

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO

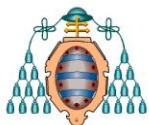
BIOLOGÍA FUNCIONAL Y MOLECULAR

**Genes de *Yersinia ruckeri* relacionados con
el proceso infeccioso y con el “factor
sensible al calor” (HSF)**

Memoria presentada por **Roberto Navais Barranco**

para optar al título de **Doctor por la Universidad de Oviedo**

Oviedo 2013



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Genes de <i>Yersinia ruckeri</i> relacionados con el proceso infeccioso y con el "factor sensible al calor" (HSF)	Inglés: <i>Yersinia ruckeri</i> genes related to the infectious process and the heat sensitive factor (HSF)
2.- Autor	
Nombre: Roberto Navais Barranco	
Programa de Doctorado: Biología Funcional y Molecular (Interdepartamental)	
Órgano responsable: Departamento de Biología de Organismos y Sistemas	

RESUMEN (en español)

Yersinia ruckeri es el agente etiológico de la yersiniosis, enfermedad que afecta fundamentalmente a los salmónidos y que produce pérdidas económicas considerables en la acuicultura de muchos países. El esclarecimiento de los mecanismos de virulencia que posee la bacteria es un factor determinante, no solo para el conocimiento de su fisiología, sino también, para la elaboración de nuevas estrategias de prevención y tratamiento.

En esta memoria se presenta el estudio de varios genes de *Y. ruckeri*. Un grupo de ellos, codifica el sistema YctCBA, integrado por tres componentes implicados en el transporte de citrato. Este sistema resultó ser inducible por suero de trucha arcoíris y reprimible por glucosa. Además, se identificaron y estudiaron dos genes, *yprA* e *yprB*, cuyos productos presentan homología con proteasas pertenecientes a la familia de peptidasas U32. Estos genes se inducen en condiciones de microaerobiosis y están implicados en el proceso infeccioso. Finalmente, se ha identificado el gen que codifica el factor sensible al calor (HSF), asociado con la virulencia en estudios anteriores. El producto de este gen (*yraS*), una alquil sulfatasa capaz de degradar el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), confiere mayor virulencia a la cepa que lo porta, aunque no es determinante para conferir resistencia frente al detergente. Esta resistencia viene proporcionada por el sistema AcrAB-TolC.

Los resultados obtenidos en este trabajo, además de definir nuevos genes implicados en el proceso infeccioso de *Y. ruckeri*, abren alternativas inéditas para el estudio de otros microorganismos patógenos.



RESUMEN (en Inglés)

Yersinia ruckeri is the etiological agent of enteric redmouth disease (ERM), which mainly affects salmonids and causes important economic losses in the aquaculture of many countries. Clarifying the virulence mechanisms of the bacterium is a key factor, not only for the knowledge of its physiology, but also for the development of new prevention and treatment strategies.

In this work, the study of several *Y. ruckeri* genes is presented. Some of them, code for the YctCBA system, constituted by three components involved in citrate transport. This system was shown to be inducible by rainbow trout serum and repressible by glucose. In addition to this, *yrpA* and *yrpB*, two genes whose products show homology to proteases of the U32 peptidase family, were identified and studied. These genes are induced under microaerobic conditions and are involved in the infectious process. Finally, the gene that codes for the heat sensitive factor (HSF), associated with virulence by previous studies, has been identified. The product of this gene (*yraS*), an alkyl sulfatase capable of degrading sodium dodecyl sulphate (SDS), causes an increase in virulence of the harbouring strain, although it is not responsible for the resistance to the detergent. This resistance is conferred by the AcrAB-TolC system.

The results obtained in this work, not only define new genes involved in the infectious process of *Y. ruckeri*, but also pave the way for new approaches in the study of other pathogenic microorganisms.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Después de seis años este arduo camino que es la realización de una tesis doctoral llega a su fin. Toca mirar atrás, recordar los malos y, sobre todo, los buenos momentos vividos. Estos últimos están llenos de personas que me han allanado el camino. Porque sin ellos no hubiera sido posible y porque "de bien nacidos es ser agradecidos", quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que de alguna forma u otra han hecho realidad este trabajo. Así que gracias:

A mi director, José Agustín Guijarro, por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por haberme concedido una beca de investigación para poder realizar la tesis doctoral.

A mis más que compañeros de laboratorio, en especial a Jessica, por haberme enseñado y por haber resuelto siempre con paciencia mis dudas.

A mis amigos, por haberme ayudado a desconectar del trabajo cuando lo he necesitado.

A mis padres y a mi hermana, por todo el cariño mostrado.

A Inés, sobre todo a ti, por haber estado siempre ahí, por haber aguantado mis malos momentos y por haberme animado todos los días y a todas horas. Has sido tú quien me ha dado la fuerza para poder llegar al final del camino.

A todos aquellos que me habéis apoyado: Gracias.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AN: agar nutritivo

ARNr: ARN ribosómico

CN: caldo nutritivo

DL₅₀: dosis letal 50

DO: densidad óptica

ELISA: enzyme-linked immunoabsorbent assay (ensayo inmunoenzimático)

ERIC-PCR: enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias)

ERM: enteric redmoth (enfermedad de la boca roja)

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

G+C: guanina más citosina

GFP: green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)

HSF: heat sensitive factor (factor sensible al calor)

IFAT: immunofluorescence antibody test (test de inmunofluorescencia indirecta)

IVET: *in vivo* expression technology (tecnología de expresión *in vivo*)

nt: posición nucleotídica dentro de un marco abierto de lectura

LAMP: loop mediated isothermal amplification (amplificación isotérmica mediada por bucle)

LPS: lipopolisacárido

MLST: multilocus sequence typing

OMP: outer membrane protein (proteína de membrana externa)

ONPG: o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido

pb: pares de bases

PBS: phosphate-buffered saline (solución salina tamponada con fosfato)

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

RBS: ribosome binding site (sitio de unión al ribosoma)

REP-PCR: repetitive element polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa de elementos repetitivos)

ROS: reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)

rpm: revoluciones por minuto

SFB: suero fetal bovino

STA: suero de trucha arcoíris

STM: signature-tagged mutagenesis (mutagénesis de marcaje)

T^a: temperatura de anillamiento

Tris: tris-2-amino-2 (hidroximetil)-1,3-propanodiol

TSA: agar de triptona y soja

TSB: caldo de triptona y soja

UFC: unidad formadora de colonia

ÍNDICE



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. EL GÉNERO <i>Yersinia</i>	2
I.2. <i>Yersinia ruckeri</i>	2
I.3. LA ENFERMEDAD ENTÉRICA DE LA BOCA ROJA (ERM: Enteric Redmouth Disease) O YERSINIOSIS.....	5
I.4. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	10
I.5. LA TECNOLOGÍA DE EXPRESIÓN <i>IN VIVO</i> (IVET): CLON <i>iviIX</i>	13
I.5.1. El transporte del citrato en bacterias.....	14
I.6. LAS PROTEASAS EXTRACELULARES BACTERIANAS	15
I.7. EL FACTOR SENSIBLE AL CALOR (HSF) DE <i>Y. ruckeri</i>	16
I.8. LAS SULFATASAS.....	16
I.9. LA RESISTENCIA BACTERIANA AL SDS	17
I.10. OBJETIVOS	18
II. MATERIAL Y MÉTODOS	23
II.1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	23
II.2. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL ADN	25
II.3. SELECCIÓN, SECUENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS.....	26
II.3.1. Selección del gen <i>iviIX</i>	26
II.3.2. Construcción de una genoteca de mutantes de <i>Y. ruckeri</i> 150R con el transposón mini- Tn5 Km2.....	26

II.3.3. Selección de mutantes.....	28
II.3.3.1. Selección de mutantes con fenotipo HSF ⁻ en medios con dodecil sulfato de sodio (SDS).....	28
II.3.3.2. Selección de mutantes incapaces de crecer en presencia de SDS.....	28
II.3.4. Secuenciación e identificación de los genes de interés	28
II.3.4.1. Secuenciación de los genes <i>yctCBA</i>	28
II.3.4.2. Secuenciación de los genes <i>yrpAB</i>	30
II.3.4.3. Secuenciación del gen <i>yraS</i>	31
II.3.4.4. Secuenciación del operón <i>acrAB</i> y del gen <i>acrR</i>	32
II.3.4.5. Análisis in silico de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.....	33
II.4. OBTENCIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES Y COMPLEMENTADAS	33
II.4.1. Obtención de las cepas mutantes <i>Y. ruckeri</i> 150R <i>yctC</i> , 150R <i>yraA</i> , 150R <i>yraB</i> y 150R <i>yraS</i> mediante mutagénesis insercional.....	33
II.4.2. Obtención de las cepas complementadas <i>Y. ruckeri</i> 150R <i>yraS</i> ⁺ y <i>Y. ruckeri</i> 956 <i>yraS</i> ⁺	35
II.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES Y COMPLEMENTADAS	36
II.5.1. Caracterización de la cepa mutante <i>Y. ruckeri</i> 150R <i>yctC</i>	36
II.5.1.1. Efecto del citrato sobre el crecimiento de la bacteria	36
II.5.1.2. Determinación de la utilización de citrato como única fuente de carbono	36
II.5.2. Caracterización de las cepas mutantes <i>Y. ruckeri</i> 150R <i>yraA</i> y 150R <i>yraB</i>	37
II.5.2.1. Crecimiento en el medio M9CG y en el medio CN	37
II.5.2.2. Determinación de la actividad proteolítica con azocoll.....	37
II.5.2.3. Determinación de la actividad proteolítica con azocaseína.....	38
II.5.2.4. Determinación de la actividad proteolítica mediante SDS-PAGE (zimogramas)	39
II.5.2.5. Determinación de la actividad proteolítica sobre diferentes componentes de la matriz extracelular	39
II.5.3. Caracterización de la cepa mutante <i>Y. ruckeri</i> 150R <i>yraS</i> y de las cepas complementadas <i>Y. ruckeri</i> 150R <i>yraS</i> ⁺ y <i>Y. ruckeri</i> 956 <i>yraS</i> ⁺	40
II.5.3.1. Determinación del fenotipo HSF ⁺ /HSF ⁻ en medio sólido con SDS.....	40
II.5.3.2. Análisis de la actividad SDS hidrolasa mediante SDS-PAGE	40
II.5.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el SDS	41
II.5.3.4. Crecimiento de <i>Y. ruckeri</i> en presencia de SDS y cuantificación de la degradación del detergente.....	41
II.5.3.5. Determinación de la utilización del SDS como fuente de carbono.....	42
II.5.3.6. Ensayos de motilidad tipo swarming	42
II.5.4. Caracterización de la cepa mutante <i>Y. ruckeri</i> 150R <i>acrA</i>	42
II.5.4.1. Ensayos de susceptibilidad a detergentes y antimicrobianos	42

II.6. DETERMINACIÓN DE LA DL ₅₀ DE DIFERENTES CEPAS DE <i>Y. ruckeri</i> EN TRUCHA ARCOÍRIS	43
II.7. OBTENCIÓN DEL SUERO DE TRUCHA ARCOÍRIS Y DETERMINACIÓN MEDIANTE HPLC DE SU CONTENIDO EN CITRATO	43
II.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>yctCBA</i> E <i>yrpAB</i>	44
II.9. LOCALIZACIÓN GENÓMICA DEL GEN <i>yraS</i>	45
II.10. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL GEN <i>yraS</i> EN DIFERENTES CEPAS DE <i>Y. ruckeri</i>	46
II.11. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-MASAS (GC-MS).....	46
II.12. NÚMEROS DE ACCESO DE LAS SECUENCIAS EN LAS BASES DE DATOS	47
III. RESULTADOS	51
III.1. EL SISTEMA TRANSPORTADOR DE CITRATO <i>YctCBA</i>	51
III.1.1. Análisis <i>in silico</i> del operón <i>yctCBA</i>	51
III.1.2. Regulación del operón <i>yctCBA</i>	53
III.1.3. Determinación mediante HPLC del contenido en citrato del suero de trucha arcoíris....	55
III.1.4. Caracterización de la cepa mutante <i>Y. ruckeri</i> 150 <i>RyctC</i>	56
III.2. EL OPERÓN <i>yrpAB</i>	58
III.2.1. Análisis <i>in silico</i> del operón <i>yrpAB</i>	58
III.2.2. Regulación del operón <i>yrpAB</i>	59
III.2.3. Caracterización de las cepas mutantes <i>Y. ruckeri</i> 150 <i>yrpA</i> y 150 <i>RyrpB</i>	61
III.3. LA ALQUIL SULFATASA <i>YraS</i>	66
III.3.1. Construcción de una genoteca de mutantes con el transposón mini-Tn5 Km2 y selección de mutantes con fenotipo HSF ⁻	66
III.3.2. Análisis <i>in silico</i> del gen <i>yraS</i>	67
III.3.3. Localización del gen <i>yraS</i> en el genoma de <i>Y. ruckeri</i>	70
III.3.4. Determinación del fenotipo HSF ⁺ /HSF ⁻ de la cepa <i>Y. ruckeri</i> 150 <i>RyraS</i> y las cepas complementadas <i>Y. ruckeri</i> 150 <i>RyraS</i> ⁺ y 956 <i>yraS</i> ⁺	71
III.3.5. Correspondencia entre la presencia/ausencia del gen <i>yraS</i> y el fenotipo HSF ⁺ /HSF ⁻ en diferentes cepas de <i>Y. ruckeri</i>	73
III.3.6. Actividad SDS hidrolasa en SDS-PAGE	73
III.3.7. Susceptibilidad al SDS de diferentes cepas de <i>Y. ruckeri</i>	75
III.3.8. Crecimiento de <i>Y. ruckeri</i> en presencia de SDS.....	76
III.3.9. Identificación mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) del producto de la degradación del SDS por <i>Y. ruckeri</i>	77
III.3.10. Utilización del SDS como nutriente por <i>Y. ruckeri</i>	78
III.3.11. Efecto del gen <i>yraS</i> sobre la motilidad de <i>Y. ruckeri</i>	79
III.3.12. Determinación de la virulencia de la cepa mutante 150 <i>yraS</i>	80
III.4. LA BOMBA DE EXPULSIÓN DE COMPUESTOS TÓXICOS <i>AcrAB-TolC</i>	80

III.4.1. Obtención de un mutante sensible al SDS	80
III.4.2. Análisis <i>in silico</i> del operón <i>acrAB</i> y del gen regulador <i>acrR</i>	81
III.4.3. Caracterización de la cepa mutante <i>Y. ruckeri</i> 150 <i>RacrA</i>	82
III.4.3.1. Susceptibilidad a diferentes detergentes y agentes antimicrobianos.....	82
IV. DISCUSIÓN.....	87
IV.1. EL SISTEMA TRANSPORTADOR DE CITRATO YctCBA DE <i>Y. ruckeri</i>	87
IV.2. LAS PROTEASAS HIPOTÉTICAS YrpA E YrpB	92
IV.3. LA ALQUIL SULFATASA YraS	96
IV.4. LA BOMBA DE EXPULSIÓN DE COMPUESTOS TÓXICOS AcrAB-TolC	107
V. CONCLUSIONES.....	112
VI. BIBLIOGRAFÍA	116
VII. ANEXO.....	141
VII.1. SECUENCIAS DE LOS GENES DEL OPERÓN <i>yctCBA</i>	141
VII.1.1. Secuencia del gen <i>yctC</i>	141
VII.1.2. Secuencia del gen <i>yctB</i>	142
VII.2.2. Secuencia del gen <i>yctA</i>	143
VII.2. SECUENCIAS DE LOS GENES DEL OPERÓN <i>yrpAB</i>	144
VII.2.1. Secuencia del gen <i>yrpA</i>	144
VII.2.2. Secuencia del gen <i>yrpB</i>	145
VII.3. SECUENCIA DEL GEN <i>yraS</i>	146
VII.4. SECUENCIAS DE LOS GENES DEL OPERÓN <i>acrAB</i> Y DEL GEN <i>acrR</i>	147
VII.4.1. Secuencia del gen <i>acrA</i>	147
VII.4.2. Secuencia del gen <i>acrB</i>	148
VII.4.3. Secuencia del gen <i>acrR</i>	151

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura, que se define como el cultivo de especies acuáticas vegetales y animales, ha experimentado un crecimiento exponencial en numerosos países de todo el mundo durante las últimas décadas. La FAO estima que para el 2.030 la acuicultura producirá el 65% de los alimentos de procedencia acuática destinados al consumo humano. En la actualidad, ya representa más del 47% de la oferta de pescado en el mundo (Tacón y col., 2009).

