTACCAAAGTGAAGCTAAAAAA	9040
8961	GGCTTGAACTTTCCATGACAAATGTTTCTTAGTGTTTCGGAGTCTCGTCGGTAAATTGGCATGTTTTCACTTCGATTTTTT	9040
9041	AGAGATTGTCACTATGGGCGTTGAAGGTATTGACCCTCGTCACGTTGTGGGCACTTACGTGAAACCAGAAAACTGGAATG	9120
9041	TCTCTAACAGTGATACCCGCACTTCCATAACTGGGAGCAGTGCAACACCCGTGAATGCACCTTGGTCTTTTGACCTTAC	9120
9121	CGCTAATTTTCAGACCCTGATGTGCTGGTTGTCGATACCCGTAATGATTATGAAATCCAAATCGGCACCTTCAAAAAATGCG	9200
9121	GCGATTAAAGTCTGGGACTACACGACCAACAGCTATGGGCATTACTAATACTTTAGGTTTAGCCGTGGAAGTTTTTACGC	9200
9201	CTTACCACACACTGAAACCTTTCTGTGAGTTTCTGATTATGTGAAGAAGAACCTCGCACAGAGAAACACAAAAAAGTA	9280
9201	GAATGGGTGTGTGACTTTGGAAAGCACTCAAAGGACTAATACACTTCTTCTTGGAGCGTGGTCTCTTTGTGTTTTTCAT	9280

9281	GCGATGTTTTGTACTGGCGGGATTTCGCTGTGAAAAATCCACGGCTTATTTAAAAGAGCAAGGGTTCGATGAGGTGTACCA	9360
9281	CGCTACAAAACATGACCGCCCTAAGCGACACTTTTATAGGTGCCGAATAAATTTTCTCGTTCCCAAGCTACTCCACATGGT	9360
9361	TCTCGAAGGTGGCATTGTTGAAATACTTAGAAGAAGTGCCGCAAGAAGAGAGCTTATGGCAAGGTGACTGCTATGTGTTTG	9440
9361	AGAGCTTCCACCGTAAAACTTTATGAATCTTCTTCACGGCGTTCTTCTCTCGAATACCGTTCCACTGACGATACACAAAC	9440
9441	ATGGCAGAGTGGCTGTAGGGCACGCTTTAAAAGAGAGTCACTACGATGTATGTAACGCTTGCCGTTTGCCGATTACCGAT	9520
9441	TACCGTCTCACCAGCATCCCGTGCGAAATTTTCTCTCAGTGATGCTACATACATTGCGAACGGCAAACGGCTAATGGCTA	9520
9521	GAAGACAAACAGAGCGAAGTCTACGAGCAAGGCGTCAGTTGCCCATCCTGCTTCGGTACTCACTCTGCGGAACAACTGGC	9600
9521	CTTCTGTTTGTCTCGCTTCAGATGCTCGTTCCGCAGTCAACGGGTAGGACGAAGCCATGAGTGAGACGCCTTGTGACCG	9600
9601	CCGTTTCCGTGAGCGAGAAAAATCAAGTTCAGCTCGCAAAACAGCGTGGAGAAGCACACATTTGGGCGGCGATACCGCATC	9680
9601	GGCAAAGGCACTCGCTCTTTTAGTTCAAGTCGAGCGTTTTGTGCGACCTCTTCGTGTGTAAACCCGCCGCTATGGCGTAG	9680
9681	ACTGATCGAGC	9691
9681	TGACTAGCTCG	9691

» Secuencia del gen *huvR* obtenida de *V. anguillarum* H775-3

1	TCTGATATTGACACCTTTATGAACGAAAAGTACGGTAAAAATACCATTGAATACATTAACGAGGATCTTGCTATGTGGAA	80
1	AGACTATAACTGTGAAATACTTGCTTTTCATGCCATTTTATGTTAACTTATGTAATTGCTCCTAGAACGATACACCTT	80
81	CTATTACTTCGATCCTAGTGAGAATCCAGTTATCGGTTTTGGTATGAATTTCCATTCTTCTAGTGGAATGCAGGTAGACT	160
81	GATAATGAAGCTAGGATCACTCTTAGGTCAATAGCCAAAACCATACTTAAAGGTAAGAAGATCACCTTACGTCCATCTGA	160
161	ACTTCACTGCATTATCAGAGAATTTACCTTCTCGACCTCTCACCGACGAGGAGCTGAAAGAAGTCAACCGCATCGGTGAT	240
161	TGAAGTGACGTAATAGTCTCTTAAATGGAAGAGCTGGAGAGTGCTGCTCCTCGACTTCTTCAGTTGGCGTAGCCACTA	240
241	CAGGCAAGAATGCTGCAAGAGACTCTCAAATATTGGTTGCAAATTTGCCGAGACGAGCTAGTGGTTCATTGCACGTAACAT	320
241	GTCCGTTCTTACGACGTTCTCTGAGAGTTTATAACCAACGTTTAAACGGCTCTGCTCGATCACCAGTAACGTGCATTGTA	320
321	CTAGTTCAGAACGGTCAATTAGGTCGGTCGAAATAAAAAATGGGTTGTGGCATCTGAAACACATATACACATTCATGCATT	400
321	GATCAAGTCTTGCCAGTTAATCCAGCCAGCTTTATTTTTACCAACACCGTAGACTTTGTGTATATGTGTAAGTACGTAA	400
401	CAAGAGGGACTGCCAACGCGTGCGGGCTTTAGCGCAAGTGTTTACAGTGGGTTTTTGAGTTGCGCGGTGCGTTGTTAAAC	480
401	GTTTCTCCCTGACGGTTGCGCACCGCGAAATCGCGTTTCAAAATGTCACCCAAAACTCAAGCCGCCACGCAACAATTTG	480
481	ACCGCTGTAGCTTCAAGTAGGAAGAGAATATAACAATCTAGAGTTACGGATGTGATGAAAATTACATTTTTCTGTATTC	560
481	TGGCGACATCGAAGTTTCATCTTCTTATATTGTTAGATCTCAATGCCTACACTACTTTTAATGGTAAAAAGACATAAG	560
561	ACGCTCTTTTTGAACTGAGTCGCTAAAAACGTTAGCAATACGTTAAAGCTGTCTCATATTTTTCCGGTCTGCTAGAATC	640
561	TGCGAGAAAACTTGACTCAGCGATTTTTGCAATCGTTATGCAATTTTCGACAGAGTATAAAAAGGCCAGACGATCTTAG	640

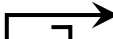
641	GCGTTGTTTCATATTTTAGCCTTTAATTTTACACACTTATCGAGGTTTTACATGGAGCTTGGATTAATCATCGTTTTTAT	720
641	CGCAACAAAGTATAAAATCGGAAATTTAAATGTGTGAATAGCTCCAAATGTACCTCGAACCTAATTAGTAGCAAAAATA	720
721	CGTGGCTGCAGCGGTTCATGGTTAAGAAAGAGATGTCAGAAAATAAGAAATAGACTCACTCATTGATAACTTTTTCTACCCC	800
721	GCACCGACGTCGCCAGTACCAATTCTTTCTCTACAGTCTTTTATTCTTTATCTGAGTGAGTAACATTGAAAAGATGGGG	800
801	TTTTTAAATGAATGTGTCTCAAAGCCAGTATTAACTGGCTTTGTTATTTCTACGATTTTTGGTTCCAAACCAGTTCTCC	880
801	AAAAATTTACTTACACAGAGTTTCGGTCATAATTTGACCGAAACAATAAAGATGCTAAAAACCAAGGTTTGGTCAAGAGG	880
881	TCGTCTATTTTCCATCCCGTCAGAGATACCACAACGATGATAAATAAGGCATACTCGTTATTGCATACTCACTGCAATTT	960
881	AGCAGATAAAAGGTAGGGCAGTCTCTATGGTGTGCTACTATTTATTCCGTATGAGCAATAACGTATGAGTGACGTAAAA	960
961	CACCAAAGG  ATGTCCATTTTGCAAAGTCCAATTACCTTAGAAGCGCTTCATATTTTAGATGCGATTGATAGACGAGGCAG	1040
961	GTGGTTTCC TACAGGTAAACGTTTCAGGTTAATGGAATCTTCGCGAAGTATAAAATCTACGCTAACTATCTGCTCCGTC	1040
1041	CTTTGCTGCGGCGGCAAATGAGCTAAGCCGTGCACCATCATCGCTGAGTTATCAGATCCAAAAATTGGAACAAGATTTAG	1120
1041	GAAACGACGCGCCCGTTTACTCGATTCCGGCAGTGGTAGTAGCGACTCAATAGTCTAGGTTTTTAACCTTGTTCTAAATC	1120
1121	ATATCACTATTTTGGACCGTTCAAGGGCATAAAGCGACGTTTACTGAAGCCGGCTTGCTCATTCTTGAGCGGGGTAGAGCC	1200
1121	TATAGTGATAAAAACTGGCAAGTCCCGTATTTTCGTGCAAAATGACTTCGGCCGAACGAGTAAGAATCGCCCCATCTCGG	1200
1201	ATTTTATCGGCGACAGAAAAATTGGTGAATGACGCAACCTTGTTAGCGAATGGTTGGGAACGGATTGACGGTGCATT	1280
1201	TAAATAGCGCTGTCTTTTAACTTACTGCGTTGGAACAATCGCTTACCAACCTTGACCTAACTGCCAGCGTAA	1280
1281	TGACGGTATTATCCCTATTCATAATTTTTTCCCAATGGTTGAAGCGTTAGGTAAATGTACAGTAAACACGAATCCGTCTTC	1360
1281	ACTGCCATAATAGGGATAAGTATTAATAAAAGGGTTACCAACTTCGCAATCCATTACAGTCATTTTGTGCTTAGGCAGAAG	1360
1361	AAGAAGAAATTTTAGCGGGGTGTTGGGAGTCACTTTCAACCGATCGAGCCGATTGCTGATTTGCCACGTATCGATACG	1440
1361	TTCTTTCTTAAATCGCCCCACAACCTCAGTGAAAGTTGGCTAGCTCGGCTAAACGACTAAACGGGTGCATAGCTATGC	1440
1441	TTACCACAAGATGTAAAGCAGAAACCATAGGAACATATGTCAATGGTTTGGGTAGCGGCCAGCTCGCATTACGCGCACAA	1520
1441	AATGGTGTCTACATTTTCGTCTTTGGTATCCTTGATACAGTTACCAAACCATCGCCGGTCGAGCGTAATGCGCGTGT	1520
1521	ACGAAGCGGTGCATTTGATGAAGAAAGCAAGGCAAAAGTATCGAGTGATTGCGATTGCCGATACCGCGCGTGACCAAGCTG	1600
1521	TGCTTCGCCACGTAACTACTTCTTCGTTCCGTTTTTCATAGCTCACTAACGCTAACGGCTATGGCGCGCACTGGTCGGAC	1600
1601	CAATGAGCGTGAATATTTTGCAAAAACAACCGCGTTTGACGGTAACATAATTCAGCGCAAAATGTGCCGCTTTAGTGGAA	1680
1601	GTTACTCGCACTTATAAAACGTTTTTGTGGCGCAAACCTGCCATTGATTAAAGTCGCGTTTTACACGGCGAAATCACCTT	1680
1681	GGGTTAGGCATTGGCACATTACCGAAACAGATAGCAGAACCATTTGATCGCCGCAAGTAACTGAAAGTAATCAGCGGATC	1760
1681	CCCAATCCGTAACCGTGAATGGCTTTGTCTATCGTCTTGGTAACTAGCGGCGTCCATTTGACTTTTCATTAGTCGCCTAG	1760
1761	TGAAGAAAAATCGATGCAGATCATTATGGCATGGCGGCGTAATAAAATGGGCGAAGCAAAGTCGTGGTGTGTGCAATACC	1840
1761	ACTTCTTTTTAGCTACGTCTAGTAATACCGTACCGCCGCAATTATTTTACCCGCTTCGTTTCAGCACCACACACGTTATGG	1840

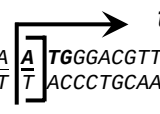
1841	TCAAGAAAACTGGACGCTAAGTTAA	AATTTTGGGCGGATCGCAGTGATCAAACCTGATCGCTACGGCT	TTATTCTGGTT	1920
1841	AGTTCTTTTGGACCTGCGATTCAATT	TTAAACCCGCTAGCGTCACTAGTTTGACTAGCGATGCCGA	AATAAGACCAA	1920
1921	TATTTAAGATCAAAACCATATCTGCCGTCCCATCTTCGAAATGCACTTCAATCTCAAAACCTAATTTTTGCGCTAGCGTC			2000
1921	ATAAATTCTAGTTTTGGTATAGACGGCAGGGTAGAAGCTTTACGTGAAGTTAGAGTTTTGGATTAAAAACGCGATCGCAG			2000
2001	AACATGCCTCGGTTGGTTGGCATGGTCATGCCGGAATTTGTAAGGTTCTTTCAAGCGACAATAGTCGATGATTTTTTG			2080
2001	TTGTACGGAGCCAACCAACCGTACCAGTACGGCTTTAAACATTCCAAGGAAAGTTCGCTGTTATCAGTACTAAAAAAC			2080
2081	CAGCAAGATTTTACCTAAACCTTTTCTTTTAAATCCGAACGGATCAAGATGGCGAACTCAGCATCGCTATTCTCAGGGT			2160
2081	GTCGTTCTAAATGGAATTTGGAAAAGGAAAATTTAGGCTTGCTAGTTCTACCGCTTGAGTCGTAGCGATAAAGAGTCCCA			2160
2161	TAATGAGTGCTCGTGAAACGCCAATAATACTCTCTTGATCATTTGGTATGATCCACTGCGACAAAAGCCATTTCTCGGTCA			2240
2161	ATTACTCACGAGCACTTTGCGGTTATTATGAGAGAAGTAGTAACCATACTAGGTGACGCTGTTTTCGGTAAAGAGCCAGT			2240
2241	TAGTCAATTTGAGTAAATTTGGCTAAGGCTTCATGGTTAAACTCGCCGACATCCGAAAAAAGCGTTTGACAAATCTTC			2320
2241	ATCAGTTAAACTCATTTTAACCGATTCCGAAGTACCAATTTGAGCGGCTGTAGGCTTTTTTCGCAACATGTTTAGAAG			2320
2321	TTTTGATACGTTACGGATAAACTCTGTCATGATGCGGCTCATCTTCGGGCAAGATTGGGCGTAAGGTTATGGCCGAGTTGT			2400
2321	AAAACTATGCAATGCCTATTTGAGACGTACTACGCCGAGTAGAAGCCGTTCTAACCAGCATTTCAATACCGGCTCAACA			2400
2401	CCTTCAGGATCACACTTTCTTCAAACCTCACTTTGGATAGGGGCGGATAGCTAATCTACTTTGTCCGTCGCCTTGGTAATCT			2480
2401	GGAAAGTCCTAGTGTGAAAGAAGTTTGAGTGAACCTATCCCCGCCATTCGATTAGATGAAACAGGCAGCGGAACCATAGA			2480
2481	TTTAGGACTAAGTTGGCATCCAATATGGTGAATTGATTGCCATTGGCTAAAACCGGGTGAATATCTAATTCATCTATTTG			2560
2481	AAATCCTGATTCAACCGTAGGTTATACCACTTAACCTAACGGTAACCGATTTTGCGCCACTTATAGATTAAGTAGATAAAC			2560
2561	TGGACATTCAATAATCATCTGCGAGATACGAACCTAAAACTCAGATAACCCATCAATATTCATTGGCTCTGGTAGTTTTT			2640
2561	ACCTGTAAAGTTATTAGTAGACGCTCTATGCTTGATTTTTGAGTCTATTGGGTAGTTATAAGTAACCGAGACCATCAAAAA			2640
2641	GCAGCCGAATTTTCCCGCTGCGTATTGCTCTGACAATCAGATAACGAGCGAGCGTCATATTCAGTGGGGGGAGTGC GGCG			2720
2641	CGTCGGCTTAAAGGGGCGACGCATAACGAGACTGTTAGTCTATTGCTCGCTCGCAGTATAAGTCACCCCTCACGCCGC			2720
2721	GCGGCATCGATTGATTCATCCATTCTGAACCACCTTGTCAGTAAAGTGACCGGGCCAAAGGTTGTATCAGTGATCAC			2800
2721	CGCCGTAGCTAACTAAGTAGGGTAAGACTTGGTGGAACAGGGTCATTTCACTGGCCCGGTTTCCAACATAGTCACTAGTG			2800
2801	TTTGATCCTGAGCTTTACCGCCAGCGAGCTTTGCCATTGCCTGAACCAATAACCCATGAACATTAGCGGAAGGATACG			2880
2801	AAACTAGGACTCGAGAAGTGGCGGTCGCTCGAAACGGTAACGGACTTGGTATTGGGTACTTGTAATCGCCTTCCTATGC			2880

←.....**Acetiltransferasa** (incompleta)

2881	AGATCTGCGTGCGATCC	2897
2881	TCTAGACGCACGCTAGG	2897

» Secuencia del operón *tolR-exbB2-exbD2-tonB2-hp* obtenida de *V. anguillarum* RV22

....→ <i>tolR</i> (incompleta)	
1	TTATTAGCCGCGATTGCACCGATGCTTGGGTTGTTAGGTACGGTGACCGGCATGATTGAAACCTTCCAAGTGATCACACA 80
1	AATAATCGGCGCTAACGTGGCTACGAACCCAACAATCCATGCCACTGGCCGTACTAAGTTTGAAGGTTCACTAGTGTGT 80
81	ATTTGGTAATGGTGATCCGAAAGTGATGGCAGGTGGTATTTCAATGGCCTTGGTGACTACCGTGCTGGGTTTAGTCTCTG 160
81	TAAACCATTACCACTAGGCTTTCACTACCGTCCACCATAAAGTTACCGGAACCACTGATGGCAGCAGCCAAATCAGAGAC 160
161	CGATTCCAAGTGTACTGGCTCACAATATCTTAAGCTCTCAAGCCGAAAAATATTCGCTCTATTTAGAAAAACAGGGGATT 240
161	GCTAAGGTGACAATGACCGAGTGTATAGAATTCGAGAGTTCGGCTTTTATAAGCGAGATAAAATCTTTTGTCCCTTAA 240
 <i>exbB2</i>	
241	GGCCTCGTTGCTGCGCAAGCAGAACAAAGA ATG CCAAGCTTCAATGAGGAATGCGGCGTAA TGAACAGCGTATTGCCAAGC 320
241	CCGGAGCAACGACGCGTTCGTCTTGTCT TACGGTTCGAAGTTACTCCTTACGCCGCACTT ACTTGTCGCATAACGGTTCG 320
321	GCACTGCTCAGCAATGACTGGCTAACAACTTGCAGCAGTTTATGCAGCAAGGGGGTATCGTCTTATGGTGGCTAGCTGG 400
321	CGTGACGAGTCGTTACTGACCGATTGTTGGAACGTCGTCAAATACGTCGTTCCCCATAGCAGAATACCACCGATCGACC 400
401	GGTGGTGGCGCTTTATTGGTTGTTGATCATCGAACGCGTACTGTTTGTGGTGGTGGAGCTTTCTAAATATCGAAAAGGGT 480
401	CCACCACCGCGAAATAACCAACAACCTAGTAGCTTGCAGATGACAAACACCACAACCTCGAAAAGGATTTATAGCTTTTCCA 480
481	GGTTAGAACAAATGGCATCAACGCACGGAACATCATTGATGGTATGCCCATGCGATTGCGGAAGGTTGGCTTGGTGAAGCA 560
481	CCAATCTTGTACCGTAGTTGCGTGCCCTTGTAGTAAGTACCATACGGGTACGCTAAGCGCTTCCAACCGAACCACTTCTG 560
561	CAGCAGATGCTGCGCCACAACCTTAACATGATCAAACCTGCTCGTCACACTTTGCCCAATGTTAGGGCTGCTCGGCACAGT 640
561	GTCGTCTACGACGCGGTGTTGGAAATTGTACTAGTTTGACGAGCAGTGTGAAACGGGTTACAATCCGACGAGCCGTGTCA 640
641	CACCGGAATGATCTCTGTGTTTGTATGTGATGGCAAATCAAGGCAGTAGCGATCCTAAATTTGATGGCATCTGGCATTTCAT 720
641	GTGGCCTTACTAGAGACACAACTACACTACCGTTTAGTTCCGTCATCGCTAGGATTTAACTACCGTAGACCGTAAAGTA 720
721	TGGCCACATTACCGACAATGGCCGGAATGGTCGCGGCCCTTGCGGGCATGTTTGTGCATGCTCGTCTGGCAAAAAAGTGT 800
721	ACCGGTGTAATGGCTGTTACCGGCCCTTACCAGCGCGGGAACGCCCGTACAAACACGTACGAGCAGACCGTTTTTTCACA 800
 <i>exbD2</i>	
801	CATCTACTTGAATTAATAATAGAAAAATCGTTAAGGAGTTTGC ATGA GATTAGGCAGACGCCAACCAAGAAATGATGAA 880
801	GTAGATGAACCTAATTTAATCTTTTGTAGCAATTCCTCAAACGC TACT CTAATCCGCTGCGGTTGGTCTTTACTACTT 880
881	GCGCAGATAGACTTAACATCGATGCTCGACATCGTCTTTATCATGCTGATTTTTTTCATTGTCACCAGCTCATTTGTTTCG 960
881	CGCGTCTATCTGAATTGTAGCTACGAGCTGTAGCAGAAATAGTACGACTAAAAAAGTAACAGTGGTCGAGTAAACAAGC 960
961	TGAATCAGGTGTTGAGGTAAACCGTCTCAAGCTTCTCACGCGGTGAGCCAGAAAGATGCGGGTATTTTTGTCGCTATCA 1040
961	ACTTAGTCCACAACCTCCAATTGGCAGGAGTTCGAAGAGTGCGCCACTCGGTCTTTCTACGCCCATAAAAACAGCGATAGT 1040
1041	ATGCATCCAATGATATTTACATCGACAAACGCTTGATTGATGTTGAGCGGTGAGAGGCCACCCTAGAACATCTGCTACTC 1120
1041	TACGTAGGTTACTATAAATGTAGCTGTTTGCAGAACTAACTACAACCTCGCACATCTCCGGTGGGATCTTGTAGACGATGAG 1120

1121	GAACAACAGATGCGGCGTTAGTGATTCAAGCGGATGAACATGCTTATAACGGTACGGTTGTTAAAGTGATGGATGCGGC	1200
1121	CTTGTTGGTCTACGCCGCAATCACTAAGTTCGCCTACTTGTACGAATATTGCCATGCCAACAAATTTACTACCTACGCCG	1200
1201	CAAAGGGGCGGAGTGAAAAATATCGCATTGGCGGCGGAGAAAGCGTTA	1280
1201	GTTTCCCGGCCCTCACTTTTTATAGCGTAACCGCCGCCTCTTCGCAAT	1280
		
1281	AGGAGCGATTTTCGCTGGCGCTGTTTCAGTTTTATGGCGTGGATGGTGGATAACGGTAACCAACACGCTGTAAACCAACTC	1360
1281	TCCTCGCTAAAGCGACCGCGACAAGTCAAAATACCGCACCTACCACCTATTGCCATTGGTTGTGCGACATTTTGTTGAG	1360
1361	AAGCACTGCGATTTAATCATGGTGATGATGGAACAAGAACACGATTTACAGCGTCGCCAACGTAGCGTTCCGGAACCTTTA	1440
1361	TTCGTGACGCTAAATTGTACCACTACTACCTTGTCTTGTGCTAAATGTGCGAGCGTTGCATCGCAAGGCCTTGGAAT	1440
1441	AAGTTGCCTGAGCCGCCACCGCAAGCACAAAGTGACACAGTCACAAACTACCGCTACGGCCGCTACATCACTCACTAGTTT	1520
1441	TTCAACGGACTCGGCGGTGGCGTTTCGTGTTCACTGTGTCAAGTGTGATGGCGATGCCGGCGATGTAGTGAGTGATCAAA	1520
1521	ACCAGCTTTGGGTTTGGATACAGCGCTTAATGGGGTGGCGATTAGCGCACCAACCTTTGGTAATTTTGGCTCAAACCAGC	1600
1521	TGGTCGAAACCCAAACCTATGTGCGCAATTACCCACCGCTAATCGCGTGGTTGGAAACCAATTAACCGAGTTTGGTCTG	1600
1601	AGGCAATGCCGTTATATCGTGTGAGCCGCTTTATCCAAGCCGAGCTCTAAAGCGAGGCGTAGAAGGTTTCGTTACATTA	1680
1601	TCCGTTACGGCAATATAGCACAGCTCGGCGAAATAGGTTTCGGCTCGAGATTTTCGCTCCGCATCTTCAAAGCAATGTAAT	1680
1681	AGCTTTACCATTGATACAACAGGAAAAAGCCGTCGACATCAATGTGTCGATGCCAATCCTAAACGTATGTTTGAGCGTGA	1760
1681	TCGAAATGGTAACATATGTTGTCTTTTCGGCAGCTGTAGTTACAGCAGCTACGGTTAGGATTTGCATACAACTCGCACT	1760
1761	AGCGATGCAAGCGCTGAAAAAATGGAAGTATCAACCTCAGATTGTTGACGGCAAAGCCATTGAGCAGCCGGGACAAACCG	1840
1761	TCGCTACGTTTCGGGACTTTTTTACCTTCATAGTTGGAGTCTAACAACCTGCCGTTTCGGTAACCTGTCGGCCCTGTTTGGC	1840
1841	TGACTGTGGAGTTTAAATCGCCAA	1920
1841	ACTGACACCTCAAAATTTAGCGGT	1920
		
1921	ATGCGAGCGAATTAAGTGCGACAACAGTCCTGAAAGTGCAAAAAGCACAGCAATTTGCATTAGAAGAGAACCTCACTCAA	2000
1921	TACGCTCGCTTAATTCACGCTGTTGTGTCAGGACTTTACGTTTTTCGTGTCGTTAAACGTAATCTTCTCTTGAGTGAGTT	2000
2001	GCCATTGAGGTACTGAGCAGTGTGAAACGTCACGCTTTACGATAAAGCATTTGTTGCCCGGATGCTTGGTGTGTTTTA	2080
2001	CGGTAACCTCCATGACTCGTCACAACCTTGCAGTGCAGAAATGCTATTTTCGTAACAACGGGCCCTACGAACACACAAAAT	2080
2081	TTGGCAAAGTGGTCAGCCCAAAGCGGCAGTCAAACAGATCAAGTACGCTGTAGAGAGTGGAGAGCTGCAAGATGAGCAGG	2160
2081	AACCGTTTCACCACTCGGGTTTCGCCGTCAAGTTGTCTAGTTTATGCGACATCTCTCACCTCTCGACGTTCTACTCGTCC	2160
2161	CATGGACCACCGAACGTATGTTGGCTGATCTGTATGTCAATGAACAACAATTTGAAAAGGCGTTACCGCACTACTACCAA	2240
2161	GTACCTGGTGGCTTGCAATACAACCGACTAGACATACAGTTACTTGTGTTAACTTTTCCGCAATGGCGTGATGATGGTT	2240
2241	TTATTGAAATCCGTTCTCTTCACAGAAAGTAGACGATCTGTGGTTGCGTATCGCACAAACCCACTACCAAATTGCACA	2320
2241	AATAACTTTAGGCAAGGAGGAAGTGTCTTTCATCTGCTAGACACCAACGCATAGCGTGTGGGTGATGGTTTAACTGTG	2320

2321	ATGGAAAAAGTGCTGCATGCGTTGGATAAATACCAAACCGTGACACCACTTAATACTAAAAATCCATTATCACTTAAAT	2400	
2321	TACCTTTTTTCACGACGTACGCAACCTATTTATGGTTTGGCACTGTGGTGAATTATGATTTTTAGGTAATAGTGAATTTA	2400	
2401	TAGGTGCGCAGCTCTGA	TGAATCCCCTAATGATTTTGGTAAAAATCATTAAAGTTAAGGTGGATACACATCTTGTCATATG	2480
2401	ATCCACGCGTCGAGACT	ACTTAGGGGATTACTAAAACCATTTTTAGTAATTCAATTCCACCTATGTGTAGAACAGTATAC	2480
2481	ATCCCGGATCCGGCTGTAAATCCGGGCAGCGCAACGGAACATTCATCAGTGTA AAAATGGAATCAATAAAGCCCTGCGCAG	2560	
2481	TAGGGCCTAGGCCGACATTAGGCCCGTCGCGTTGCCTTGTAAGTAGTCACATTTTACCTTAGTTATTTGCGGACGCGTC	2560	

Anexo IV

En el presente Anexo se exponen los artículos derivados de la presente Tesis Doctoral:

- Characterization of the heme uptake cluster genes in the bacterial fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Mouriño, S., Osorio, C. R., Lemos, M. L. *J Bacteriology* **186** (18): 6159-6167 (2004).
- Identification of the TonB Operon in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Stork, M., Di Lorenzo, M., Mouriño, S., Osorio C. R., Lemos M. L., Crosa J. H. *Infect Immun* **72** (12): 7326-7329 (2004).
- Genetic variability of the heme uptake system among different strains of the fish pathogen *Vibrio anguillarum* Identification of a new heme receptor. Mouriño, S., Rodríguez-Ares, I., Osorio, C. R., Lemos, M. *Appl Environ Microbio* **71**: 8434-8441 (2005).
- Transcriptional organization and regulation of the *Vibrio anguillarum* heme uptake cluster. Mouriño, S., Osorio, C. R., Lemos, M., Crosa, J.H. *Gene* **374**: 68-76 (2006).
- Cloning and characterization of a *Vibrio anguillarum* gene encoding a member of the LysR-family of transcriptional regulators. Mouriño, S., Osorio, C. R., Lemos, M. En preparación.
- Requirement of the TonB-ExbB-ExbD complex for high-affinity iron acquisition and infection in *Vibrio anguillarum* serotype O2. Mouriño, S., Osorio, C. R., Lemos, M. En preparación.

Characterization of Heme Uptake Cluster Genes in the Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*

Susana Mouriño, Carlos R. Osorio, and Manuel L. Lemos*

Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Aquaculture and Faculty of Biology,
University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Received 25 May 2004/Accepted 25 June 2004

Vibrio anguillarum can utilize hemin and hemoglobin as sole iron sources. In previous work we identified HuvA, the *V. anguillarum* outer membrane heme receptor by complementation of a heme utilization mutant with a cosmid clone (pML1) isolated from a genomic library of *V. anguillarum*. In the present study, we describe a gene cluster contained in cosmid pML1, coding for nine potential heme uptake and utilization proteins: HuvA, the heme receptor; HuvZ and HuvX; TonB, ExbB, and ExbD; HuvB, the putative periplasmic binding protein; HuvC, the putative inner membrane permease; and HuvD, the putative ABC transporter ATPase. A *V. anguillarum* strain with an in-frame chromosomal deletion of the nine-gene cluster was impaired for growth with heme or hemoglobin as the sole iron source. Single-gene in-frame deletions were constructed, demonstrating that each of the *huvAZBCD* genes are essential for utilization of heme as an iron source in *V. anguillarum*, whereas *huvX* is not. When expressed in *Escherichia coli* *hemA* (strain EB53), a plasmid carrying the gene for the heme receptor, HuvA, was sufficient to allow the use of heme as the porphyrin source. For utilization of heme as an iron source in *E. coli* *ent* (strain 101ESD), the *tonB exbBD* and *huvBCD* genes were required in addition to *huvA*. The *V. anguillarum* heme uptake cluster shows some differences in gene arrangement when compared to homologous clusters described for other *Vibrio* species.