España, por su tradición pesquera, tiene unos hábitos importantes de consumo de pescado, estimados en las últimas estadísticas de 2011, en torno a los 27 kg por habitante y año (FAO, 2005-2013). Esta cifra, casi tres veces superior a la media europea, convierte a España en un gran consumidor de pescado. En España, la especie cultivada más importante es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), suponiendo el 99% de la producción de acuicultura continental (FAO, 2005-2013). Esta producción de trucha arcoíris se concreta en 2010 en 17.492 toneladas, con un valor estimado de aproximadamente 30 millones de euros (FAO, 2005-2013).

En términos de producción, las enfermedades infecciosas son las que causan un mayor perjuicio económico en la industria de la acuicultura debido, fundamentalmente, a los costes de los tratamientos y a la mortalidad que generan. Entre estas enfermedades infecciosas destacan las de origen bacteriano como las producidas por:

-Bacilos Gram-negativos aerobios y anaerobios facultativos. Es, probablemente, el grupo más extenso y el que, de forma general, más problemas provoca. Entre ellos encontramos miembros de las familias Enterobacteriaceae como *Yersinia ruckeri* y *Edwardsiella tarda*,

I. Introducción

Vibrionaceae como *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus* y *Photobacterium damsela*, Aeromonadaceae como *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas hydrophila* y Pseudomonadaceae como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas anguilliseptica*.

-**Cocos y bacilos Gram-positivos:** *Renibacterium salmoninarum*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactococcus garviae*, *Streptococcus iniae*...

-**Micobacteriaceae:** *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium chelonae*.

-**Nocardiaceae:** *Nocardia salmonicida*, *Nocardia asteroides*...

-**Flavobacteriaceae:** *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium branchiophilum* y *Tenacibaculum maritimum*.

-**Parásitos intracelulares obligados:** *Piscirickettsia salmonis*...

I.1. El GÉNERO *Yersinia*

El género *Yersinia* es conocido fundamentalmente por englobar tres especies patógenas para el hombre: *Yersinia pestis*, agente etiológico de la peste, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*, responsables ambas de procesos gastrointestinales y afecciones de ganglios mesentéricos. En la actualidad, el género *Yersinia* está constituido por diecisiete especies: *Y. enterocolitica*, *Y. rodheii*, *Y. ruckeri*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. intermedia*, *Y. bercovieri*, *Y. aldovae* y *Y. kristensenii*; propuestas recientemente: *Y. aleksiciae* (Sprague y col., 2005), *Y. massiliensis* (Merhej y col., 2008), *Y. similis* (Sprague y col., 2008), *Y. nurmii* (Murros-Konttinen y col., 2011a), *Y. pekkanenii* (Murros-Konttinen y col., 2011b) y *Y. entomophaga* (Hurst y col., 2011).

I.2. *Yersinia ruckeri*

Yersinia ruckeri es una bacteria Gram-negativa que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Fue aislada por primera vez en Idaho (Estados Unidos) en los años 50 y fue descrita inicialmente por Ross y col. (1966) y Rucker (1966). Las células de *Y. ruckeri* son bacilos ligeramente curvados de 1.0 µm de diámetro y 2-3 µm de longitud (**Figura 1**). Los cultivos celulares de más de 48 horas presentan en ocasiones largas células filamentosas. Su

temperatura óptima de crecimiento es de 28-29 °C. Son bacterias anaerobias facultativas, catalasa positivas, descarboxilan la lisina y la ornitina, reducen el nitrato a nitrito, hidrolizan el Tween 20, 40 y 60 y fermentan la glucosa, el manitol, la maltosa, la manosa y la trehalosa. La capacidad para hidrolizar la gelatina, caseína y Tween 80, así como para producir acetoína y fermentar el sorbitol, varía entre las distintas cepas, lo que permite utilizar estas características en estudios taxonómicos y epidemiológicos (Davies y Frerichs, 1989). Son negativas para el test de la oxidasa, así como para las pruebas de indol, salicina y esculina (Brenner y col., 2005). La capacidad de utilización del citrato difiere entre las diferentes cepas (Horne y Barnes, 1999). Aproximadamente, el 80% de las cepas aisladas son móviles, presentando 7 u 8 flagelos en disposición peritrica. *Y. ruckeri* carece de cápsula, endosporas e inclusiones. En cuanto a su hábitat, se ha encontrado en los sedimentos y forma parte de la microbiota de las aguas dulces.

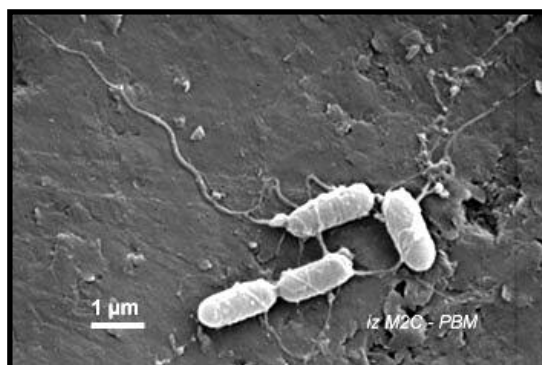


Figura 1. Fotografía realizada al microscopio electrónico de barrido de células de *Y. ruckeri*. (Tomada de <http://www.univrouen.fr/MC2/bacteries/images/yersinia.jpg>)

La inclusión de *Y. ruckeri* en el género *Yersinia* (Ewing y col., 1978) siempre ha generado gran controversia. Ross y col. (1966) inicialmente la incluyeron en la familia Enterobacteriaceae basándose tanto en la morfología, como en las características bioquímicas. Más difícil resultó asignarle un género dentro de esta familia, puesto que en función del tipo de pruebas taxonómicas utilizadas, se podía relacionar con los géneros *Serratia*, *Salmonella* o *Yersinia* (Ross y col., 1966; Ewing y col., 1978; Green y Austin, 1982). En 1982, Green y Austin mostraron que, fenotípicamente, *Y. ruckeri* estaba más próxima a *Salmonella arizonae* que a *Y. enterocolitica* o

I. Introducción

Y. pseudotuberculosis. En 1978, Ewing y col., incluyeron la bacteria en el género *Yersinia*, apoyándose en el análisis de la composición de bases del ADN. El contenido G+C de *Y. ruckeri* ($48 \pm 0,5$ %) difiere claramente del de las especies pertenecientes a los géneros *Serratia* (52-60 % G+C) y *Salmonella* (50-53 % G+C) (de Grandis y col., 1988), siendo más parecido al de otras especies del género *Yersinia* (46-50% G+C) (Manual de Bergey, 2005). A pesar de todos los estudios realizados hasta el momento, aún siguen existiendo dudas sobre su verdadera posición taxonómica. De hecho, las similitudes que las pruebas bioquímicas presentan con las de los géneros *Serratia* y *Salmonella*, y las serológicas con las correspondientes de *Hafnia alvei* y *Salmonella* sp., han hecho que varios autores consideren que este microorganismo puede llegar a constituir un nuevo género independiente (Ross y col., 1966; Llewellyn, 1980; Stevenson y Daley, 1982). En el mismo sentido, Bercovier y Mollaret (1984) también sugirieron que *Y. ruckeri* debería ser considerada un nuevo género dentro de la familia Enterobacteriaceae, puesto que con base en su ecología, atributos bioquímicos y las pruebas de hibridación de ADN, su acomodo con las otras especies del género *Yersinia* resultaba anómalo. Más recientemente, Kotetishvili y col. (2005) propusieron una nueva revisión taxonómica dado que la tipificación por secuencia de multilocus (MLST: multilocus sequence typing) y del ARNr 16S, indicaron que *Y. ruckeri* estaba bastante alejada del resto de especies del género *Yersinia*. Igualmente, apoyando esta misma idea está el hecho de que los estudios de patogenicidad realizados hasta ahora, señalaron que los mecanismos de virulencia usados por *Y. ruckeri* son diferentes a los encontrados en otras especies del género (Fernández y col., 2007; Tobback y col., 2007).

La clasificación intraespecífica en *Y. ruckeri* distingue dos biotipos (1 y 2) en función de la motilidad y la capacidad para hidrolizar el Tween 80, siendo el biotipo 1 mótil y lipasa positivo y el biotipo 2 negativo para ambas pruebas (Davies y Frerichs, 1989). En cuanto a su clasificación serológica, desde su primera descripción, se han establecido diferentes esquemas de tipado basados en las variaciones existentes en el antígeno O del lipopolisacárido (LPS), el perfil de proteínas de la membrana externa (OMPs: outer membrane proteins) y las reacciones serológicas realizadas con las células completas. De entre todas las clasificaciones intraespecíficas establecidas (Stevenson y Airdrie, 1984; Daly y col., 1986; Davies, 1990; Davies, 1991a; Stevenson y col., 1993; Romalde y col., 1993; Sousa y col., 2001), la más aceptada en la actualidad es la realizada por Romalde y col. (1993) que, basándose en el estudio de los

antígenos-O termoestables, LPS y proteínas de membrana externa (OMPs), distingue cuatro serotipos: O1, dentro del que se incluye un subgrupo a (antiguo serotipo I) y uno b (antiguo serotipo III); O2 (antiguo serotipo II) que presenta tres subgrupos (a, b y c); O3 (antiguo serotipo V) y O4 (antiguo serotipo VI). Entre estos serotipos, el clásico serotipo I, equivalente al actual serotipo O1a (Romalde y col., 1993), comprende las cepas más virulentas.

Por otro lado, Davies (1991a) ha propuesto un esquema para agrupar las cepas de *Y. ruckeri* con base en la combinación de biotipo, serotipo y perfil de OMPs. Esta clasificación resulta útil para poder discriminar entre diferentes cepas de *Y. ruckeri*, demostrar las relaciones existentes entre aislados e identificar diferentes grupos clonales. En ese mismo sentido, Bastardo y col. (2012a) han utilizado la combinación de diferentes métodos de biotipado, serotipado, perfiles de LPS y OMPs y técnicas de huella genética (ERIC-PCR y REP-PCR) para llevar a cabo un análisis polifásico de 80 cepas de *Y. ruckeri*. Los resultados de este trabajo apoyan la idea de que la combinación de métodos de tipado es, probablemente, el sistema más útil y apropiado para la realización de estudios epidemiológicos y de diversidad bacteriana.

En cuanto a la caracterización genética de *Y. ruckeri*, García y col. (1998) encontraron hasta ocho perfiles plasmídicos diferentes al analizar un total de 183 cepas aisladas de diferentes lugares geográficos. La mayoría de las cepas del serotipo I presentaban un plásmido de gran tamaño (75 MDa) cuya implicación en la virulencia todavía no ha sido determinada. Lo que sí está claro es que este plásmido no presenta homología con los plásmidos de virulencia de otras especies patógenas del género *Yersinia* (Guilvout y col., 1988). Recientemente, el análisis mediante MSLT de 103 cepas de *Y. ruckeri* aisladas de diferentes lugares geográficos, así como de diferentes hospedadores y muestras ambientales, confirmó la gran diversidad genética que existe dentro de la especie (Bastardo y col., 2012b). Las 103 cepas se agruparon en dos grandes complejos clonales denominados CC1 y CC2, mostrando un origen evolutivo común para 94 cepas dentro del CC1 y otro para las 6 cepas del CC2 (Bastardo y col., 2012b).

I.3. LA ENFERMEDAD ENTÉRICA DE LA BOCA ROJA (ERM: Enteric Redmouth Disease) O YERSINIOSIS

Y. ruckeri es el agente etiológico de la “enfermedad entérica de la boca roja” o yersiniosis, la cual produce importantes pérdidas económicas en la acuicultura de muchos países. Las infecciones agudas de la enfermedad, si no se detectan con rapidez, pueden

I. Introducción

ocasionar la pérdida del 30-70% del stock de peces y, en regiones en las que la enfermedad es endémica, se mantiene una tasa baja pero persistente de mortalidad por yersiniosis. Es una enfermedad que afecta principalmente a salmónidos (Busch, 1982), aunque la bacteria ha sido aislada a partir de otras familias de peces (McArdle y Dooley-Martin, 1985), así como de muestras de agua de río, aguas residuales y lecherías (Pritchard y col., 1995). Se cree que la yersiniosis se ha dispersado globalmente desde Estados Unidos a partir de la exportación de truchas durante la expansión de la práctica de este cultivo. Las primeras evidencias de yersiniosis en Europa aparecen publicadas por Lessel y col. (1983), quienes describieron un primer aislamiento de *Y. ruckeri* en Francia en 1981. La aparición de la enfermedad en Europa y su posterior diseminación a lo largo del continente fue favorecida por la ausencia de controles estrictos y sistemas de identificación. La expansión de la enfermedad desde Estados Unidos y Europa a países como Australia, Sudáfrica y Chile se debió probablemente a la importación por parte de estos países de huevos y alevines de salmónidos. Actualmente, la enfermedad se extiende por las piscifactorías de salmónidos de América (Estados Unidos, Canadá, Chile y Perú), Europa (Dinamarca, Francia, Italia, Alemania, Noruega, Reino Unido, España y Portugal), Australia y Sudáfrica.

La yersiniosis es una enfermedad sistémica y los signos externos en el pez (oscurecimiento de la piel) así como su comportamiento (anorexia y cierto aletargamiento) son comunes a los de otras septicemias causadas por bacterias Gram-negativas, con excepción de los alevines en los que son frecuentes las muertes asintomáticas (Kawula y col., 1996). El enrojecimiento de la garganta y la boca (**Figura 2A**), ocasionado por hemorragias subcutáneas, al que la enfermedad debe su nombre, aparece frecuentemente, pero no siempre. La progresión de la enfermedad, de no haber tratamiento, puede llevar a una erosión de la mandíbula y del paladar (Horne y Barnes, 1999). Las hemorragias aparecen en la superficie del cuerpo, en la punta de las branquias, en la base de las aletas y alrededor de la línea lateral, pero sólo en raras ocasiones se convierten en úlceras (**Figura 2B**) (Horne y Barnes, 1999). En algunos casos, en estadios avanzados de la infección, se presenta exoftalmia con hemorragias en la cavidad ocular y el iris (**Figura 2B**) (Fuhrmann y col., 1983). La zona ventral del extremo distal del intestino puede también inflamarse, tanto interna como externamente (**Figura 2C**). Internamente, hay una congestión de los vasos sanguíneos por todo el peritoneo, y petequias que afectan al hígado, páncreas, vejiga natatoria, músculos laterales y tejido adiposo asociado a

los ciegos pilóricos (Wobeser, 1973). El riñón y el bazo pueden inflamarse y puede aparecer un fluido amarillento, opaco y de aspecto mucoso en el estómago y en el intestino (Busch, 1982). Mediante microscopía se ha detectado la presencia de la bacteria en prácticamente todos los tejidos, principalmente en riñón, corazón, hígado y branquias (Horne y Barnes, 1999). Además, puede haber una necrosis severa en los tejidos hematopoyéticos del riñón (Horne y Barnes, 1999). De hecho, Wobeser (1973), Quentel y Aldrin (1986) y Lehman y col. (1987) observaron la existencia de anemia aguda en los peces afectados. Más recientemente, Welch y Wiens (2005) hallaron la bacteria en bazo y sangre utilizando la proteína verde fluorescente (GFP). Asimismo, Fernández y col. (2003) corroboraron la presencia de la bacteria en intestino y branquias al observar actividad β -galactosidasa en estos órganos tras realizar infecciones experimentales con cepas de *Y. ruckeri* que contenían fusiones transcripcionales con el gen *lacZ*. Recientemente, Méndez y Guijarro (2013), en experimentos *in vivo* realizados mediante la utilización del operón *lux*, también han localizado la bacteria en el intestino y han sugerido que este órgano es importante para el establecimiento de la infección y su diseminación.

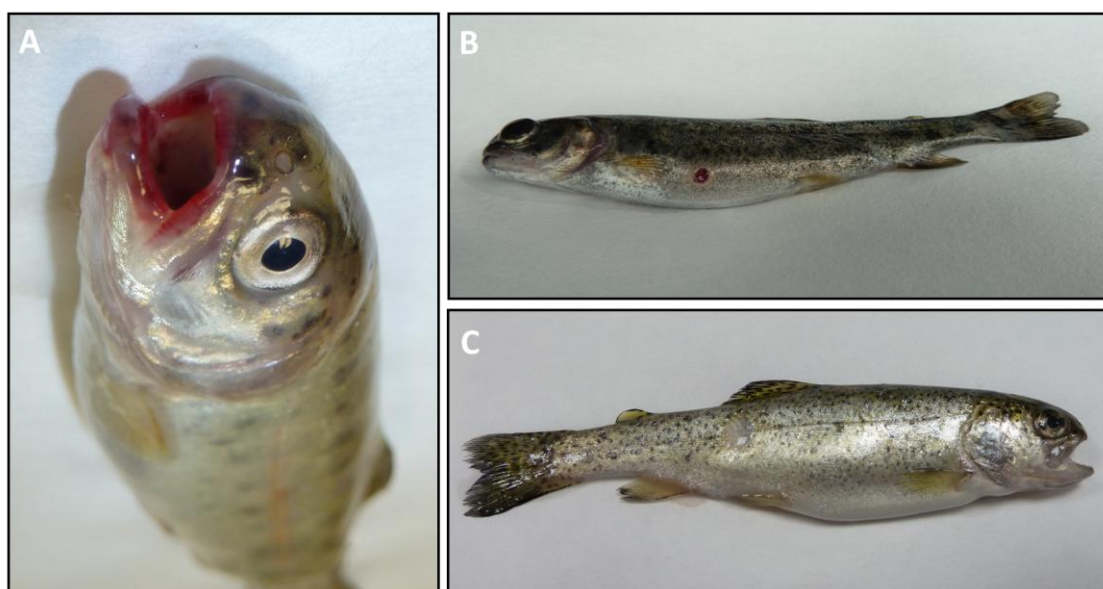


Figura 2. Fotografías de truchas arcoíris (*O. mykiss*) mostrando algunos síntomas de yersiniosis: hemorragias en la zona bucal (A), exoftalmia y úlceras (B) y distensión abdominal (C).

I. Introducción

Por otro lado, *Y. ruckeri* puede sobrevivir en el intestino de peces aparentemente sanos y la bacteria no ser detectada en los controles rutinarios de valoración del estado sanitario de estos. Este papel de portador que los peces pueden presentar, es muy importante para la transmisión de la infección causada por *Y. ruckeri*. Además, en condiciones de estrés para el animal, como el incremento de temperatura del agua, alta densidad, traslados, calidad pobre del agua, etc., puede, en estos portadores, aparecer la enfermedad. La corrección de los factores ambientales desencadenantes de la patología puede restaurar la salud del pez, aunque, a veces, es necesario el uso de un antibiótico si las condiciones están muy deterioradas.

La principal fuente de dispersión de la bacteria es a partir de las heces de peces portadores o enfermos (Busch y Lingg, 1975), si bien, normalmente, el número de bacterias diseminado no es suficiente para causar la aparición de brotes, excepto en condiciones de estrés (Hunter y col., 1980). La capacidad de *Y. ruckeri* de formar biopelículas sobre superficies y sedimentos representa también un potencial foco de infección recurrente en las piscifactorías (Coquet y col., 2002; Vendrell y col., 2009). Además, el aislamiento de *Y. ruckeri* a partir de mamíferos y otros animales salvajes como aves e invertebrados, pone de manifiesto que estos, junto con los peces silvestres, pueden actuar como vectores en la transmisión de la bacteria entre diferentes piscifactorías (Hunter y col., 1980; Willumsen, 1989).

La aparición de yersiniosis en una piscifactoría puede delimitarse mediante la aplicación de buenas prácticas sanitarias como por ejemplo, el control de la introducción en la piscifactoría de peces infectados y la correcta desinfección de los huevos importados. En zonas donde la yersiniosis es endémica, es importante tener un exhaustivo control sobre las condiciones estresantes anteriormente mencionadas, siendo aun así difícil evitar que, durante el verano, se produzcan brotes debido a factores tales como un flujo insuficiente y alta temperatura del agua.

El tratamiento de la enfermedad suele consistir en la administración de antibióticos. Los compuestos más utilizados son la sulfamerazina, la oxitetraciclina, combinaciones de trimetoprim y sulfonamida, ácido oxolínico y florfenicol. La utilización de sulfamidas potenciadas ha resultado de mucha utilidad (Bullock y col., 1983; Ledo y col., 1987). Aunque permiten controlar la enfermedad, el uso prolongado de antibióticos, además de ser costoso, puede provocar la selección de cepas resistentes. Así, Rodgers y col. (2001) observaron que una

exposición continuada de *Y. ruckeri* a ácido oxolínico, oxitetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, producía un aumento en la resistencia de *Y. ruckeri* a estos compuestos. Además, en algunas cepas de *Y. ruckeri* aisladas de brotes de yersiniosis, también se ha observado una reducción en la susceptibilidad a las quinolonas (Gibello y col., 2004).

La yersiniosis fue la primera enfermedad de peces para la que se desarrolló una vacuna (Busch, 1978; Cossarini-Dunier, 1986), comercializándose en 1976. La formulación de la mayoría de las vacunas comerciales contra la yersiniosis está basada sólo en cepas del serotipo 01/biotipo 1, que son las que causan la mayoría de los brotes de la enfermedad. Aunque esta vacuna monovalente que consiste en una preparación de células inactivadas con formalina, ofrece diferentes grados de protección cruzada con los demás serotipos (Cipriano y Rupenthal, 1987; Stevenson, 1997), se han descrito durante los últimos años brotes de la enfermedad en Inglaterra (Austin y col., 2003), España (Fouz y col., 2006) y Estados Unidos (Arias y col., 2007) en peces que habían sido previamente vacunados frente a yersiniosis. En todos los casos las cepas aisladas, causantes de estos brotes fueron clasificadas como del biotipo 2 debido a que carecían de motilidad y no secretaban fosfolipasa. Parece ser que las diferencias en el antígeno O del lipopolisacárido existentes entre las cepas del biotipo 1 y del biotipo 2 son las responsables de que la vacuna comercial no sea eficaz frente a estas últimas (Tinsley y col., 2011). La presión selectiva ejercida durante muchos años a través de la aplicación sistemática de la misma vacuna ha podido provocar la emergencia de nuevas cepas antigénicamente diferentes y para las cuales la vacuna utilizada resulta ineficaz. Desde 2008, existe una vacuna bivalente (AquaVac® RELERA™; Intervet International B.V.) que parece conceder protección frente a cepas de los biotipos 1 y 2. No obstante, en los últimos años se han realizado trabajos que se han centrado en el desarrollo de otras estrategias preventivas que también son capaces de incrementar las tasas de supervivencia de los animales afectados, como pueden ser el uso de inmunoestimulantes (Siwiki y col., 2003; Ryckaert y col., 2010) o probióticos (Raida y col., 2003; Kim y Austin, 2008; Capkin y Altinok, 2009; Abbass y col., 2010).

El diagnóstico de la enfermedad puede realizarse mediante el aislamiento y posterior identificación de la bacteria en diferentes medios de cultivo como agar de triptona y soja (Stevenson y Daly, 1982), agar sangre (Gibello y col., 2004), agar nutritivo (Secades y Guijarro, 1999), agar MacConkey (Gibello y col., 1999) o agar cerebro-corazón (Arias y col., 2007). Algunos métodos de diagnóstico están basados en pruebas bioquímicas como los sistemas API

I. Introducción

20E (Romalde y Toranzo, 1991), API ZYM (Joh y col., 2010) o API 50CH (Dear, 1988), o en características serológicas mediante pruebas de aglutinación y otros métodos como la inmunoadsorción enzimática (ELISA) o la inmunofluorescencia (IFAT) (Smith y col., 1987). Sin embargo, son las técnicas moleculares como la PCR (Gibello y col., 1999; Temprano y col., 2001; Del Cerro y col., 2002, Altinok y col., 2001; Keeling y col., 2012), las que se usan habitualmente para completar la rutina de diagnóstico y confirmar la identificación de *Y. ruckeri*. Otra técnica molecular, la amplificación isotérmica del ADN o LAMP, también se ha usado para detectar *Y. ruckeri* en tejidos de peces infectados (Saleh y col., 2008).

I.4. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

El control eficaz durante años de la yersiniosis mediante la vacunación, es probablemente una de las causas que han propiciado que los estudios sobre los mecanismos de patogenicidad de *Y. ruckeri* sean escasos. No obstante, el estudio de estos mecanismos tiene interés no solamente veterinario, sino también biológico, dado que esta especie está alejada del resto de las especies del género (Bergey's, 2005), y en particular, de las especies causantes de enfermedad en el hombre, por lo que sus mecanismos de patogenicidad pueden ser muy diferentes. Además, la reciente aparición de brotes, causados por cepas del biotipo 2, en peces vacunados, pone de manifiesto la necesidad de profundizar en el conocimiento de los factores de virulencia de esta bacteria para poder desarrollar nuevas estrategias de prevención y tratamiento. A continuación, se describen brevemente algunos de los factores que han sido relacionados con la virulencia de la bacteria.

En 1993, Romalde y Toranzo (1993) comprobaron que los **productos extracelulares** de *Y. ruckeri*, que incluían lipasas, proteasas y hemolisinas, cuando se inyectaban por vía intraperitoneal en peces, eran altamente tóxicos y reproducían las zonas necróticas y hemorrágicas propias de la enfermedad. Basándose en estos estudios, Secades y Guijarro (1999) purificaron y caracterizaron la metaloproteasa Yrp1 perteneciente a la subfamilia de las serralisinas. Esta proteasa es capaz de digerir diferentes proteínas de la matriz y del músculo, destacando especialmente la digestión de la laminina, componente mayoritario de las membranas basales, lo cual estaría directamente relacionado con la invasión de tejidos (Fernández y col., 2003). El gen que codifica Yrp1 es parte de un operón que también incluye a los genes *yrdD*, *yrdE* e *yrdF* que codifican un transportador ABC de tipo I y al gen *inh*, que

codifica un inhibidor de la proteasa (Fernández y col., 2002). La inactivación por mutagénesis insercional tanto del gen *ypr1* como del gen *yprE* resultó en un incremento significativo de la DL₅₀, demostrándose la participación de esta proteasa en la virulencia de la bacteria (Fernández y col., 2002).

El **hierro** es un elemento fundamental para el crecimiento microbiano, pero su disponibilidad para la bacteria en el interior del hospedador animal es muy baja. Por ello, la capacidad para captar este elemento es un requisito determinante para la supervivencia de la bacteria dentro del hospedador y se correlaciona generalmente con su virulencia. En este sentido, los microorganismos disponen de sistemas de adquisición de hierro eficaces como los mediados por sideróforos, pequeñas moléculas extracelulares capaces de quelar el hierro para, posteriormente, poder ser utilizado por la célula. *Y. ruckeri* posee un sistema de captación de hierro mediado por un sideróforo de tipo catecolato, denominado ruckerbactina (Fernández y col., 2004). La producción de este sideróforo es inducida durante el proceso infeccioso (Fernández y col., 2004) y su ausencia determina una atenuación en la virulencia de la bacteria (Fernández y col., 2004). Otros productos extracelulares importantes relacionados con la captación de hierro son las hemolisinas (Poole y col., 1988). En el caso de *Y. ruckeri*, Fernández y col. (2007) confirmaron que la producción de la hemolisina YhIA aumentaba bajo condiciones limitantes de hierro, lo que sugiere su participación en la captación de hierro de los hematíes. Esta presentaba no sólo actividad hemolítica, sino también, citolítica sobre células de la línea fibroblástica BF-2 de pez (Fernández y col., 2007). Los estudios realizados *in vivo* con mutantes de *Y. ruckeri* que tenían inactivado el gen *yhIA* indicaron que la hemolisina estaba implicada en la virulencia de la bacteria (Fernández y col., 2007). Además, estudios recientes han mostrado que este gen se expresa de forma significativa en el interior del pez durante el proceso infeccioso (Méndez y col., 2013).