Iron is an essential element for most bacteria, serving as a cofactor in key metabolic processes such as nucleotide biosynthesis, electron transfer, and energy transduction. Most bacterial pathogens require iron for growth and to establish an infection, and thus they have developed efficient mechanisms to obtain iron from the host (32). The small amounts of extracellular iron are quickly bound by high-affinity carrier proteins such as transferrin in serum and lactoferrin in secretions. *Vibrio anguillarum* is the etiological agent of a septicemic disease known as vibriosis, which affects a large number of marine fish species. Within the 10 O serogroups described by Sørensen and Larsen (35), only serotypes O1 and O2 and, to a lesser extent, serotype O3 are considered important fish pathogens. Although *V. anguillarum* is the best known fish pathogen of the genus *Vibrio*, the nature of its virulence mechanisms is not thoroughly understood. Strains of pathogenic *V. anguillarum* serotypes can acquire iron by the production and secretion of siderophores (2, 4, 16, 19, 38). Heme and some heme-containing proteins, including hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin, can also be used as iron sources by a siderophore-independent mechanism (23, 24).

In this way, many gram-negative pathogens have the ability to obtain iron through utilization of free heme or heme proteins from the host tissues (7, 18), and heme utilization genes have been identified in numerous species, including *Yersinia enterocolitica* (36, 37), *Vibrio cholerae* (13, 26, 29), *Escherichia coli* O157 (39), *Vibrio vulnificus* (20), *Plesiomonas shigelloides* (14), and *Shigella dysenteriae* (28) among others. Specific re-

ceptors are involved in heme binding and transport. Receptor-mediated uptake of heme includes translocation of the ligands into the periplasm by an energy-dependent process that requires a functional TonB system (30, 36). The TonB protein, which is anchored in the cytoplasmic membrane and associated with two accessory proteins, ExbB and ExbD, spans the periplasm and interacts with the ligand-loaded receptor. The TonB-ExbBD system is believed to be involved in transducing the energy of the proton motive force of the cytoplasmic membrane into transport energy required by the receptor. The pernicious oxidative effects of free heme dictate the presence of a periplasmic binding protein to transport heme across the periplasmic compartment. Transport of heme or iron across the cytoplasmic membrane is driven by ATP hydrolysis, and an ATP-binding cassette (ABC) transporter is commonly involved in transport through the cytoplasmic membrane (17).

In previous studies we identified HuvA, the outer membrane receptor involved in heme uptake in *V. anguillarum*. The *huvA* gene was isolated from a *V. anguillarum* H-775-3 cosmid library by its ability to restore heme utilization in 101ESD, an *E. coli* mutant strain that fails to grow under iron-limiting conditions and cannot use heme as an iron source (25). A TonB-ExbB-ExbD system has also been recently found in *V. anguillarum*. It was observed that a *tonB* mutant strain was still able to take up heme, suggesting that *V. anguillarum* may harbor two TonB systems (M. Stork, M. Di Lorenzo, S. Mouriño, C. R. Osorio, M. L. Lemos, and J. H. Crosa, unpublished data).

The goal of the present study was to identify and characterize the genes involved in heme transport in *V. anguillarum*. Sequences of the heme uptake cluster genes were determined and analyzed, and deletion mutants were constructed and tested for the ability to grow with hemin or hemoglobin as the sole iron source. Complementation of *E. coli* mutants with *V. anguillarum*

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Aquaculture and Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Spain. Phone: 34-981563100, ext. 16080. Fax: 34-981547165. E-mail: mlemos@usc.es.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference or source
<i>V. anguillarum</i> H-775-3	Serotype O1 plasmidless avirulent strain, deficient in anguibactin biosynthesis, derived from strain 775 by curing of pJM1	J. H. Crosa
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Cloning strain	Laboratory stock
SM17-1- λ pir	Cloning strain	Laboratory stock
EB53	<i>aroB hemA</i>	6
101ESD	HB101 derivative, deficient in enterobactin biosynthesis $\Delta(entC-entA)$	J. H. Crosa
Plasmids		
pGEMT-Easy	PCR cloning vector, Ap ^r	Promega
pWKS30	Low-copy-number plasmid vector, Ap ^r	41
pACYC177	Cloning vector, Ap ^r Km ^r	33
pACYC184	Cloning vector, Ap ^r Cm ^r	33
pVK100	Mobilizable cloning vector, Tc ^r Km ^r	15
pRK2013	Mobilizing plasmid for triparental mating, Km ^r	5
pKEK229	Suicide vector derived from pCVD442, Ap ^r	3
pNidKan	pKEK229 with a 1.5-kb PstI-PstI fragment containing the Km cassette from pKAN π	This study
pML1	21-kb fragment from a gene library of strain H775-3 cloned into pVK100, Tc ^r	25
pCAR121	ApaLI fragment of pML1 containing <i>huvA</i> gene cloned into pACYC177; Km ^r	This study
pCAR126	ApaLI fragment of pML1 containing <i>huvX</i> , <i>tonB-exbBD</i> , and <i>huvB</i> genes and partial <i>huvZ</i> and <i>huvC</i> genes cloned into pACYC177, Km ^r	This study
pCAR115	PCR-amplified <i>huvA</i> gene cloned into pWKS30, Ap ^r	This study
pCAR179	<i>huvZ</i> gene cloned in pWKS30, Ap ^r	This study
pCAR181	<i>huvX</i> gene cloned in pWKS30, Ap ^r	This study
pSML11	EcoRV fragment of pML1 containing complete <i>huvZX</i> genes cloned into pWKS30	This study
pSML23	9-kb PCR fragment encoding the heme uptake system of <i>V. anguillarum</i> H-775-3 cloned into pWKS30, Ap ^r	This study
pSML32	PstI-EcoRI fragment of pSML23 containing <i>huvBCD</i> genes cloned into pWKS30, Ap ^r	This study
pSML33	SacI-ApaI fragment of pSML23 containing <i>tonB-exbBD</i> and <i>huvBCD</i> genes cloned into pWKS30, Ap ^r	This study
pSML34	SacI-HindIII fragment of pML1 containing <i>tonB-exbBD</i> genes cloned into pWKS30, Ap ^r	This study

genes for restoration of heme utilization as an iron and porphyrin source was also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids, bacteria, and media. Plasmids and bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *V. anguillarum* cells were routinely grown at 25°C in tryptic soy agar (Difco) supplemented with 1% NaCl (TSA-1), as well as in M9 minimal medium (27) supplemented with 0.2% Casamino Acids (Difco) (CM9). *E. coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth, LB agar, or CM9 supplemented with antibiotics when appropriate. Strain EB53 *aroB hemA* and its derivatives were routinely grown in LB medium supplemented with 2 μ g of 5-aminolevulinic acid (ALA; Sigma) ml⁻¹. All strains were stored frozen at -80°C in LB broth with 20% glycerol. Antibiotics were used at the following final concentrations: tetracycline hydrochloride at 15 μ g ml⁻¹, kanamycin at 25 μ g ml⁻¹, and ampicillin sodium salt at 50 μ g ml⁻¹. 2,2'-Dipyridyl (Sigma), used to chelate nonheme iron, was prepared at 10 mM in ultrapure water (milli-Q; Millipore). Bovine hemin (Sigma) was dissolved at 5 mM in 10 mM NaOH. Bovine hemoglobin (Sigma) was dissolved at 1 mM in ultrapure water.

Recombinant DNA techniques. Recombinant DNA methods including restriction-enzyme digestions, ligation reactions, agarose gel electrophoresis, and plasmid analysis were performed following standard protocols (34). Chromosomal DNA was isolated by using the Easy-DNA kit (Invitrogen). Plasmid purification and elution of DNA fragments from agarose gels were performed with kits from QIAGEN. Southern blot analyses were performed with Hybond-N+ membranes (Amersham Biosciences), using the ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection system (Amersham Biosciences), following the manufacturer's instructions. *E. coli* strains were transformed by a standard calcium chloride method (34). Triparental mating for transfer of cosmid pML1 into *E. coli* EB53 was performed as described previously (8). *E. coli* strain HB101 harboring the helper plasmid pRK2013 was used as a mobilizing strain (5).

DNA sequencing and data analysis. DNA sequences were determined by the dideoxy-chain termination method by using the Big Dye Terminator v3.0 DNA sequencing kit (Applied Biosystems) on an automated sequencer, ABI 377 (Ap-

plied Biosystems). Restriction maps were generated and DNA translation was performed with the BioEdit Sequence Alignment Editor (11). Homologies of the deduced amino acid sequences were determined by consulting the EMBL and SWALL databases, using the FASTA3 and BLAST algorithms, at the European Bioinformatics Institute website.

Construction of chromosomal mutations. Gene deletions in *V. anguillarum* H-775-3 were constructed by using PCR amplifications of two fragments of each gene, which when ligated together would result in an in-frame (nonpolar) deletion. Amplification was carried out using the Expand High Fidelity PCR system (Roche). The oligonucleotides used to amplify the carboxy- and amino-terminal fragments of each gene are listed in Table 2. Construction of an in-frame *huvAZXBCD tonB exbBD* mutant was accomplished by ligating the PCR products obtained with primer pairs HuvA.A-HuvA.B and HuvD.C2-HuvD.D. Allelic exchange was carried out using the suicide vector pNidKan. Plasmid pKEK229 (3) was cut with PstI, and a kanamycin resistance cassette (Genblock; Pharmacia) was inserted, producing pNidKan. As a pCVD442 derivative, pNidKan contains R6K *ori*, requiring the *pir* gene product for replication, and the *sacB* gene, conferring sucrose sensitivity. Construction of in-frame deletions of *huvX*, *huvZ*, *huvC*, *huvD*, *huvB*, *huvA* and deletion of the complete gene cluster occurred in several steps. The PCR-amplified carboxy-terminal gene fragments were ligated into pWKS30, and resulting plasmids were cut with appropriate enzymes and ligated to the amino-terminal PCR fragments of each corresponding gene. This process resulted in the formation of mutant alleles Δ *huvZ* (removes coding sequences for amino acids 76 to 126), Δ *huvX* (removes coding sequences for amino acids 90 to 144), Δ *huvC* (removes coding sequences for amino acids 19 to 291), Δ *huvB* (removes coding sequences for amino acids 18 to 259), Δ *huvD* (removes coding sequences for amino acids 183 to 345), and Δ *huvA* (removes coding sequences for amino acids 178 to 698) and the complete gene cluster deletion mutant Δ *huv* (removes coding sequences encompassing amino acid 178 encoded by *huvA* and amino acid 345 encoded by *huvD*). Each deleted allele cloned in pWKS30 was digested with NotI and SalI and ligated into the NotI/SalI sites of the suicide vector pNidKan. The resulting plasmids were mated from *E. coli* SM17-1- λ pir into *V. anguillarum* H-775-3, and transformants with the plasmid

TABLE 2. Oligonucleotides used in this study

Amplified region	Primer	Nucleotide sequence ^a
Mutant constructions		
<i>huvA</i> , amino terminal	HuvA.A	5'-GCTCTAGAAAGCTTTATCAACAATTGATT-3'
	HuvA.B	5'-TCCCCCGGGGAAAGCTTTGCTTGTCGCC-3'
<i>huvA</i> , carboxy terminal	HuvA.C	5'-TCCCCCGGGAACGACTACTCTCAAGCTGAG-3'
	HuvA.D	5'-GCGAATTCTGGGTAAAGAGGGCGAGTTAC-3'
<i>huvZ</i> , amino terminal	HuvZ.C	5'-GCGGATCCGACGTGCGGGTTACCTCCAA-3'
	HuvZ.D	5'-GCGAATTCTATGATTTACGAATTTAAAA-3'
<i>huvZ</i> , carboxy terminal	HuvZ.A	5'-GCTCTAGAGCTTCCGTGCCCTAACTTTA-3'
	HuvZ.B	5'-GCGGATCCGACGGCTTAAGCCAGCTGCAA-3'
<i>huvX</i> , amino terminal	HuvX.A	5'-GCTCTAGATGTCGATATCACCGCTTACTT-3'
	HuvX.B	5'-GCGGATCCTTTATGGGACGTGAAAGTCAT-3'
<i>huvX</i> , carboxy terminal	HuvX.C	5'-GCGGATCCCATTCCTCAATCCGCTAATGA-3'
	HuvX.D	5'-GCAAGCTTGCATCGAATATGCGGTTGA-3'
<i>huvB</i> , amino terminal	HuvB.A	5'-GCTCTAGACAAGCGCCCATTTGCTTTATAA-3'
	HuvB.B	5'-GCGGATCCGTCATTGGAGTGCAGCACGAG-3'
<i>huvB</i> , carboxy terminal	HuvB.C	5'-GCGGATCCGCTCTCGTCGGCGGGTTAGGC-3'
	HuvB.D	5'-GCGAATTCTGTAGTAAGCGACCAAGT-3'
<i>huvC</i> , amino terminal	HuvC.A	5'-GCTCTAGACACGCTTTTAAAAACCGTATG-3'
	HuvC.B	5'-GCGGATCCGTCATTGGAGTGCAGCACGAG-3'
<i>huvC</i> , carboxy terminal	HuvC.C	5'-GCGGATCCATTGTGACTGCGCTGGTGGGT-3'
	HuvC.D	5'-GCGAATTCTGCATTATAGCGAAGGACGCG-3'
<i>huvD</i> , amino terminal	HuvD.A	5'-GCTCTAGACTTGTGGTTCGGCGCAATTTT-3'
	HuvD.B	5'-GCGGATCCCTTTGCTAACTATTGCGTTG-3'
<i>huvD</i> , carboxy terminal	HuvD.C	5'-GCGGATCCTCGTCGCTTGTGCGCCGACAT-3'
	HuvD.D	5'-GCGAATTCTGCTCGATCGTATGCGGTAT-3'
<i>huvAZXBCD tonB exbBD</i> , carboxy terminal	HuvD.C2	5'-TCCCCCGGGTCGTCGCTTGTGCCGCACAT-3'
Gene amplification		
<i>huvA</i>	huvA-5'	5'-GCGAATTCTGGTGACAGCAGCGGCATCC-3'
	huvA-Eco-3'	5'-GCGAATTCAGGAGTTCATGGAACAACAAGCC-3'
<i>huvX</i>	VA-huvZ-D	5'-GCGAATTCTATGATTTACGAATTTAAAA-3'
	VA-HutZ-1	5'-CTCACATTCGGACGGCCTTCA-3'
<i>huvZ ΔhuvX</i>	PX3	5'-GCCTTTTCTTACAATGTCC-3'
	VA-TonB-4	5'-TGTTTGGGCTTGTGGGCTC-3'

^a Restriction sites for XbaI, BamHI, HindIII, EcoRI, and SmaI are underlined.

integrated into the chromosome by homologous recombination were selected on agar medium containing kanamycin and ampicillin. A second recombination event was obtained by selecting for sucrose resistance (10% wt/vol) and resistance to the specific antibiotic for the recipient strain (ampicillin). This led to obtention of *V. anguillarum* Δ *huvZ*, Δ *huvX*, Δ *huvC*, Δ *huvB*, Δ *huvD*, Δ *huvA*, and Δ *huv* mutant strains. Southern blot hybridization analysis was used to verify allelic exchange of the parental gene. In addition, for each mutant strain, the region involved in the deletion construction was PCR amplified and sequenced to ensure that the constructs were nonpolar (data not shown).

Subcloning of pML1 and construction of plasmids carrying *V. anguillarum* genes. Oligonucleotides used to amplify genes of the *V. anguillarum* heme uptake system are listed in Table 2. Cosmid pML1 was cut with ApaI, and two fragments were subcloned in pACYC177, yielding pCAR121 (containing *huvA*) and pCAR126 (containing *huvX*, *tonB-exbBD*, *huvB*, and partial *huvZC* genes). An EcoRV fragment containing complete *huvZX* genes was cloned in pWKS30 to yield pSML11. A SacI-HindIII fragment including complete *tonB-exbBD* genes was cloned in pWKS30 to yield pSML34.

The complete nine-gene heme uptake cluster was PCR amplified with primers *huvA*-5' and *HuvC*.D. The PCR product was cut with EcoRI and cloned in pWKS30 to produce pSML23. A PstI-EcoRI fragment of pSML23 containing *huvBCD* genes, and a SacI-ApaI fragment, including the *tonB* system plus *huvBCD* genes, were subcloned in pWKS30 to yield pSML32 and pSML33, respectively (in cases where a unique promoter exists upstream of *tonB* from which the six downstream genes are transcribed, *huvBCD* genes cloned in pSML32 will not be expressed).

The complete *huvA* gene including upstream and downstream DNA was amplified with primers *huvA*-5' and *huvA*-Eco-3'. The PCR product was cut with EcoRI and cloned in pWKS30 to yield pCAR115. The complete *huvX* gene including upstream DNA was amplified with primers VA-*huvZ*-D and VA-HutZ-1. The PCR product was cloned in pGEMT-Easy, and the insert was cut with EcoRI and subcloned in pWKS30 to yield pCAR181. The complete *huvZ* gene including the putative *huvX* promoter and in-frame-deleted *huvX* open reading frame (ORF) was amplified from *V. anguillarum* Δ *huvX* with primers PX3 and VA-TonB-4 (this allows

the cloning of *huvZ* independently of *huvX* while still maintaining the putative *huvX* promoter, from which it is feasible that transcription of *huvZ* may occur). The PCR product was cloned in pGEMT-Easy, and the insert was cut with EcoRI and cloned in pWKS30 to yield pCAR179. All the PCR-amplified *V. anguillarum* genes to be used in complementation assays were obtained with the Expand High Fidelity PCR system (Roche) and further DNA sequenced to ensure that no PCR errors were artificially introduced.

Hemin and hemoglobin utilization assays. To test the ability of *V. anguillarum* mutants to utilize hemin or hemoglobin as an iron source, overnight cultures of the parental strain, *V. anguillarum* H-775-3, and the mutant strains were adjusted to the same optical density and diluted 1:100 in fresh CM9 broth containing the iron source (hemin, 10 μ M; or hemoglobin, 1 μ M) with or without the iron chelator 2,2'-dipyridyl at 100 μ M. Cultures were shaken at 25°C, and absorbance at 600 nm was monitored at 1-h intervals over 12 h.

Complementation experiments. To test which genes of the cluster were essential for the utilization of hemin and hemoglobin as iron and porphyrin sources, *E. coli* strain EB53 *aroB hemA* and strain 101ESD Δ (*entC-entA*) were transformed with several plasmids. One-hundred-microliter portions of overnight cultures were added to 3 ml of molten soft nutrient broth (NB) or CM9 and plated onto appropriately prepared NB, CM9, or CM9 supplemented with 100 μ M 2,2'-dipyridyl plates. Sterile filter paper disks were loaded with 20 μ l of 5 and 0.05 mM hemin and 1 mM hemoglobin. Disks spotted with 20 μ l of 2 mg·ml⁻¹ ALA or 5 mM FeSO₄ were included as positive controls for utilization of porphyrin and iron sources, respectively. Results were annotated as positive or negative after 24 h of incubation.

Nucleotide sequence accession number. The EMBL accession number for the sequence described in this article is AJ496544.

RESULTS

Nucleotide sequence analysis of *V. anguillarum* heme utilization genes. The genetic organization of the *V. anguillarum*

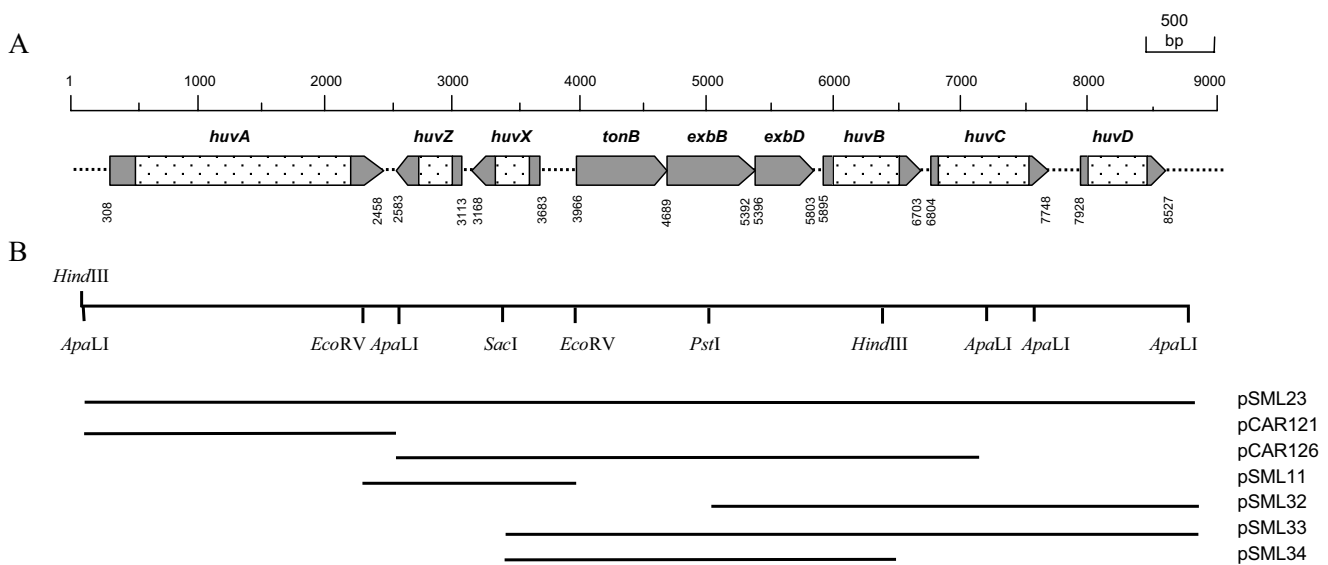


FIG. 1. (A) Physical map of the heme uptake gene cluster of *V. anguillarum* and mutant allele construction. ORFs are depicted as arrows, which indicate the direction of transcription, and the vertical numbers show the start and the end points of each gene. Deleted regions within each gene are shown as stippled boxes. (B) Relevant plasmid derivatives of the heme uptake cluster and restriction sites used in subcloning procedures.

heme utilization gene cluster was determined by partial DNA sequence analysis of pML1, a cosmid which enabled *E. coli* 101ESD to utilize heme as an iron source and which contains the heme receptor gene, *huvA* (25). The two strands of a DNA region downstream of *huvA* spanning ca. 6,000 bp were sequenced, and eight closely linked ORFs were identified (Fig. 1). The predicted products display significant similarity to components of other heme uptake systems in *Vibrio* and *Plesiomonas* species (Table 3).

A gene which we termed *huvZ* was found 125 bp downstream of the *huvA* stop codon and is transcribed from the opposite strand. *huvZ* encodes a 176-amino-acid protein with homology to proteins linked to heme transport systems (Table 3). The function of HuvZ homologues remains uncharacter-

ized, though some observations suggest that *P. shigelloides* HugZ could be involved in preventing heme toxicity (14). Interestingly, database comparisons evidence that HuvZ has homology to proteins containing a flavin mononucleotide-binding split barrel (data not shown). This homology suggests that this protein may play a role in processes of electron transfer, with the heme group being involved.

The next ORF in the cluster corresponds to the *huvX* gene, located 55 nucleotides upstream of the *huvZ* start codon, and codes for a predicted protein of 171 amino acids. The highest similarities were to proteins linked to heme transport systems of gram-negative bacteria (Table 3). None of the HuvX homologues has a known function, but it has been suggested that *P. shigelloides* HugX could be involved in preventing heme toxicity (14).

TABLE 3. Proteins with homology to products of *V. anguillarum* *huvZ*, *huvX*, and *huvBCD* genes

<i>V. anguillarum</i> protein	Homologue	EMBL accession no.	Amino acid identity (%)	Amino acid similarity (%)
HuvZ	<i>V. cholerae</i> hypothetical protein	Q9KL41	82	93
	<i>V. parahaemolyticus</i> hypothetical protein	O87J24	82	92
	<i>V. vulnificus</i> hypothetical protein	Q8D3S0	81	90
	<i>P. shigelloides</i> HugZ	Q93ST0	64	78
HuvX	<i>V. cholerae</i> hypothetical protein	Q9KL40	78	91
	<i>V. parahaemolyticus</i> hypothetical protein	O87J25	74	88
	<i>V. vulnificus</i> hypothetical protein	Q8D3S1	71	87
	<i>P. shigelloides</i> HugX	Q93SS9	51	70
HuvB	<i>V. parahaemolyticus</i> HutB	Q87J30	68	82
	<i>V. cholerae</i> HutB	Q9KL36	66	81
	<i>V. vulnificus</i> heme transporter	Q8D3S6	64	80
	<i>P. shigelloides</i> HugB	Q93SS3	44	64
HuvC	<i>V. cholerae</i> HutC	Q9KL35	75	90
	<i>V. parahaemolyticus</i> HutC	O87J31	74	87
	<i>V. vulnificus</i> heme transporter	Q8D3S7	75	85
	<i>P. shigelloides</i> HugC	Q93SS2	61	78
HuvD	<i>V. cholerae</i> HutD	O52047	70	83
	<i>V. parahaemolyticus</i> HutD	O87J32	71	86
	<i>V. vulnificus</i> heme transporter	Q8D3S8	60	77
	<i>P. shigelloides</i> HugD	Q93SS1	48	66

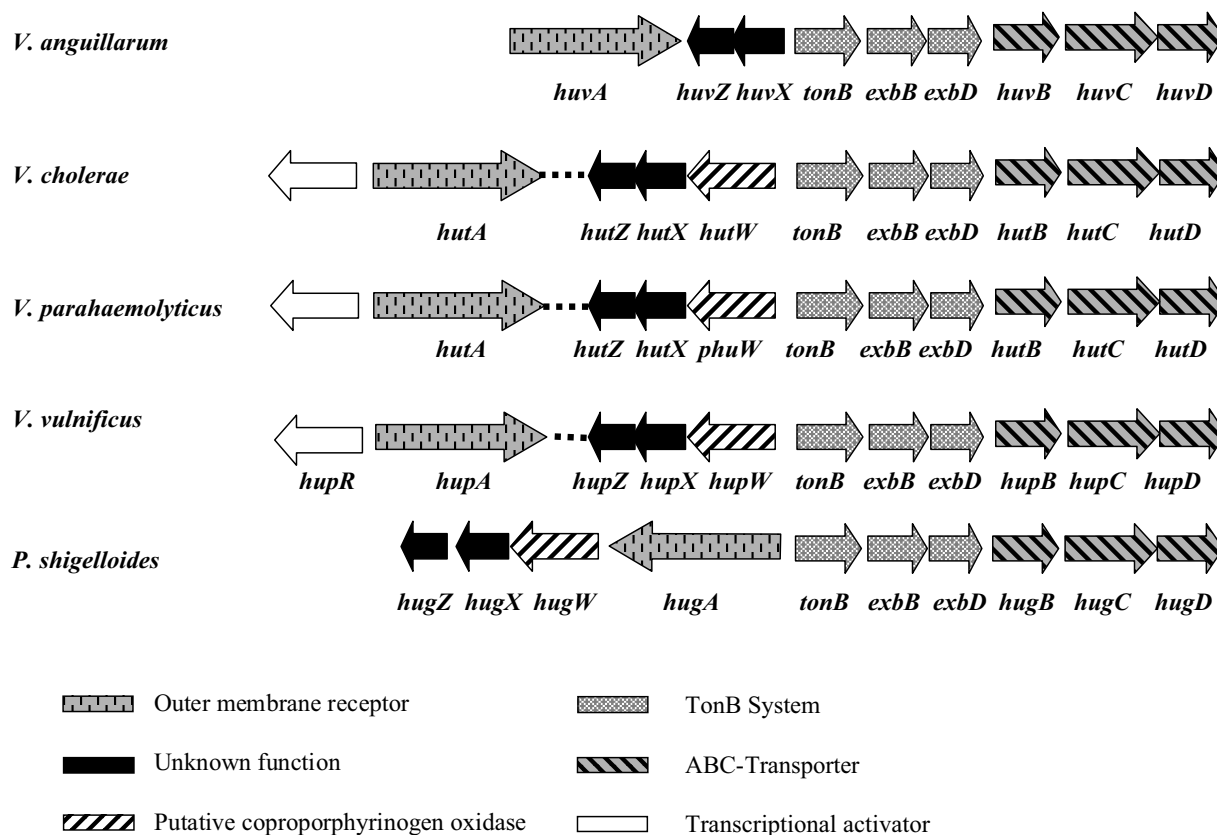


FIG. 3. Comparative chromosomal arrangement of heme uptake cluster genes in *Vibrio* species and *P. shigelloides*.

of the heme receptor, has been found in *V. vulnificus* (21). Homologues of this gene are encountered upstream of *V. parahaemolyticus* *hutA* (22) and *V. cholerae* *hutA* (12). However, the nucleotide sequence immediately upstream of *V. anguillarum* *huvA* does not code for an HupR homologue (data not shown).

Phenotypic analysis of heme uptake system chromosomal mutants with hemin or hemoglobin as the only iron source. In order to evaluate the importance of individual genes of the heme uptake system in the utilization of hemin or hemoglobin, individual in-frame deletions of *huvA*, *huvZ*, *huvX*, *huvB*, *huvC*, and *huvD* and an in-frame deletion of the complete nine-gene cluster were constructed. The H-775-3 strain, deficient in siderophore anguibactin biosynthesis, was chosen in order to eliminate background growth resulting from anguibactin-mediated iron uptake in iron-restricted media. Growth assays were carried out in triplicate, and results shown here are the means of three independent experiments. Strains were first assayed in an iron-sufficient medium with hemin (10 μ M). No significant differences in growth rates were seen in iron-sufficient medium between mutant strains and *V. anguillarum* H-775-3 (Fig. 4A). The same mutants were then grown in an iron-restricted medium with the iron chelator 2,2'-dipyridyl added at a concentration of 100 μ M and containing 10 μ M hemin as the sole iron source. Under these conditions, no significant differences in growth were observed between the Δ *huvX* strain and the parental strain, *V. anguillarum* H-775-3, with the slight differences observed likely due to a lower initial inoculum. This demonstrates that this gene is not essential for

the utilization of hemin as the sole iron source in *V. anguillarum*. By contrast, the rest of the assayed mutants were drastically affected in their ability to use hemin. Mutation of any *huvAZBCD* gene decreased bacterial growth to minimal levels (Fig. 4B). The Δ *huv* strain showed a reduction in growth with hemin as the sole iron source comparable to that observed in the single Δ *huvA*, Δ *huvZ*, Δ *huvB*, Δ *huvC*, and Δ *huvD* mutants (Fig. 4B). The same results were obtained for all the assayed strains when hemoglobin was used as the iron source instead of hemin (data not shown).

Utilization of heme compounds by *E. coli* EB53 and 101ESD complemented with *V. anguillarum* genes. The ability of *V. anguillarum* heme transport genes to allow the use of hemin or hemoglobin as porphyrin and iron sources was evaluated in *E. coli* EB53 (*aroB hemA*) and in *E. coli* 101 ESD [Δ (*entC-entA*)], respectively. The *aroB* and *entC-entA* mutations render *E. coli* unable to produce its own siderophore, enterochelin, and the *hemA* mutation disrupts synthesis of heme. Therefore, *E. coli* EB53 cannot grow unless supplied with the heme biosynthetic precursor ALA. EB53 could satisfy the porphyrin deficiency by utilizing exogenously supplied hemin, as long as a genetic system for hemin uptake is provided. Similarly, 101ESD cannot grow in the presence of iron chelators unless supplied with a utilizable source of iron.