Los microorganismos patógenos han desarrollado también sistemas eficaces de captación de **zinc**, que, al igual que el hierro, no se encuentra fácilmente disponible en las cantidades necesarias para la bacteria en el interior del hospedador. La capacidad de captación de zinc también ha sido relacionada con la virulencia en varios microorganismos como *S. enterica* o *E.coli* (Gabbianelli y col., 2011; Sabri y col., 2009; Ammendola y col., 2007; Petrarca y col., 2010). En *Y. ruckeri*, el operón *znuABC*, que codifica un sistema de transporte de alta afinidad por el zinc, también está implicado en el establecimiento y mantenimiento del proceso

I. Introducción

infeccioso en trucha arcoíris (Dahiya y Stevenson, 2010a). Este sistema está constituido por una proteína periplasmática de unión al zinc (ZnuA), una permeasa de membrana interna (ZnuB) y una ATPasa (ZnuC), y es homólogo al transportador ZnuABC de *E. coli* (Dahiya y Stevenson, 2010a). La proteína ZnuA solo se acumula en la bacteria cuando es cultivada en condiciones de escasez de zinc.

La **evasión del sistema inmunológico** por parte de la bacteria, especialmente la resistencia a la acción de los macrófagos, es esencial para la colonización eficiente del hospedador (Magnadóttir, 2006). En este sentido, se ha observado que las cepas de *Y. ruckeri* del serotipo I que poseen un plásmido de 75 MDa resisten la acción bactericida de los macrófagos, aunque los mecanismos subyacentes aún se desconocen (Stave y col., 1987). Además, Davies y col. (1991b) observaron también que las cepas virulentas del serotipo I eran resistentes a la acción bactericida del suero de trucha, lo que apoya la existencia de este proceso de evasión de *Y. ruckeri* del sistema inmune del pez. Además, se ha descrito recientemente en *Y. ruckeri* la existencia del operón *cdsAB*, constituido por dos genes, el *cdsA*, que codifica una L-cisteína permeasa, y el *cdsB*, que codifica una L-cisteína desulfidasa (Méndez y col., 2011) que hidroliza el aminoácido en piruvato, NH_3 y SH_2 . El operón se expresa fuertemente *in vivo* (Méndez y Guijarro, 2013) y su inactivación supone una pérdida significativa de la virulencia de la bacteria (Méndez y col., 2011). Recientes descubrimientos de Ryckaert y col. (2010) definieron a *Y. ruckeri* como un patógeno intracelular facultativo en macrófagos de trucha arcoíris. Dado que los macrófagos producen altos niveles de NO para luchar contra patógenos bacterianos o parásitos, el sistema CdsAB podría ayudar a *Y. ruckeri* a sobrevivir en estas células utilizando la cisteína existente para generar SH_2 y así reconstituir los centros Fe-S de proteínas dañadas consecuencia del estrés por NO y otros derivados al que la bacteria tiene que hacer frente durante su replicación en los macrófagos (Méndez, 2012).

La **adherencia bacteriana** a los tejidos del hospedador es un paso esencial para la colonización y posterior progresión de la infección mediante la liberación de toxinas e invasión celular. Proteínas de membrana externa, otras proteínas de superficie, polisacáridos capsulares, fibrillas y pili son las estructuras que pueden servir como adhesinas bacterianas (Hultgren y col., 1993). La capacidad de adherencia de *Y. ruckeri* a diferentes líneas celulares de peces ha sido analizada en varios estudios (Romalde y col., 1990; Romalde y Toranzo, 1993), aunque solo ha

podido observarse una ligera capacidad de adherencia e invasión por parte de algunas cepas a la línea celular CHSE-214 de embrión de salmón (Romalde y Toranzo, 1993).

Los **sistemas de secreción de tipo IV (T4SS)** de patógenos intracelulares transfieren moléculas efectoras, desde la bacteria, al interior de las células hospedadoras, desarrollando un papel clave en la supervivencia de estas dentro de macrófagos o eritrocitos. En *Y. ruckeri* se ha hallado un T4SS, codificado por el operón *traHIJKCLMN*, que está relacionado con la virulencia (Méndez y col., 2009), y que, por lo tanto, podría ser importante durante la etapa intracelular de la bacteria. El operón *traHIJKCLMN* se parece tanto por su secuencia como por su estructura, al operón *tra* hallado en el plásmido de virulencia pADAP de *Serratia entomophila* (Hurst y col., 2003). La expresión del operón se induce a 18 °C, como ocurre con otros factores de virulencia de *Y. ruckeri*, y bajo condiciones de escasez de nutrientes. La presencia del operón en 15 cepas de *Y. ruckeri* de diferentes orígenes es un indicativo de la importancia que tiene para el ciclo vital de esta bacteria.

Los mecanismos de **regulación de la expresión genética** juegan un papel importante durante el desarrollo del proceso infeccioso ya que permiten la expresión diferencial de genes para que la bacteria se adapte a los distintos ambientes que encuentra en el hospedador. Los sistemas de regulación de dos componentes son uno de los que utiliza la bacteria para adaptarse a los cambios en su entorno. En *Y. ruckeri*, se ha descrito el sistema BarA-UvrY, que contribuye a su virulencia, posiblemente, a través de la regulación de la expresión de genes durante el proceso de invasión de células epiteliales y de resistencia al proceso de estrés oxidativo inducido por las células del sistema inmune (Dahiya y col., 2010b).

I.5. LA TECNOLOGÍA DE EXPRESIÓN *IN VIVO* (IVET): CLON *iviIX*

La tecnología IVET es una estrategia de captura de promotores que se inducen específicamente durante la infección (genes *ivi*; *in vivo* induced), utilizando el hospedador como sistema de selección (Mahan y col., 1993). En *Y. ruckeri* la aplicación de esta tecnología al proceso infeccioso en trucha arcoíris permitió seleccionar 14 clones, cada uno de los cuales contienen un gen *ivi*, cuya expresión se induce durante el proceso infeccioso y que, por tanto, está de una u otra forma, relacionado con éste (Fernández y col., 2004; Méndez y col., 2009; Méndez y col., 2011). Entre los 14 clones identificados, merece especial mención el clon *iviIX*, por su vinculación a este trabajo de investigación.

I. Introducción

I.5.1. El transporte del citrato en bacterias

El citrato es un intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que está presente en muchos productos naturales como las frutas, los vegetales, la leche o el suero humano. A diferencia de lo que ocurre en los organismos eucariotas, y a pesar de su interés, el transporte de citrato ha sido poco estudiado en bacterias. En la literatura sólo aparecen algunos ejemplos como el sistema transportador TctCBA de *Salmonella typhimurium* (Sweet y col., 1984; Widenhorn y col., 1988a; Widenhorn y col., 1988b), el sistema BctCBA de *Bordetella pertussis* (Antoine y col., 2005) y la citrato permeasa CitP de las bacterias del ácido láctico (Dridier y col., 2004). Según el sistema de clasificación elaborado por Saier (2000), hasta el momento se han descrito cinco familias de transportadores de citrato en bacterias. En todos los casos estos sistemas permiten mediante un transporte activo la entrada de citrato en la célula.

El citrato, una vez en el citoplasma de la bacteria y, mediante su entrada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, puede ser usado como fuente de energía, así como fuente de carbono para la síntesis de ácidos grasos, aminoácidos, colesterol o glucosa. De hecho, en *Corynebacterium glutamicum*, se ha demostrado que su crecimiento en un medio con citrato aumenta la expresión de los genes que codifican los enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (aconitasa, succinil-CoA sintetasa, succinato deshidrogenasa y fumarasa), la enzima málica, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la gluconeogénica gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y la ATP sintasa (Polen y col., 2007).

Por otra parte, la utilización del citrato como fuente de energía y carbono se puede producir tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias. En presencia de oxígeno la utilización del citrato ocurre a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, mientras que, en su ausencia, son varias las vías fermentativas implicadas en su metabolismo (Bott, 1997).

Además de como fuente de energía y carbono, el citrato puede contribuir a la supervivencia de bacterias patógenas en su hospedador. Así, se ha descrito la implicación en virulencia de sistemas transportadores de citrato en las bacterias fitopatógenas *Pectobacterium atrosepticum* (Urbany y Neuhaus, 2008) y *Xanthomonas campestris* (Tamir-Ariel y col., 2007). Urbany y Neuhaus (2008) sugieren, entre otras hipótesis, que la bacteria podría utilizar el citrato para sintetizar la acromobactina, un agente quelante de hierro, factor limitante para *P. atrosepticum* en el hospedador. En el caso de *X. campestris*, la absorción y posterior utilización

del citrato por la bacteria podría generar condiciones favorables para el patógeno mediante un cambio del pH (Tamir-Ariel y col., 2007). Se sabe que la alcalinización del apoplasto es un requisito para el establecimiento exitoso de muchas bacterias fitopatógenas (Alfano y Collmer., 1996; Alfano y Collmer., 2004). Asimismo, el citrato podría ser una importante fuente de carbono para la bacteria en el apoplasto, y de esta manera facilitar su crecimiento, contribuyendo a una colonización más rápida de los tejidos por la bacteria (Tamir-Ariel y col., 2007).

I.6. LAS PROTEASAS EXTRACELULARES BACTERIANAS

La producción de enzimas proteolíticas extracelulares es común a microorganismos patógenos y no patógenos. Estas enzimas son factores importantes para el ciclo de vida bacteriano y pueden proveer de nutrientes al microorganismo en forma de péptidos o aminoácidos al hidrolizar las proteínas del entorno. Además, pueden contribuir de forma relevante a la virulencia en las bacterias patógenas (Miyoshi y Shinoda, 2000; Fernández y col., 2000). De hecho, muchos autores mantienen que las proteasas son los factores de virulencia más importantes de entre todos los componentes extracelulares. Se ha sugerido que las enzimas proteolíticas de los patógenos de peces juegan un importante papel causando un daño tisular masivo en el hospedador, lo que puede facilitar el establecimiento y progresión de la infección. Está demostrado que proteasas de los patógenos de peces *A. hydrophila* (Kanai y Wakabayashi, 1984; Leung y Stevenson, 1988; *Abolghait* y col., 2010), *A. salmonicida* (Sakai, 1985; Gunnlaugsdottir y Gudmundsdottir, 1997), *Flexibacter psychrophilus* (Bertolini y col., 1994) y *Moritella viscosa* (Bjornsdottir y col., 2009); *L. anguillarum* (Norqvist y col., 1990; Denkin y Nelson., 2004) causan importantes daños en los tejidos de los peces, por lo que pueden participar en el proceso infeccioso y ser consideradas como factores de virulencia.

Sin embargo, no todas las proteasas extracelulares parecen estar implicadas en la virulencia. Así, las serín proteasas AhpA de *A. hydrophila* (Cascón y col., 2000a) y AspA de *A. salmonicida* (Vipond y col., 1998), así como la enzima proteolítica Fpp2 de *F. psychrophilum* (Pérez-Pascual y col., 2011) no parecen ser esenciales para el desarrollo del proceso infeccioso.

Parece, por lo tanto, que el papel que las proteasas pueden jugar en la virulencia de la bacteria puede ser muy diferente, lo que hace necesario el estudio minucioso de cada una de estas enzimas en cada microorganismo concreto.

I.7. EL FACTOR SENSIBLE AL CALOR (HSF) DE *Y. ruckeri*

Furones y col. (1990) hallaron una asociación entre la virulencia de las cepas del serotipo I de *Y. ruckeri* y la presencia en ellas de un factor sensible al calor (HSF), identificado como una banda de aproximadamente 120 kDa de masa molecular que se detectaba exclusivamente en los extractos celulares de las cepas virulentas cuando se examinaban mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Las cepas se clasificaron como HSF⁺ o HSF⁻ en función de la presencia o ausencia de este factor (Furones y col., 1990). Los experimentos de infección en trucha arcoíris llevados a cabo por inyección intraperitoneal e inmersión con las cepas clasificadas como HSF⁺ siempre causaban una elevada mortalidad, mientras que con las cepas HSF⁻ no había mortalidad alguna (Furones y col., 1990). Basándose en estos resultados, Furones y col. (1990) sostienen que el HSF es un factor de virulencia relevante de *Y. ruckeri*. Con el objetivo de poder diferenciar fácilmente las cepas HSF⁺ de las cepas HSF⁻ y con ello discriminar rápidamente cepas virulentas de no virulentas, Furones y col. (1993) desarrollaron un medio de cultivo diferencial que contenía SDS y el colorante azul de Coomassie. En este medio, las colonias de las cepas HSF⁺ formaban un depósito cremoso alrededor de la colonia y aparecían de color blanco, mientras que las colonias de las cepas HSF⁻ no presentaban dicho depósito y absorbían el colorante tiñéndose de azul. La naturaleza del factor HSF es, hasta este momento, desconocida y dada su vinculación con la virulencia es interesante ahondar en su estudio.

I.8. LAS SULFATASAS

Los microorganismos utilizan una gama de sulfatasas con una amplia variedad de especificidades de sustrato para poder utilizar ésteres de sulfato como fuente de carbono y/o azufre. Además de su función característica consistente en hidrolizar los grupos sulfato de sustratos exógenos para proveer de azufre y carbono a la bacteria, algunos estudios han demostrado que pueden tener funciones de osmoprotección y también han sugerido su posible participación en procesos patogénicos (Hanson y col., 2004). Recientemente, se ha definido un grupo de sulfatasas que contienen un dominio de unión a zinc (THxHxDHxGG-102-E-18-AE-44-H) que las relaciona con las metalo-β-lactamasas, y que descomponen alquil sulfatos en sulfato inorgánico y el alcohol correspondiente (**Figura 3**). Hasta la fecha, en esta familia de enzimas, solo la sulfatasa SdsA1 de *Pseudomonas aeruginosa* (Hagelueken y col., 2006) ha sido estudiada

con detalle con respecto a su estructura y mecanismo catalítico. Esta enzima degrada el detergente SDS, como lo hace también la alquil sulfatasa SdsA de *Pseudomonas* sp. ATCC19151 (Davison y col., 1992), primer miembro descrito de este grupo de sulfatasas. Además de las especies de *Pseudomonas* mencionadas, se han encontrado otras muchas bacterias capaces de degradar el SDS y metabolizarlo como fuente de carbono (Chaturvedi y Kumar, 2010).

La biorremediación del SDS está empezando a recibir una mayor atención debido a que el uso de este detergente en la industria y en determinados productos domésticos se está incrementando de una forma alarmante, hasta tal punto que las plantas de tratamiento son incapaces de hacer frente a las cantidades presentes en las aguas residuales. Las consecuencias de su sobreuso y consiguiente contaminación de las vías fluviales constituyen un problema muy serio, especialmente para la salud del ser humano. Por lo tanto, el descubrimiento de bacterias capaces de degradar el detergente abre una nueva vía para el desarrollo de tecnología de biorremediación útil para hábitats contaminados. Aunque las enzimas y rutas metabólicas implicadas en la biodegradación ya se conocen, es necesario un estudio más detallado para la construcción de dicha tecnología.

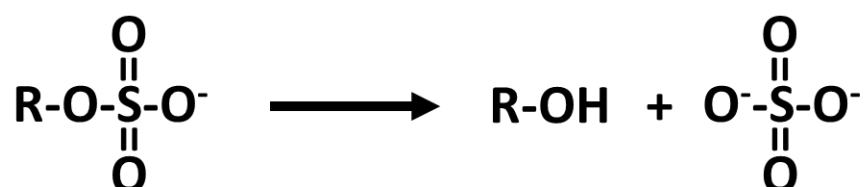


Figura 3. Reacción de conversión de un alquil sulfato en sulfato inorgánico y el alcohol correspondiente.

I.9. LA RESISTENCIA BACTERIANA AL SDS

El SDS es un detergente aniónico que solubiliza las membranas biológicas y desnaturaliza las proteínas (Helenius y Simons, 1975). De esta manera altera la estructura y

I. Introducción

función de la membrana celular y de las enzimas bacterianas y contribuye a la lisis celular (Glover y col., 1999). El nivel de sensibilidad a este detergente varía de unos grupos bacterianos a otros, incluso dentro de cepas de una misma especie. Ha sido descrito que algunas bacterias entéricas pueden crecer en una concentración de SDS del 10% (p/v). En cambio, el crecimiento de las bacterias Gram-positivas se ve completamente inhibido en una concentración de SDS del 0,1% (p/v) (Kramer y col., 1984). Los estudios que han indagado en los mecanismos que hacen que determinados grupos de bacterias sean más resistentes a este detergente, son más bien escasos. En la literatura sólo aparecen unos pocos trabajos en *P. aeruginosa* (Klebensberger y col., 2006), *E. coli* (Adamowicz y col., 1991; Nickerson y Aspedon, 1992; Aspedon y Nickerson, 1993; Rajagopal y col., 2002), *Enterococcus faecalis* (Flahaut y col., 1996) o *Enterobacter cloacae* (Kramer y col., 1980; Kramer y Nickerson., 1984; Nickerson y Aspedon, 1992; Aspedon y Nickerson, 1993).

Se han descrito varios mecanismos que pueden contribuir a la resistencia a los detergentes aniónicos como son las barreras de difusión (Nikaido y Vaara, 1985), las bombas de expulsión de múltiples drogas (Poole, 2004), las proteasas Clp (Rajagopal y col., 2002) o la formación de agregados celulares (Klebensberger y col., 2006). Con respecto a las barreras de difusión, parece ser que, en las bacterias entéricas, la membrana externa es la principal de ellas en relación con la permeabilidad frente a los detergentes (Nikaido y Vaara, 1985). Por otro lado, el mecanismo de resistencia al SDS descrito recientemente, la formación de agregados celulares constituidos por células embebidas en una matriz extracelular de ADN y polisacáridos ácidos (Klebensberger y col., 2006), abre una nueva vía hacia el conocimiento de los sistemas de resistencia que muchas bacterias presentan frente a los detergentes aniónicos.

En *Y. ruckeri*, Furones y col. (1993) observaron que la bacteria es capaz de crecer en un medio sólido con una concentración de SDS del 5% (p/ v). Este resultado supone un nivel de resistencia considerable de esta bacteria al detergente, sin embargo, a día de hoy, se desconoce el mecanismo que le permite a *Y. ruckeri* tolerar esta concentración.

I.10. OBJETIVOS

Como se ha expuesto en la introducción, *Y. ruckeri* es una bacteria poco estudiada, tanto en los aspectos de su biología como, en particular, en los mecanismos que le confieren

capacidad para producir enfermedad. Ello hace que la investigación relacionada con ambos sea de interés, por lo que, los objetivos planteados en este trabajo, fueron los siguientes:

- 1.** Identificación, caracterización y relación con la virulencia del gen *iviX*, identificado por la tecnología IVET, y de los genes adyacentes al operón *cdsAB*.
- 2.** Identificación, caracterización y relación con la virulencia del gen que codifica el factor HSF.
- 3.** Identificación de los genes responsables de la resistencia al SDS.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de *Y. ruckeri* y *Escherichia coli* así como los plásmidos que han sido utilizados en este estudio están recogidos en las **Tablas 1 y 2** y la **Tabla 3**, respectivamente. Las cepas de *E. coli* se cultivaron rutinariamente en el medio 2xTY. La composición del medio 2xTY por 1 l de agua destilada es: 5 g de NaCl (Merck), 10 g de extracto de levadura (Laboratorios Conda) y 16 g de triptona (Merck). Se añadió agar al 2% (p/v) para el cultivo en medio sólido. Las cepas de *Y. ruckeri* se cultivaron en el medio caldo nutritivo (CN) o agar nutritivo (AN) (con agar al 1,5% p/v) (Pronadisa). Para algunos experimentos se utilizaron los medios de cultivo caldo de triptona y soja (TSB) (Merck), agar de triptona y soja (TSA) (con agar al 1,5% p/v) y el medio mínimo descrito por Romalde y col. (1991) sin glucosa (M9). Al medio M9 en determinados experimentos se le añadió casaminoácidos en una concentración de 2 g/l (M9C), glucosa en una concentración de 5 g/l (M9G) o, ambos, en las concentraciones mencionadas (M9CG). Para los experimentos de motilidad, se utilizó el medio agar triptona semisólido (10 g/l de triptona, 5 g/l de NaCl, 0,6% de agar). En los casos requeridos se añadieron al medio de cultivo los siguientes antibióticos en las concentraciones indicadas: ampicilina (100 µg/ml), rifampicina (50 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), estreptomycin (50 µg/ml) o eritromicina (10 µg/ml). La temperatura de incubación fue de 37 °C para *E. coli* y de 18 °C o 28 °C para *Y. ruckeri*. Todos los cultivos realizados en medio líquido se incubaron con una agitación de 250 rpm. El control del crecimiento bacteriano se llevó a cabo mediante la valoración de la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) con un espectrofotómetro Hitachi U-2900, a diferentes tiempos de incubación.

II. Material y Métodos

Tabla 1. Cepas de *Y. ruckeri* utilizadas en este estudio. En negrita se indican las cepas parentales.

Cepa	Características	Fuente o referencia
<i>Y. ruckeri</i>		
150	Cepa aislada de brote	J.L. Larsen, Universidad de Frederiksberg (Dinamarca)
150yraS	yraS::pJP5603 Km ^r	Este estudio
150R	Rif ^r derivada de 150	Fernández y col., 2002
150RiviX	Cepa con fusión <i>ivi</i> inducida <i>in vivo</i>	Fernández y col., 2004
150RyctC	yctC::pJP5603 Km ^r	Este estudio
150yrpA	yrpA::pJP5603 Km ^r	Este estudio
150RyrpB	yrpB::pIVET8 Ap ^r	Este estudio
150R HSF ⁻ 2-4	Cepas mutantes con inserción de mini-Tn5	Este estudio
150RacrA	acrA::mini-Tn5 Km2 Km ^r	Este estudio
150RyraS (HSF ⁻ 1)	yraS::mini-Tn5 Km2 Km ^r	Este estudio
150R yraS ⁺	150RyraS con pGBM5::yraS	Este estudio
146, 147, 148, 149	Cepas aisladas de brote	J.L. Larsen, Universidad de Frederiksberg (Dinamarca)
955, 956, 43/19	Cepas aisladas de brote	C.E.C.T. (España)
956 yraS ⁺	956 con pGBM5::yraS	Este estudio
35/85, 13/86	Cepas aisladas de brote	C.J. Rodgers, Universidad de Tarragona
A100, A102	Cepas aisladas de brote	I. Márquez (España)
150/05,158/05,382/05	Cepas aisladas de brote	Proaqua Nutrición S.A.
137/76, 138/76, NCTC 10478, NCMB 1315, NCMB 1316, Yr.V187/09/115, Yr.V187/09/700, ATCC 29473	Cepas aisladas de brote	C.J. Rodgers, Fish Diseases Laboratory, Weymouth (Reino Unido)
RD38	Cepa aislada de brote	R.L. Davies, Universidad de Stirling (Escocia)
AL 3017	Cepa aislada de brote	M.D. Furones, IRTA (Tarragona)

Tabla 2. Cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio

Cepa	Características	Fuente o referencia
<i>E. coli</i>		
DH5αpir	F'/endA1 hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (NaI ^R) λ (pir)	Woodcock y col., 1989
S17-1λpir	λ (pir) hsdR pro thi, RP4-2 Tc::Mu Km::Tn7	Simon y col., 1983
MT1694	Contiene pRK2013	Figurski y Helinski, 1979

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Características	Fuente o referencia
pIVET8	Ap ^r , oriR6K, mob ⁺ , genes lacZY sin promotor	Mahan y col., 1995
pJP5603	Km ^r , vector de clonación	Penfold y col., 1992
pGBM5	Sp ^c /Sm ^r , promotor lac	Manen y col., 1997
pUC19	Ap ^r , vector de clonación	Pharmacia
pUT mini-Tn5 Km2	Ap ^r , oriR6K, mobRP4, tnp, mini-Tn Km2 (Km ^r)	De Lorenzo y col., 1990

II.2. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL ADN

Las técnicas rutinarias de manipulación de ADN se llevaron a cabo según los protocolos descritos por Sambrook y Russell (2001). La extracción del ADN plasmídico se realizó según el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Para la extracción de ADN cromosómico de *Y. ruckeri* se utilizó el Kit comercial "GenElute Bacterial Genomic DNA" (Sigma Aldrich Co.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los enzimas ADN ligasa del fago T4 y fosfatasa alcalina de intestino de ternero, se adquirieron en Roche Ltd., los enzimas de restricción en Takara Shuzo Co., Ltd., los oligonucleótidos en Sigma Aldrich Co. y los reactivos de PCR en Biotools B&M Labs., S.A.

Para la hibridación mediante Southern blot (Sambrook y Russell, 2001), las muestras de ADN se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,75% (p/v) y, posteriormente, se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon "Amersham Hybond-N" (GE Healthcare Limited). A continuación, el ADN fue fijado a la membrana mediante una exposición de tres

II. Material y Métodos

minutos a la luz ultravioleta en un transiluminador Gel Doc XT System (Bio-Rad Laboratories). La membrana así tratada, fue utilizada para la hibridación con una sonda de ADN previamente amplificada mediante PCR en un termociclador Perkin-Elmer 9700 GeneAmp, utilizando desoxinucleósidos trifosfato marcados con digoxigenina, de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante del kit “PCR DIG labelling mix” (Roche Diagnostics S.L.). Como conjugado se utilizó el anticuerpo antidigoxigenina unido al enzima fosfatasa alcalina (“Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments” de Roche Diagnostics S.L.). El revelado se llevó a cabo añadiendo el sustrato luminiscente “CDP-Star” de Roche Diagnostics y la señal se detectó después de la exposición y revelado de películas “Hyperfilm MP” (GE Healthcare Limited).

La secuenciación del ADN se realizó en un secuenciador de ADN automático ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems) perteneciente al Servicio de Secuenciación de Secugen (<http://www.secugen.es>), siguiendo el método de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos, con un kit de secuenciación “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems) y oligonucleótidos sintéticos (Sigma Aldrich Co.).

II.3. SELECCIÓN, SECUENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS

II.3.1. Selección del gen *ivlX*

La aplicación de la tecnología IVET en *Y. ruckeri* permitió identificar 14 genes inducidos específicamente durante el proceso infeccioso (genes *ivi*) en trucha arcoíris (Fernández y col., 2004). Entre ellos, está el gen *ivlX*, objeto de estudio del presente trabajo.

II.3.2. Construcción de una genoteca de mutantes de *Y. ruckeri* 150R con el transposón mini-Tn5 Km2

Para la construcción de una genoteca de mutantes de *Y. ruckeri* 150R con el transposón mini-Tn5 Km2, se utilizó el plásmido pUT mini-Tn5 Km2 (**Figura 4**) (de Lorenzo y col., 1990). El vector utilizado, que contiene el transposón mini-Tn5 Km2, es replicativo en la cepa S17-1 λ pir, pero se comporta como suicida en *Y. ruckeri* 150R. Células competentes de *E. coli* S17-1 λ pir obtenidas por el método de Dower y col. (1988) fueron transformadas con dicho vector mediante electroporación, utilizando el equipo Gene PulserTM de Bio-Rad con las siguientes condiciones: 2,5 KV, 25 μ F y 200 Ω . Después del pulso, las células se incubaron durante una

hora en el medio 2xTY a 37 °C y 250 rpm. A continuación, se sembraron en placas que contenían el medio 2xTY con ampicilina y estas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Entre los transformantes, se seleccionó uno que era portador del plásmido y se utilizó para transferirlo mediante conjugación en filtro a *Y. ruckeri* 150R. Para ello, se tomaron 500 µl de un cultivo en fase exponencial de la cepa donadora (*E. coli* S17-1 λ pir portadora del plásmido pUT mini-Tn5 Km2) y 4 ml de la cepa receptora (*Y. ruckeri* 150R) en la misma fase de crecimiento. Las células de ambas especies se lavaron por centrifugación con agua MiliQ y se mezclaron en 10 ml de agua MiliQ. La suspensión obtenida se pasó a través de un filtro de membrana de 47 mm con un tamaño de poro de 0,45 µm (Pall Life Sciences). Este filtro se colocó sobre una placa del medio AN y se incubó a 28 °C durante 4 horas. Seguidamente, las células se resuspendieron mediante agitación en 2 ml del medio CN. Posteriormente, la suspensión bacteriana se sembró en placas de medio AN que contenía kanamicina y rifampicina y se incubaron a 28 °C durante 48 horas para la selección de los transconjugantes.