Growth around hemin (0.05 and 5 mM) or hemoglobin (1 mM) disks on nutrient agar plates (NB) was used to assay the use of porphyrin sources by *E. coli* EB53. To test whether the introduction of the entire heme transport gene cluster would

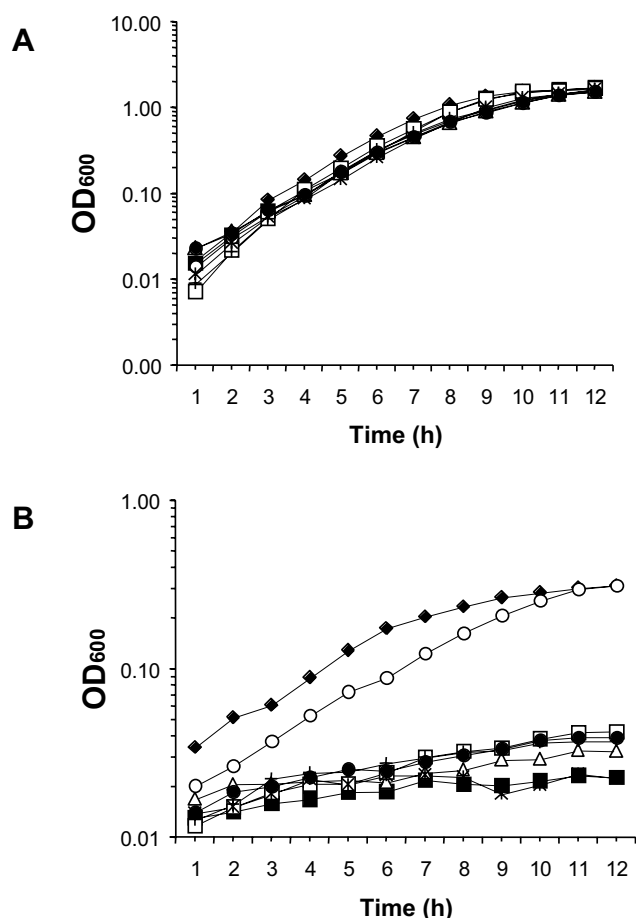


FIG. 4. Growth of *V. anguillarum* H-775-3 (◆) and Δ *huvA* (■), Δ *huvZ* (△), Δ *huvX* (○), Δ *huvB* (□), Δ *huvC* (●), Δ *huvD* (+), and Δ *huv* (*) mutants in CM9 minimal medium. Growth was with hemin (10 μ M) as the iron source without (A) and with (B) the free-iron chelator 2,2'-dipyridyl (100 μ M). Results are expressed as the averages of three independent experiments. OD₆₀₀, optical density at 600 nm.

promote hemin and hemoglobin utilization as porphyrin sources, cosmid pML1, containing the entire heme transport region within a ca. 15-kb *V. anguillarum* H-775-3 genome fragment, was introduced into EB53 by triparental mating. This

transformant utilized hemin and hemoglobin as porphyrin sources. A subclone of pML1 (pCAR121) containing only *huvA* proved to be sufficient to confer the utilization of hemin and hemoglobin as porphyrin sources upon *E. coli* EB53. This indicates that *E. coli* EB53 (a K-12 derivative) encodes all the additional functions necessary for transporting and utilizing heme as a porphyrin when an outer membrane heme receptor is provided. None of other plasmid combinations assayed, in which *huvA* was absent, could complement EB53 (data not shown).

To determine which genes are necessary for the utilization of hemin and hemoglobin as iron sources, *E. coli* 101ESD was complemented with *V. anguillarum* genes and tested on CM9 minimal medium plates supplemented with 100 μ M 2,2'-dipyridyl and with hemin and hemoglobin supplied on paper disks. Results are summarized in Table 4. *E. coli* 101ESD transformed with plasmids containing *huvA* alone did not grow in this medium, indicating that other genes in addition to *huvA* are needed for the utilization of hemin or hemoglobin as an iron source. However, *E. coli* 101ESD transformed with cosmid pML1 utilized both compounds as iron sources. In order to determine the minimum genetic background necessary for utilization of heme as an iron source, different gene combinations were assayed.

Heme iron utilization did not occur when strain 101ESD/pCAR121 was transformed with pSML11 (*huvZX*) or with pCAR126 (*huvX tonB exbBD huvB*). The complete nine-gene cluster was PCR amplified, cloned in pWKS30 to yield pSML23, and transformed into 101ESD. This strain utilized hemin and hemoglobin as iron sources, indicating that this capacity is encoded within the nine-gene cluster described here and that this utilization is not due to extra genes present in pML1.

Complete *tonB exbBD huvBCD* genes cloned in pSML33 and transformed into strain 101ESD/pCAR121 allowed this strain to utilize hemin and hemoglobin as iron sources. However, 101ESD/pCAR121/pSML32 and 101ESD/pCAR121/pSML34 failed to grow with hemin or hemoglobin. These results together demonstrate that *tonB exbBD* genes in combination with *huvA* are not sufficient for heme iron utilization unless *huvBCD* genes are also provided. It is feasible that *huvBCD* genes are the crucial ones in combination with

TABLE 4. Utilization of hemin and hemoglobin as iron sources by *E. coli* 101ESD complemented with *V. anguillarum* heme uptake genes^a

Strain	Gene(s) present	Utilization of:		
		Hemoglobin (0.1 mM)	Hemin (5 mM) ^c	FeSO ₄
101ESD	None	—	—	+
101ESD/pCAR121	<i>huvA</i>	—	—	+
101ESD/pCAR126	<i>huvX tonB-exbBD-huvB</i>	—	—	+
101ESD/pML1	<i>huvAZX tonB-exbBD-huvBCD</i>	+	+	+
101ESD/pCAR115/pCAR126	<i>huvAX tonB-exbBD-huvB</i>	—	—	+
101ESD/pCAR121/pCAR179	<i>huvAZ</i>	—	—	+
101ESD/pSML23	<i>huvAZX tonB-exbBD-huvBCD</i>	+	+	+
101ESD/pCAR121/pCAR181	<i>huvAX</i>	—	—	+
101ESD/pCAR121/pSML11	<i>huvAZX</i>	—	—	+
101ESD/pCAR121/pSML32	<i>huvA-exbD-huvBCD^b</i>	—	—	+
101ESD/pCAR121/pSML34	<i>huvA tonB-exbBD</i>	—	—	+
101ESD/pCAR121/pSML33	<i>huvA tonB-exbBD-huvBCD</i>	+	+	+

^a Assay was conducted on CM9 plates supplemented with 100 μ M 2,2'-dipyridyl.

^b Genes *exbD-huvBCD* in pSML32 will not be expressed if they are transcribed from a promoter upstream of *tonB*.

^c The same results were obtained when 0.05 mM hemin was used.

huvA to allow transport of heme compounds into the cytoplasm of *E. coli* and further utilization as iron sources. The finding that *tonB* *exbBD* genes need to be provided in the same plasmid together with downstream *huvBCD* genes in order to allow complementation may be explained by the existence of a single promoter upstream of *tonB*, as has been reported for *V. cholerae* (29).

DISCUSSION

Utilization of hemin and heme-containing proteins as iron sources has been reported for *V. anguillarum* (23, 24), but the molecular mechanism supporting heme uptake is unknown. In a recent work, the *V. anguillarum* outer membrane heme receptor gene *huvA* was characterized, and a *huvA* mutant obtained by chemical mutagenesis showed a reduction in virulence for fish (25). In the present study, we characterized a gene cluster in *V. anguillarum* that has similarities with heme iron assimilation systems found in other *Vibrio* species and *P. shigelloides*, both at the amino acid level and gene organization.

Homologues of *V. anguillarum* HuvZX proteins have been described, associated with the heme utilization systems of *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *P. shigelloides*, but to date their roles remain unascertained. In the present study we report the mutational analysis of *V. anguillarum* *huvZX* genes. Our results have shown that a *huvX* deletion mutant is able to use heme nearly as efficiently as the parental strain. This suggests that either *huvX* is not directly involved in the use of heme as an iron source or additional *V. anguillarum* genes may substitute for the function of *huvX*. However, deletion of *huvZ* drastically reduces the ability of the bacterium to grow with heme as the sole iron source, indicating that this gene is essential for heme iron utilization. A HuvZ-related activity may be present in *E. coli* 101ESD, since the heme uptake system of *V. anguillarum* can be easily reconstituted in 101ESD without HuvZ. However, the actual function of HuvZ remains unknown. A possibility would be that HuvZ is involved in removing iron from heme. It has been proposed that the oxidative cleavage of heme mediated by heme oxygenases is a mechanism for iron acquisition for some bacteria. Heme oxygenase genes have been described recently for *Neisseria meningitidis* (44), and *Corynebacterium diphtheriae* (42), but no significant homology exists between these described heme oxygenase genes and HuvZ. Recently, Wyckoff et al. (43) demonstrated that *hutZ* (homologous to *huvZ*) is also essential for heme iron utilization in *V. cholerae*. These authors could not demonstrate a heme oxygenase activity for HutZ, suggesting that it may act as a heme carrier or storage protein. Further studies are needed in order to ascertain the role played by HuvZ in the utilization of heme as an iron source.

V. anguillarum *huvBCD* genes are essential for heme uptake. Nonpolar deletions in any of these three genes drastically reduce the growth of *V. anguillarum* with hemin or hemoglobin as the sole iron source. In contrast, it has been reported that *V. cholerae* *hutB*, *hutC*, or *hutD* mutants still retain significant growth when hemin is used as the only iron source (29). Thus, it is possible that proteins of other transport systems of *V. cholerae* can substitute for the physiological role of either HutB, -C, or -D, while in *V. anguillarum* each one of these proteins is essential for heme uptake.

Complementation studies carried out with *E. coli* EB53

showed that the *V. anguillarum* outer membrane heme receptor HuvA is sufficient for utilization of heme compounds as porphyrin sources. Complementation of *E. coli* heme-deficient mutants with an outer membrane heme receptor provided in *trans* has been previously reported (36). Interestingly, the *P. shigelloides* heme receptor gene *hugA* could not complement an *E. coli* DHE-1 *hemA* mutant for the use of heme as a porphyrin source unless *P. shigelloides* *tonB*-*exbB*-*exbD* genes were also provided in *trans* (14).

In the use of heme compounds as an iron source, *huvA* plus *tonB* *exbBD* *huvBCD* are needed to reconstitute the *V. anguillarum* heme transport system in *E. coli* 101ESD (an HB101 derivative). Similarly, Occhino et al. (29) reported that utilization of hemin as an iron source can be reconstituted in *E. coli* 1017 (HB101 derivative, *ent*) with *V. cholerae* *hutA*, *tonB* *exbBD*, and *hutBCD* genes. In contrast, Henderson et al. (14) observed that a plasmid containing *hugWXXZ* was necessary in addition to *hugA* and *tonB*-*exbBD* to reconstitute the *P. shigelloides* heme iron utilization system in *E. coli* 1017.

We hypothesize that the *V. anguillarum* *huvBCD* genes are crucial for heme iron utilization in *E. coli* 101ESD but the *tonB* and *exbBD* genes are not. Complementation of EB53 for heme utilization as a porphyrin source did not depend on the presence of the *V. anguillarum* TonB system in *trans*, which means that *huvA* alone is active in an *E. coli* background. We propose that *hutBCD* genes are transcribed from a promoter located upstream of the *tonB* gene, and thus actual complementation for heme iron utilization is achieved only when the six genes *tonB*, *exbBD*, and *huvBCD*, are provided together on a plasmid. It remains to be explained why heme utilization as a porphyrin source in *E. coli* EB53 does not depend on *huvBCD* genes while utilization as an iron source in *E. coli* 101ESD does require *huvBCD*. This could be due to a difference in strain background, as for example, the presence of an inner membrane transporter in EB53.

As reported by Stojiljkovic and Hantke (36), the *Y. enterocolitica* outer membrane heme receptor HemR alone is sufficient to complement *E. coli* for utilization of heme as a porphyrin source, and it is possible that hemin, once in the periplasm, can be incorporated into cytochromes located in the cytoplasmic membrane (10). However, utilization of heme compounds as iron sources would be feasible only as long as the heme compound is transported from the periplasmic space into the cytoplasm, where it is expected that additional proteins are implicated in degradation of the heme molecule and in the release of iron. As proposed by Stojiljkovic and Hantke (36), the difference between porphyrin and iron utilization from heme may be merely quantitative, being the amount of heme needed to satisfy the cell's requirements for iron, much larger than the amount necessary as a porphyrin source. This being the case, *E. coli* EB53 complemented with *V. anguillarum* HuvA could transport trace amounts of heme as a porphyrin source into the cytoplasm via nonspecific *E. coli* ABC transporters. However, heme iron utilization could be effective only as long as a specific ABC transporter (HuvBCD) is provided.

The gene coding for the *V. anguillarum* outer membrane heme receptor is linked to the rest of heme transport genes. Such a spatial organization is unusual in other species of the family *Vibrionaceae*, where the outer membrane receptor gene is separated from the rest of the transport genes by hundreds

of kilobases (1, 12, 22). Other differences in the *V. anguillarum* heme uptake cluster include the absence of a putative coproporphyrinogen oxidase gene and a gene for a LysR transcriptional activator homologue, which are present in *V. vulnificus*, *V. cholerae*, and *V. parahaemolyticus* (1, 12, 22). It is possible that the heme transport cluster originally included homologues of these genes, which eventually underwent a spatial reorganization in the genome of *V. anguillarum*.

In conclusion, we have shown in this study that the heme uptake cluster of *V. anguillarum* H-775-3 includes nine genes, five of which proved to be essential for utilization of heme as an iron source. The gene arrangement of the *V. anguillarum* heme uptake cluster has unique features which differentiate it from homologous clusters found in other gram-negative bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge J. H. Crosa, K. E. Klose, and V. Braun for providing strains and plasmids.

This work was supported by grants AGL2000-0492 and AGL-2003-00086 from the Ministry of Science and Technology of Spain (co-funded by the FEDER Programme from the European Union) and grant PGIDT01PXI26202PN from Xunta de Galicia to M.L.L.

REFERENCES

- Chen, C.-Y., K.-M. Wu, Y.-C. Chang, C.-H. Chang, H.-C. Tsai, T.-L. Liao, Y.-M. Liu, H.-J. Chen, A. B.-T. Shen, J.-C. Li, T.-L. Su, C.-P. Shao, C.-T. Lee, L.-I. Hor, and S.-F. Tsai. 2003. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res.* **13**:2577–2587.
- Conchas, R. F., M. L. Lemos, J. L. Barja, and A. E. Toranzo. 1991. Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2956–2962.
- Correa, N., C. M. Lauriano, R. McGee, and K. E. Klose. 2000. Phosphorylation of the flagellar regulatory protein FlrC is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization. *Mol. Microbiol.* **35**:743–755.
- Crosa, J. H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**:517–530.
- Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:7347–7351.
- Eberspächer, B., and V. Braun. 1980. The involvement of cytochromes in the uptake of ferrichrome by *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **7**:61–64.
- Genco, C. A., and D. W. Dixon. 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* **39**:1–11.
- Goldberg, J. B., and D. E. Ohman. 1984. Cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a gene involved in the production of alginate. *J. Bacteriol.* **158**:1115–1121.
- Gualerzi, C. O., and C. L. Pon. 1990. Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**:5881–5889.
- Haddock, B. A., and H. U. Schairer. 1973. Electron-transport chains of *Escherichia coli*. Reconstitution of respiration in a 5-aminolevulinic acid-requiring mutant. *Eur. J. Biochem.* **35**:34–45.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**:95–98.
- Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleischmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter, and C. M. Fraser. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**:477–483.
- Henderson, D. P., and S. M. Payne. 1993. Cloning and characterization of the *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin. *Mol. Microbiol.* **7**:461–469.
- Henderson, D. P., E. E. Wyckoff, C. E. Rashidi, and A. L. Oldham. 2001. Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. *J. Bacteriol.* **183**:2715–2723.
- Knauf, V. C., and E. W. Nester. 1982. Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* **8**:45–54.
- Köster, W. L., L. A. Actis, L. S. Waldbeser, M. E. Tolmasky, and J. H. Crosa. 1991. Molecular characterization of the iron transport system mediated by the pJM1 plasmid in *Vibrio anguillarum* 775. *J. Biol. Chem.* **266**:23829–23833.
- Köster, W. 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B₁₂. *Res. Microbiol.* **152**:291–301.
- Lee, B. C. 1995. Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol. Microbiol.* **18**:383–390.
- Lemos, M. L., P. Salinas, A. E. Toranzo, J. L. Barja, and J. H. Crosa. 1988. Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **170**:1920–1925.
- Litwin, C. M., and B. L. Byrne. 1998. Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization: regulation of expression and determination of the gene sequence. *Infect. Immun.* **66**:3134–3141.
- Litwin, C. M., and J. Quackenbush. 2001. Characterization of a *Vibrio vulnificus* LysR homologue, HupR, which regulates expression of the haem uptake outer membrane protein, HupA. *Microb. Pathog.* **31**:295–307.
- Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, and T. Iida. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**:743–749.
- Mazoy, R., and M. L. Lemos. 1991. Iron-binding proteins and heme compounds as iron sources for *Vibrio anguillarum*. *Curr. Microbiol.* **23**:221–226.
- Mazoy, R., and M. L. Lemos. 1996. Identification of heme-binding proteins in the cell membranes of *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**:265–270.
- Mazoy, R., C. R. Osorio, A. E. Toranzo, and M. L. Lemos. 2003. Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Arch. Microbiol.* **179**:329–338.
- Mey, A. R., and S. M. Payne. 2001. Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Mol. Microbiol.* **42**:835–849.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mills, M., and S. M. Payne. 1997. Identification of *shuA*, the gene encoding the heme receptor of *Shigella dysenteriae*, and analysis of invasion and intracellular multiplication of a *shuA* mutant. *Infect. Immun.* **65**:5358–5363.
- Occhino, D. A., E. E. Wyckoff, D. P. Henderson, T. J. Wrona, and S. M. Payne. 1998. *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol. Microbiol.* **29**:1493–1507.
- O'Malley, S. M., S. L. Mouton, D. A. Occhino, M. T. Deanda, J. R. Rashidi, K. L. Fuson, C. E. Rashidi, M. Y. Mora, S. M. Payne, and D. P. Henderson. 1999. Comparison of the heme iron utilization systems of pathogenic vibrios. *J. Bacteriol.* **181**:3594–3598.
- Panek, H., and M. R. O'Brian. 2002. A whole genome view of prokaryotic biosynthesis. *Microbiology* **148**:2273–2282.
- Ratledge, C., and L. G. Dover. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:881–941.
- Rose, R. E. 1988. The nucleotide sequence of pACYC177. *Nucleic Acids Res.* **16**:356.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sørensen, U. S. B., and J. L. Larsen. 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:593–597.
- Stojiljkovic, I., and K. Hantke. 1992. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with the other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria. *EMBO J.* **11**:4359–4367.
- Stojiljkovic, I., and K. Hantke. 1994. Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **13**:719–732.
- Stork, M., M. Di Lorenzo, T. J. Welch, L. M. Crosa, and J. H. Crosa. 2002. Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* **48**:222–228.
- Torres, A. G., and S. M. Payne. 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **23**:825–833.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**:945–951.
- Wang, R. F., and S. R. Kushner. 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing, and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**:195–199.
- Wilks, A., and M. P. Schmitt. 1998. Expression and characterization of a heme oxygenase (HmuO) from *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Biol. Chem.* **273**:837–841.
- Wyckoff, E. E., M. Schmitt, A. Wilks, and S. M. Payne. 2004. HutZ is required for efficient heme utilization in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **186**:4142–4151.
- Zhu, W., A. Wilks, and I. Stojiljkovic. 2000. Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the *hemO* gene of *Neisseria* is a heme oxygenase. *J. Bacteriol.* **182**:6783–6790.

Two *tonB* Systems Function in Iron Transport in *Vibrio anguillarum*, but Only One Is Essential for Virulence

Michiel Stork,¹ Manuela Di Lorenzo,¹ Susana Mouriño,²
Carlos R. Osorio,² Manuel L. Lemos,²
and Jorge H. Crosa^{1*}

Department of Molecular Microbiology and Immunology, Oregon Health & Science University,
Portland, Oregon,¹ and Departamento de Microbiología e Parasitología, Universidade
de Santiago de Compostela, Instituto de Acuicultura, Campus Sur,
Santiago de Compostela, Galicia, Spain²

Received 15 July 2004/Returned for modification 13 August 2004/Accepted 30 August 2004

We have identified two functional *tonB* systems in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*, *tonB1* and *tonB2*. Each of the *tonB* genes is transcribed in an operon with the cognate *exbB* and *exbD* genes in response to iron limitation. Only *tonB2* is essential for transport of ferric anguibactin and virulence.

Outer membrane receptors for ferric siderophores require energy to internalize the complexed iron. This energy is transduced from the proton motive force in the inner membrane to the outer membrane receptor by the TonB protein in complex with the ExbB and ExbD proteins (4, 10). The presence of *tonB* has been associated with bacterial virulence in bacteria such as *Vibrio cholerae* (16), *Shigella dysenteriae* (15), and *Bordetella pertussis* (13).

To be able to cause an infection in a vertebrate fish host, the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* requires an active iron uptake mechanism (2, 6, 8, 17, 21) mediated by the siderophore anguibactin (1); however, it can also acquire iron via transport of heme and siderophores secreted by other microorganisms, like ferrichrome and enterobactin (5). Anguibactin is synthesized via a nonribosomal peptide synthetase mechanism and secreted to the extracellular environment (9). Once bound to iron, the ferric siderophore is transported back into the cell cytosol through the specific outer membrane receptor FatA and a transport complex consisting of the periplasmic binding lipoprotein FatB and the integral membrane proteins FatC and FatD (3, 7, 12).

Ferric-anguibactin transport via the FatA receptor requires energy, suggesting the existence of a *tonB* complex in *V. anguillarum* (7).

The *tonB*, *exbB*, and *exbD* cluster in *V. anguillarum* 775 also includes the heme transport genes (Fig. 1). This *tonB* system shows homology to the *V. cholerae tonB1* cluster: TonB1, 48% (GenBank accession number NP_233295.1); ExbB1, 74% (NP_233296.1); ExbD1, 72% (NP_233297.1). When the *tonB1* gene was replaced with a chloramphenicol resistance cassette (MS533), no phenotypic difference in iron uptake could be detected by bioassays with different iron sources (Table 1). This indicates that at least one other *tonB* system must be

present in *V. anguillarum*. By Tn10 mutagenesis (11) of MS533, the *tonB1* knockout, we identified a mutant, MS570, that was unable to transport any of the iron sources tested (Table 1). The Tn10 insertion was cloned and sequenced, showing that it occurred at bp 935 of an open reading frame homologous (66% identity) to open reading frame 1547 (*tolR*) of the *V. cholerae* genome (accession no. AF047974.1). This *V. anguillarum tolR* homologue is located upstream of a second *tonB* cluster (Fig. 1), which shares homology with the *tonB2* system in *V. cholerae*: TonB2, 68% (NP_231186.1); ExbB2, 87% (NP_231185.1); ExbD2, 62% (NP_231184.1). We then generated a *tonB2* knockout strain by inserting the kanamycin resistance (Km^r) cassette (18) into the chromosomal locus of *tonB2*, with the suicide vector pTW-MEV (19) in the wild-type *V. anguillarum* strain, generating MS801. We repeated this mutagenesis with the *tonB1* mutant strain to obtain the *tonB1-tonB2* double mutant MS658. We complemented the mutants with a construct harboring the *tonB2* operon under the control of the Km^r gene promoter in pACYC177, pMS789. The mutants and complemented mutants were used in bioassays (Table 1). While the *tonB1* mutant does not show any changes with respect to the wild type, the *tonB1-tonB2* double mutant is impaired in transport of all of the iron sources tested. TonB2, but not TonB1, functions in the transport of anguibactin and enterobactin, while both TonB proteins can operate in the transport of ferrichrome and heme. We also transformed plasmid pMS789, harboring the *tonB2* system, into *Escherichia coli tonB* mutant KP1032, showing that *tonB2* from *V. anguillarum* cannot complement the *tonB* mutation in KP1032 (Table 1), even though the *tonB2* operon of *V. anguillarum* is expressed in *E. coli* as determined by reverse transcription (RT)-PCR (data not shown). This was somewhat surprising since the *V. cholerae tonB2* gene can complement this *E. coli* strain and the TonB2 proteins from *V. anguillarum* and *V. cholerae* share high homology, as is apparent in the alignment of these two proteins (Fig. 2). Furthermore, as is also shown in Fig. 2, comparison with *E. coli* TonB does not lead to an obvious answer for the lack of complementation.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Microbiology and Immunology, Oregon Health & Science University, SW Sam Jackson Pk. Rd., Portland, OR 97239. Phone: (503) 494-7583. Fax: (503) 494-6862. E-mail: crosajor@ohsu.edu.

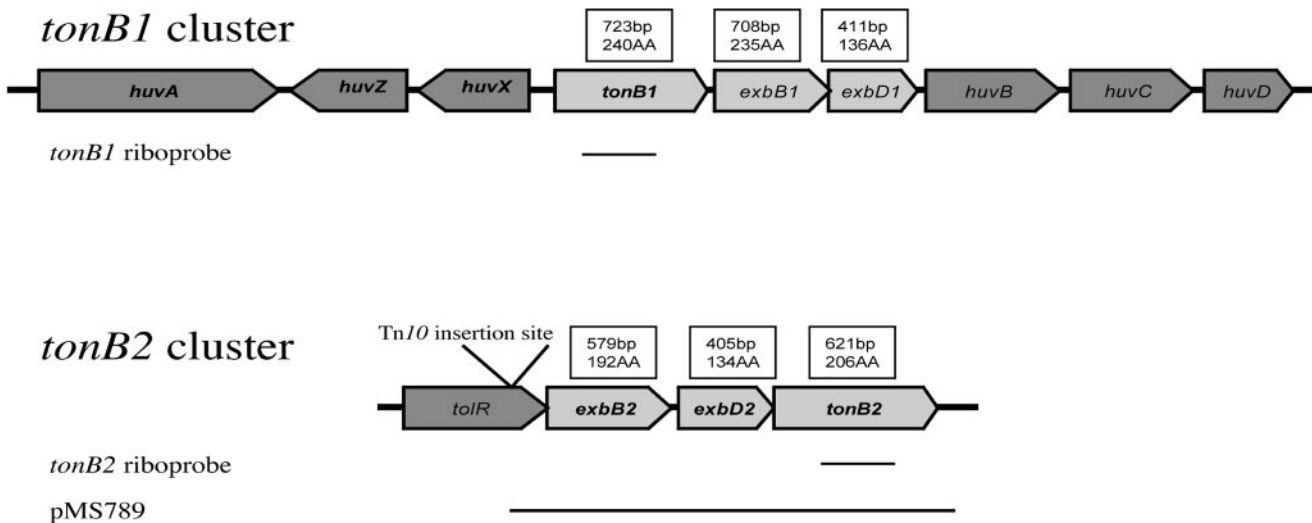


FIG. 1. Schematic representation of the *tonB1* and *tonB2* loci in *V. anguillarum*. The sizes of the genes and the corresponding proteins are shown above the *tonB* cluster genes. Also shown is the site of insertion of the Tn10 Km^r transposon in the *tolR* homologue. The lines under the loci represent the DNA fragments cloned in the pACYC177 plasmid generating pMS789, used in complementing studies, and the riboprobes used in the RPAs. AA, amino acids.

We also analyzed the transcription of the two *V. anguillarum* *tonB* clusters by RT-PCR to determine whether the two *tonB* genes are transcribed in an operon with the respective *exbB* and *exbD* genes. As shown in Fig. 3, a band of the expected size was detected for all three genes, indicating that each one of the two *tonB* systems is indeed transcribed as an operon. Since the Tn10 mutant has the same phenotype as *tonB2* mutant MS801, it may be that the *tolR* homologue is also part of the *tonB2* operon and that the phenotype comes from a polar effect of the transposon on downstream genes. Therefore we performed an RT-PCR with a primer in *exbB2* for the RT reaction and a

primer set in *tolR* for the PCR. The results in Fig. 3C demonstrate that *tolR* is indeed also part of the *tonB2* operon.

To determine whether expression of the *tonB1* and *tonB2* systems is regulated by the iron concentration in the cell, we performed an RNase protection assay (RPA) with labeled riboprobes to detect either the *tonB1*- or the *tonB2*-specific mRNAs on total RNA obtained from cultures grown under

TABLE 1. Bioassay results

Strain	Result with following Fe source:				
	FAC ^a	Ang. ^b	Ent. ^c	Fer. ^d	Heme
<i>V. anguillarum</i> 775	+	+	+	+	+
H775-3 ^h	+	— ^f	+	+	+
MS533 (<i>tonB1</i>)	+	+	+	+	+
MS801 (<i>tonB2</i>)	+	—	—	+	+
MS658 (<i>tonB1 tonB2</i>)	+	—	—	—	—
MS801/pMS789 ⁱ	+	+	+	+	+
MS658/pMS789	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> W3110	+	ND ^g	+	+	ND
<i>E. coli</i> KP1032	+	ND	—	—	ND
<i>E. coli</i> KP1032/pMS789	+	ND	—	—	ND

^a FAC, ferric ammonium citrate.
^b Ang.: anguibactin from *V. anguillarum* 775.
^c Ent.: enterobactin from *E. coli* HB101.
^d Fer., ferriochrome.
^e +, positive, forming a zone of growth around the iron source.
^f —, negative, no zone of growth around iron source.
^g ND, not determined.
^h Plasmidless derivative of *V. anguillarum* 775 lacking the anguibactin transport system.
ⁱ Plasmid containing the *V. anguillarum tonB2, exbB2, and exbD2* genes.

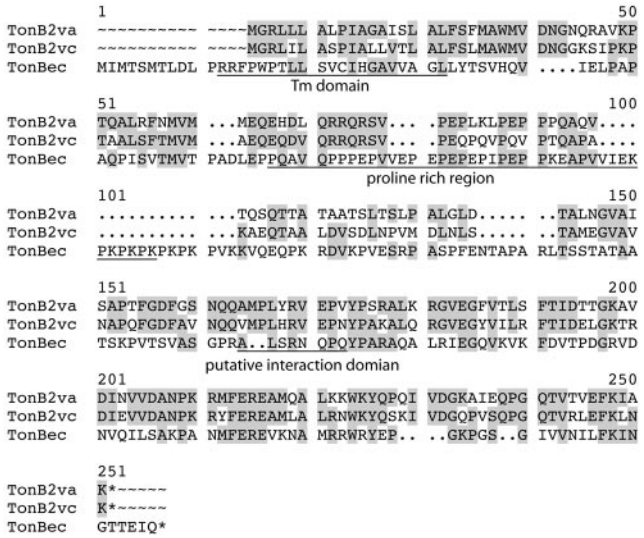


FIG. 2. Amino acid sequence alignment of the TonB2 proteins of *V. anguillarum* and *V. cholerae* (TonB2va and TonB2vc, respectively) and the TonB protein of *E. coli* (TonBec). We used the sequence analysis software package of the University of Wisconsin Genetics Computer Group. Underlined are the transmembrane domain, the proline-rich region, and the putative site of interaction with outer membrane proteins as determined for *E. coli* TonB. Identical amino acids are highlighted in gray.