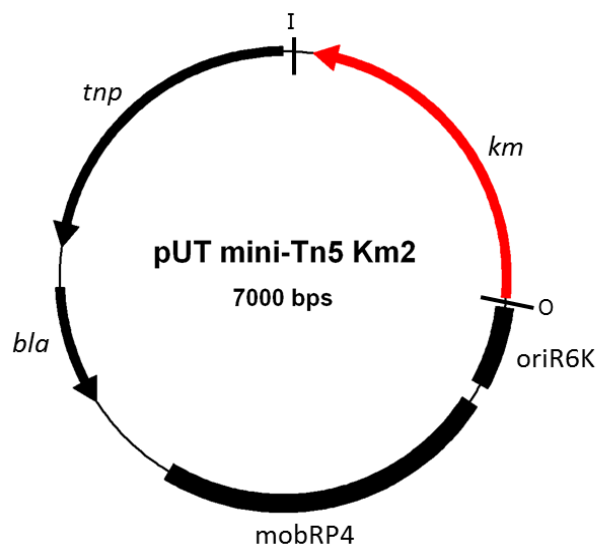


Figura 4. Esquema del plásmido pUT mini-Tn5 Km2. *km*: gen de resistencia a kanamicina; *tnp*: gen que codifica la transposasa; *bla*: gen de resistencia a ampicilina; *mobRP4*: origen de transferencia del plásmido; *oriR6K*: origen de replicación del plásmido; I y O: extremos del transposón.

II.3.3. Selección de mutantes

II.3.3.1. Selección de mutantes con fenotipo HSF⁻ en medios con dodecil sulfato de sodio (SDS)

Los transconjugantes obtenidos en las placas con el medio AN con kanamicina y rifampicina, según fue descrito en el **apartado II.3.2**, se transfirieron con palillos estériles a placas con el medio TSA al que se había añadido SDS al 1% (p/v) y el colorante azul de Coomassie al 0,01% (p/v). Tras la incubación de las placas, durante cinco días a 28 °C, aquellas colonias que mostraron el fenotipo HSF⁻ fueron seleccionadas para su posterior análisis.

Con el fin de constatar en los mutantes seleccionados, que la inserción del transposón mini-Tn5 Km2 en el genoma de la bacteria se había producido en un único lugar y que, además, no conllevaba la integración simultánea del plásmido portador, se extrajo el ADN genómico de estos mutantes y se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XbaI* para su posterior análisis por Southern blot según lo descrito en el **apartado II.2**. Como sondas para la hibridación se utilizaron fragmentos de ADN internos de los genes *km*, gen de resistencia a kanamicina contenido en el transposón mini-Tn5 Km2 y, *tnp*, gen que codifica la transposasa perteneciente al plásmido pUT.

II.3.3.2. Selección de mutantes incapaces de crecer en presencia de SDS

Los transconjugantes de una genoteca construida según el método descrito en el **apartado II.3.2** se transfirieron, en paralelo, a placas con el medio TSA y TSA con SDS (0,5% p/v). Tras la incubación, durante 48 horas a 28 °C, se identificó una colonia que solo crecía en el medio TSA. Este mutante fue utilizado para análisis posteriores. En él se comprobó, siguiendo el procedimiento descrito en el **apartado II.3.3.1**, que la inserción del transposón había ocurrido en un único punto del genoma.

II.3.4. Secuenciación e identificación de los genes de interés

II.3.4.1. Secuenciación de los genes *yctCBA*

La recuperación del ADN plasmídico integrado en el cromosoma del clon *ivlX*, y que contenía el ADN de interés, se llevó a cabo mediante conjugación triparental (Rainey y col., 1997), con *E. coli* MT1694 como cepa cooperadora de la conjugación y *E. coli* S17-1 λ pir como

cepa receptora. Para la secuenciación del ADN situado en posición 5' respecto a los genes *cat* y *lacZY* del plásmido pIVET8 se utilizó el oligonucleótido catseq2 (5'-CGGTGGTATATCCAGTG-3') correspondiente a los nucleótidos 31 a 15 del gen *cat* (**Figura 5**). Con el fin de completar la secuencia de nucleótidos del marco abierto de lectura contenido en el clon *iviX* y analizar la región adyacente a la misma, se extrajo el ADN genómico de la cepa *Y. ruckeri* 150R*iviX* y se digirió totalmente con la enzima *SphI* (**Figura 5**). Los fragmentos de ADN obtenidos en dicha digestión se sometieron a la acción de la enzima T4 ADN ligasa. La mezcla de ligación se utilizó para transformar la cepa *E. coli* S17-1 λ *pir* mediante electroporación como fue descrito anteriormente. La selección de los transformantes portadores del vector pIVET8 que contenían el fragmento de interés, se hizo en el medio 2xTY con ampicilina. De ellos, se extrajo el ADN plasmídico y se secuenció el fragmento clonado utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia inicial. Conforme se fue conociendo la secuencia del ADN obtenido, se diseñaron nuevos oligonucleótidos para continuar la secuenciación. El fragmento de ADN así secuenciado, no contenía la secuencia completa de los genes *yctCBA*, por lo que el ADN genómico de la cepa *Y. ruckeri* 150R*iviX* fue digerido con la enzima *SalI* (**Figura 5**). Los fragmentos de restricción fueron religados e introducidos en *E. coli* S17-1 λ *pir* por electroporación y los clones de interés se seleccionaron en el medio 2xTY en presencia de ampicilina. De estos clones se obtuvo el correspondiente plásmido con el que se continuó la secuenciación de los genes *yctCBA* diseñando nuevos oligonucleótidos conforme se iba definiendo la secuencia. Como ocurrió con el fragmento obtenido mediante digestión con la enzima *SphI*, el fragmento de ADN obtenido con la enzima de restricción *SalI* tampoco permitió completar la secuencia del gen *yctA*. Para finalizarla se utilizó la técnica de PCR. Con este fin, se extrajo ADN genómico de la cepa *Y. ruckeri* 150R y se utilizó como ADN molde en una reacción de PCR. Para ello se empleó el kit "Long Amplification" (Biotools B&M Labs., S.A.) y como iniciadores dos oligonucleótidos específicos, diseñado uno a partir de la secuencia parcial conocida del gen *yctA* (5'-GCCTATCGGTGGAATCA-3') y el otro de la secuencia del genoma (NZ_ACCC00000000.1) correspondiente a los nucleótidos 471-487 (5'-ATTCATTATCAACCTGC-3') del gen adyacente (GI:238754267) al gen *yctA* homólogo de la cepa *Y. ruckeri* ATCC 29473. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, seguido de 25 ciclos de amplificación consistentes en un paso inicial de desnaturalización de 30 segundos a 94 °C, uno de anillamiento de 30 segundos a 44 °C y uno de elongación de 90 segundos a 72 °C, y un ciclo de elongación final

II. Material y Métodos

durante 7 minutos a 72 °C. La secuenciación del producto amplificado así como de los fragmentos de ADN obtenidos mediante digestión enzimática del ADN cromosómico de la cepa *Y. ruckeri* 150R*ivlX*, se llevó a cabo siguiendo el método mencionado en el **apartado II.2**.

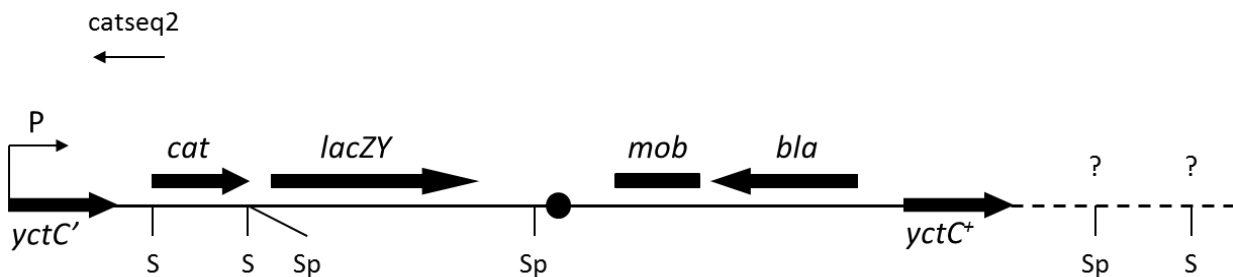


Figura 5. Esquema de la organización de la región del genoma que contiene el plásmido pIVET8 en el clon *ivlX* de *Y. ruckeri* 150R. *yctC'*: copia incompleta del gen *yctC*, *yctC+*: copia completa del gen *yctC*; *cat*: cloranfenicol acetil transferasa; *lacZY*: genes del operón de la lactosa; *mob*: región necesaria para la conjugación; *bla*: β-lactamasa. Sp: diana *SphI*; S: diana *SalI*. catseq2: oligonucleótido utilizado para la obtención de la secuencia del ADN situado en posición 5' respecto a los genes *cat* y *lacZY*. P: promotor hipotético seleccionado por IVET.

II.3.4.2. Secuenciación de los genes *yrpAB*

Para obtener la secuencia completa de los genes *yrpAB* se extrajo el ADN genómico de la cepa mutante *Y. ruckeri* 150R*cdsB* que contiene el gen *cdsB* interrumpido por el plásmido pJP5603 (Méndez y col., 2011). Dicho ADN fue digerido con la enzima de restricción *KpnI* (**Figura 6**). Los fragmentos obtenidos en esta digestión se sometieron a la acción de la enzima T4 ADN ligasa. La mezcla de ligación se utilizó para transformar la cepa *E. coli* S17-1λ*pir* mediante electroporación. Los clones de interés portadores del plásmido pJP5603 se seleccionaron en el medio 2xTY con kanamicina y de ellos, se extrajo el ADN plasmídico y se secuenció siguiendo el método descrito en el **apartado II.2**.

A partir de la secuencia de ADN obtenida se diseñaron nuevos oligonucleótidos que permitieron continuar la secuenciación del fragmento de interés. El fragmento de ADN obtenido con la enzima *KpnI*, no contenía la secuencia completa de los genes *yrpAB*. Por esta razón, el ADN genómico de la cepa *Y. ruckeri* 150R*cdsB* fue digerido con la enzima de restricción *SacI* (**Figura 6**). Los fragmentos resultantes de esta digestión fueron religados e introducidos en

E. coli S17-1 λ pir por electroporación y los clones de interés portadores del plásmido con la inserción se seleccionaron en presencia de kanamicina. Se obtuvo así el plásmido pJP5603 con el ADN clonado y utilizando oligonucleótidos que se fueron diseñando conforme se iba definiendo la secuencia, se completó esta.

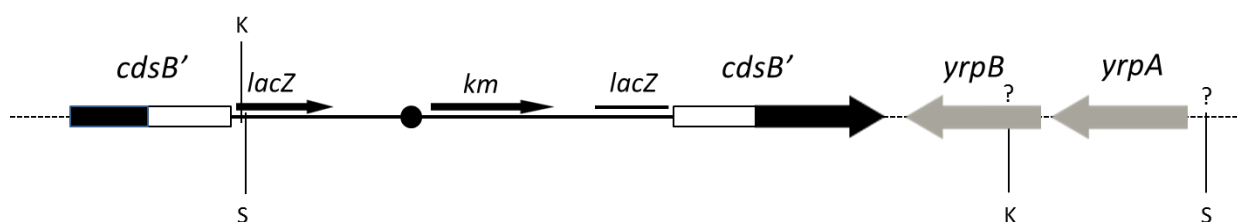


Figura 6. Esquema de la organización de la región del genoma que contiene el plásmido pJP5603 en la cepa mutante *Y. ruckeri* 150R*cdsB*. *cdsB'*: copia incompleta del gen *cdsB*. *km*: gen de resistencia a kanamicina; *lacZ*: gen del operón de la lactosa. K: diana *KpnI*, S: diana *SacI*.

II.3.4.3. Secuenciación del gen *yraS*

Para la recuperación y posterior secuenciación del ADN correspondiente al gen en el que se había integrado el transposón mini-Tn5 Km2, se extrajo el ADN genómico del mutante HSF 1. La secuenciación del ADN situado en posición 5' respecto al gen *km* del transposón mini-Tn5, se realizó previa digestión del ADN genómico con la enzima *EcoRI*, mientras que para la secuenciación del ADN situado en posición 3' se utilizó la enzima *PstI* (**Figura 7**). Los fragmentos resultantes de dichas digestiones se ligaron con el plásmido pUC19, digerido previamente con la enzima correspondiente y desfosforilado. Las mezclas de ligación resultantes se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* S17-1 λ pir mediante electroporación. Una vez seleccionados los transformantes en placas con el medio 2xTY con ampicilina y kanamicina, se extrajo su ADN plasmídico y se secuenció con oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia conocida del transposón (**Figura 7**). Conforme se avanzó en la secuenciación se fueron diseñando sucesivos oligonucleótidos que permitieron definir el resto de la secuencia del gen *yraS*.

II. Material y Métodos

II.3.4.4. Secuenciación del operón *acrAB* y del gen *acrR*

Para la recuperación del ADN correspondiente al gen en el que se había integrado el transposón mini-Tn5 Km2 y su posterior secuenciación se extrajo primeramente el ADN genómico del mutante 150*RacrA*. Para la secuenciación del ADN situado en posición 5' respecto al gen *km* del transposón mini-Tn5, se digirió el ADN genómico con la enzima *KpnI*, mientras que para la secuenciación del ADN situado en posición 3' se digirió con la enzima *XbaI* (**Figura 7**). Los fragmentos resultantes de dichas digestiones se sometieron a ligación con el plásmido pUC19, digerido previamente con las mismas enzimas y desfosforilado. Las mezclas de ligación obtenidas se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* S17-1 λ *pir* mediante electroporación. Una vez seleccionados los transformantes en placas con el medio 2xTY con ampicilina y kanamicina, se extrajo su ADN plasmídico y se secuenció primeramente con oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia conocida del transposón (**Figura 7**). Con base en las secuencias parciales iniciales se fueron diseñando sucesivos oligonucleótidos que permitieron definir el resto de la secuencia del gen *acrA* y las secuencias de los genes *acrB* y *acrR*.

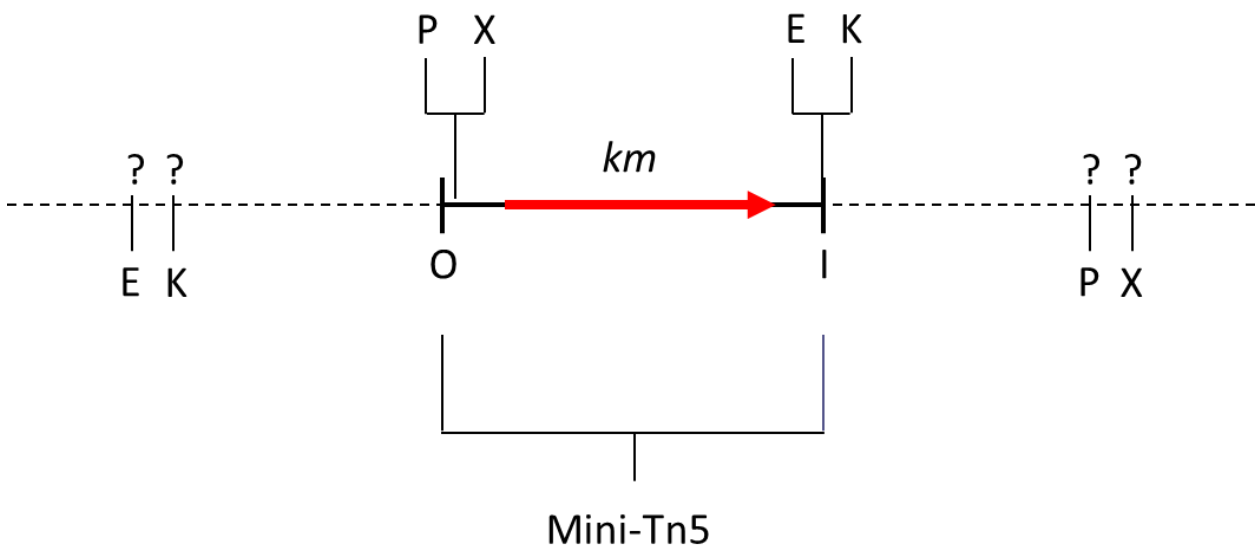


Figura 7. Esquema general de la organización en el genoma del transposón mini-Tn5 Km2 en los mutantes para los genes *yraS* y *acrA*. En trazo continuo se representa el transposón delimitado por sus extremos I y O; En línea discontinua se indica el ADN genómico. *km*: gen de resistencia a kanamicina. E: diana *EcoRI*; K: diana *KpnI*; P: diana *PstI*; X: diana *XbaI*.

II.3.4.5. Análisis *in silico* de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

El análisis de las secuencias de ADN, así como la identificación de los dominios conservados en los productos resultantes de su traducción, se realizó con los programas informáticos Blastx y Blastp del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). La traducción de las secuencias nucleotídicas y la localización de dianas de restricción en las mismas se llevó a cabo con los programas del paquete informático Molecular Toolkit (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit>). El análisis de los productos proteicos se realizó mediante programas específicos del servidor Expasy (Expert Protein Analysis System; <http://us.expasy.org/tools>), como los programas SignalP y PSORTb, que permitieron predecir la existencia de péptidos señal y la posible localización celular de las proteínas estudiadas, respectivamente. La predicción de la topología de las proteínas de membrana se llevó a cabo utilizando el programa TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>). El alineamiento de las secuencias de las proteínas se realizó con el programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>, Edgar, 2004), usando los parámetros estándar. Este alineamiento fue examinado manualmente para corregir residuos situados incorrectamente y se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con el programa MEGA (<http://www.megasoftware.net/>, Tamura y col., 2011), usando el modelo WAG+G (Whelan y Goldman, 2001) como el método de sustitución de aminoácidos y cuatro categorías gamma. Se realizó un análisis bootstrap de 500 réplicas. La topología se comprobó y se editó utilizando iTOL (<http://itol.embl.de/>, Letunic y Bork, 2007 y 2011) y las correcciones gráficas se realizaron con el software Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems, EUA).

II.4. OBTENCIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES Y COMPLEMENTADAS

II.4.1. Obtención de las cepas mutantes *Y. ruckeri* 150*RyctC*, 150*yrpA*, 150*RyrpB* y 150*yraS* mediante mutagénesis insercional

Con el fin de estudiar la función de los genes de interés, así como su implicación en la virulencia de la bacteria, se obtuvieron cepas mutantes isogénicas para cada uno de ellos. Los genes seleccionados fueron los siguientes: *yctC*, que codifica una proteína transportadora de ácidos tricarbóxicos; *yrpA* e *yrpB*, que codifican potenciales proteasas; e *yraS*, que codifica una alquil sulfatasa.

II. Material y Métodos

Inicialmente, se amplificaron fragmentos internos de cada uno de los genes mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos y las condiciones que aparecen en la **Tabla 4**. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 9700 GeneAmp y consistieron en un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C; seguido de 25 ciclos de amplificación cada uno con una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 30 segundos, otra de anillamiento de 30 segundos a temperatura variable (T^a), dependiendo de los oligonucleótidos utilizados, para finalizar con una de elongación a 72 °C durante 1 minuto; y un ciclo de elongación final a 72 °C durante 7 minutos.

Tabla 4. Oligonucleótidos y condiciones de PCR utilizados para la amplificación de fragmentos internos de los diferentes loci.

Gen	Oligonucleótidos (5'-3')	Posición en gen	T^a	Tamaño producto amplificado
<i>yctC</i>	iviX-E: ATGAGAATTCCGGTTCGCTACTTAATC	nt 288-304	48°C	457 pb
	iviX-S: AGGAGTCGACGAAACCCTGTTCTTTGG	nt 744-728		
<i>yrpA</i>	yrpA-E: CTGAGAATTCGATGCTCTGATTCTGGC	nt 268-284	50°C	446 pb
	yrpA-S: TGTAGTCGACACCAGATAGCGGCCTTT	nt 713-697		
<i>yrpB</i>	yrpB-a: AGGAGGATCCGAATTCTTGTGGAAGC	nt 265-281	44°C	402 pb
	yrpB-b: ATGCGGATCCGGTCTGAATACCATTAA	nt 666-650		
<i>yraS</i>	yraS-S: ATGCGTCGACAATGTTTTTCCGGCAA	nt 688-704	52°C	668 pb
	yraS-E: ATGCGAATTCAGTGTCGCTGGATTACC	nt 1355-1339		

En las secuencias de los oligonucleótidos aparecen subrayadas las dianas de restricción. nt: posición nucleotídica dentro de la secuencia del gen. T^a : Temperatura de anillamiento.

Los oligonucleótidos utilizados, todos ellos con 4 nucleótidos adicionales en su extremo 5', fueron diseñados con una diana *EcoRI* (*yctC*-E, *yrpA*-E, e *yraS*-E), *Sall* (*yctC*-S, *yrpA*-S e *yraS*-S) o *BamHI* (*yrpB*-a e *yrpB*-b) para permitir la clonación de los productos amplificados en los vectores pJP5603 (**Tabla 3**) y pIVET8 (**Tabla 3**). Los productos amplificados fueron digeridos con las correspondientes enzimas y ligados con los plásmidos pIVET8 (en el caso del fragmento

interno del gen *yrbB*) o pJP5603 (para los fragmentos de los genes *yctC*, *yrbA* e *yraS*), previamente digeridos con los enzimas *Bgl*II (pIVET8) o *Eco*RI y *Sal*I (pJP5603). El plásmido pIVET8 tras su digestión y previo paso a la ligación, fue desfosforilado. Las mezclas de ligación resultantes, se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* S17-1 λ *pir* mediante electroporación. Una vez seleccionados los transformantes en placas con el medio 2xTY con kanamicina para el caso de los portadores del plásmido pJP5603, o ampicilina para los que contenían el pIVET8, se extrajo su ADN plasmídico y mediante digestión con las enzimas *Pst*I y *Bam*HI de los plásmidos pJP5603 y pIVET8, respectivamente, se identificaron aquellos clones portadores de los plásmidos con los fragmentos de interés. Posteriormente, los plásmidos con el fragmento interno de los genes *yctC* e *yrbB* fueron transferidos a la cepa *Y. ruckeri* 150R y los plásmidos con el fragmento interno de los genes *yrbA* e *yraS* a la cepa *Y. ruckeri* 150 mediante conjugación en filtro, siguiendo el protocolo descrito en el **apartado II.3.1**. Finalmente, los transconjugantes fueron seleccionados en AN en la presencia de eritromicina (150) o rifampicina (150R) y kanamicina (pJP5603) o ampicilina (pIVET8).

La confirmación de la interrupción de los genes *yctC*, *yrbA*, *yrbB* e *yraS* de *Y. ruckeri* se obtuvo mediante análisis por Southern blot según lo descrito en el **apartado II.2**. Para ello, se extrajo el ADN genómico de las cepas mutantes y parental y se digirió con distintos enzimas de restricción. El ADN digerido se separó en un gel de agarosa al 0,75% (p/v). Como sondas para la hibridación se utilizaron los productos de amplificación marcados con digoxigenina y generados mediante PCR (**Tabla 4**), correspondientes a los fragmentos de ADN internos de los respectivos genes.

II.4.2. Obtención de las cepas complementadas *Y. ruckeri* 150R *yraS*⁺ y *Y. ruckeri* 956 *yraS*⁺

La complementación de las cepas *Y. ruckeri* 150R *yraS* y *Y. ruckeri* 956 se llevó a cabo mediante la clonación en el vector pGBM5 (**Tabla 3**) de un fragmento *Sal*I-*Eco*RI de 2,3 kb que contenía tanto la región estructural como la región reguladora del gen *yraS* y la posterior transformación por electroporación con el plásmido resultante de células competentes de dichas cepas. Para ello, se amplificó mediante PCR el gen *yraS* utilizando los oligonucleótidos *yraS*-S (5'-CCTGGTCGACGGTTGGTATTGTCTGGT-3'), correspondiente a los nucleótidos 89 a 73 antes del codón de inicio, e *yraS*-E (5'-GGCGGAATTCAGTCAGTGAGATAACGA-3'), relativo a los nucleótidos 76 a 60 después del codón de parada del gen. El primer oligonucleótido contenía

II. Material y Métodos

una diana *Sall* y el segundo una diana *EcoRI* (ambas subrayadas). Los dos iniciadores se diseñaron con cuatro bases adicionales en su extremo 5'. El fragmento amplificado fue digerido con ambas enzimas y ligado con el vector pGBM5, previamente digerido con las mismas enzimas. La mezcla de ligación resultante fue introducida mediante electroporación en la cepa *E. coli* DH5 α *pir* y los transformantes fueron seleccionados en placas de 2xTY con estreptomicina. Entre los clones obtenidos se seleccionó uno que fuera portador de la construcción de interés. A partir de éste, se extrajo el ADN plasmídico y se introdujo mediante electroporación en células competentes de las cepas *Y. ruckeri* 150Ryrs y *Y. ruckeri* 956. La selección de los transformantes se efectuó en placas con el medio AN con estreptomicina. La actividad SDS hidrolasa se detectó en placas con el medio TSA al que se había añadido SDS al 1% (p/v) y el colorante azul de Coomassie al 0,01% (p/v).

II.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES Y COMPLEMENTADAS

II.5.1. Caracterización de la cepa mutante *Y. ruckeri* 150RyctC

II.5.1.1. Efecto del citrato sobre el crecimiento de la bacteria

Con el fin de conocer la importancia del transporte de ácidos tricarbóxicos en la fisiología de *Y. ruckeri*, se hizo un seguimiento del crecimiento de la cepa mutante *Y. ruckeri* 150RyctC en relación al de la cepa parental, en condiciones de presencia y ausencia de citrato. Para ello, matraces de 250 ml que contenían 20 ml de los medios de cultivo M9C, M9CG y M9C con 25mM de citrato trisódico, se inocularon con 0,2 ml de un cultivo en la fase estacionaria de crecimiento de las cepas parental y mutante y, seguidamente, se incubaron a 18 °C y 250 rpm. A diferentes tiempos de incubación se tomaron muestras de 1 ml y se valoró el crecimiento midiendo la DO₆₀₀.

II.5.1.2. Determinación de la utilización de citrato como única fuente de carbono

Se valoró la capacidad de utilización de citrato como única fuente de carbono de las cepas mutante y parental en placas de medio agar citrato de Simmons (Oxoid) y mediante la prueba bioquímica correspondiente en una tira API 10S. En el centro de las placas con agar citrato de Simmons se depositaron 8 μ l de un cultivo en la fase estacionaria de crecimiento de cada cepa y, posteriormente, se incubaron a 18 °C durante 48 horas. Las tiras API 10S se

inocularon de acuerdo con el protocolo descrito, a tal fin, por el comerciante, y a continuación se incubaron a 18 °C durante 24 horas.

II.5.2. Caracterización de las cepas mutantes *Y. ruckeri* 150yrpA y 150RyrpB

II.5.2.1. Crecimiento en el medio M9CG y en el medio CN

En el caso de las cepas mutantes *Y. ruckeri* 150yrpA y 150RyrpB, se hizo un seguimiento de su crecimiento en relación a la cepa parental en el medio M9CG y en el medio CN. Para ello, matraces de 250 ml con 20 ml de estos medios de cultivo se inocularon con 0,2 ml de un cultivo en la fase estacionaria temprana de crecimiento de las cepas mencionadas y, seguidamente, se incubaron a 18 °C y 250 rpm. A diferentes tiempos de incubación, se tomaron muestras de 1 ml y se valoró el crecimiento midiendo la DO₆₀₀.

II.5.2.2. Determinación de la actividad proteolítica con azocoll

Cultivos en la fase estacionaria temprana de crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150, 150yrpA y 150RyrpB fueron utilizados para inocular (1:100) matraces de 250 ml con 20 ml del medio CN o del medio M9CG con peptona (5% p/v). Los matraces que contenían el medio M9CG con peptona se incubaron en estático en condiciones de microaerobiosis (5-7% O₂) utilizando el sistema anaerocult C (Merck). Las temperaturas de incubación fueron 18 °C y 28 °C. Tras 24 horas de incubación, los cultivos se centrifugaron durante 15 minutos a 4 °C y 7.000 rpm, y se tomó el sobrenadante para, posteriormente, pasarlo a través de filtros de jeringa con tamaño de poro de 0,2 µm (Pall Life Sciences). Para la obtención de los extractos celulares, se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo de cada cepa y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm. Las células se lavaron por centrifugación y se resuspendieron en PBS 0,01 M (pH 7,4) y, a continuación, se rompieron mediante ultrasonidos aplicando pulsos de diez segundos con intervalos de un minuto, todo ello en un baño de hielo. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se recuperaron los sobrenadantes libres de restos celulares. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo añadiendo 100 µl de las muestras de sobrenadante del cultivo o del sobrenadante libre de restos celulares a 400 µl del sustrato azocoll (Sigma) en una concentración de 1,5 mg/ml, previamente lavado con PBS 0,01 M (pH 7,4) y resuspendido en el mismo tampón con CaCl₂ (5

II. Material y Métodos

mM). La mezcla de reacción se incubó con agitación moderada durante dos horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 10 minutos a 10.200 rpm, y se transfirieron 200 μ l del sobrenadante a un pocillo de una placa microtiter. La actividad proteolítica se cuantificó midiendo la DO_{520} en un lector de placas microtiter (PowerWave™ XS, BioTek). Con cada grupo de muestras se utilizaron como blanco por un lado, 100 μ l de medio de cultivo para los ensayos con el sobrenadante y, el mismo volumen de tampón, para los ensayos con extracto libre de restos celulares. Se definió la unidad de actividad enzimática como la cantidad de proteína que incrementaba la DO_{520} en 0,01 bajo las condiciones ensayadas durante dos horas. Cada ensayo se realizó tres veces de forma independiente. El protocolo descrito se llevó a cabo también con modificaciones relativas al volumen del filtrado utilizado, al volumen y la concentración del sustrato y a la temperatura y el tiempo de incubación de la reacción.