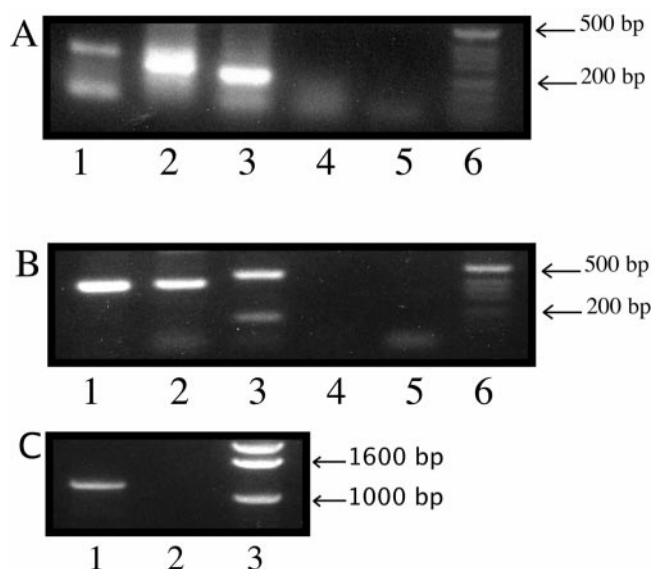


FIG. 3. The *tonB1* and *tonB2* clusters are transcribed as separate operons. RT-PCR was performed with a downstream primer for the RT reaction in *exbD1* and in *tonB2* for the *tonB1* and *tonB2* clusters, respectively. In the subsequent PCR, specific primer sets for each gene were used to identify their presence in the same cDNA sample. (A) Lanes: 1, *tonB1* RT-PCR product; 2, *exbB1* RT-PCR product; 3, *exbD1* RT-PCR product; 4, control with no reverse transcriptase; 5, H₂O control; 6, molecular weight marker. (B) Lanes: 1, *exbB2* RT-PCR product; 2, *exbD2* RT-PCR product; 3, *tonB2* RT-PCR product; 4, control with no reverse transcriptase; 5, H₂O control; 6, molecular weight marker. (C) Lanes: 1, *tolR* RT-PCR product; 2, control with no reverse transcriptase; 3, molecular weight marker.

iron-rich and iron-limiting conditions. Figure 4 shows the RPAs for *tonB1* (panel A) and *tonB2* (panel B). Comparison of lanes 1 (iron rich) and 2 (iron limiting) demonstrates that both *tonB* operons are iron regulated.

The ability of *V. anguillarum* to cause infection has been correlated with the ability to synthesize anguibactin (2, 6, 8, 20, 21). We therefore investigated if the transport of anguibactin, mediated by the TonB2 protein, is essential for virulence. We performed 50% lethal dose (LD₅₀) experiments with fish, and the results are listed in Table 2. The *tonB2* mutant is severely attenuated in virulence, more than 100-fold, while the *tonB1* mutant shows only a 10-fold decrease in virulence. The *tonB1-tonB2* double mutant is twofold more attenuated in virulence than the *tonB2* mutant, possibly because the *tonB2* mutant still has the ability to take up heme via TonB1. Complementation of the *tonB2* and *tonB1-tonB2* mutants with the wild-type *tonB2* gene results in restoration of virulence to a level close to that of the wild type. Our results demonstrate that a functional *tonB2* system is essential for ferric-anguibactin transport and virulence in *V. anguillarum*.

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences of the *tonB1* and *tonB2* clusters from *V. anguillarum* strain 775 have been deposited in the GenBank sequence library and assigned accession numbers AJ496544 and AY644719, respectively.

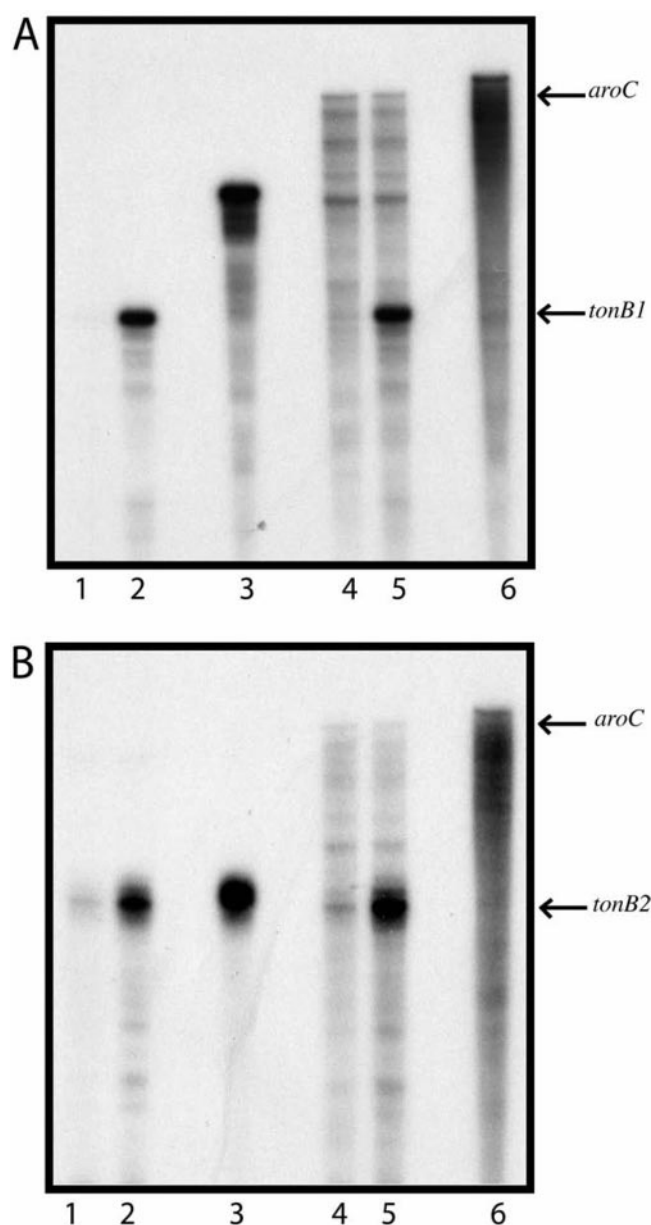


FIG. 4. Iron regulation of the two *tonB* systems. RPAs were performed with the MAXIscript kit and the RPA III RNase Protection kit, both from Ambion. RPAs for *tonB1* (A) and *tonB2* (B) were performed with RNA isolated from *V. anguillarum* 775 cultures grown under iron-rich (lanes 1 and 4) or iron-limiting (lanes 2 and 5) conditions. The *aroC* control is included in lanes 4 and 5. The riboprobes are shown in lanes 3 and 6.

TABLE 2. LD₅₀ determination in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*)

Strain	LD ₅₀ ^a	Fold attenuation ^b
<i>V. anguillarum</i> 775	1.2 × 10 ⁴	1
MS533 (<i>tonB1</i>)	1.3 × 10 ⁵	10
MS801 (<i>tonB2</i>)	1.3 × 10 ⁶	103
MS658 (<i>tonB1 tonB2</i>)	2.9 × 10 ⁶	234
MS801/pMS789 ^c	7.1 × 10 ⁴	6
MS658/pMS789	2.3 × 10 ⁴	2

^a LD₅₀ calculated by the method of Reed and Muench (14).

^b Fold attenuation normalized to wild-type *V. anguillarum* 775.

^c Plasmid containing the *V. anguillarum tonB2 exbB2* and *exbD2* genes.

This work was supported by grants AI19018 and GM64600 from the National Institutes of Health to J.H.C. and grants AGL2000-0492 and AGL-2003-00086 from the Ministry of Science and Technology of Spain and grant PGIDT01PXI26202PN from Xunta de Galicia to M.L.L.

We thank S. Payne, K. Postle, and K. Hughes for providing some of the strains used in this study and G. Winkelman for purified siderophores.

REFERENCES

1. Actis, L. A., W. Fish, J. H. Crosa, K. Kellerman, S. R. Ellenberger, F. M. Hauser, and J. Sanders-Loehr. 1986. Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1). *J. Bacteriol.* **167**:57–65.
2. Actis, L. A., M. E. Tolmasky, and J. H. Crosa. 1999. Vibriosis, p. 523–557. In P. Woo and D. Bruno (ed.), *Fish diseases and disorders. Viral, bacterial and fungal infections*, vol. 3. CAB International Publishing, Wallingford, United Kingdom.
3. Actis, L. A., S. A. Potter, and J. H. Crosa. 1985. Iron-regulated outer membrane protein OM2 of *Vibrio anguillarum* is encoded by virulence plasmid pJM1. *J. Bacteriol.* **161**:736–742.
4. Bradbeer, C. 1993. The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:3146–3150.
5. Crosa, J. H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**:517–530.
6. Crosa, J. H. 1980. A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature* **284**:566–568.
7. Crosa, J. H., and L. L. Hodges. 1981. Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775. *Infect. Immun.* **31**:223–227.
8. Crosa, J. H., L. L. Hodges, and M. H. Schiewe. 1980. Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **27**:897–902.
9. Crosa, J. H., and C. T. Walsh. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:223–249.
10. Held, K. G., and K. Postle. 2002. ExbB and ExbD do not function independently in TonB-dependent energy transduction. *J. Bacteriol.* **184**:5170–5173.
11. Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557–6567.
12. Koster, W. L., L. A. Actis, L. S. Waldbeser, M. E. Tolmasky, and J. H. Crosa. 1991. Molecular characterization of the iron transport system mediated by the pJM1 plasmid in *Vibrio anguillarum* 775. *J. Biol. Chem.* **266**:23829–23833.
13. Pradel, E., N. Guiso, F. D. Menozzi, and C. Locht. 2000. *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect. Immun.* **68**:1919–1927.
14. Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**:493–497.
15. Reeves, S. A., A. G. Torres, and S. M. Payne. 2000. TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect. Immun.* **68**:6329–6336.
16. Seliger, S. S., A. R. Mey, A. M. Valle, and S. M. Payne. 2001. The two TonB systems of *Vibrio cholerae*: redundant and specific functions. *Mol. Microbiol.* **39**:801–812.
17. Stork, M., M. Di Lorenzo, T. J. Welch, L. M. Crosa, and J. H. Crosa. 2002. Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* **48**:222–228.
18. Taylor, L. A., and R. E. Rose. 1988. A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K. *Nucleic Acids Res.* **16**:358.
19. Welch, T. J., S. Chai, and J. H. Crosa. 2000. The overlapping *angB* and *angG* genes are encoded within the *trans*-acting factor region of the virulence plasmid in *Vibrio anguillarum*: essential role in siderophore biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**:6762–6773.
20. Wertheimer, A. M., W. Verweij, Q. Chen, L. M. Crosa, M. Nagasawa, M. E. Tolmasky, L. A. Actis, and J. H. Crosa. 1999. Characterization of the *angR* gene of *Vibrio anguillarum*: essential role in virulence. *Infect. Immun.* **67**:6496–6509.
21. Wolf, M. K., and J. H. Crosa. 1986. Evidence for the role of a siderophore in promoting *Vibrio anguillarum* infections. *J. Gen. Microbiol.* **132**(Pt. 10): 2949–2952.

Genetic Variability of the Heme Uptake System among Different Strains of the Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*: Identification of a New Heme Receptor

Susana Mouriño, Isabel Rodríguez-Ares, Carlos R. Osorio, and Manuel L. Lemos*

Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura y Facultad de Biología,
Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 8 July 2005/Accepted 6 September 2005

The ability to utilize heme compounds as iron sources was investigated in *Vibrio anguillarum* strains belonging to serotypes O1 to O10. All strains, regardless of their serotype or isolation origin could utilize hemin and hemoglobin as sole iron sources. Similarly, all of the isolates could bind hemin and Congo red, and this binding was mediated by cell envelope proteins. PCR and Southern hybridization were used to assay the occurrence of heme transport genes *huvABCD*, which have been previously described in serotype O1. Of 23 strains studied, two serotype O3 isolates proved negative for all *huvABCD* genes, whereas nine strains included in serotypes O2, O3, O4, O6, O7, and O10 tested negative for the outer membrane heme receptor gene *huvA*. A gene coding for a novel outer membrane heme receptor was cloned and characterized in a *V. anguillarum* serotype O3 strain lacking *huvA*. The new heme receptor, named HuvS, showed significant similarity to other outer membrane heme receptors described in *Vibrionaceae*, but little homology (39%) to HuvA. This heme receptor was present in 9 out of 11 of the *V. anguillarum* strains that tested negative for HuvA. Furthermore, complementation experiments demonstrated that HuvS could substitute for the HuvA function in *Escherichia coli* and *V. anguillarum* mutants. The *huvS* and *huvA* sequences alignment, as well as the analysis of their respective upstream and downstream DNA sequences, suggest that horizontal transfer and recombination might be responsible for generating this genetic diversity.

Vibrio anguillarum is a fish pathogen that causes the disease known as vibriosis, a lethal hemorrhagic septicemia affecting a large number of mainly marine fish species, as well as bivalve mollusks and crustaceans (35, 36). Vibriosis is one of the most serious diseases affecting the mariculture industry worldwide, causing important economic losses, although vaccination programs have proved to be effective (34, 35). Sørensen and Larsen grouped *V. anguillarum* isolates in 10 serogroups based on antigen 'O' (29). The number of O-serotypes has been extended up to 23 (9, 27). However, only serotypes O1 and O2 and, to a lesser extent, serotype O3 are considered important pathogens since most vibriosis outbreaks described thus far were caused by one of these serotypes (11, 35). The other serotypes are considered environmental strains, although their pathogenic potential cannot be ruled out (26, 29, 35).

V. anguillarum expresses several virulence factors; the most important thus far recognized is the ability to produce different enzymes and toxins that notoriously contribute to cause disease (36). Another important virulence factor is the ability to scavenge the iron contained in host tissues that is bound by different iron-binding proteins. The main mechanisms of iron acquisition from these proteins are based on the synthesis of siderophores, whose production has been demonstrated in the main serotypes of *V. anguillarum* (3, 4, 12, 21, 32), even in those considered nonpathogenic (13). Interestingly, different mech-

anisms for siderophore-mediated iron acquisition seem to be present in *V. anguillarum* serotypes (12, 21, 32).

Siderophore-independent mechanisms for iron uptake have been described in many bacterial pathogens, one of the best known being the utilization of host heme compounds as iron sources (8, 25, 37). We have previously demonstrated that serotypes O1 and O2 of *V. anguillarum* can use heme groups as iron sources and that this ability can be useful for survival and to colonize fish tissues (14, 16).

Although several heme uptake systems have been described in bacteria, most of them include an outer membrane heme receptor and a TonB-dependent internalization system to transport the heme molecule into the periplasm, where a periplasmic heme-binding protein binds heme. A permease protein and an ATPase conforming an inner membrane-associated ABC transporter are necessary to further transport heme into the cytoplasm (25, 37). A genetic system consisting of nine clustered genes involved in heme uptake has been recently characterized in *V. anguillarum* serotype O1 strain 775 (20), which includes an iron-regulated outer membrane heme receptor HuvA, a TonB system, a periplasmic heme-binding protein HuvB, and an ABC transporter conformed by HuvC and HuvD. However, nothing is known about the presence of this mechanism of iron acquisition in other strains and serotypes of *V. anguillarum*. Since the siderophore-based mechanisms were found to be different among serotypes and strains of this fish pathogen (3), we sought to analyze the presence of a heme uptake mechanism in strains of *V. anguillarum* serotypes other than O1 in order to determine whether heme binding and heme utilization as an iron source is a species determinant of *V. anguillarum* and whether the genetic system

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura y Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain. Phone: 34-981563100, ext. 16080. Fax: 34-981547165. E-mail: mlemos@usc.es.

TABLE 1. Oligonucleotides used as primers in PCR

Primer	Nucleotide sequence	Amplified region
P3-1 HuvA-Short 3'	GGAATGTTGTGCGAGCACTA CATGGAACAACAAAGCCAGC	<i>huvA</i>
VAhuvB-2 VAhuvC1-rev	GAACGGATTATCAGTGC GGCG AAAATTGCGCCGACCAACAA	<i>huvB</i> and <i>huvB</i> probe
VAhuvC-1 HuvC.D	TTGTTGGTTCGGCGCAATTTT GCGAATTCGATTATAGCGAAGGGACGCG	<i>huvCD</i> probe
VAhuvC-2 HuvB.D	GCATTGACTACCTTGTGTGGT GCGAATTCGTGAGTAAGAGTGCACCAAGT	<i>huvC</i>
VAhuvD-2 RT-huvD	TTCTTCCTCAGCAAAGTACG TAGACCATTGGGAAATCCA	<i>huvD</i>
cDNA <i>huvZ</i> VAhuvX1	CCAAGAGTTTCGTCAAGAAC AAGGCGCTTTCATTCAAAT	Downstream <i>huvZ</i>
<i>huvS</i> <i>huvS</i> 6-rev	CGAAGACCAGCGGTTAATAT GCTCTCGCAGAAGAAGTTTC	<i>huvS</i>

for heme uptake is shared by the different serotypes and strains.

MATERIALS AND METHODS

Strains and culture conditions used. *V. anguillarum* strains have been described in previous studies (3, 26), and their serotypes and origins are indicated in Table 2. The identity of strains has been confirmed by biochemical tests, and rRNA 16S sequence. Serogroup was confirmed by slide agglutination tests (26). We have included 23 strains representative of serogroups O1 to O10. Cells were routinely grown at 25°C in tryptic soy agar (Difco) supplemented with 1% NaCl (TSA-1), as well as in M9 minimal medium (19) supplemented with 0.2% Casamino Acids (Difco) (CM9). *Escherichia coli* HB101, used as control, was grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium. All strains were stored frozen at -80°C in LB broth with 20% glycerol. Iron-deficient culture conditions were achieved by adding the nonassimilable iron chelator ethylenediamine-di-(*o*-hydroxyphenyl-acetic acid) (EDDA) at different concentrations to CM9.

Hemin and hemoglobin utilization assays. The utilization of hemin and hemoglobin as iron sources was tested in liquid and in solid media. Stock solutions of bovine hemoglobin (Sigma-Aldrich) and bovine hemin (Sigma-Aldrich) were prepared at 5 mM in deionized water and at 10 mM in 10 mM NaOH, respectively. Both solutions were freshly prepared before use and filter sterilized. CM9 medium was supplemented with 500 µM EDDA, a concentration sufficient to cause a total growth inhibition of strains to be tested. Utilization of hemin and hemoglobin was tested in CM9 plus EDDA liquid medium by adding these compounds at concentrations between 0.1 and 10 µM. A 1/100-log-phase inoculum grown in LB broth was used to inoculate CM9 medium. Growth of the strains was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) at different time intervals. Alternatively, soft CM9 medium supplemented with EDDA was mixed with a 1/100 LB broth inoculum and poured onto plates. After solidification, sterile paper disks impregnated with 10 µM hemoglobin or hemin were placed onto the medium. After incubation at 25°C for 48 h, visible growth around disks indicates utilization of the compound as iron source.

Hemin and Congo red binding. Hemin and Congo red binding by *V. anguillarum* cells was monitored in liquid medium according to the methods previously described (15, 28). Cells were incubated for 12 h in CM9 medium in duplicate with or without iron supplement (10 µM FeCl₃). After incubation, cells were resuspended in M9 salts (pH 7.5), and Congo red or hemin were incorporated to a final concentration of 30 µg ml⁻¹. The cell suspension was incubated at 25°C, and 1-ml samples were withdrawn at 30-min intervals. Samples were immediately centrifuged, and the absorbance of supernatants was measured at 488 nm for Congo red binding and at 400 nm for hemin binding.

Hemin-binding assays were also performed by using a solid-phase dot blot assay (15, 28). A total of 40 µl of a bacterial cell suspension (ca. 2 × 10⁷ CFU), grown in CM9 or CM9 plus hemin 10 µM, was filtered onto nitrocellulose membranes (0.45-µm pore size; Millipore) and tested for hemin binding as

previously described (6, 15). After immobilization, membranes were air dried and blocked with gelatin (2% in 50 mM Tris plus 0.9% NaCl) for 2 h. The membrane was washed several times in distilled water, immersed in a buffer (50 mM Tris, 0.9% NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.05% Triton X-100) containing hemin 10 µM, and incubated for 2 h at 30°C with gentle shaking. Membrane was then washed in distilled water and stained with DMB (3,3'-dimethoxybenzidine; Sigma). A DMB solution of 10 mg ml⁻¹ in distilled water was freshly prepared just before staining and, after being stirred for 15 min, 10 ml of a 0.5 M sodium citrate buffer (pH 4.4) and 200 µl of 30% H₂O₂ were added. After the mixture was stained for 1 to 3 min, the membrane was thoroughly washed with water and air dried.

The involvement of proteins in hemin binding was tested by treating cells with a protease before the hemin-binding assay. Before immobilization on nitrocellulose membranes, the cells were resuspended in phosphate-buffered saline buffer containing 0.2 mg of proteinase K (Sigma) ml⁻¹ and incubated for 2 h at 37°C. The cells were then washed two times with CM9 medium, filtered on nitrocellulose membranes, and tested for hemin binding as described above.

Southern hybridization and PCR. Chromosomal DNA from *V. anguillarum* strains was purified by using the Easy-DNA kit (Invitrogen). DNA was digested overnight with BglII, and restriction fragments were separated in 1.1% agarose gels. Southern blots were performed onto Hybond-N+ membranes (Amersham-Pharmacia) by using the ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System (Amersham-Pharmacia) according to the manufacturer's recommendations. A 1.0-kb HindIII fragment was used as a probe for the *huvA* gene. PCR screening for presence of *huvA* was accomplished with primers P3-1 and HuvAShort-3'. Probes for *huvB* and *huvCD* genes were PCR amplified and purified from agarose gels with a QIAquick gel extraction kit (QIAGEN). The oligonucleotides used to amplify the *huvB* probe were VAhuvB-2 and VAhuvC1-rev. The same primers were used for PCR screening of presence of *huvB* gene. *huvCD* probe was amplified with primers VAhuvC-1 and HuvC.D. To confirm the *huvCD* hybridization data, *huvC* and *huvD* genes were independently amplified in a PCR screening. *huvC* was amplified with VAhuvC-2 and HuvB.D. Primers used to amplify *huvD* were VAhuvD-2 and RT-huvD. Primers sequence and locations are described in Table 1 and Fig. 2A.

Cloning of a new heme receptor gene *huvS*. The existence of a putative new heme receptor downstream of *huvZ* gene in *huvA*-negative *V. anguillarum* strains was investigated in strain ET-208 (serotype O3) by using inverse PCR. For this purpose, chromosomal DNA was cut with a single restriction enzyme (BssHII) and self-ligated. Ligation products were used as a template in a PCR with primers cDNA-huvZ2 and VAhuvX1 (Table 1), by using the Expand Long Template Kit (Roche Diagnostics). The PCR product was cloned in pGEM-T Easy (Promega) to yield pSML88 and sequenced. The complete *huvS* gene was excised from pSML88 as an ApaLI fragment and cloned into the ApaLI site of vector pACYC177 to yield pSML92. *huvS* was excised from pSML92 as a PstI-HindIII fragment and cloned into the mobilizable vector pMMB208 to yield pSML93, which was transformed into *E. coli* S17-1-λ-pir and further transferred to *V. anguillarum* Δ*huvA* mutant strain (20) by conjugation.

TABLE 2. Bacterial strains of *V. anguillarum* used in this study, utilization of hemin as the only iron source, and presence of *huvA*, *huvBCD*, and *huvS* genes

Strain	Serotype	Source, location	Utilization of Hm ^a	Presence of ^b :		
				<i>huvA</i>	<i>huvBCD</i>	<i>huvS</i>
R82	O1	<i>Scophthalmus maximus</i> , Spain	+	+	+	—
ATCC ^c 43305	O1	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Denmark	+	+	+	—
775	O1	<i>Oncorhynchus kisutch</i> , United States	+	+	+	—
TM-14	O1	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Spain	+	+	+	—
96F	O1	<i>Morone saxatilis</i> , United States	+	+	+	—
RV22	O2	<i>Scophthalmus maximus</i> , Spain	+	+	+	—
ATCC 43306	O2	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	—	+	+
ATCC 14181	O2	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	—
43F	O2	<i>Morone saxatilis</i> , United States	+	+	+	—
13A5	O3	Seawater, Spain	+	—	—	—
B.1.1.2/4	O3	Seawater, Denmark	+	—	—	—
ET-208	O3	<i>Anguilla japonica</i> , Japan	+	—	+	+
11008	O3	<i>Dicentrarchus labrax</i> , France	+	—	+	+
ATCC 43307	O3	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Denmark	+	—	+	+
PT-493	O3	<i>Plecoglossus altivelis</i> , Japan	+	—	+	+
RPM 41.11	O4	<i>Scophthalmus maximus</i> , Spain	+	+	+	—
ATCC 43308	O4	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	—	+	+
ATCC 43309	O5	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	—
ATCC 43310	O6	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	—	+	+
ATCC 43311	O7	<i>Anguilla anguilla</i> , Denmark	+	—	+	+
ATCC 43312	O8	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	—
ATCC 43313	O9	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	+	+	—
ATCC 43314	O10	<i>Gadus morhua</i> , Denmark	+	—	+	+

^a Utilization of hemin (Hm) at 10 μ M as the only iron source tested in CM9 plates containing EDDA. All strains were also positive in the utilization of Hemoglobin as iron source.

^b Presence detected by PCR and confirmed by Southern blot hybridization.

^c ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Va.

The presence of *huvS* in *V. anguillarum* isolates was screened by PCR amplification with primers *huvS3* and *huvS6*-rev (Table 1), which amplify a 1,231-bp internal fragment of *huvS* gene. The results were confirmed by Southern blot hybridization, with this 1,231-bp PCR fragment as a probe.

DNA sequence and data analysis. The DNA sequence was determined by the dideoxy chain termination method using the CEQ DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter) using a capillary DNA sequencer CEQ 8000 (Beckman Coulter). The European Bioinformatics Institute services were used to consult the EMBL

and SWALL databases with the FASTA3 and BLAST algorithms. The EMBL accession number for the sequence described in this article is AM042548.

Complementation experiments. About 100 μ l of overnight cultures of *E. coli* 101ESD Δ (*entC-entA*) transformed with plasmids pSML33 (20) and pSML92 were added to 3 ml of molten soft CM9 minimal medium and plated onto appropriate preprepared CM9 or CM9 supplemented with 150 μ M 2,2'-dipyridyl plates. Sterile filter paper disks were loaded with 20 μ l of either 5 mM hemin or 0.1 mM hemoglobin. A disk containing 20 μ l of 10 μ M FeSO₄ was also included

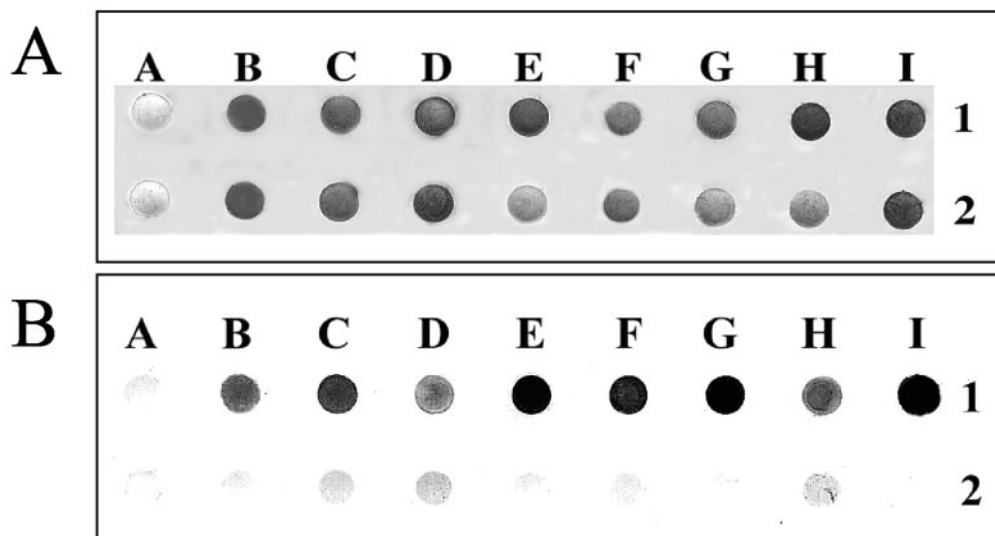


FIG. 1. (A) Hemin binding by whole cells from different strains of *V. anguillarum* cultured under iron-rich (1) and iron-deficient (2) conditions. (B) Effect of proteinase K treatment (2) on hemin binding compared to nontreated cells (1). Lanes: A, *E. coli* HB101 (negative control); B, 775; C, RV22; D, ET-208; E, RM 40.1; F, ATCC 43309; G, ATCC 43310; H, ATCC 43311; I, ATCC 43313.

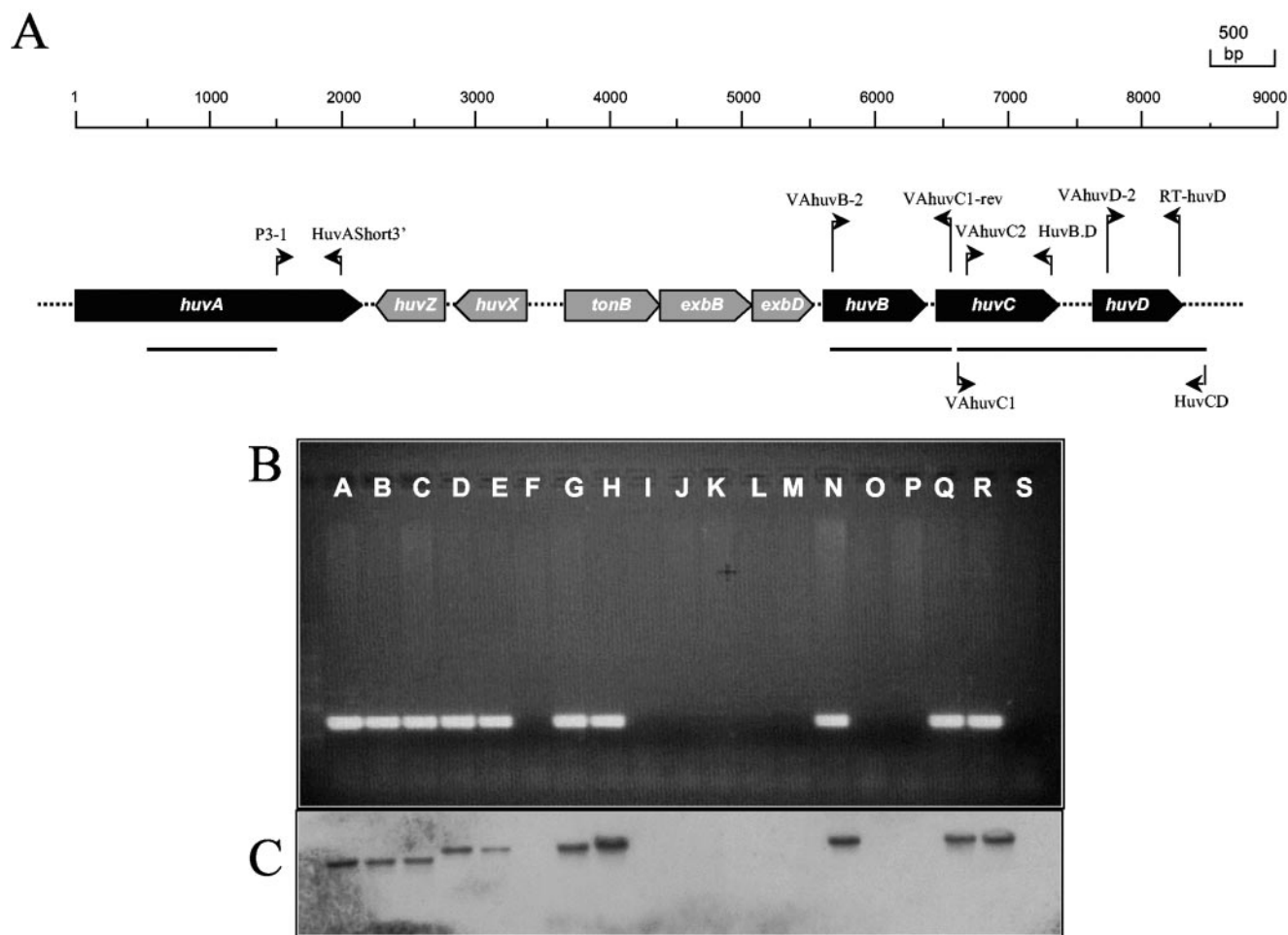


FIG. 2. (A) Physical map of the heme uptake cluster of *V. anguillarum* O1 strain 775 (see reference 20). Thin arrows indicate the position and direction of primers used in the PCR screening and in the amplification of *huvB* and *huvCD* DNA probes. Horizontal bars denote location of DNA probes. (B) Results of PCR screening for presence of the heme receptor *huvA* gene in a collection of *V. anguillarum* strains. (C) Southern blot confirmation of presence of *huvA* gene. Letters in panels B and C denote *V. anguillarum* strains as follows: A, 775; B, R-82; C, TM-14; D, 96-F; E, ATCC 14181; F, ATCC 43306; G, RV22; H, 43-F; I, PT-493; J, 13A5; K, 11008; L, ET-208; M, ATCC 43307; N, RPM 41.11; O, ATCC 43310; P, ATCC 43311; Q, ATCC 43312; R, ATCC 43313; S, ATCC 43314.

as positive control. The results were annotated as positive or negative after 24 h of incubation. Overnight cultures of *V. anguillarum* Δ *huvA* (20) transformed with pSML93 were subcultured 1:100 in tubes of CM9 medium supplemented with 5 μ M EDDA, with or without hemin 10 μ M or hemoglobin 1 μ M as the sole iron sources. FeSO_4 was also used at 10 μ M as positive control. After 24 h of incubation the OD_{600} was measured.

RESULTS AND DISCUSSION

Utilization of hemin and hemoglobin as iron sources. All strains, regardless of their serotype or isolation source, could utilize hemin or hemoglobin as the only iron sources when cultured in iron-restricted conditions (Table 2). Growth curves in the presence of these iron sources showed no significant differences between strains (data not shown). This suggests that utilization of heme compounds as sole iron sources is a characteristic of the species *V. anguillarum*, since the 23 tested strains showed the same heme utilization profile. In previous studies we reported that hemin and hemoglobin could promote the in vitro growth of *V. anguillarum* strains belonging to se-

rotypes O1 and O2 (14). However, no data were available for serotypes O3 to O10. The present study confirms that a system for the uptake of heme and its utilization as an iron source is likely widespread in all *V. anguillarum* strains.

The presence of a heme uptake system is not a marker of virulence in *V. anguillarum*, since serotypes O4 to O10 are environmental and unable to cause an infection, while retaining the ability to use heme compounds as iron source. However, this does not rule out a role for heme utilization during the infective process of this fish pathogen. The ability of a bacterial pathogen to acquire iron from heme compounds present in host tissues is supposed to constitute an advantage for colonization and to establish an infection, as has been demonstrated in pathogens such as *V. cholerae* (10), *Haemophilus ducreyi* (30), *Streptococcus pneumoniae* (33), *Neisseria meningitidis* (31), and *V. anguillarum* serotype O1 (16). *V. anguillarum* strains have been reported to produce extra cellular enzymes such as hemolysins and cytolysins (7, 36). Thus, once

HuvS	MNKVITQMYTKTLLSASILLALSPAALAEVSRFDEVVVSATRTQSKKDVSSSIESISS	60
HuvA	MNKVITQMYTKTLLSASILLALSPAALAEVSRFDEVVVSATRTSQAIKNTAASVAVISS	60
	*****:*****:***	
HuvS	SEIAEVMADNIQQALNSTPGVEAEGNGRFGIAGFNIRGMDGSRVKMMVDGVQPPVPYNPG	120
HuvA	KDIEANMAKDVAAILLEYTPGVSTNSSRQGVQITINIRGVEGNRIKIMVDGVTQQAQFDGG	120
	..* **.: * : ****.:... * * : *****:*.*:***** * :.: *	
HuvS	-ATEQRKYPNAIEIDTLQAEVKNKGASSTLYGSDALGGVLLRTKNPEDVLVTEGNEQRF	179
HuvA	PYSFVNSSAISIDPDMVKSVEVIKGAASSLHGSDAIGGVVAFDTKDPDFLKGDAITGGQ	180
	: . . . :*: * :.:** ***:**:*:*:*:*:* : **:*.* * ..	
HuvS	GIKSGYTSANEQFKTTLTWAMRQDKLETLLMATYANGSETQTHGSGSEIEGPDRAQNPFA	239
HuvA	AKLS-YSEDKSFSEHIAIANRSGNLETIVAYTRRDQEQNFADRK-----EDYSIETQ	234
	. * *: * :.:* . : * *.:*****: * :*.* *.... : : :.	
HuvS	DSKLGNNLAKAFYQANDNHRGLTAEYYNKRYDEDELNYNGYSIMPGFYTDNYNQDTNE	299
HuvA	DSAKNDLLKLQYQLSDAHRLEFFGEALHNKTDSDIAHS-----SYKNYHGQDTTK	285
	** :.* * * * * * * * :. * * :.: *.* : :.: :.*.*:	
HuvS	RLRVGIEHQWLMNTLLADSLD----WSLN-----FQDSSALAKNYDTTPSNGRRLRE	347
HuvA	QYRLGIKHIWLADSAIADTITSRASWQSKEDNGLTHRFQPASSGRPPYTPANADNQTKD	345
	: *:*:* * * :.:***: * . : * * :.: * * :.: * : :.: :.	
HuvS	RESSDQSIQFDGQLSKAVDLNGLNHEFTYGASYINNDFDLDNDYKLDAGTSTPGSSGIP	407
HuvA	YFYNEKDIELETQLDKLVTGLQTEHNFYGLSFASDISNINTELNSDPATPNQVLVYIP	405
	...:*** * * . . *.* * * :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. *	
HuvS	DATIVQWGLFLQDQAYFIQDRLLITAGLRYDSFEATPSVDAGYTQSYEANKDSAFTARLG	467
HuvA	DATDQKIGLFLVQDEITLLSGNLIVTPGLRYDSFSTDP--GGSTTEPLVKFDDSAITSLRG	463
	*** : *:*:* :.:...*.*.*.*.*.*.*.* : * .. *.* . *.*:*:*.*	
HuvS	SVFHVNPENLAVFGQISQGFKAFTVYDLYFYFN--QGAIIDANPDLKAEKSLSYELGLRG	524
HuvA	ALYRINNQHVSFAQVSQGFRAFPNFTELYTYDNIHRYVNDPNPYLKSETSLAYELGYR	523
	:.:* : *:*.*:*:*:*.*.*.*.*.* : : : *.* *.*:*.*:*.*.* *	
HuvS	QNDSTNFEITTFYNEYTDFITQSKTGKQGGKDIPTKENLDEVITYGAEFSSRIDLDKAFN	584
HuvA	NTNVSATEISAFYSYDQDFIERVTTKKVNGITHYSYVNLSEATIKGIELSNQLKLDQLIG	583
	:.: : *:*:*.*:* * * : * *.* : : *.*.* * *.*:*:*.*.* :.	
HuvS	APQGTYTRLAIAAEGEDKKTGDALDSVAPLTSNVGLGLDRD--QYGALLNVKMWASKTD	642
HuvA	APNGMSTRLAASYSGEDG-NGRPLNSVNPWNVAALNYDDESTWGTSLKLNITAAKSA	642
	:.* *.* :.:*** * . *:*.* * . .*. * : : *.* :.: *.*:	
HuvS	WQSNTN-----ADAAGYTLIDLTAYYKPMQGLTIRAGLFNALDKKYWLYSDLTGRD	693
HuvA	GNINRDQLNSGTENQVELPSATIVDITAYFKPMQDVITAGIFNLTDKEYYRWNDIRGKT	702
	: * : . . . :*:***:*:*.*.* *.* *.* *.* :.: *.* :	
HuvS	ATGETFNIDSKSQPGRNWGLNVDYQF	719
HuvA	NLDNDY-----SQAERNYAITAKYEF	723
	:.: : **.*.*:..*.*	

FIG. 3. Alignment of the amino acid sequences of *V. anguillarum* HuvS and HuvA outer membrane heme receptors. Numbers refer to the amino acid position. Asterisk indicates amino acid positions conserved in the two proteins, and similar residues are denoted by periods. The putative TonB boxes are shown boxed.

the bacterium invades the host, these enzymes could release heme groups from blood cells and make heme iron available for its utilization by the pathogen.

Hemin binding by *V. anguillarum* cells surface. Whole cells from all strains could bind hemin in a solid-phase dot blot assay (Fig. 1A) or in liquid media. Hemin binding was confirmed by Congo red binding assays in liquid media (data not shown). No difference in binding was noted among strains tested (Fig. 1A). Binding was inhibited in all serotypes and strains tested when cells were previously treated with proteinase K (Fig. 1B), which indicates the involvement of cell surface proteins in heme binding. In addition, heme-binding ability was shown to be independent of the iron load in the culture medium, suggesting that constitutive outer membrane proteins play a role in this function.

Hemin-binding ability is widespread in many bacteria, and several cell surface molecules such as polysaccharides (1, 5) or proteins can mediate this binding. For example, at least eight membrane-associated proteins of *Bartonella quintana* bind hemin (2). The role of cell surface proteins in heme binding in *V. anguillarum*

was previously reported in serotype O1 and O2 strains, where outer membrane proteins of 39 and 37 kDa were isolated, respectively (17). However, these outer membrane heme-binding proteins may not be involved in heme transport across the membrane. In previous studies, we could demonstrate that mutation of the outer membrane heme receptor (HuvA) in a serotype O1 strain does not have a significant influence on hemin binding (16), suggesting that *V. anguillarum* has surface molecules with hemin-binding activity but without transport function.

Differential occurrence of heme transport genes. In a previous study, a gene cluster involved in the uptake of heme was characterized in *V. anguillarum* serotype O1 strain 775 (20). This cluster included genes for the outer membrane receptor HuvA, the periplasmic hemin-binding protein HuvB, the inner membrane permease HuvC, and the inner membrane ATPase HuvD proteins, the last two constituting an ABC transporter (Fig. 2A). To assess the presence of these heme transport genes among different *V. anguillarum* strains, we performed PCR amplification with specific primers for *huvABCD* genes (Table 1). The results are summarized in Table 2 and show that

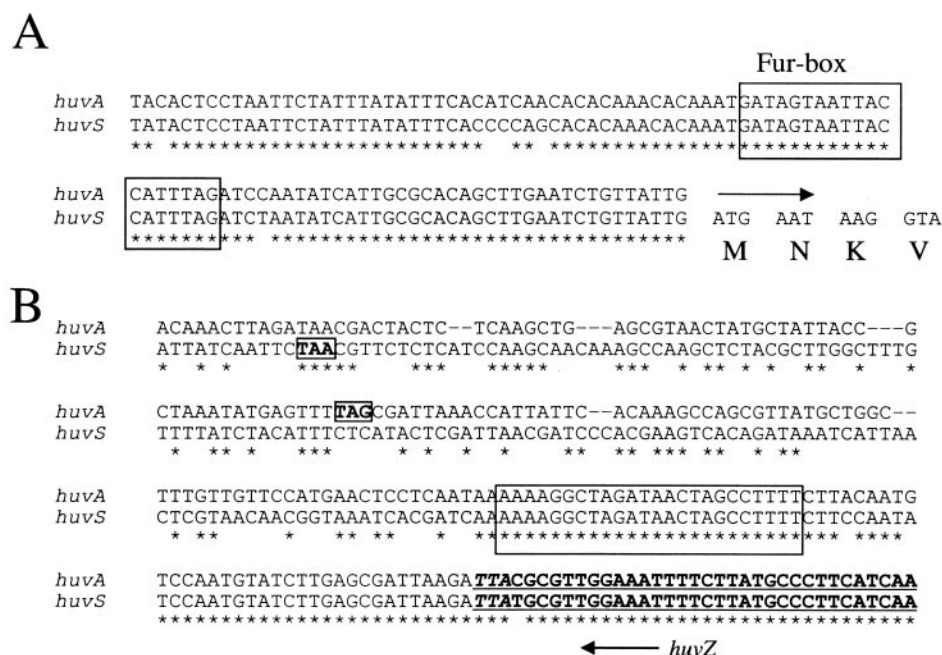


FIG. 4. (A) Comparative sequence analysis of the nucleotide sequence of *huvA* and *huvS* predicted promoter regions. A putative conserved Fur-box is boxed. The arrow indicates the translation start site for both *huvA* and *huvS*. The N-terminal residues of HuvS and HuvA are denoted by using the single-letter code. (B) Comparative sequence analysis of the predicted termination regions of *huvA* and *huvS*. The respective stop codons are shown in bold and boxed. A region of dyad symmetry conforming a putative transcriptional terminator is boxed. Sequence of the 3' end of the neighbor *huvZ* gene is shown in bold and underlined, and the *huvZ* stop codon is shown in italics.

strains 13A5 and B1.1.2/4 (serotype O3) were negative for all genes assayed. In addition, strain ATCC 43306 (serotype O2), all serotype O3 strains, strain ATCC 43308 (serotype O4), strain ATCC 43310 (serotype O6), strain ATCC 43311 (serotype O7), and strain ATCC 43314 (serotype O10) were negative for the presence of the heme receptor gene *huvA*, (Table 2 and Fig. 2B), whereas all of them gave positive results for the presence of *huvBCD* genes. Southern blot hybridizations with probes specific for *huvA*, *huvB*, and a probe for *huvCD* genes confirmed the results obtained by PCR (Table 2 and Fig. 2C).

Interestingly, all serotype O3 strains included in the present study proved negative for *huvA*, the outer membrane receptor (Table 2 and Fig. 2). Moreover, two of these strains (13A5 and B1.1.2/4), which were isolated from seawater, tested negative for the four heme transport genes assayed (*huvABCD*), being the unique *V. anguillarum* isolates which did not share the genes for the periplasmic hemin-binding protein and the ABC transporter reported in serotype O1. All of the serotype O1 strains showed positive hybridization for *huvABCD*, indicating a conserved gene content in their heme uptake mechanism. In the rest of the strains, no relationship between serogroup and the presence or absence of these genes could be inferred.

In a previous study we demonstrated that *huvABCD* genes are essential for heme utilization in serotype O1 strain 775 since mutation of any of these genes cause the loss of ability to grow in presence of heme or hemoglobin as sole iron sources (20). This therefore indicates that *V. anguillarum* 775 has only one functional heme uptake system, and no additional redundant genes can substitute for the functions of either *huvABCD*. In contrast, in *V. cholerae*, redundant gene functions have been described for the homologues of *huvABCD* (18, 22). In the

present work, we report that some non-O1 *V. anguillarum* strains are able to utilize heme compounds as iron source while lacking either *huvA*, *huvBCD*, or the four genes altogether. This indicates that additional, yet-uncharacterized genes must substitute for these transport functions in the strains that proved negative for the genes assayed. The differential occurrence of several heme uptake genes in different strains of *V. anguillarum* suggests the possible use of these genes as epidemiological markers.

Cloning and characterization of *huvS*, a new heme receptor gene. In *V. anguillarum*, the existence of negative strains for the *huvA* gene suggests the likely existence of one or more additional receptors with heme transport activity. In these strains the nucleotide sequence of the putative unknown heme receptor could differ with respect to that of the previously characterized *huvA* (16) to prevent it from hybridizing with the *huvA* probe or from being amplified by PCR. We hypothesized that, if an alternative outer membrane heme receptor gene existed in the *huvA*-negative *V. anguillarum* strains and if its chromosomal location were conserved with respect to *huvA*, it would be feasible to clone it by chromosome walking and investigating the DNA region in the vicinity of *huvZ* (Fig. 3).

In order to test this possibility, an Inverse-PCR aimed at amplifying DNA downstream of *huvZ* gene was carried out with the *huvA*-negative ET-208 strain (serotype O3). A PCR product was obtained and sequenced to completion, and a complete open reading frame (ORF) consisting of 2,160 bp and coding for a putative protein of 719 amino acids was inferred, which we named HuvS. The highest similarities were to *V. mimicus* heme receptor MhuA (63% identity), *Vibrio fischeri* heme receptor (59%), and *Photobacterium damsela*

TABLE 3. Utilization of hemin or hemoglobin as an iron source by *E. coli* and *V. anguillarum* heme uptake-deficient mutants complemented with outer membrane heme receptors *huvA* and *huvS* genes

Strain	Gene(s) present in plasmids	Utilization of ^a :		
		Hm at 10 μM	Hb at 1 μM	FeSO ₄ at 10 μM
<i>E. coli</i>				
101ESD	None	—	—	+
101ESD/pCAR121	<i>huvA</i>	—	—	+
101ESD/pSML33	<i>tonB-exbBD-huvBCD</i>	—	—	+
101ESD/pSML33/pCAR121	<i>tonB-exbBD-huvBCD huvA</i>	+	+	+
101ESD/pSML92	<i>huvS</i>	—	—	+
101ESD/pSML33/pSML92	<i>tonB-exbBD-huvBCD huvS</i>	+	+	+
<i>V. anguillarum</i> ^b				
H775-3	None	+ (1.27)	+ (1.31)	+ (1.20)
H775-3 Δ <i>huvA</i>	None	— (0.18)	— (0.18)	+ (1.20)
H775-3 Δ <i>huvA</i> /pCAR121	<i>huvA</i>	+ (1.17)	+ (1.10)	+ (1.18)
H775-3 Δ <i>huvA</i> /pSML93	<i>huvS</i>	+ (1.15)	+ (1.06)	+ (1.19)

^a + or —, growth or no growth in the plate assays. Hm, hemin; Hb, hemoglobin.

^b Numbers in parentheses indicate the OD₆₀₀ mean values in the liquid medium assays (see Materials and Methods) reached after 24 h of incubation.

heme receptor HutA (47%). The deduced HuvS protein showed 39% identity to *V. anguillarum* HuvA, being remarkable the fact that the first 44 positions were identical between the two *V. anguillarum* heme receptors, whereas the rest of the molecule showed significant sequence divergence (Fig. 3).

HuvS contains conserved features that are common to other TonB-dependent outer membrane heme receptor proteins. HuvS shares with HuvA a 100% identical TonB-box (Fig. 3). In addition, the amino acid sequence of HuvS shows a conserved terminal phenylalanine residue that is required for incorporation into the outer membrane and that is shared by most of the heme receptors described to date. The nucleotide sequence upstream of the *huvS* start codon shows 96% identity to the respective sequence of *huvA* (Fig. 4A) and contains a putative binding site for the Fur protein (the so-called Fur-box). This clearly points out to that *huvS* transcription is regulated by Fe(III) levels, as has been demonstrated for *huvA* by transcriptional fusion analysis (S. Mouriño, C. R. Osorio, M. L. Lemos, and J. H. Crosa, unpublished data). However, as stated above, the hemin-binding phenotype of *huvA* or *huvS* containing strains is independent of iron levels. This apparent contradiction can be explained by the multicomponent nature of the hemin-binding ability (16).

Downstream of the termination codon, there is a region of nucleotide sequence that differs between the two genes, but the sequence is again highly conserved in the region close to the stop codon of the neighbor *huvZ* gene and nearly identical in the coding sequence of *huvZ* (Fig. 4B). This stretch of conserved sequence contains a region of dyad symmetry that might constitute a putative transcriptional terminator. The fact that the nucleotide sequence of *huvA* (from serotype O1 strain 775) and *huvS* (from serotype O3 ET-208 strain) is highly conserved in the regions flanking the ORF, but highly variable in the ORF itself, suggests that one of the two genes could have been gained by lateral transfer. Recombination could have occurred within the *huvZ* sequence and the DNA upstream of *huvA*/*huvS*, and lead to the exchange of the sequence corresponding to the heme receptor ORF.

The presence of *huvS* in *V. anguillarum* isolates was screened by PCR amplification and confirmed by Southern blot hybrid-

ization. The results demonstrated that *huvS* is present in nine *V. anguillarum* strains that have tested negative for *huvA* (Table 2). *huvS* gene was present in four of six of the serotype O3 strains tested, as well as in strains of serotypes O2, O4, O6, O7, and O10. Curiously, the two serotype O3 strains that tested negative for the four genes *huvABCD* also tested negative for *huvS* (Table 2). The nucleotide sequence of *huvBCD* genes in strains containing *huvS* was almost identical to the *huvBCD* genes of strains with *huvA* (data not shown). According to the virulence degree of each strain, as reported by Pazos et al. (26), there is not a clear correlation between presence of *huvA* or *huvS* and the virulence degree. However, it is noteworthy that the two strains in which the *huvBCD* genes and *huvA* or *huvS* were absent are environmental isolates with a low degree of virulence (50% lethal dose of $>10^7$).

Although heme uptake systems seem to be quite similar in different species (20, 24), diversity of specific heme transport genes within a species has also been reported previously. For example, Worst et al. (38) described the existence of several heme utilization loci in *Helicobacter pylori*. In *V. cholerae*, at least three different outer membrane heme receptor genes coexisting in the same strain have been reported (18). These three receptors have differences in their sequence, but all of them share functional characteristics in the use of heme as iron source. Similarly, strains of *Pseudomonas aeruginosa* containing two distinct outer membrane heme receptors have been described (23). In the present study, we have demonstrated that two different heme receptors exist within *V. anguillarum* but do not coexist in the same cell, which makes a difference with the situation reported in *V. cholerae*.

Substitution of *huvA* function by *huvS*. To test that HuvS actually functions as an outer membrane heme receptor, a plasmid containing this gene was transformed into *E. coli* 101ESD previously transformed with plasmid pSML33. This strain contains all of the genes necessary for heme internalization but lacks an outer membrane heme receptor and thus cannot use heme as an iron source (20). However, when this strain was transformed with plasmid pSML92 containing *huvS*, it could utilize hemin and hemoglobin as sole iron sources, demonstrating that the new *V. anguillarum* heme receptor can

substitute HuvA in the *E. coli* complementation model (Table 3). In addition, the *huvS* gene was introduced into a *V. anguillarum* Δ *huvA* mutant strain (unable to grow with hemin or hemoglobin as sole iron sources) and tested for its ability to restore the wild-type phenotype. The Δ *huvA* strain transformed with plasmid pSML93 recovered the ability to grow with heme compounds as the sole iron source and achieving growth rates similar to wild-type levels (Table 3). This confirms that HuvS functions in *V. anguillarum* as an outer membrane heme receptor and that it can efficiently substitute the HuvA function.

Conclusion. The results obtained in the present study reveal that the heme uptake system of *V. anguillarum* shows genetic diversity. The sequence analysis of *huvS* and *huvA* and their respective upstream and downstream DNA sequences suggest that horizontal transfer and recombination might be responsible for generating this variability. Still, two *V. anguillarum* strains showed to lack *huvABCD* and *huvS* genes, suggesting that the genetic diversity of the heme uptake system of this species can be higher than expected. Studies to analyze what genes substitute for *huvABCD* roles in these strains are currently under way. Furthermore, the fact that all *V. anguillarum* strains examined have a heme uptake system, although encoded by different genetic determinants, suggest that this mechanism must have a basic role in the cell physiology, although their role in virulence is still unclear.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant AGL2003-00086 from the Ministry of Science and Technology of Spain (cofunded by the FEDER Programme from the European Union) and grants PGIDIT04PXIC23501PN and PGIDIT04RMA261014PR-3 from Xunta de Galicia to M.L.L.

REFERENCES

- Bélanger, M., C. Bégin, and M. Jacques. 1995. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect. Immun.* **63**:656–662.
- Carroll, J. A., S. A. Coleman, L. S. Smitherman, and M. F. Minnick. 2000. Hemin-binding surface proteins from *Bartonella quintana*. *Infect. Immun.* **68**:6750–6757.
- Conchas, R. F., M. L. Lemos, J. L. Barja, and A. E. Toranzo. 1991. Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2956–2962.
- Di Lorenzo, M., M. Stork, A. F. Alice, C. S. López, and J. H. Crosa. 2004. *Vibrio*, p. 241–255. In J. H. Crosa, A. R. Mey, and S. M. Payne (ed.), *Iron transport in bacteria*. ASM Press, Washington, D.C.
- Do Vale, A., B. Magariños, J. L. Romalde, M. L. Lemos, A. E. Ellis, and A. E. Toranzo. 2002. Binding of haemin by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Dis. Aquat. Org.* **48**:109–115.
- Fouz, B., R. Mazoy, M. L. Lemos, M. J. del Olmo, and C. Amaro. 1996. Utilization of hemin and hemoglobin by *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2806–2810.
- García, T., K. Otto, S. Kjelleberg, and D. R. Nelson. 1997. Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1034–1039.
- Genco, C. A., and D. W. Dixon. 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* **39**:1–11.
- Grisez, L., and F. Ollevier. 1995. Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4367–4373.
- Henderson, D. P., and S. M. Payne. 1994. *Vibrio cholerae* iron transport systems: roles of haeme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems. *Infect. Immun.* **62**:5120–5125.
- Larsen, J. L., K. Pedersen, and I. Dalsgaard. 1994. *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. *J. Fish Dis.* **17**:259–267.
- Lemos, M. L., P. Salinas, A. E. Toranzo, J. L. Barja, and J. H. Crosa. 1988. Chromosome-mediated iron-uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **170**:1920–1925.
- Lemos, M. L., R. Mazoy, R. F. Conchas, and A. E. Toranzo. 1991. Presence of iron uptake mechanisms in environmental non-pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **11**:150–152.
- Mazoy, R., and M. L. Lemos. 1991. Iron-binding proteins and heme compounds as iron sources for *Vibrio anguillarum*. *Curr. Microbiol.* **23**:221–226.
- Mazoy, R., and M. L. Lemos. 1996. Identification of heme-binding proteins in the cell membranes of *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**:265–270.
- Mazoy, R., C. R. Osorio, A. E. Toranzo, and M. L. Lemos. 2003. Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilization and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Arch. Microbiol.* **179**:329–338.
- Mazoy, R., F. Vázquez, and M. L. Lemos. 1996. Isolation of heme-binding proteins from *Vibrio anguillarum* using affinity chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**:19–23.
- Mey, A. R., and S. M. Payne. 2001. Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Mol. Microbiol.* **42**:835–849.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mourinho, S., C. R. Osorio, and M. L. Lemos. 2004. Characterization of the heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **186**:6159–6167.
- Muñoz, L., M. L. Lemos, and Y. Santos. 2001. Presence of high-affinity iron uptake systems in fish-isolated and environmental strains of *Vibrio anguillarum* serotype O3. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**:79–83.
- Occhino, D. A., E. E. Wyckoff, D. P. Henderson, T. J. Wrona, and S. M. Payne. 1998. *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol. Microbiol.* **29**:1493–1507.
- Ochsner, U. A., Z. Johnson, and M. L. Vasil. 2000. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**:185–198.
- O'Malley, S. M., S. L. Mouton, D. A. Occhino, M. T. Deanda, J. R. Rashidi, K. L. Fuson, C. E. Rashidi, M. Y. Mora, S. M. Payne, and D. P. Henderson. 1999. Comparison of the heme iron utilization systems of pathogenic vibrios. *J. Bacteriol.* **181**:3594–3598.
- Osorio, C. R., and M. L. Lemos. 2002. Haeme iron acquisition mechanisms in *Vibrionaceae*, p. 419–436. In S. G. Pandalai (ed.), *Recent research developments in microbiology*, vol. 6. Research Signpost, Kerala, India.
- Pazos, F., Y. Santos, B. Magariños, I. Bandín, S. Núñez, and A. E. Toranzo. 1993. Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum*-related organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2969–2976.
- Pedersen, K., L. Grisez, R. van Houdt, T. Tiainen, F. Ollevier, and J. L. Larsen. 1999. Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Curr. Microbiol.* **38**:183–189.
- Smalley, J. W., A. J. Birss, A. S. McKee, and P. D. Marsh. 1995. Congo red binding by *Porphyromonas gingivalis* is mediated by a 66-kDa outer-membrane protein. *Microbiology* **141**:205–211.
- Sørensen, U. B. S., and J. L. Larsen. 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:593–597.
- Stevens, M. K., S. Porcella, J. Klesney-Tait, S. Lumbley, S. E. Thomas, M. V. Norgard, J. D. Radolf, and E. J. Hansen. 1996. A hemoglobin-binding outer membrane protein is involved in virulence expression by *Haemophilus ducreyi* in an animal model. *Infect. Immun.* **64**:1724–1735.
- Stojilkovic, I., V. Hwa, L. de SaintMartin, P. O'Gaora, X. Nassif, F. Heffron, and M. So. 1995. The *Neisseria meningitidis* hemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol. Microbiol.* **15**:531–541.
- Stork, M., M. Di Lorenzo, T. J. Welch, L. M. Crosa, and J. H. Crosa. 2002. Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* **48**:222–228.
- Tai, S. S., C.-J. Lee, and R. E. Winter. 1993. Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **61**:5401–5405.
- Toranzo, A. E., and J. L. Barja. 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Org.* **9**:73–82.
- Toranzo, A. E., and J. L. Barja. 1993. Virulence factors of bacteria pathogenic for cold water fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* **3**:5–36.
- Toranzo, A. E., Y. Santos, and J. L. Barja. 1997. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. *Dev. Biol. Stand.* **90**:93–105.
- Wandersman, C., and I. Stojilkovic. 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors, and hemophores. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:215–220.
- Worst, D. J., J. Maaskant, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, and J. G. Kusters. 1999. Multiple haem-utilization loci in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **145**:681–688.

Transcriptional organization and regulation of the *Vibrio anguillarum* heme uptake gene cluster

Susana Mouriño ^{a,b}, Carlos R. Osorio ^a, Manuel L. Lemos ^{a,*}, Jorge H. Crosa ^b

^a Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Aquaculture and Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, Campus Sur, Santiago de Compostela 15782, Spain

^b Department of Molecular Microbiology and Immunology, Oregon Health and Science University, SW Sam Jackson Park Road, Portland, OR 97239, USA

Received 23 November 2005; received in revised form 17 January 2006; accepted 19 January 2006

Available online 3 March 2006

Received by A. Bernardi

Abstract

Vibrio anguillarum can utilize heme and hemoglobin as iron sources. Nine genes, *huvA*, *huvZ*, *huvX*, *tonB1*, *exbB1*, *exbD1*, *huvB*, *huvC*, *huvD*, encoding the proteins involved in heme transport and utilization, are clustered in a 10-kb region of chromosomal DNA. Reverse Transcriptase-PCR analysis demonstrated that the gene cluster is arranged into three transcriptional units: (1) *huvA*, (2) *huvXZ*, and (3) *tonB1exbB1D1-huvBCD*. Transcriptional start sites for each *huvA*, *huvX*, and *tonB1* promoters were identified by primer extension analysis, and their respective –10 and –35 regions were shown to exhibit similarity to those of sigma⁷⁰-recognized promoters. Expression from the three promoters, as analyzed by transcriptional fusions to a promoter less *lacZ* gene, was regulated by the iron concentration. Furthermore, analysis of the β-galactosidase activities of these fusions in a *V. anguillarum* *fur* mutant demonstrated that the ferric uptake regulator repressor protein (Fur) is directly involved in the negative iron-mediated regulation of the heme uptake cluster.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Heme transport; Gene regulation; Iron-regulated genes; Fur

1. Introduction

Heme and heme-containing proteins are an important source of iron for many bacterial species (Lee, 1995; Stojiljkovic and Perkins-Balding, 2002). Numerous gram-negative pathogens possess transport mechanisms for obtaining iron from these sources. In the most common mechanism heme is bound by a TonB-dependent outer membrane receptor, and transported subsequently into the cytosol by a periplasmic heme-binding protein and an inner membrane-associated ABC-transporter (Stojiljkovic and Perkins-Balding, 2002). This system has been described in several pathogens as *Vibrio cholerae*, *Plesiomonas shigelloides*,

or *Photobacterium damsela*, among others (Henderson and Payne, 1993; Henderson et al., 2001; Juárez-Río et al., 2005). Some other heme-uptake mechanisms consist of an outer membrane receptor and a heme-binding protein that is secreted via a type I protein secretion system, as in *Serratia marcescens* (Ghigo et al., 1997) and *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner et al., 2000).

The Fur protein has been described as a transcriptional regulator that represses the expression of many of the genes involved in iron acquisition (Escobar et al., 1999). However, in some organisms, Fur can act indirectly as a positive regulator in controlling gene expression, for instance through the action of the small RNA RyhB (Massé and Gottesmann, 2002). Some of the genes involved in heme utilization contain potential Fur-binding boxes in their promoter regions, suggesting that they may be iron-regulated through the Fur repressor (Lee, 1995).

Vibrio anguillarum is the aetiological agent of a septicemic disease known as vibriosis, which affects a large number of marine fish species. Like other bacteria, pathogenic strains of *V. anguillarum* can also acquire iron by utilization of

Abbreviations: Fur, ferric uptake regulator; ABC-transporter, ATP-binding-cassette transporter; EDDA, Ethylenediamine-di-(o-hydroxy-phenylacetic acid); TSA, Tryptic Soy Agar; CM9, M9 minimal medium supplemented with casaminoacids; Km, Kanamycin; Ap, Ampicillin; Gm, Gentamycin; FAC, Ferric ammonium citrate; RT-PCR, Reverse transcription coupled Polymerase Chain Reaction.

* Corresponding author. Tel.: +34 981563100x16080; fax: +34 981547165.

E-mail address: mlemos@usc.es (M.L. Lemos).

Table 1
Bacterial strains and plasmids

Designation	Relevant characteristic(s)	Reference/source
Strains		
<i>V. anguillarum</i>		
H775-3	Strain deficient in anguibactin biosynthesis, derived from strain 775 by curing of pJM1	Laboratory stock
775met11	775 strain <i>fur</i> , deficient in Fur protein biosynthesis	Tolmasky et al., 1994
B106 (Δ <i>huvX</i>)	H775-3 derivative with a deletion in <i>huvX</i> gene	Mouriño et al., 2004
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Cloning strain	Laboratory stock
S17-1- λ pir	Cloning strain, lysogenized with λ pir bacteriophage, host for π -requiring plasmids; conjugal donor	Laboratory stock
Plasmids		
pCR2.1-TOPO	Cloning vector, Ap ^r , Km ^r	Invitrogen
pHRP309	Promoterless- <i>lacZ</i> plasmid for transcriptional fusion, Gm ^r	Parales and Harwood, 1993
<i>phuvA</i> : <i>lacZ</i>	Putative promoter region of <i>huvA</i> cloned into the pHRP309 vector	This study
<i>ptonB1</i> : <i>lacZ</i>	Putative promoter region of <i>tonB1</i> cloned into the pHRP309 vector	This study
<i>phuvX</i> : <i>lacZ</i>	Putative promoter region of <i>huvX</i> cloned into the pHRP309 vector	This study
<i>phuvB</i> : <i>lacZ</i>	Putative promoter region of <i>huvB</i> cloned into the pHRP309 vector	This study

host heme and heme-containing proteins including hemoglobin, hemin–hemopexin and hemoglobin–haptoglobin (Mazoy and Lemos, 1991). In a previous work, we characterized this heme utilization system in *V. anguillarum* (Mouriño et al., 2004). The system comprises genes coding for an outer membrane receptor (*huvA*); a protein with uncharacterized function (*huvX*); a putative heme storage protein (*huvZ*); a TonB1 system (comprising *tonB1*, *exbB1* and *exbD1* genes); a periplasmic heme-binding protein (*huvB*); a cytoplasmic membrane permease protein (*huvC*); and an ATP-binding protein (*huvD*). Among these genes, *huvA*, *huvZ* and *huvBCD* proved to be necessary for heme utilization as a sole iron source in *V. anguillarum*, while *huvX* was not.

In the present study, RNA analysis identified the transcriptional start sites of the heme uptake cluster and demonstrated that these genes are organized in two operons, and that *huvA* is independently transcribed from its own promoter. In addition, regulation of the heme uptake cluster was examined by measuring the expression of the three identified promoters in promoter-*lacZ* transcriptional fusion constructs over different growing conditions, both in wild-type and in *fur* backgrounds.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and media

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *V. anguillarum* strains were routinely grown at 25 °C in Tryptic Soy Agar (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 1% NaCl (TSA-1), as well as in M9 minimal medium (Miller, 1972) supplemented with 0.2% casaminoacids (Difco) (CM9). *E. coli* strains were grown at 37 °C in LB broth or LB agar supplemented with antibiotics when appropriate. Permanent stocks of all strains were maintained in LB broth with 20% (vol/vol) glycerol at –80 °C. Antibiotics (all from Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain) were added at the following final concentrations: gentamycin (Gm) 10 μ g ml^{–1}; ampicillin sodium salt (Ap) at 50 μ g ml^{–1}; kanamycin (Km) at 50 μ g ml^{–1}. CM9 medium was made low in iron by the addition of

ethylenediamine di (*o*-hydroxy-phenylacetic acid) (EDDA) (Sigma-Aldrich) as chelator of non-heme iron. EDDA was prepared solving 1 g in 1 N NaOH, adjusting to pH 9.0 with 6 N HCl and bringing volume up to 20 ml in ultrapure water milli-Q (Millipore Iberica, Barcelona, Spain). The concentration of this solution is 138 mM and was assayed at final concentrations of 5 μ M and 1.5 μ M. Ferric Ammonium Citrate (FAC) and Fe₂(SO₄)₃ were used as iron source at 4 μ g ml^{–1} and 40 μ M respectively. Bovine hemin (Hm) and Protoporphyrin IX (Sigma-Aldrich) were dissolved at 5 mM in 10 mM NaOH and were added at final concentration of 10 μ M. All solutions were sterilized by filtration.

2.2. Standard methods

Plasmids used in this study are listed in Table 1. Recombinant DNA methods including restriction-enzyme digestions, ligation reactions, and agarose-gel electrophoresis were performed following standard protocols (Sambrook and Russell, 2001). Plasmid purification and elution of DNA fragments from agarose gels were performed using kits from Qiagen (Venlo, The Netherlands). *E. coli* strains were transformed using a standard calcium chloride method (Sambrook and Russell, 2001).

2.3. RNA purification and RT-PCR

A *V. anguillarum* H775-3 25 ml culture was grown until exponential phase in high- and low-iron CM9 medium and total RNA was isolated with the RNA isolation Reagent RNeasywiz™ (Ambion, Austin, TX, USA) following the manufacturer's recommendations. Reverse Transcriptase (RT)-PCR analysis were performed with 0.6 μ g of RNA pre-treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA) by using the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A negative control reaction for PCR was performed with total RNA without M-MLV reverse transcriptase to confirm the lack of genomic DNA contamination in each reaction mixture. Primers used to amplify the cDNA from putative *huvXZ* and *tonB1exbB1D1*-

Table 2
Oligonucleotides used in RT–PCR, primer extension experiments, and lacZ fusions

Amplified region	Primer	Nucleotide sequence
RT–PCR ^a		
<i>huvZ</i>	RT-huvZ	5'-TTATGCCCTTCATCAAGGT-3'
	cDNA-huvZ1	5'-CCAAGAGTTTCGTCAAGAAC-3'
<i>huvX</i>	cDNA-huvX1	5'-GCTCACTAAAGAAACCAAAG-3'
	cDNA-huvX2	5'-GGATTACTTGAACAGAAAG-3'
<i>huvD</i>	RT-huvD	5'-TAGACCATTTGGGAAATCCAT-3'
	cDNA-huvD1	5'-GCTTACTTCGGTGTTCGCA-3'
<i>huvC</i>	cDNA-huvC1	5'-AATATCAGCTTCAGTGACAG-3'
	cDNA-huvC2	5'-AAATACTTTGCCTTTTGT-3'
<i>huvB</i>	cDNA-huvB1	5'-CACAAATCTCTTCTCATTG-3'
	cDNA-huvB2	5'-AGGATAGAGCAATGCGTTA-3'
<i>exbD1</i>	cDNA-exbD11	5'-TCACTGCCAACAACCGACTC-3'
	cDNA-exbD12	5'-ACTTCGGCGGTTTTGTCTGC-3'
<i>exbB1</i>	cDNA-exbB11	5'-ACTGCTTAGCCTTGGTGTGG-3'
	cDNA-exbB12	5'-CCAGAATGCAGTTGATGACG-3'
<i>tonB1</i>	cDNA-tonB1	5'-AAACCCACCTCCAGAAAAG-3'
	cDNA-tonB12	5'-TGGGCGAGTAACAAAAGACG-3'
Primer extension		
<i>huvA</i>	PE-huvA1	5'-CTTCTTCTGCGAGAGCTGCA-3'
	PE-huvA2	5'-GACAGCAACAGAAGCGGCGG-3'
<i>huvX</i>	PE-huvX1	5'-TGTCGGCAATAAGGTTCGGT-3'
	PE-huvX2	5'-GGCAATGCCTGCACCACTTC-3'
<i>tonB1</i>	PE-tonB1	5'-GATTTCCTCCGAGGCATGGC-3'
Transcriptional fusions ^b		
<i>huvA</i> promoter	FT-huvA1	5'-GCGGTACCTATCAACAATTGATTGATCAA-3'
	FT-huvA2	5'-GCCCGGGTAGTGTTTTGTGATCATCTG-3'
<i>huvX</i> promoter	FT-huvXZ1	5'-GCGGTACCAAGGTGGATTGATTCCCGCAG-3'
	FT-huvXZ2	5'-GCCCGGGCATATTCATTTCAGTTCGTT-3'
<i>tonB1</i> promoter	FT-TonB1	5'-GCGGTACCATCAACAATCGCAACCATCTC-3'
	FT-TonB12	5'-GCCCGGGGTACTCCATATAACAACAAAG-3'
<i>exbD1–huvB</i> intergenic region	FT-huvBCD1	5'-GCGGTACCTCATTTTTATTGTCATGGTGT-3'
	FT-huvBCD2	5'-GCCCGGGGTGTGTCATCGTGTGTACTC-3'

^a Primers used for the reverse transcription are in boldface letters.

^b Restriction sites for *KpnI* and *SmaI* are underlined.

huvBCD transcripts and primers for the subsequent PCR are listed in Table 2.

2.4. Primer extension analysis

Primer extension analysis was done basically as described by Delany et al. (2001). Seventy-five pmol of each oligonucleotide were previously end-labelled with the T4 polynucleotide kinase (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) in presence of (γ -³²P)-ATP (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Unincorporated (γ -³²P)-ATP was removed cleaning the reactions with the Quiaquick Nucleotide Removal kit (Qiagen). About 10⁶ cpm of ³²P-labelled 5'-end primer was annealed to *V. anguillarum* H775-3 total RNA (10 μ g) and reverse transcription was carried out using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. DNA sequencing was performed using the dideoxy-chain termination method and the *Sequenase kit, Version 2.0* (U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH, USA), with (α -S³⁵)-ATP (Perkin Elmer) as radioactive isotope. The sequenced products and the cDNA fragments obtained after the reverse transcriptase reaction were separated and analyzed in urea-polyacrylamide sequencing gels (6%) as described (Sambrook and Russell, 2001). The size of the cDNA products obtained was precisely mapped by

running appropriate sequencing ladders along the primer extension products.

2.5. Construction of lacZ transcriptional fusions and β -galactosidase assays

Amplification fragments of about 400 bp corresponding to *V. anguillarum* presumptive *huvA*, *huvX* and *tonB1* promoter regions, as well as the region between *exbD1* and *huvB* genes, were obtained by PCR using the Biotaq DNA polymerase (Biolone, Randolph, MA, USA). Primers used are listed in Table 2. DNA fragments containing the putative *huvA*, *huvX* and *tonB* promoter sequences, as well as additional nucleotides of their respective coding sequences (Fig. 2A, B), were fused to promoterless *lacZ* gene in the low-copy-number reporter plasmid pHRP309 (Parales and Harwood, 1993). Amplification products were initially cloned into pCR2.1-Topo vector (*Topo cloning system* from Invitrogen) and subcloned into the *KpnI*–*EcoRI* sites of the pHRP309. Resulting transcriptional fusion constructs, *phuvA::lacZ*, *phuvX::lacZ* and *ptonB1::lacZ* (Table 1) were mobilized from *E. coli* S17-1- λ pir to *V. anguillarum* strains H775-3, 775met11 and B106 (Δ *huvX*) by conjugation. Resulting *V. anguillarum* strains, carrying the promoter-*lacZ* fusion vector

or control plasmid pHRP309, were grown in minimal medium CM9 under different iron availability conditions. The β -galactosidase activities were measured by the method of Miller (Miller, 1992). All experiments were done in triplicate and the values given are average.

3. Results

3.1. Transcriptional organization of heme uptake cluster

The genetic organization of the *V. anguillarum* heme utilization gene cluster shows that genes *huvX* and *huvZ* are transcribed from the opposite strand respect to *huvA* and genes downstream of *tonB1*. This organization suggests that this system is organized in three transcriptional units: *huvX-huvZ*, *tonB1exbB1D1-huvBCD* and the heme receptor gene, *huvA*, which could be transcribed from its own promoter. To confirm the transcriptional association of the two putative operons, *huvX-huvZ* and *tonB1exbB1D1-huvBCD*, RT-PCR analyses were carried out. *V. anguillarum* H775-3 was grown to mid-log phase in CM9 and harvested for extraction of total RNA. Reverse transcription was performed from primers homologous to the 3' end of *huvZ* (RT-*huvZ*) and *huvD* (RT-*huvD*) genes (Table 2, Fig. 1A). The resulting cDNA was used as template for PCR amplification using specific primers for each gene included within the operon. PCR products corresponding to the predicted size of each tested gene were amplified (Fig. 1B), proving that *huvZ* and *huvX* genes are cotranscribed from a promoter located upstream of *huvX*. Similarly, results obtained in the assay with the *tonB1exbB1D1-huvBCD* gene cluster confirmed the existence of a polycistronic mRNA comprising *tonB1*, *exbB1*, *exbD1*, *huvB*, *huvC* and *huvD* genes, which would

be cotranscribed from the promoter located upstream of *tonB1* (Fig. 1B).

3.2. Identification of promoter sequences and Fur-boxes in the heme-uptake genes

To define the promoters of the heme-uptake system, total cell RNA isolated from *V. anguillarum* H775-3 was used to map precisely the transcriptional start site for the *huvA* gene and the *huvXZ* and *tonB1exbB1D1-huvBCD* operons by primer extension experiments. In the reverse transcription reactions of *huvA*, two 5'-labeled oligonucleotides complementary to the coding region and located at 70 and 149 bp respectively from the first ATG of the gene were used, as described in Section 2.4. The size of the cDNA products obtained with both primers pointed to the presence of a transcriptional start site at an adenine residue located at position 64 upstream of the putative *huvA* translational start codon (Fig. 2A). According to the transcription start site and by comparison with previously described –10 and –35 regions in *V. anguillarum* iron-regulated genes (Chai et al., 1998), we mapped a putative –10 (ATCAAC) and –35 (CCTAAT) promoter region (Fig. 2A). Previously, the presence of a putative binding site for the Fur protein in the *huvA* promoter region had been suggested (Mazoy et al., 2003). The iron boxes of iron-regulated genes generally exist in close proximity to their promoter regions but we identified a putative iron box (AATGATAGTAATTACCATT), which shared 58% identity with the *E. coli* consensus iron box (de Lorenzo et al., 1987) and was located 6 bp downstream to the transcriptional start site of the *huvA* gene. These results suggest that, although the predicted Fur-box is not located immediately upstream of the putative –35 and –10 sequence, as it is in the majority of Fur-regulated genes reported so far, *huvA* transcription is iron-regulated.

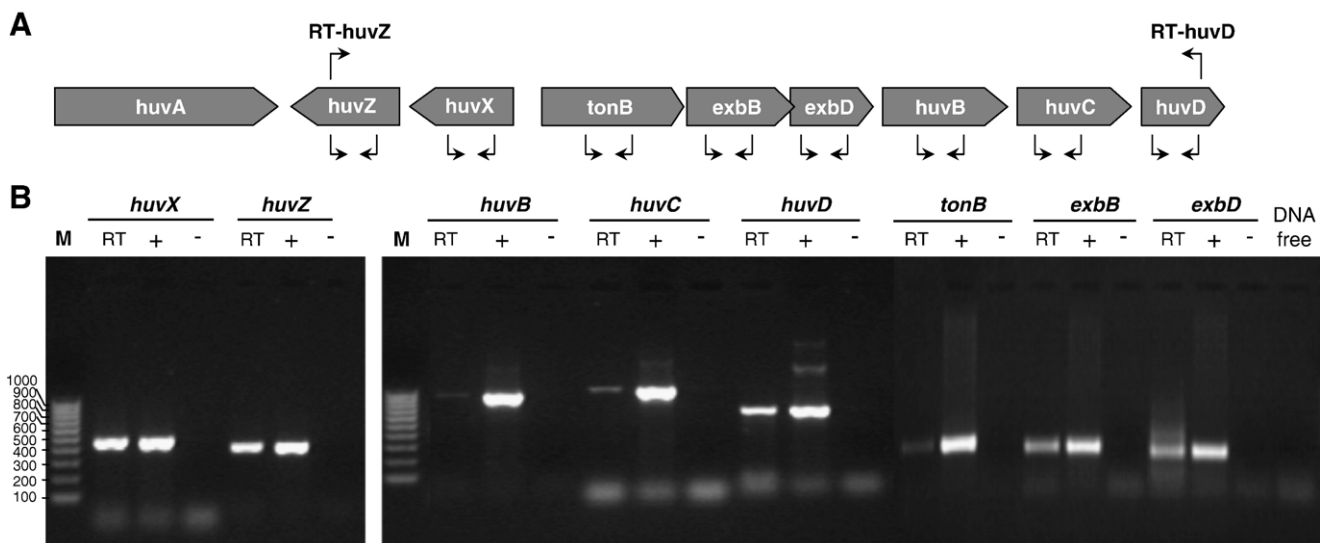


Fig. 1. RT-PCR demonstration of the cotranscription of *huvXZ* and *tonB1exbB1D1-huvBCD*. (A) Physical organization of the heme uptake gene cluster of *V. anguillarum* H775-3. Total RNA isolated from *V. anguillarum* H775-3 was used for reverse transcription with primers RT-*huvZ* and RT-*huvD*, and PCR was performed with internal primer pairs of each gene. Arrows designate the primers used for the cDNA amplification and primer pairs used in the following PCR reactions. (B) PCR analysis for the detection of *huvXZ* and *tonB1exbB1D1-huvBCD* transcripts. Lanes RT, PCR using the reverse transcription cDNA as template; lanes +, PCR amplification from genomic DNA; lanes –, reaction without reverse transcription products; lane “DNA free”, RNA treated with DNase and used as template in the PCR reaction; lanes M, molecular size standard (bp).

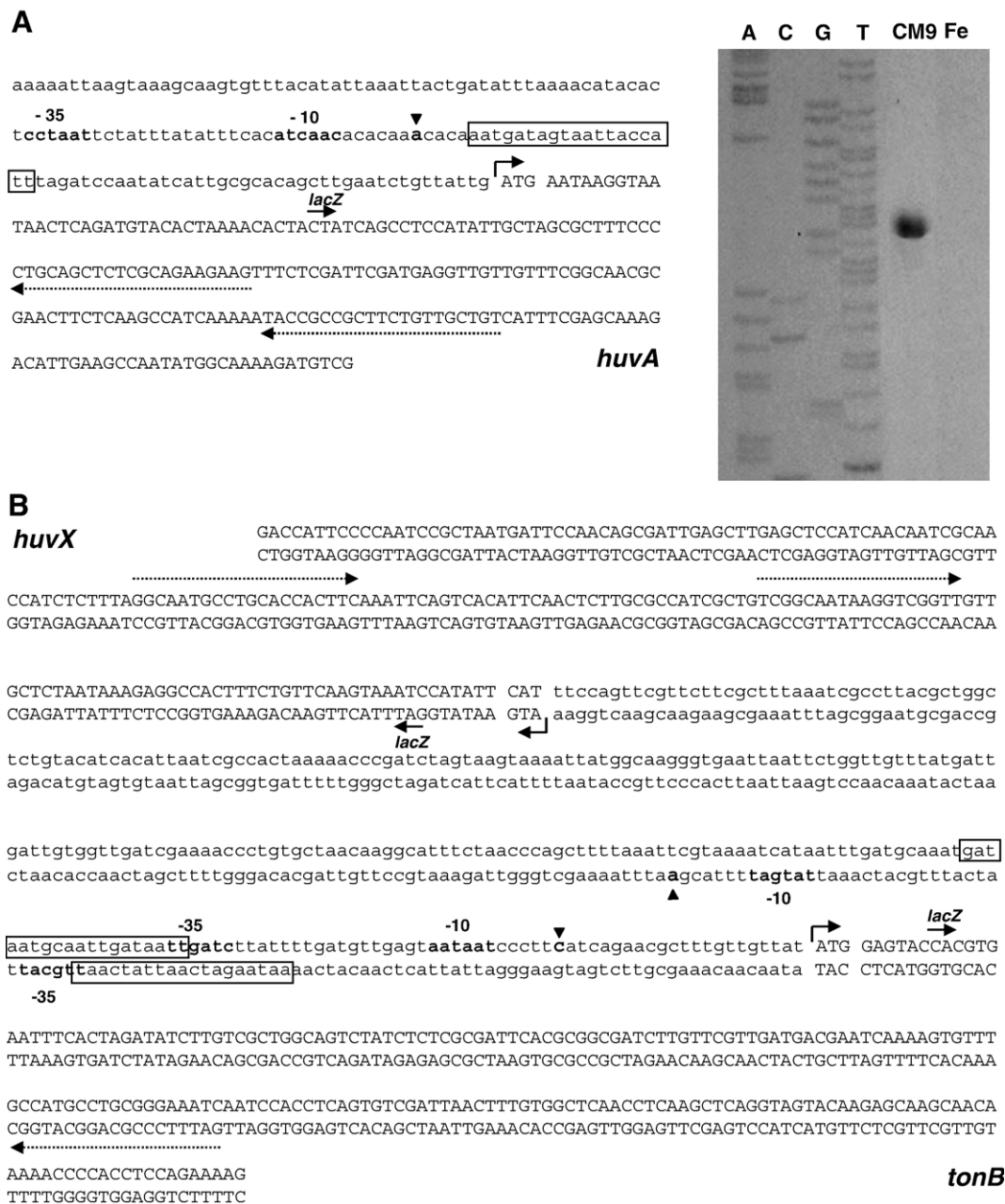


Fig. 2. Characterization of transcriptional start sites of heme-uptake cluster. (A) Primer extension analysis of the *huvA* gene. Total RNA was isolated from cultures of *V. anguillarum* H775-3 grown in control (CM9) and in iron-replete (Fe) medium. (B) Nucleotide sequences of the intergenic region of the *huvXZ* and *tonB1exbB1D1-huvBCD* operons. Discontinuous arrows designate locations of primers used in the primer extension and sequencing reactions. The putative -35 and -10 promoter sequences are indicated in boldface letters and putative Fur-binding sequences are boxed. An arrow denotes the translational start site of each gene while the transcriptional start site is indicated in boldface type and by a small triangle above the nucleotide sequence. Translated sequences are shown in uppercase. The positions at which the putative promoter regions were fused to *lacZ* gene in pHRP309 are denoted by an arrow with a “*lacZ*” label.

To test this, primer extension analysis was carried out with total RNA obtained from *V. anguillarum* H775-3 grown in CM9 medium supplemented with FAC $4 \mu\text{g ml}^{-1}$. No signal was observed in these iron excess conditions (Fig. 2A), suggesting a Fur-mediated regulation, which would repress this promoter under high-iron conditions.

The second promoter of the heme-uptake cluster corresponds to the *huvXZ* operon. In the opposite strand, a putative promoter upstream of *tonB1* would be responsible for transcription of the *tonB1exbB1D1-huvBCD* operon. The

transcriptional start sites of both operons are predicted to be located in the 283 bp intergenic region between the oppositely oriented genes *huvX* and *tonB1* (Fig. 2B). Similarly to the *huvA* promoter analysis, in this case two primers located at positions 50 and 103 downstream to the translational start site were used for the *huvX* reverse transcription reaction. Subsequent analysis of the cDNA by electrophoresis mapped the operon transcription start site at position 185 upstream of the first ATG of *huvX*. Potential -10 and -35 sequences and a putative Fur-box (AATAAGATCAAT TATCAAT) with 52% identity to the

consensus Fur-binding sequence are indicated in Fig. 2B. Finally, primer 5'-GATTTCCCGCAGGCATGGC-3', where the first G is complementary to the nucleotide located at position 103 of the *tonB1* sequence, was used for the analysis of the *tonB1exbB1D1-huvBCD* promoter. Migration of the DNA fragment resulting from the primer extension, in relation to the DNA sequence standard, indicated that the start site of transcription is a C residue located 22 bp upstream of *tonB1* ATG translational start codon. A putative Fur box (GATAATGCAATTGATAATT) was identified 33 bp upstream of position +1 and matched 13 of 19 nucleotides with the *E. coli* Fur-box consensus sequence.

The *huvX* –10 and –35 sequences were identified as (–12) TATGAT (–7) and (–35) TTGCAT (–30) (with respect to the *huvX* start site), whereas the *tonB1* –10 and –35 promoter elements were identified as (–11) AATAAT (–6) and (–35) TTGATC (–30) (with respect to the *tonB1* transcriptional start site). Presence of putative Fur binding sites suggests that both promoters are regulated by iron. Therefore, primer extension assays with total RNA purified from an iron-rich medium were carried out and, as described for *huvA*, no cDNA signal was detected (data not shown) concluding that transcription of *V. anguillarum* heme uptake cluster is repressed under high-iron conditions.

To look for the presence of additional promoters between *exbD1* and *huvB* genes, primer extension analysis was also carried out using a primer that hybridized at about 50 nucleotides downstream from the *huvB* ATG start codon. No signal was obtained in all the assays (data not shown), suggesting that, at least in these conditions, the DNA region between *exbD1* and *huvB* lacks promoter activity.

3.3. Regulation of expression of the heme uptake system

To determine the promoter activity and test whether the iron regulation of transcription on the *V. anguillarum* heme-uptake system occurred at the transcription initiation level, we constructed transcriptional fusions and examined their expression under high- and low-iron conditions. The β -galactosidase activities of the *V. anguillarum* H775-3 strains carrying transcriptional fusion constructs *huvA::lacZ*, *huvX::lacZ* and *tonB1::lacZ* are shown in Fig. 3. As a control, *V. anguillarum* H775-3 carrying the pHRP309 plasmid without any promoter was analyzed in parallel, exhibiting low levels of β -galactosidase activity under all growth conditions tested. High β -galactosidase activities were observed for *huvA::lacZ*, *huvX::lacZ* and *tonB1::lacZ* fusions in low-iron medium, whereas the addition of $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 40 μM to the culture medium resulted in the lowest β -galactosidase activity, indicating repression of promoter activity. These results correlate with RNA primer extension experiments, indicating that the heme-uptake cluster is regulated by iron. In these high-iron conditions, descent in β -galactosidase levels was similar for *huvA::lacZ* (Fig. 3A) and *huvX::lacZ* (Fig. 3B) fusions (six- and seven-fold respectively) whereas *tonB1::lacZ* (Fig. 3C) expression showed a repression over 4-fold. The overall β -galactosidase activities increased significantly under iron depletion with EDDA (1.5

μM). The transcriptional levels for *huvA*, *huvX* and *tonB1* promoters at low iron conditions were 38-, 19- and 12-fold higher respectively as compared than to high-iron medium.

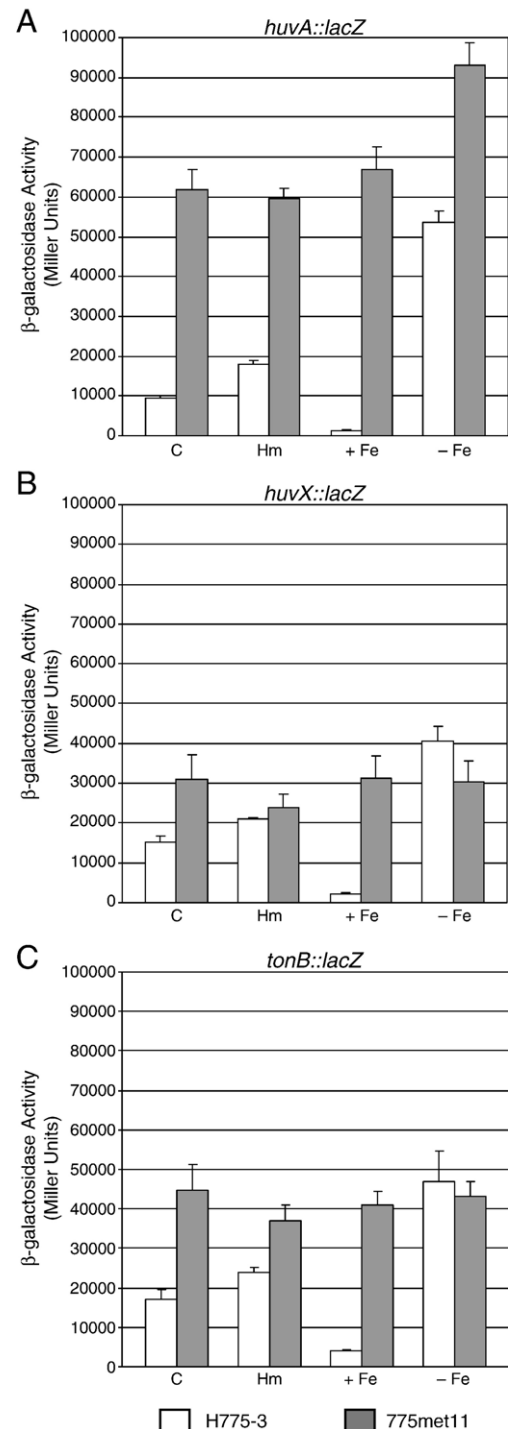


Fig. 3. Transcriptional analysis of the *huvA* (A), *huvX* (B) and *tonB1exbB1D1-huvBCD* (C) promoters with *lacZ* fusions. Bars indicate β -galactosidase activities of cultures grown under different conditions: C, control conditions in CM9 medium; Hm, CM9 iron-depleted by addition of EDDA 5 μM , plus hemin 10 μM ; +Fe, CM9 iron-repleted by addition of $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 40 μM ; -Fe, CM9 iron-depleted by addition of EDDA 1.5 μM . β -galactosidase activity of transcriptional fusions was assayed in the parental strain H775-3 (white bars), and in the 775met11 *fur* mutant (dark bars).

Analysis of the heme-uptake system sequence showed the presence of a potential Fur-box within the *huvA* promoter region. Similar motifs were evidenced within the promoter regions of *huvX* and *tonB1* (Fig. 2). To determine the level of Fur-mediated repression, the *promoter::lacZ* fusions were conjugated into the *V. anguillarum fur* mutant strain 775met11 (Tolmasky et al., 1994). The same iron conditions utilized with the H775-3 strain were now assayed with 775met11, and results are showed in Fig. 3. Iron-dependent repression of *huvX* and *tonB1* promoters was not detected in the respective *fur*-mutant derivatives and β -galactosidase activity was high under both high- and low-iron conditions, indicating that the promoters are constitutive in the absence of Fur.

When assayed in the parental strain H775-3, the *huvA::lacZ* fusion showed lower β -galactosidase activity than *huvX::lacZ* and *tonB1::lacZ* when iron was present in the culture medium (Fig. 3). However, in iron-depleted conditions *huvA* expression overcame the levels of the other promoters assayed. In the same experiments carried out in the *V. anguillarum fur* mutant, the *huvA* promoter showed higher β -galactosidase activity than *huvX* and *tonB1* promoters in all assayed conditions, mainly when iron was chelated by EDDA (Fig. 3). Taken together, these results suggest that in absence of iron *huvA* expression is stimulated. This could be explained by the existence of a positive regulation that would increase transcription, by an increased translation process and/or an increased stability of the *huvA* mRNA in the cell. In addition, from the *lacZ* fusion results in the *fur* background, we can conclude that the iron-responsive Fur protein is directly involved in the negative iron-regulation of these genes, blocking the transcription of the *V. anguillarum* heme-uptake system.

The *huvX-tonB1* intergenic region contains two divergent overlapping promoters. This transcriptional organization represents a general type of gene organization in an extended variety of bacterial genomes. In some cases, one transcript determines a regulatory molecule, which may act within the divergent transcription unit to control transcription of the other transcript and/or its own transcription (Anisimov et al., 2005). In the heme-uptake systems characterized to date, homologous of *huvX* are the only genes without an assigned function. Due to the divergent promoter organization in *V. anguillarum*, we hypothesized that *huvX* could act as a transcriptional regulator of *tonB1* expression. To test this, *huvX::lacZ* and *tonB1::lacZ* transcriptional fusions were assayed in a *huvX* mutant (B106 Δ *huvX*) (Mouriño et al., 2004). Results did not show significant differences between the mutant and the parental strain (data not shown), indicating that *huvX* does not have a regulatory function over the *tonB1* promoter.

To test the possibility of heme playing a role as a transcriptional activator (Vanderpool and Armstrong, 2003) in *V. anguillarum*, *huvA::lacZ*, *huvX::lacZ* and *tonB1::lacZ* transcriptional fusions were assayed in low-iron conditions in the presence of heme or protoporphyrin IX. Addition of hemin to CM9 medium, which had been reduced for free Fe by supplementation with EDDA, elicited a weak induction of each promoter (Fig. 3). However, this slight induction can be attributed to insufficient free iron available due to

the presence of EDDA. In the *fur* mutant we obtained similar β -galactosidase levels when *V. anguillarum* strains were grown with or without heme, confirming that the activation of the heme-uptake cluster is not heme-dependent. Protoporphyrin IX, the Fe-free precursor of heme, was also tested for inductive potential. Addition of this molecule to the low-iron minimal medium did not increase the expression levels of reporter fusions (data not shown).

According to *huvB* primer extension results, the region between *exbD1* and *huvB* genes lacks promoter activity. To verify that the transcription of *huvB* gene is indeed driven from the *tonB1* promoter, and that there is not a low promoter activity in the assayed primer extension conditions, this region was cloned upstream of the *lacZ* gene in the pHRP309 vector as previously described. The resulting reporter plasmid (*huvB::lacZ*) was assayed in *V. anguillarum* H775-3 in iron-rich and iron-limiting conditions and β -galactosidase levels measured. These levels showed to be similar to the control strain, indicating that the intergenic region between *exbD1* and *huvB* genes has not promoter activity, and therefore the *huvB* gene must be transcribed from the promoter located upstream of the *tonB1* gene.

4. Discussion

Although the genetic organization of heme-uptake systems has been described in many gram-negative bacteria, their transcriptional organization and gene regulation have been studied in detail in only a few species (King et al., 2005; Occhino et al., 1998). We show here that the *V. anguillarum* heme uptake cluster is arranged into three transcriptional units: *huvA*, *huvXZ* and *tonB1exbD1-huvBCD*, being all three promoters iron-regulated in a Fur-dependent manner.

The *huvA* gene codes for the *V. anguillarum* outer membrane heme receptor protein (Mazoy et al., 2003). To date, it has been described that expression of many iron-regulated outer membrane receptors is controlled at the transcriptional level by the Fur protein (Funahashi et al., 2002; Jacobi et al., 2001; Tolmasky et al., 1994). The analysis of the *huvA* promoter region revealed a potential Fur-box downstream of its transcriptional start site. This location is unusual in the Fur-binding sequences, but a similar situation has been described in the *fur* gene of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Haraszthy et al., 2002). Transcriptional fusion results obtained in low-iron conditions and in the *fur* mutant confirmed a Fur-mediated regulation of *huvA*. In some cases, secondary regulatory systems often operate with Fur to activate or inhibit specific genes under certain environmental conditions and have been previously described in *V. anguillarum*, where AngR and the TAF products act synergistically to positively regulate the expression of the iron transport genes that process the iron-anguibactin complex (Wertheimer et al., 1999). In our transcriptional fusion studies *huvA::lacZ* showed lower expression than *huvX::lacZ* and *tonB1::lacZ*, except in low-iron conditions where its transcriptional activity was clearly increased. This difference was more obvious in the *fur* mutant where, in all assayed conditions, the expression of *huvA* reached higher levels than the other tested promoters (Fig. 3). This could be

explained by an intrinsic enhanced transcription/translation of *huvA* transcript compared to *huvXZ* and *tonBexbBD-huvBCD* operons. Alternatively, the existence of a trans-acting positive regulator could be proposed. In this sense, a LysR family transcriptional activator (*hupR*) has been reported to enhance transcription of the *V. vulnificus* heme receptor gene under low-iron conditions in the presence of hemin (Litwin and Quackenbush, 2001). Interestingly, we have recently identified in *V. anguillarum* a gene (*huvR*) homolog to *hupR* (unpublished data), which points out to the existence of a similar mechanism in *V. anguillarum*.

The analysis of *huvXZ* and *tonBlexbBD1-huvBCD* divergent promoters showed that both sequences are included within the same DNA region. This form of gene organization can be an opportune arrangement when the genes involved must be coordinately regulated, conferring the advantage of allowing simultaneous transcriptional regulation from a single control region (Anisimov et al., 2005; Beck and Warren, 1988; Hunt et al., 1994; Watnick et al., 1998). In most bacterial species, transcriptional regulation of iron uptake genes depends on the regulatory gene *fur* which acts as a classical repressor, blocking transcription in the presence of high concentration of iron (Escolar et al., 1999). This is the case of *E. coli* *fepA-fes* enterobactin region (Hunt et al., 1994) or *V. parahaemolyticus* *pvs-pvu* loci (Tanabe et al., 2003), whose divergent promoters are directly regulated by the Fur protein. Gene regulation by Fur has also been previously described in the anguibactin-mediated iron uptake system of *V. anguillarum* (Chai et al., 1998; Tolmasky et al., 1994).

Collado-Vides et al. (1991) proposed that a transcriptional repressor would be more effective when it binds near to the –10 and initiation sites obstructing the RNA polymerase binding to its specific site. However, Fur-boxes are usually described to be located between the –10 and –35 sequences in iron-regulated genes (King et al., 2005; Watnick et al., 1998). The similarity of *huvX* and *tonB1* Fur-binding motifs to the consensus iron-box of *E. coli* pointed out to the possibility that these promoters are regulated by Fur. Transcriptional *lacZ*-fusions carried both in the *V. anguillarum* wild type and in the 775met11 *fur* mutant confirmed this hypothesis. Potential Fur-binding regions were inferred in the *huvX* and *tonB* promoters respectively and they showed to overlap partially. Alternatively, there is a possibility that these two putative Fur-boxes actually behave as a single one, being that predicted for the *tonB* gene, the most similar to the *E. coli* consensus. Either of the two scenarios, i.e. two overlapping Fur-boxes or only one Fur-box, could allow the simultaneous co-regulation of the two divergent promoters.

The distance that separates the coding sequences of *exbD1* and *huvB* is 52 bp. The unusual feature of a TonB system genes being part of an operon with *huvBCD* heme transport genes would suggest the existence of a second promoter from *huvB*. Our results with a *huvB::lacZ* fusion and primer extension analysis, and the lack of obvious terminators within this *exbD1-huvB* region, suggest that transcription from the *tonB1* promoter read through *tonBlexbBD1* and the *huvBCD* genes, originating only one polycistronic

tonBlexbBD1-huvBCD transcript. This result confirms our previous finding that *tonBlexbBD1* genes need to be provided in the same plasmid together with *huvBCD* genes in order to confer *E. coli* the ability to use hemin as iron source (Mouriño et al., 2004). However, this does not exclude the possibility that additional promoter sequences exist between *huvB-huvC* and *huvC-huvD*.

Although the TonB system is essential for heme uptake, we have shown in a previous work (Stork et al., 2004) that in absence of *tonB1*, *V. anguillarum* can use a second set of TonB genes (*tonB2exbB2D2*) to transport heme inside the cell cytosol. It is known that the TonB system is not only involved in heme uptake but also in the active transport of other iron-containing ligands (Nikaido, 2003) and even other molecules as maltose (Neugebauer et al., 2005). This could explain, in part, why all the heme uptake genes are not necessarily cotranscribed as a single operon. However, the fact that a TonB system is part of an operon with *huvBCD* genes favors the hypothesis of a simultaneous evolutionary acquisition of *tonB* and heme uptake genes, as has been suggested for *V. cholerae* (Occhino et al., 1998). The overall similarity in gene sequences and arrangement between the *V. anguillarum* heme uptake system and those of other members of the Vibrionaceae (Mouriño et al., 2004) suggests a common ancestral origin and a possible critical role in the physiology of the cell.

Acknowledgements

We are grateful to C.S. Harwood for providing plasmid pHRP309. This work was supported by grants AI19018 and GM64600 from the National Institutes of Health to J.H.C., and grants AGL2003-00086, from the Ministry of Science and Technology of Spain (cofunded by the EU FEDER Programme), and PGIDIT04PXIC23501PN from Xunta de Galicia to M.L.L. S. M. also acknowledges Xunta de Galicia (Spain) for a predoctoral fellowship.

References

- Anisimov, R., Brem, D., Heesemann, J., Rakin, A., 2005. Molecular mechanism of YbtA-mediated transcriptional regulation of divergent overlapping promoters *ybtA* and *irp6* of *Yersinia enterocolitica*. FEMS Microbiol. Lett. 250, 27–32.
- Beck, C.F., Warren, R.A., 1988. Divergent promoters, a common form of gene organization. Microbiol. Rev. 52, 318–326.
- Chai, S., Welch, T.J., Crosa, J.H., 1998. Characterization of the interaction between Fur and the iron transport promoter of the virulence plasmid in *Vibrio anguillarum*. J. Biol. Chem. 273, 33841–33847.
- Collado-Vides, J., Magasanik, B., Gralla, J.D., 1991. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 55, 371–394.
- de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M., Neilands, J.B., 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. J. Bacteriol. 169, 2624–2630.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R., Scarlato, V., 2001. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol. 42, 1297–1309.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J., de Lorenzo, V., 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. J. Bacteriol. 181, 6223–6229.

- Funahashi, T., et al., 2002. Identification and characterization of *pvuA*, a gene encoding the ferric vibrioferrin receptor protein in *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. 184, 936–946.
- Ghigo, J.M., Létoffé, S., Wandersman, C., 1997. A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179, 3572–3579.
- Haraszthy, V.I., Lally, E.T., Haraszthy, G.G., Zambon, J.J., 2002. Molecular cloning of the *fur* gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect. Immun. 70, 3170–3179.
- Henderson, D.P., Payne, S.M., 1993. Cloning and characterization of the *Vibrio cholerae* genes encoding the utilization of iron from haemin and haemoglobin. Mol. Microbiol. 7, 461–469.
- Henderson, D.P., Wyckoff, E.E., Rashidi, C.E., Verlei, H., Oldham, A.L., 2001. Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. J. Bacteriol. 183, 2715–2723.
- Hunt, M.D., Pettis, G.S., McIntosh, M.A., 1994. Promoter and operator determinants for Fur-mediated iron regulation in the bidirectional *fepA-fes* control region of the *Escherichia coli* enterobactin gene system. J. Bacteriol. 176, 3944–3955.
- Jacobi, C.A., Gregor, S., Rakin, A., Heesemann, J., 2001. Expression analysis of the yersiniabactin receptor gene *fyuA* and the heme receptor hemR of *Yersinia enterocolitica* in vitro and in vivo using the reporter genes for green fluorescent protein and luciferase. Infect. Immun. 69, 7772–7782.
- Juiz-Río, S., Osorio, C.R., Lemos, M.L., 2005. Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of *huta* pseudogenes. Arch. Microbiol. 183, 347–358.
- King, N.D., Kirby, A.E., Connell, T.D., 2005. Transcriptional control of the *rhoIR-bhuRSTUV* heme acquisition locus in *Bordetella avium*. Infect. Immun. 73, 1613–1624.
- Lee, B.C., 1995. Quelling the red menace: haem capture by bacteria. Mol. Microbiol. 18, 383–390.
- Litwin, C.M., Quackenbush, J., 2001. Characterization of a *Vibrio vulnificus* LysR homologue, HupR, which regulates expression of the haem uptake outer membrane protein, HupA. Microb. Pathog. 31, 295–307.
- Massé, E., Gottesman, S., 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 4620–4625.
- Mazoy, R., Lemos, M.L., 1991. Iron-binding proteins and heme compounds as iron sources for *Vibrio anguillarum*. Curr. Microbiol. 23, 221–226.
- Mazoy, R., Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Lemos, M.L., 2003. Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. Arch. Microbiol. 179, 329–338.
- Miller, J.H., 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miller, J.H., 1992. A Short Course in Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- Mouriño, S., Osorio, C.R., Lemos, M.L., 2004. Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. J. Bacteriol. 186, 6159–6167.
- Neugebauer, H., Herrmann, C., Kammer, W., Schwarz, G., Nordheim, A., Braun, V., 2005. ExbBD-dependent transport of maltodextrins through the novel MalA protein across the outer membrane of *Caulobacter crescentus*. J. Bacteriol. 187, 8300–8311.
- Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67, 593–656.
- 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 *tonB1*, *exbB1*, *exbD1* genes. Mol. Microbiol. 29, 1493–1507.
- Ochsner, U.A., Johnson, Z., Vasil, M.L., 2000. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 146, 185–198.
- Parales, R.E., Harwood, C.S., 1993. Construction and use of a new broad-host-range lacZ transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram-bacteria. Gene 133, 23–30.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Stojiljkovic, I., Perkins-Balding, D., 2002. Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. DNA Cell Biol. 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. Infect. Immun. 72, 7326–7329.
- 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*. J. Bacteriol. 185, 6938–6949.
- Tolmasky, M.E., Wertheimer, A.M., Actis, L.A., Crosa, J.H., 1994. Characterization of the *Vibrio anguillarum* fur gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. J. Bacteriol. 176, 213–220.
- Vanderpool, C.K., Armstrong, S.K., 2003. Heme-responsive transcriptional activation of *Bordetella bhu* genes. J. Bacteriol. 185, 909–917.
- Watnick, P.I., Butters, J.R., Calderwood, S.B., 1998. The interaction of the *Vibrio cholerae* transcription factors, Fur and IrgB, with the overlapping promoters of two virulence genes, *irgA* and *irgB*. Gene 209, 65–70.
- Wertheimer, A.M., et al., 1999. Characterization of the *angR* gene of *Vibrio anguillarum*: essential role in virulence. Infect. Immun. 67, 6496–6509.

2

CLONING AND CHARACTERIZATION OF A *Vibrio anguillarum*
4 GENE ENCODING A MEMBER OF THE LysR FAMILY OF
TRANSCRIPTIONAL REGULATORS

6

8 **Susana Mouriño, Carlos R. Osorio, Manuel L. Lemos***

10 *Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Aquaculture and Faculty of*
Biology, University of Santiago de Compostela, Campus Sur, Santiago de Compostela
15782, Spain

12

14

* Corresponding author

16 Department of Microbiology and Parasitology
Institute of Aquaculture and Faculty of Biology
18 University of Santiago de Compostela
Campus Sur
20 Santiago de Compostela 15782
Spain
Phone: +34-981563100 ext 16080
Fax: +34-981547165
22 E-mail: mlemos@usc.es

24

2 ABSTRACT

The heme uptake system of *V. anguillarum* is dependent of iron-levels and is
4 regulated at the transcriptional level by the negative regulator Fur. The expression of
huvA, which codify for the outer membrane heme receptor, is stimulated in iron-limited
6 conditions probably by a second regulatory mechanism. Here, we cloned *huvR*, a gene
that encodes a protein of 298 amino acids exhibiting 77-81% identity to LysR-family
8 transcriptional regulators associated to outer membrane heme receptors in *Vibrio* spp. A
huvA::lacZ fusion contained on a plasmid was transformed into Fur⁻, Fur⁺ and Δ *huvR*
10 strains of *V. anguillarum*. The *huvR* gene shows high homology with genes encountered
upstream of the heme outer-membrane receptor of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae*
12 and with the *hupR* gene described in *V. vulnificus*, which regulates positively the
expression of the heme receptor *hupA*. Results of β -galactosidase assays under different
14 iron concentrations and the regulatory effect of HuvR in *huvA* expression are discussed.

INTRODUCTION

Iron is an essential nutrient for most pathogenic microorganisms, playing a key role in microbial metabolism, toxicity and pathogenesis. However, most of the extracellular iron within eukaryotes is sequestered by iron-binding proteins, while intracellular iron is predominantly bound to heme. To survive within this iron-limited environment, bacterial pathogens have developed elaborate mechanisms to extract iron from the host iron-binding compounds. So, many pathogens produce siderophores or possess mechanisms for obtaining iron from heme and heme-containing proteins. Cellular components required for iron utilization are controlled at the transcriptional level in either a negative or positive fashion. The iron-binding repressor protein Fur is the first described regulator of iron uptake systems, but it is not the only one. In many species, expression of iron uptake genes requires transcriptional activation, which can be mediated by heme, as in *Porphyromonas gingivalis* (4, 21), extracytoplasmic function sigma factors, as in *Corynebacterium diphtheriae* (12) or positive regulators, like AngR and the TAF products in *V. anguillarum* (1, 31). Usually, negative and positive regulators act co-ordinately controlling the iron entry and storage.

LysR-type transcriptional regulators (LTTRs) comprise the largest family of prokaryotic DNA-binding transcriptional factors and are broadly represented in *Bacteria*, *Archaea* and algal chloroplasts (23, 25). LTTRs, in cooperation with Fur, have been characterized as regulators of the expression of diverse genes involved in a wide range of cellular processes, such as virulence (30) or iron uptake (14). Most LTTRs are often encoded by genes that are transcribed divergently from their target genes, and operate as transcriptional regulators activating the expression together with a small molecule ligand that act as a coinducer (25). In other cases, this regulator could be codified for by a gene located distant from the target gene (13, 26, 29). The highest

aminoacidic sequence similarity between LysR-type proteins exists within the 66 N-terminal amino acids. This conserved region constitutes the DNA-binding domain and contains a helix-turn-helix DNA-binding motif (25).

In the present work we describe the characterization of a LysR-type transcriptional regulator in the fish pathogen *V. anguillarum*.

MATERIAL AND METHODS

Bacteria, plasmids and media. Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *V. anguillarum* strains were routinely grown at 25 °C in Tryptic Soy Agar (Difco) supplemented with 1% NaCl (TSA-1), as well as in M9 minimal medium (17) supplemented with 0.2% casaminoacids (Difco) (CM9). *E. coli* strains were grown at 37 °C in LB broth or LB agar supplemented with antibiotics when appropriate. Permanent stocks of all strains were maintained in LB broth with 20% (vol/vol) glycerol at -80°C. Antibiotics were added at the following final concentrations: gentamycin (Gm) 10 µg ml⁻¹; ampicillin sodium salt (Ap) at 50 µg ml⁻¹; kanamycin (Km) at 50 µg ml⁻¹ and rifampicin (Rif) at 50 µg ml⁻¹ (all from Sigma-Aldrich). CM9 medium was made low in iron by the addition of ethylenediamine di (*o*-hydroxy-phenylacetic acid) (EDDA) as chelator of non-heme iron. EDDA was prepared by dissolving 1 g in 1 N NaOH, adjusting to pH 9.0 with 6 N HCl and bringing volume up to 20 ml in milli-Q (Millipore) ultrapure water. The concentration of this solution is 138 mM and was assayed at final concentrations of 5 µM and 1.5 µM. Fe₂(SO₄)₃ was used as iron source at 40 µM. Bovine hemin (Sigma-Aldrich) was dissolved at 5 mM in 10 mM NaOH and was added at a final concentration of 10 µM. All solutions were sterilized by filtration.

Recombinant DNA techniques. Recombinant DNA methods including

restriction-enzyme digestions, ligation reactions, agarose-gel electrophoresis and plasmid analysis were performed following standard protocols (24). Chromosomal DNA was isolated using the Easy-DNA kit (Invitrogen). Plasmid purification and elution of DNA fragments from agarose gels was performed using kits from Qiagen. *E. coli* strains were transformed using a standard calcium chloride method (24).

PCR amplification. To isolate *V. anguillarum* *huvR* gene, a PCR with

degenerate primers hutR5'2 and hutR3'2 (Table 2) was performed using BioTaq DNA polymerase (Bioline) and the extending temperature tested in PCR reactions was from 55°C to 70°C in a T-Gradient Thermocycler (Biometra). To perform Inverse-PCR, *V. anguillarum* H775-3 genomic DNA was previously cut with *Pst*I and self-ligated. Ligation products were used as template in PCR reactions with primers HuvR1 and HuvR2 (Table 2). Amplifications were carried out with Expand Long Template PCR System (Roche) according to the manufacturer's instructions. PCR product was cloned into pGEM-T-Easy (Promega) to yield plasmid pSML86 and sequenced.

DNA sequencing and data analysis. The DNA sequence was determined by the

dideoxy chain-termination method using the CEQ DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter) using a capillary DNA sequencer CEQ 8000 (Beckman Coulter). Restriction maps and DNA translation were generated by the BioEdit Sequence Alignment Editor (5). The European Bioinformatics Institute services were used to consult the EMBL and SWALL databases with the FASTA3 and BLAST algorithms. The EMBL accession number for the sequence described in this article is AM259387.

Construction of chromosomal mutations. Gene deletions in *V. anguillarum*

H775-3 and 775met11 were constructed by using PCR amplifications of two fragments of *huvR* gene, which when ligated together would result in an in-frame (nonpolar) deletion. Amplification was carried out using the Expand High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics). Construction of an in-frame *huvR* mutant was accomplished by ligating the PCR products obtained with primer pairs HuvR.A-HuvR.B (5' end) and HuvR.C-HuvR.D (3' end) (Table 2). Allelic exchange was carried out using the suicide vector pNidKan (19). Plasmid pNidKan contains R6K *ori*, requiring the *pir* gene product for replication, and the *sacB* gene, conferring sucrose sensitivity. Construction of in-frame deletion occurred in several steps. The PCR-amplified 5'-end gene fragment was ligated into pWKS30, and resulting plasmid was cut with appropriate enzymes to ligate the corresponding 3'-end PCR fragment of the gene. This process resulted in the formation of the mutant allele Δ *huvR* (removes coding sequences for amino acids 20 to 279). Then, deleted allele cloned in pWKS30 was digested with *NotI* and *SalI* and ligated into the *NotI/SalI* sites of the suicide vector pNidKan. Resulting plasmid was mated from *E. coli* S17-1- λ *pir* into *V. anguillarum* strains, and transformants, with the plasmid integrated into the chromosome by homologous recombination, were selected on agar medium containing kanamycin and ampicillin (selection of H775-3 recombinants) or rifampicin (selection of 775met11 recombinants). A second recombination event was obtained by selecting for sucrose resistance (10% wt/vol) and resistance to the specific antibiotic for the recipient strain. This led to obtention of *V. anguillarum* mutant strains B219 (Δ *huvR*) and B228 (double mutant Δ *huvR*/ Δ *fur*). To verify allelic exchange of the parental gene and to ensure that the constructs were non

polar, the region involved in the deletion construction was amplified by PCR and sequenced (data not shown).

β-galactosidase assays. Transcriptional fusion construct *phuvA::lacZ*, which includes the promoter region of *huvA* (20), was mobilized from *E. coli* S17-1-λpir to *V. anguillarum* mutant strains by conjugation. Resulting *V. anguillarum* strains, carrying the promoter-*lacZ* fusion vector or control plasmid pHRP309 (22), were grown in CM9 minimal medium with Fe₂(SO₄)₃, CM9 with EDDA 1.5 μM, or CM9 supplemented with EDDA 5 μM and hemin to a final concentration of 10 μM. β-galactosidase assays were performed on midlog-phase cultures as described (18). All experiments were done in triplicate and the values given are the arithmetic average.

RNA purification and RT-PCR. A *V. anguillarum* H775-3 25 ml culture was grown until exponential phase in high- and low-iron CM9 medium and total RNA was isolated with the RNA isolation Reagent RNeasyTM (Ambion) following the manufacturer's recommendations. Reverse Transcriptase (RT)-PCR analysis were performed with 0.6 μg of RNA pre-treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega) by using the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). A negative control reaction for PCR was performed with total RNA without M-MLV reverse transcriptase to confirm the lack of genomic DNA contamination in each reaction mixture. Primers used to amplify the cDNA from *huvR* transcript and primers for the subsequent PCR are listed in Table 2.

RESULTS

2

Cloning and sequence analysis of the DNA region containing the *huvR*

4 **locus.** In *V. vulnificus*, a LysR family transcriptional activator (*hupR*) has been reported
to enhance transcription of heme receptor gene (14). Homologues to *hupR* are
6 encountered upstream of *V. parahaemolyticus* heme receptor *hutA* (access number
Q87HS3), *V. cholerae* *hutA* (access number Q9AQK6) and *V. mimicus* *mhuA* (access
8 number Q9KM14), pointing to a conserved regulatory mechanism in these *Vibrio* spp.
Despite the high similarity in the spatial organization of heme uptake genes in the
10 chromosome of *V. anguillarum* to that described in other *Vibrio* spp (19), the nucleotide
sequence immediately upstream of *V. anguillarum* *huvA* does not code for a putative
12 LysR-type transcriptional regulator. To amplify this LTTR in *V. anguillarum*,
degenerate primers were designed from a multiple alignment of *V. vulnificus* *hupR*
14 homologues (Fig. 1). A PCR product was obtained and sequenced, and a partial ORF
(named *huvR*) was identified. The deduced sequence, of 142 amino acids, shares 80-
16 85% similarity to members of the LysR family of transcriptional regulators. Completion
of the nucleotide sequence was carried out by Inverse-PCR. A new PCR fragment of
18 about 4 kb, containing chromosomal upstream and downstream regions of the *huvR*
gene, was cloned and the resulting plasmid was named pSML86. The *huvR* gene
20 encodes a protein of 298 amino acid residues, with a predicted molecular mass of 32.8
kDa. The deduced amino acid sequence exhibits significant homology between HuvR
22 and the LysR family of positive transcriptional activator proteins in bacteria, like *V.*
vulnificus HupR (77% identity) and homologues identified in *V. parahaemolyticus*
24 (81% identity), *V. cholerae* (79% identity) and *V. mimicus* (78% identity) (Fig. 1). The
highest similarity corresponds to the N-terminal region, where the conserved helix-turn-

helix DNA-binding motive was deduced (residues 10-70). From the sequence analysis it was also possible to deduce the putative recognition and/or response domain (residues 92-171 and 196-206) and the domain required for both DNA binding and coinducer response (residues 239-290). A Shine-Dalgarno sequence was identified just upstream of the initiating ATG start codon and, at 400 bp upstream from this codon, we identified a putative Fur box (GATGAAAATTACCATTTT) shared 73% identity with the *E. coli* consensus Fur box (3) (Fig. 2A). However, no putative recognition sequences or T-N₁₁-A motifs could be inferred from this analysis. Downstream to *huvR*, a second incomplete ORF was identified on the complementary strand. It encodes a putative acetyltransferase, whose position and orientation are conserved in *Vibrio* spp.

Analysis of *huvR* expression. To investigate the *huvR* gene expression, we performed a reverse transcriptase PCR (RT-PCR) experiment. We used a downstream primer for the reverse transcription reaction, *huvR4rev*, and used the cDNA to amplify a fragment of the gene by PCR, with primers *huvR1* and *huvR1rev* (Table 2) as described in Material and Methods. Simultaneously, to determine whether *huvR* expression is repressed by the iron concentration in the cell, we performed RT-PCR assays using total RNA obtained from cultures of *V. anguillarum* H775-3 grown to a mid-log phase in high and low-iron media. The same amount of total RNA was used in all experiments. The results (Figure 2B) show a weak RT-PCR product, corresponding to the expected size, in all assayed conditions. Comparison of PCR amplification from samples extracted in iron rich and iron limiting growing conditions did not show significant differences and demonstrates that *huvR* expression is not iron regulated.

Effect of *huvR* mutation in the heme uptake gene cluster transcriptional

activity. To date, *V. vulnificus* HupR is the only LysR-type protein which has been described as the transcriptional positive regulator of a heme uptake receptor, under low-iron conditions and in presence of hemin as coinducer (14). In a previous work (20), we described that, in absence of iron, *V. anguillarum* *huvA* expression was stimulated, pointing to the existence of a secondary positive regulation that would increase *huvA* transcription (20). In most cases, the LysR-type transcriptional regulators associated to heme uptake receptors and identified in *Vibrio* spp. are linked to their corresponding target genes, but *V. anguillarum* represents an exception to this gene organization and the *huvA* receptor gene is linked with the transport genes in a unique cluster. The hypothesis of a regulatory effect in *huvA* expression through the HuvR protein is supported by the high similarity between HuvR and *V. vulnificus* HupR sequences. To test this hypothesis, two Δ *huvR* mutants were obtained from *V. anguillarum* H775-3 and 775met11 (strains B219 and B228, respectively). Transcriptional fusion construct *phuvA::lacZ* (Mouriño *et al.*, 2006) was transferred to mutant strains and assayed under low and high-iron conditions. According to the results obtained (Fig. 3) there was not significant differences between wild type strains and their respective Δ *huvR* mutants when grown in low and high-iron media. Finally, to test if a coinducer is required for this transcriptional activation, hemin was added under low-iron conditions and *huvA* expression was evaluated. In contrast to *V. vulnificus* *hupA* expression, addition of hemin in *V. anguillarum* did not significantly affect the β -galactosidase activity of *huvA* promoter (Fig. 3).

Our results suggest that HuvR protein is not directly involved in *huvA* expression. However, in the same experiments carried out in the *V. anguillarum* *fur* mutant, the *huvA* promoter showed an increase in the β -galactosidase activity in low-

iron media (Fig. 3). This observation suggests that, in absence of iron, *huvA* expression is stimulated and it reaffirms the previous idea about the likely existence of a second unknown mechanism of positive iron-dependent regulation.

DISCUSSION

The expression of many iron uptake genes is regulated by the concentration of iron in the environment, with increased expression occurring under low-iron conditions. While various Fe-dependent bacterial regulators are currently known, only Fur, a global Fe-dependent repressor of iron-uptake systems, has been extensively studied. In many cases, Fur is sufficient to adequately control expression of a specific gene. However, some genes encoding a particular Fur-dependent iron acquisition system may require an additional level of regulation (6, 11, 27). These more complicated regulatory systems often operate together with Fur to activate specific genes under more limited environmental circumstances.

Previously, we have reported that the *V. anguillarum* heme uptake cluster is negatively regulated by iron at the transcriptional level (20). Sequences homologous to the *E. coli* Fur-binding site were identified in all characterized promoters and the Fur repression was demonstrated via transcriptional fusion assays. However, in iron-limited conditions, *huvA* transcriptional activity was clearly increased, mostly in the *fur* mutant. These results suggested the existence of a new transcriptional regulatory mechanism involved in *huvA* expression.

In the present work, we describe the identification and cloning of the *huvR* gene. The deduced amino acid sequence of HuvR shares homology to the LysR family of transcriptional regulators, which comprise the largest family of prokaryotic regulatory

proteins that apparently evolved from a distant ancestor into subfamilies found in
diverse prokaryotes (Schell, 1993). So far, most of these family members are DNA-
binding proteins that positively regulate transcription of linked target genes or unlinked
regulons encoding extremely diverse functions and most of them also regulate their own
expression. The common family features are protein sizes ranging from 276 to 350
residues, a helix-turn-helix motif near the N-terminus that is involved in DNA-binding,
and, in some cases, the requirement for a small molecule that acts as a coinducer (25). It
has been proposed that a protein that exhibits the N-terminal H-T-H motif and >20%
amino acid sequence identity with another LTTR family members should be regarded as
a LysR transcriptional regulator (9). *V. anguillarum* *huvR* encodes a protein of 298
amino acids and, based on sequence alignments, a helix-turn-helix motif at the N-
terminus was identified. This protein exhibits 77-81% identity to members of the LysR
family closely associated to heme uptake receptors identified in *Vibrio* spp. All these
observations support the idea that HuvR is a member of this LysR family of
transcriptional regulators.

In numerous prokaryotic organisms, the Fur protein is the central regulatory
protein influencing the expression of iron-regulated genes. This is accomplished by
iron-bound Fur interacting with an operator site (Fur-box) in iron-regulated genes and
directly repressing their synthesis by blocking transcription initiation. However, it is
also recognized that Fur may exert its effect indirectly by altering the expression of
small regulatory RNA (16) or extracytoplasmic function sigma factors (10). DNA
region upstream to *huvR* exhibits one putative Fur-box which matches 12 of the 19
nucleotides from the *E. coli* consensus (3). For this reason, and to test the role of Fur in
huvR expression, RT-PCR analyses were developed under different iron-conditions. Our
results showed that Fur does not regulate the expression of *huvR* under different iron-

conditions or with hemin as the only iron-source. In addition, these results showed that
2 *huvR* appears to be expressed at a low level in *V. anguillarum* H775-3, which is a
characteristic feature of several encoding LysR-type regulators (7, 28).

4 The high similarity at the sequence level between different *Vibrio* spp, led us to
suspect that, similarly to *V. vulnificus* HupR, the LTTR characterized in *V. anguillarum*
6 could be required for transcriptional activation of the outer membrane heme receptor,
huvA. Under iron-replete conditions it is known that the Fur repressor binds to Fur
8 boxes within iron-regulated promoters, thus repressing transcription of iron-regulated
genes. Our data suggests that, under these conditions, the active Fur protein represses
10 transcription of *huvA* and, therefore, the transcriptional activation of the *huvA* promoter
via HuvR could be unable. However, under low-iron conditions the Fur repressor is
12 inactive, allowing the transcription of iron uptake genes. In these conditions, we could
expect an increase in *huvA* expression through the HuvR protein. According to our
14 results, there are not significant differences in the expression levels obtained from *V.*
anguillarum strains H775-3 and 775met11 and their Δ *huvR* derivatives. Similar results
16 were obtained under conditions of relative iron restriction and in the presence of heme,
suggesting that this molecule does not act as coinducer in the HuvR interaction. All
18 these observations imply that HuvR is either, unable to interact with the *huvA* promoter,
or this LysR-type regulator needs another molecule, different from heme, to activate the
20 expression of the *V. anguillarum* heme receptor.

Previously, we showed that the heme uptake system is highly conserved in
22 *Vibrionaceae* and the gene coding for the *V. anguillarum* outer membrane heme
receptor, *huvA*, is linked to the rest of heme transport genes (19). This spatial
24 organization is unusual in other *Vibrio* spp, where the outer membrane receptor gene is
separated from the rest of transport genes by hundreds of kilobases (2, 8, 15). Other

difference of *V. anguillarum* heme uptake cluster includes the absence of the *huvR* transcriptional activator located divergently to the heme receptor gene.

LysR type transcriptional regulators usually bind to their regulated promoters at a ~15 bp, partially dyadic sequence centre near -65 (with respect to the regulated gene), which has the conserved T-N₁₁-A motif. All LysR family members also interact with a dissimilar sequence downstream on the same side of the DNA helix and near the -35 RNA polymerase binding site (25). In the present work, these conserved regions could not be inferred from the sequence analysis of *huvR* and *huvA* promoter regions. It is possible that originally the gene organization of genes involved in heme transport were conserved in *Vibrionaceae* (including the distant heme receptor). Then, spatial reorganizations underwent in the genome of *V. anguillarum* could result in a new gene organization, translocating the *huvA* gene from the region upstream to *huvR* to the sequence adjacent to the heme uptake cluster. It is possible that, during these spatial reorganizations, recognition sequences needed for the LysR-type function could be deleted, resulting in the *V. anguillarum* HuvR inactivation.

The present study shows that the LTTR *huvR*, with heme as coinducer, is not required for transcription of the *huvA* gene. Whether this protein is also required for the expression of other genes and whether the response regulator, with a different molecule acting as coinducer, is indeed involved in controlling the expression of *huvA* are currently being studied in our laboratory.

REFERENCES

1. **Crosa, J. H.** 1997. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:319-36.
2. **Chen, C. Y., K. M. Wu, Y. C. Chang, C. H. Chang, H. C. Tsai, T. L. Liao, Y. M. Liu, H. J. Chen, A. B. Shen, J. C. Li, T. L. Su, C. P. Shao, C. T. Lee, L. I. Hor, and S. F. Tsai.** 2003. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res* **13**:2577-87.
3. **de Lorenzo, V., S. Wee, M. Herrero, and J. B. Neilands.** 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J Bacteriol* **169**:2624-30.
4. **Genco, C. A., B. M. Odusanya, and G. Brown.** 1994. Binding and accumulation of hemin in *Porphyromonas gingivalis* are induced by hemin. *Infect Immun* **62**:2885-92.
5. **Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**:95-98.
6. **Hamza, I., Z. Qi, N. D. King, and M. R. O'Brian.** 2000. Fur-independent regulation of iron metabolism by Irr in *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology* **146** (Pt 3):669-76.
7. **Hedstrom, R. C., C. R. Funk, J. B. Kaper, O. R. Pavlovskis, and D. R. Galloway.** 1986. Cloning of a gene involved in regulation of exotoxin A expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **51**:37-42.
8. **Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J.**

- Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter, and C. M. Fraser.** 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**:477-83.
9. **Henikoff, S., G. W. Haughn, J. M. Calvo, and J. C. Wallace.** 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:6602-6.
10. **Hunt, T. A., W. T. Peng, I. Loubens, and D. G. Storey.** 2002. The *Pseudomonas aeruginosa* alternative sigma factor PvdS controls exotoxin A expression and is expressed in lung infections associated with cystic fibrosis. *Microbiology* **148**:3183-93.
11. **Kirby, A. E., N. D. King, and T. D. Connell.** 2004. RhuR, an extracytoplasmic function sigma factor activator, is essential for heme-dependent expression of the outer membrane heme and hemoprotein receptor of *Bordetella avium*. *Infect Immun* **72**:896-907.
12. **Kirby, A. E., D. J. Metzger, E. R. Murphy, and T. D. Connell.** 2001. Heme utilization in *Bordetella avium* is regulated by RhuI, a heme-responsive extracytoplasmic function sigma factor. *Infect Immun* **69**:6951-61.
13. **Klauck, E., J. Bohringer, and R. Hengge-Aronis.** 1997. The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Mol Microbiol* **25**:559-69.

14. **Litwin, C. M., and J. Quackenbush.** 2001. Characterization of a *Vibrio vulnificus* LysR homologue, HupR, which regulates expression of the haem uptake outer membrane protein, HupA. *Microb Pathog* **31**:295-307.
15. **Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, and T. Iida.** 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**:743-9.
16. **Massé, E., and S. Gottesman.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4620-5.
17. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, N.Y.
18. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
19. **Mouriño, S., C. R. Osorio, and M. L. Lemos.** 2004. Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **186**:6159-67.
20. **Mouriño, S., C. R. Osorio, M. L. Lemos, and J. H. Crosa.** 2006. Transcriptional organization and regulation of the *Vibrio anguillarum* heme uptake gene cluster. *Gene* **374C**:68-76.
21. **Olczak, T., W. Simpson, X. Liu, and C. A. Genco.** 2005. Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Rev* **29**:119-44.

22. **Parales, R. E., and C. S. Harwood.** 1993. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram- bacteria. *Gene* **133**:23-30.
23. **Pérez-Rueda, E., J. Collado-Vides, and L. Segovia.** 2004. Phylogenetic distribution of DNA-binding transcription factors in bacteria and archaea. *Comput Biol Chem* **28**:341-50.
24. **Sambrook, J., and D. W. Rusell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Third edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
25. **Schell, M. A.** 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**:597-626.
26. **Sperandio, V., C. C. Li, and J. B. Kaper.** 2002. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun* **70**:3085-93.
27. **Vanderpool, C. K., and S. K. Armstrong.** 2003. Heme-responsive transcriptional activation of *Bordetella bhv* genes. *J Bacteriol* **185**:909-17.
28. **Vasil, M. L., U. A. Ochsner, Z. Johnson, J. A. Colmer, and A. N. Hamood.** 1998. The *fur*-regulated gene encoding the alternative sigma factor PvdS is required for iron-dependent expression of the LysR-type regulator *ptxR* in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**:6784-8.
29. **Watanabe, T., H. Fujihara, and K. Furukawa.** 2003. Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J Bacteriol* **185**:3575-82.

30. **Watnick, P. I., J. R. Butterton, and S. B. Calderwood.** 1998. The interaction of the *Vibrio cholerae* transcription factors, Fur and IrgB, with the overlapping promoters of two virulence genes, *irgA* and *irgB*. *Gene* **209**:65-70.
31. **Wertheimer, A. M., W. Verweij, Q. Chen, L. M. Crosa, M. Nagasawa, M. E. Tolmasky, L. A. Actis, and J. H. Crosa.** 1999. Characterization of the *angR* gene of *Vibrio anguillarum*: essential role in virulence. *Infect Immun* **67**:6496-509.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Designation	Relevant characteristic(s)	Reference/Source
Strains		
<i>V. anguillarum</i>		
H775-3	Strain deficient in anguibactin biosynthesis, derived from strain 775 by curing of pJM1.	Laboratory stock
775met11	775 strain <i>fur</i> , deficient in Fur protein biosynthesis	Tolmasky et al., 1994
B219 (Δ <i>huvR</i>)	H775-3 derivative with a deletion in <i>huvR</i> gene	This study
B228 (<i>fur</i> Δ <i>huvR</i>)	775met11 derivative with a deletion in <i>huvR</i> gene	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Cloning strain	Laboratory stock
S17-1- λ <i>pir</i>	Cloning strain, lysogenized with λ <i>pir</i> bacteriophage, host for π -requiring plasmids; conjugal donor	Laboratory stock
Plasmids		
pGEM-T- <i>Easy</i>	Cloning vector, Ap ^r	Promega
pNidia/Kan	pKEK229 with a 1.5-kb <i>Pst</i> I- <i>Pst</i> I fragment containing the Kan-cassette from pKAN π	Mouriño <i>et al.</i> , 2004
pHRP309	Promoterless- <i>lacZ</i> plasmid for transcriptional fusion, Gm ^r	Parales and Harwood, 1993
<i>phuvA::lacZ</i>	Putative promoter region of <i>huvA</i> cloned into the pHRP309 vector	Mouriño <i>et al.</i> , 2006
pSML86	<i>huvR</i> gene amplified by I-PCR and cloned into the pGEM-T- <i>Easy</i> vector Ap ^r	This study

TABLE 2. Oligonucleotides used in this study

Primer ^{a, b}	Nucleotide sequence
hutR5'.2 (degenerate primer)	5'-AGAGGCAGCTTTGCDKCDGC-3'
hutR3'.2 (degenerate primer)	5'-GCYGGYTGYTCRCGHGCGYGT-3'
huvR4-rev	5'- ATTTTCTTCAGATCCGCTG -3'
huvR1	5'- CGATGATGGTGCACGGCTTAG -3'
huvR1rev	5'- CTCGTTATTGCATACTCACT -3'
huvR2	5'-GATTGCTGATTGCCCCACG-3'
HuvR.A	5'- GCGGATCCTCTGATATTGACACCTTTAT -3'
HuvR.B	5'- GCGAATTC ^{CAATCGCATCTAAAATATGAAG} -3'
HuvR.C	5'- GCGAATTC ^{ATGGGCGAAGCAAAGTCGTGG} -3'
HuvR.D	5'- GCAAGCTTCGTATCCTTCCGCTAATGTT -3'

^a Primer used for the reverse transcription in RT-PCR analysis is in boldface letters.

^b Restriction sites for *EcoRI*, *BamHI* and *HindIII* added in primers used in *huvR* mutations are underlined.

FIGURE LEGENDS

2

Figure 1. Multiple alignment between the *V. anguillarum* transcriptional regulator HuvR and their corresponding homologues identified in *Vibrio* spp. Arrows indicate degenerated primers designed from the most conserved regions. Helix-turn-helix motif is enclosed within a box.

8 **Figure 2.** (A) Upstream sequence and partial nucleotide sequence of *V. anguillarum* *huvR*. The ribosomal-binding site (RBS) is indicated on the upper strand. The deduced amino acid sequence is indicated in boldface letters. The region homologous to the *E. coli* Fur-binding site (Fur-box) is enclosed within a box. (B) PCR analysis for detection of *huvR* transcription from cultures grown under different conditions. C, Control conditions in CM9 medium; +Fe, CM9 iron-repleted by addition of $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 40 μM ; Lane -Fe, CM9 iron-depleted by addition of EDDA 1.5 μM ; Hm, CM9 iron-depleted by addition of EDDA 5 μM , plus hemin 10 μM . Lane +, PCR amplification from genomic DNA; lane -, reaction without reverse transcription product. M, molecular size standard (pb).

18

Figure 3. Transcriptional analysis of the *huvA* promoter (*phuvA::lacZ*) assayed under different conditions: C, control conditions; +Fe, iron-replete; Hm, iron-depleted with hemin added to a 10 μM final concentration; -Fe, iron-limited conditions. Cells of *V. anguillarum* wild type (H775-3), ΔhuvR mutant (B219), *fur* mutant (775met11) and the double mutant *fur*/ ΔhuvR (B228) were tested.

24

V. anguillarum MSILQSPITLEALHILDAIDRRGSFAAAANELSRAPSSLSYQIQKLEQDLDITIFDRSGH 60
V. cholerae ---MLSPITLEALHILDAIERRGSF AAAANELNRAPSSLSYQIQKLEQDLDLMIFDRSGH 57
V. parahaemolyticus ---MQSPITLEALHILDAIDRRGSFAAAANELDRAPSSLSYQIQKLEQDLDINIFDRSGH 57
V. mimicus ---MLSPITLEALHILDAIERRGSF AAAANELNRAPSSLSYQIQKLEQDLDLMIFDRSGH 57
V. vulnificus ---MQSPITLEALHILDAIDRRGSFASAAANELDRAPSSLSYQIQKLEQDLDIMIFDRSGH 57

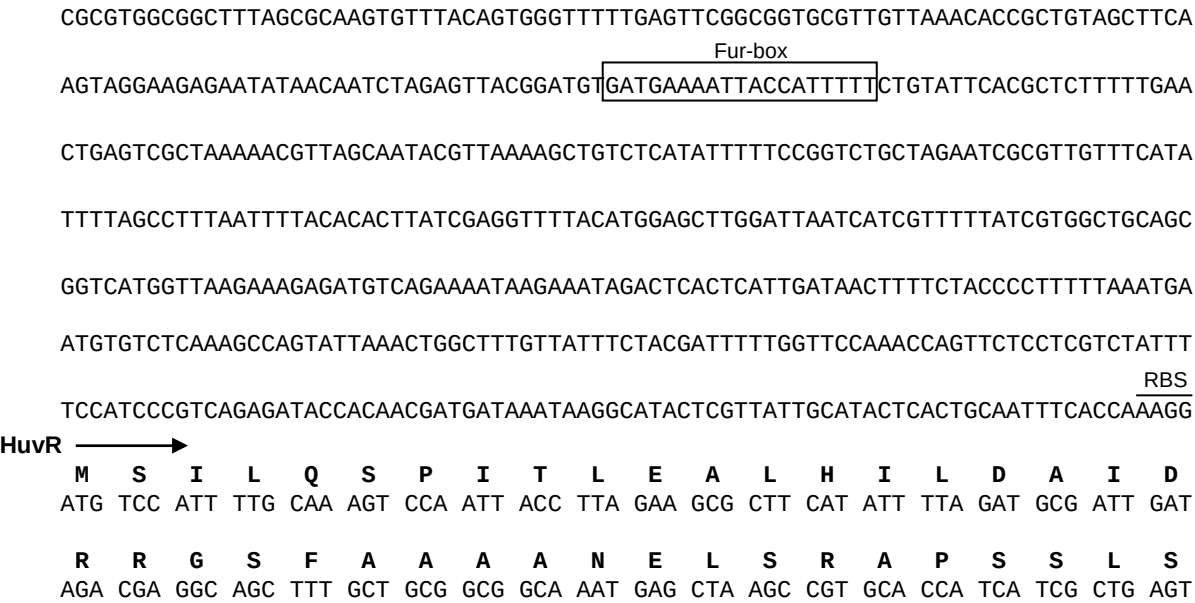
V. anguillarum KATFTEAGLLILERGRAILSAATEKLVNDATLLANGWELDLTVAFDGIIPHNFFPMVEAL 120
V. cholerae RANFTEAGKLILERGRAILAAATEKLVNDATLLANGWELDITIALDGIIPAAANLFFPMVEAL 117
V. parahaemolyticus KALFTEAGKLILERGRAILOASEKLVNDATLLANGWELDITVAFDGIIPISNFFQMVDAL 117
V. mimicus RANFTEAGKLILERGRAILAAATEKLVNDATLLANGWELDITIALDGIIPATNLFSMVEAL 117
V. vulnificus KANFTDAGRLILERGRITILAAATEKLVNDATLLANGWELDISIAYDGIIGTHHFFSLVDAL 117

V. anguillarum GNVSKTRVRLQEEILAGCWESLSTDRADLLICPRIDTLPQDVKAETIGTMSMWVAASSH 180
V. cholerae GNISKTRVRLQDEILAGCWEALATGRADLLICPRIEALPQDVKAETIGTMKMIWVAAPTH 177
V. parahaemolyticus AEVSSTRVRLQEEILAGSWESLNTGRADLLVCPSLDTLPQEVKAEEKIGKMSMIWVAATEH 177
V. mimicus GNISKTRVRLQDEILAGCWEALATGRADLLICPRIDALPQDVKAETIGKMKMIWVAAPTH 177
V. vulnificus GNVSKTRVRLQEEILAGCWESLQSGRADLLVCPKLEVLPHDVKADTIGKMSMTWVAAPNH 177

V. anguillarum YAHKRSGAFDEEARQKYRVIAIADTARDQPAHSVNILOKQPRLTVTNFSAKCAALVEGLG 240
V. cholerae YVHRRSGEFNEEARQKYRAIAIADTAREQPAMSVNIIQRPRLTVSNLDAKCKALVAGLG 237
V. parahaemolyticus YVHKRSGEFDDSAEQKYRIIAIADTAREQPALSINIIQKQPRLTVTNFTAKVEALTAGLG 237
V. mimicus YVHRRAGEFNEEARQKYRAIAIADTAREQPAMSVNIIQRPRLTVSTLDAKCKALVAGLG 237
V. vulnificus YVHKRSGEFNDSAREKYRIIAIADTAREQPAITVNIIOKQPRLTVTNLQAKVDALVTGLG 237

V. anguillarum IGTLPKQITAEPLIIAAGKLLKVTISGSEKSMQIIMAWRRNMGEAKSWCVQYLKKNWTL 298
V. cholerae IGTLPQLQAQPYIDKGELKATHGSEDLEMDIVLAWRRNMGEAKSWCIQYLKKNWRWE 295
V. parahaemolyticus IGTLPQRQIALPLIEKGVLKQIEGTEEQPMDIILAWRRNTMGEAKSWCIQYLKKNWKLK 295
V. mimicus IGTLPQQYAQPYIDRGLQYINGESDSEMEIVLAWRRNTMGEAKSWCIQYLKKNWRWA 295
V. vulnificus IGTLPDITATPLIEAGKLLKEIEGAEQQHLEIILAWRRNMGEAKSWCIQYLKKNWKLK 295

A



B

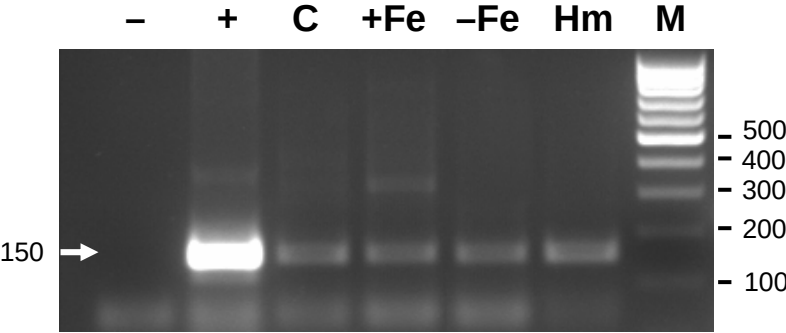


Figure 2

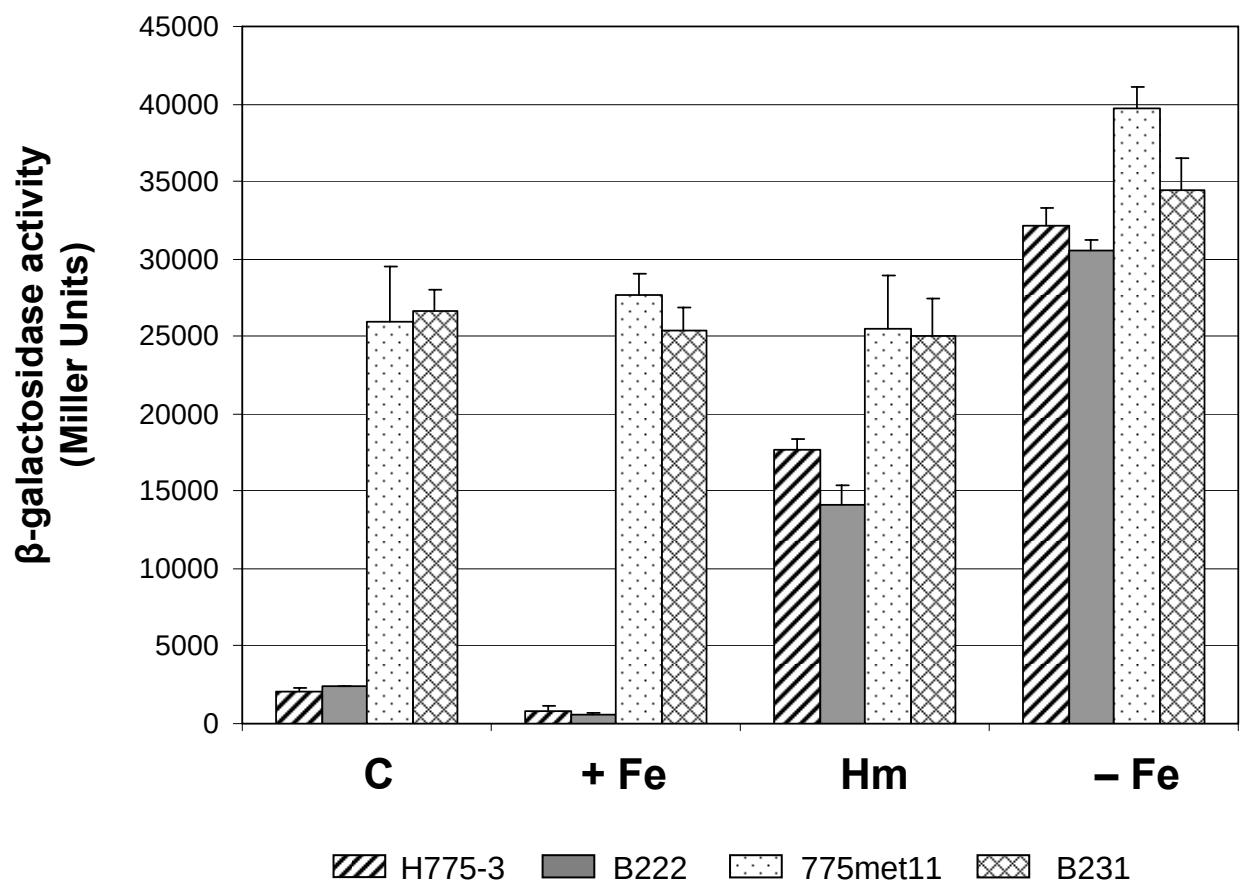
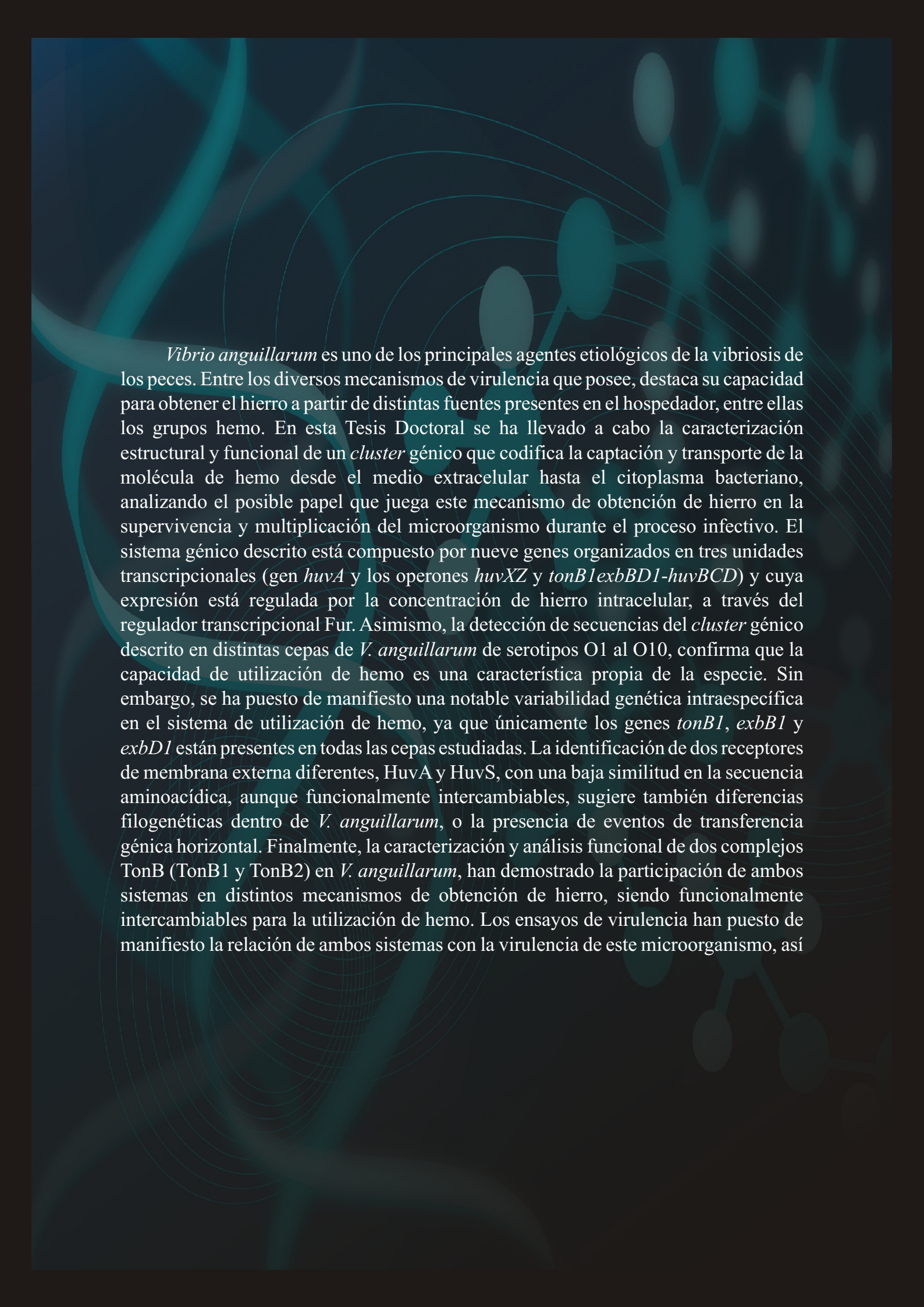


Figure 3



Vibrio anguillarum es uno de los principales agentes etiológicos de la vibriosis de los peces. Entre los diversos mecanismos de virulencia que posee, destaca su capacidad para obtener el hierro a partir de distintas fuentes presentes en el hospedador, entre ellas los grupos hemo. En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la caracterización estructural y funcional de un *cluster* génico que codifica la captación y transporte de la molécula de hemo desde el medio extracelular hasta el citoplasma bacteriano, analizando el posible papel que juega este mecanismo de obtención de hierro en la supervivencia y multiplicación del microorganismo durante el proceso infectivo. El sistema génico descrito está compuesto por nueve genes organizados en tres unidades transcripcionales (gen *huvA* y los operones *huvXZ* y *tonB1exbBD1-huvBCD*) y cuya expresión está regulada por la concentración de hierro intracelular, a través del regulador transcripcional Fur. Asimismo, la detección de secuencias del *cluster* génico descrito en distintas cepas de *V. anguillarum* de serotipos O1 al O10, confirma que la capacidad de utilización de hemo es una característica propia de la especie. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto una notable variabilidad genética intraespecífica en el sistema de utilización de hemo, ya que únicamente los genes *tonB1*, *exbB1* y *exbD1* están presentes en todas las cepas estudiadas. La identificación de dos receptores de membrana externa diferentes, HuvA y HuvS, con una baja similitud en la secuencia aminoacídica, aunque funcionalmente intercambiables, sugiere también diferencias filogenéticas dentro de *V. anguillarum*, o la presencia de eventos de transferencia génica horizontal. Finalmente, la caracterización y análisis funcional de dos complejos TonB (TonB1 y TonB2) en *V. anguillarum*, han demostrado la participación de ambos sistemas en distintos mecanismos de obtención de hierro, siendo funcionalmente intercambiables para la utilización de hemo. Los ensayos de virulencia han puesto de manifiesto la relación de ambos sistemas con la virulencia de este microorganismo, así