II.5.2.3. Determinación de la actividad proteolítica con azocaseína

Para los ensayos de actividad proteolítica con el sustrato azocaseína (Sigma), se utilizaron muestras de sobrenadante y extracto libre de restos celulares obtenidas del mismo modo que el descrito en el **apartado II.5.2.2**, empleando para los extractos celulares en lugar del tampón PBS el tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7,4). Así, 250 μ l de estas muestras se añadieron a 350 μ l de una solución de azocaseína (1% p/v en tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,4) y la mezcla de reacción se incubó durante dos horas a 28 °C. Transcurrido este tiempo, la reacción se paró con 600 μ l de ácido tricloroacético (10 % p/v) y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Finalmente, se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C y 12.000 rpm, se neutralizaron 800 μ l del sobrenadante con 200 μ l de NaOH 1,8 N y se cuantificó la actividad proteolítica midiendo la DO_{420} con un espectrofotómetro Hitachi U-2900. Con cada grupo de muestras se utilizó como blanco 250 μ l de medio de cultivo para los ensayos con sobrenadante y 250 μ l del tampón para los ensayos con extracto libre de restos celulares. Se definió la unidad de actividad enzimática como la cantidad de proteína que incrementaba la DO_{420} en 0,01 a 28 °C durante dos horas. Cada ensayo se realizó tres veces de forma independiente.

II.5.2.4. Determinación de la actividad proteolítica mediante SDS-PAGE (zimogramas)

Cultivos en la fase estacionaria temprana de crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150, 150yrpA y 150RyrpB fueron utilizados para inocular (1:100) matraces de 250 ml con 20 ml del medio M9CG con peptona (5% p/v). Los matraces se incubaron en estático a 28 °C en condiciones de microaerobiosis (5-7% O₂) utilizando el sistema anaerocult C (Merck). Tras 24 horas de incubación, los cultivos se centrifugaron durante 15 minutos a 4 °C y 7000 rpm, y se tomó el sobrenadante para posteriormente filtrarlo utilizando filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0,2 µm (Pall Life Sciences). 15 ml del sobrenadante libre de células se concentraron mediante tubos de ultrafiltración Amicon Ultra-15 (membrana con tamaño de exclusión de 10 kDa) (Millipore) en 0,5 ml del tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7,4). Alícuotas del concentrado así obtenido de las diferentes cepas fueron sometidas, por el método de Laemmli (1970), a SDS-PAGE en geles de 12% de acrilamida copolimerizados con caseinato de sodio (1% p/v) o gelatina (1% v/v). Las muestras no se desnaturalizaron por calor antes de ser sometidas a la electroforesis y esta se realizó en una cámara fría a 4 °C y 15 mA. Tras la electroforesis, los geles se lavaron dos veces y durante dos horas con Triton X-100 (2,5% v/v) a 4 °C. Después de los lavados los geles se incubaron a 28 °C durante 18 horas en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) con 5 mM de CaCl₂. Finalmente, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (0,1% p/v) y se destiñeron con la misma solución sin el colorante para revelar las zonas de hidrólisis del sustrato.

II.5.2.5. Determinación de la actividad proteolítica sobre diferentes componentes de la matriz extracelular

Para analizar la hidrólisis de proteínas de la matriz extracelular por los sobrenadantes de cultivo de las cepas *Y. ruckeri* 150, 150yrpA y 150RyrpB, obtenidos como se ha descrito en el **apartado II.5.2.4**. Se ensayaron los siguientes sustratos y concentraciones: colágeno tipo I (Becton Dickinson) a 200 µg/ml, colágeno tipo IV (Sigma) a 45 µg/ml, laminina (Sigma) a 120 µg/ml, vitronectina (Sigma) a 100 µg/ml y fibronectina (Sigma) a 120 µg/ml. Las reacciones se realizaron a 28 °C durante 18 horas, en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) con 5 mM de CaCl₂. Transcurrido este tiempo, se les añadió tampón de muestra (1:5) (Laemmli, 1970), y se desnaturalizaron por tratamiento a 100 °C durante 10 minutos. A continuación, las muestras se

II. Material y Métodos

sometieron a SDS-PAGE en un gel con un 10% (p/v) de acrilamida, y tras la electroforesis el gel se tiñó mediante tinción de plata (Gromova y Celis, 2006) o azul de Coomassie (0,1% p/v).

II.5.3. Caracterización de la cepa mutante *Y. ruckeri* 150R_{yaS} y de las cepas complementadas *Y. ruckeri* 150R *yaS*⁺ y *Y. ruckeri* 956 *yaS*⁺

II.5.3.1. Determinación del fenotipo HSF⁺/HSF⁻ en medio sólido con SDS

La determinación del fenotipo HSF⁺/HSF⁻ en las diferentes cepas de *Y. ruckeri* se realizó en placas con el medio TSA con SDS (1% p/v) que se incubaron a 28 °C durante cinco a siete días. Cuando se utilizó algún colorante para definir mejor el fenotipo, éste se añadió al medio de acuerdo a lo descrito por Furones y col. (1993). Así, el colorante azul de Coomassie se utilizó en una concentración final de 0,01% (p/v). El colorante rojo de rutenio se utilizó al 0,008% (p/v).

II.5.3.2. Análisis de la actividad SDS hidrolasa mediante SDS-PAGE

Para analizar la actividad SDS hidrolasa de las distintas cepas de *Y. ruckeri* en SDS-PAGE, estas se incubaron en el medio TSB hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionaria. Se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo de cada cepa y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm. Las células se lavaron por centrifugación y se resuspendieron en Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8) y, a continuación, se rompieron mediante ultrasonidos aplicando pulsos de diez segundos con intervalos de un minuto, todo ello en un baño de hielo. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación, se recuperaron los sobrenadantes libres de restos celulares y alícuotas de estos fueron sometidas a SDS-PAGE en geles de 12% de acrilamida por el método de Laemmli (1970). La electroforesis se realizó a 15 mA en una cámara fría de 4 °C para evitar el efecto desnaturalizante del calor durante el proceso. En algunos casos, alícuotas de los extractos fueron tratadas previamente a 100 °C durante 10 minutos. Tras la electroforesis los geles se incubaron durante 4 horas a 20 °C. En casos puntuales, tras la incubación, los geles fueron teñidos con una solución del colorante negro Sudán (0,5% p/v) en etanol 70%.

II.5.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el SDS

La determinación de la CMI para el SDS de las diferentes cepas de *Y. ruckeri* se llevó a cabo por el siguiente procedimiento: se prepararon diluciones seriadas de SDS con base 2 en el medio CN y se dispuso 1 ml de cada dilución por triplicado. El rango de concentraciones de SDS que se ensayaron fue de 0,0015625% a 12,8% (p/v). El inóculo bacteriano se preparó diluyendo 1:100 una suspensión 0,5 McFarland (10^8 UFC/ml) de un cultivo en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} : 0,5) en el medio CN. Se añadió 1 ml de la suspensión celular resultante a cada tubo, de forma que la concentración final de bacteria en el tubo fue 5×10^5 UFC/ml, y los tubos se incubaron a 28 °C durante 24 horas. La CMI para el SDS se determinó sembrando 0,1 ml de las diluciones seriadas con base diez de cada tubo en placas con el medio AN. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas y tras este tiempo, se determinó el número de UFC/ml. El ensayo se realizó tres veces de forma independiente.

II.5.3.4. Crecimiento de Y. ruckeri en presencia de SDS y cuantificación de la degradación del detergente

La determinación del crecimiento de *Y. ruckeri* en presencia de SDS se llevó a por el siguiente procedimiento: se preparó un inóculo bacteriano diluyendo 1:100 una suspensión 0,5 McFarland (10^8 UFC/ml) de un cultivo en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} : 0,5) en el medio CN. 2 ml de la suspensión celular resultante, se diluyeron en 17,8 ml de CN y a esta dilución se le añadió 0,2 ml de SDS (25% p/v) para tener una concentración final de 0,25% (p/v). Esta mezcla se transfirió a un matraz de 250 ml, de forma que la concentración de la bacteria en el matraz fue de aproximadamente 10^5 UFC/ml. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 72 horas y a diferentes tiempos de incubación se determinó la concentración de células tomando alícuotas del cultivo y sembrando diluciones de estas en placas de AN. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas y se determinó el número de UFC/ml. La concentración de SDS en los sobrenadantes de las muestras tomadas a lo largo del tiempo, se determinó utilizando el método de Rusconi y col. (2001) con ligeras modificaciones. Así, alícuotas de 1 μ l de una dilución 1:3 de las muestras obtenidas, fueron transferidas por triplicado a pocillos de una placa microtiter. A cada pocillo se le añadió 0,2 ml de una solución de 1,8 mM del colorante Stains-all (Sigma). La concentración de SDS se cuantificó midiendo la DO_{438} en un lector de placas

II. Material y Métodos

microtiter (PowerWave™ XS, BioTek). En cada experimento, se construyó una recta patrón de SDS en el rango de 0 a 0,1% (p/v). El ensayo se realizó tres veces de forma independiente.

II.5.3.5. Determinación de la utilización del SDS como fuente de carbono

Con el fin de conocer si *Y. ruckeri* era capaz de utilizar el SDS como fuente de carbono, placas con los medios M9 y M9C con distintas concentraciones de SDS en el rango de 0,1 a 1% (p/v) se inocularon con 5 µl de cultivos en la fase estacionaria temprana de crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150R y 150RyraS. Estas placas se incubaron a 28 °C hasta 12 días, y al cabo de este tiempo se valoró el crecimiento mediante un examen macroscópico. Asimismo, se determinó el crecimiento en medio líquido utilizando para este fin los mismos medios con SDS en el rango de 0,05 a 1% (p/v). Cultivos en la fase estacionaria temprana de crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150R y 150RyraS fueron utilizados para inocular 1:100 tubos con 5 ml de medio de cultivo. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 24 horas, y transcurrido este tiempo se valoró el crecimiento mediante el método de diluciones seriadas con recuento de viables en placa como fue descrito en el **apartado II.5.3.3**.

II.5.3.6. Ensayos de motilidad tipo swarming

Para la determinación de la motilidad de tipo swarming de las diferentes cepas de *Y. ruckeri*, alícuotas de 1 µl de los cultivos incubados durante toda la noche en el medio CN a 28 °C, fueron depositadas sobre el medio agar triptona semisólido con SDS al 0,1% (p/v). Las placas se incubaron a 28 °C durante tres a cinco días.

II.5.4. Caracterización de la cepa mutante *Y. ruckeri* 150RacrA

II.5.4.1. Ensayos de susceptibilidad a detergentes y antimicrobianos

Para la determinación de la susceptibilidad a detergentes y antimicrobianos se prepararon diluciones seriadas con base dos en el medio CN del compuesto a ensayar y se procedió del mismo modo que el descrito en el **apartado II.5.3.3**. Se determinó la CMI para cada compuesto definiéndola en este caso como la mínima concentración del compuesto que era capaz de inhibir totalmente el crecimiento de la bacteria. La CMI para el SDS se determinó mediante

recuento en placa como ya fue mencionado en el **apartado II.5.3.3**. En todos los casos los ensayos se realizaron tres veces de forma independiente.

II.6. DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀ DE DIFERENTES CEPAS DE *Y. ruckeri* EN TRUCHA ARCOÍRIS

El valor de la DL₅₀ se determinó a través de ensayos con truchas arcoíris (*O. mykiss*) adquiridas en una piscifactoría comercial. Pevio a los ensayos de DL₅₀ un pequeño número de peces elegidos al azar, fueron analizados mediante la siembra y posterior incubación a 18 °C de una muestra obtenida de diferentes órganos en el medio CN para determinar la ausencia de infecciones. Los animales tenían un peso medio de entre 10 y 15 g y se mantuvieron en tanques de 60 l con agua de clorada a 18 ± 1 °C. Las diferentes cepas de *Y. ruckeri* a ensayar, se cultivaron en el medio CN a 18 °C, y en la fase exponencial de crecimiento, las células se lavaron con PBS mediante centrifugación y se resuspendieron en el mismo tampón. Con esta suspensión bacteriana se prepararon diluciones seriadas con base 10 y se inyectaron intraperitonealmente 0,1 ml de cada dilución (rango de 10 a 10⁷ UFC) a grupos de diez peces. Paralelamente, en cada experimento, se inyectaron 0,1 ml de PBS a un grupo de peces control. Durante siete días, se anotaron y retiraron, diariamente, los peces que iban muriendo y el valor de DL₅₀ se calculó, de acuerdo con el método de Reed y Muench (1938). Aleatoriamente y a lo largo del experimento se analizaron algunos de los peces muertos para lo cual se tomaron muestras de diferentes órganos que se sembraron en placas con el medio CN. Estas placas fueron posteriormente incubadas a 28 °C durante 48 horas y algunas de las colonias crecidas se analizaron mediante PCR para confirmar la presencia en el pez de la cepa de *Y. ruckeri* inyectada. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

II.7. OBTENCIÓN DEL SUERO DE TRUCHA ARCOÍRIS Y DETERMINACIÓN MEDIANTE HPLC DE SU CONTENIDO EN CITRATO

El suero de trucha arcoíris (STA) se obtuvo a partir de muestras de sangre tomadas de la vena caudal de peces de aproximadamente 1 kg de peso. Las muestras se colectaron en tubos BD Vacutainer SST II Advance y se centrifugaron durante 15 minutos a 1.300 rpm para separar el suero de las células y, el suero así obtenido, fue utilizado para el análisis mediante HPLC utilizando el método de González de Llano y col. (1996). Se empleó para tal determinación una columna de exclusión iónica ICsep ION-300 (Transgenomic, San Jose, CA) que fue cargada con

II. Material y Métodos

100 µl de la muestra de suero diluido 1:10 y filtrado a través de filtros de 0,45 µm. El tiempo de retención para el ácido cítrico fue establecido en 14 minutos mediante el análisis de ácido cítrico puro. La cuantificación del pico correspondiente al ácido cítrico se realizó mediante una ecuación de regresión lineal ($R^2 \geq 0.99$) usando, como estándar, diferentes concentraciones de ácido cítrico. En paralelo, se analizó por el mismo procedimiento una muestra de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen Life Technologies).

II.8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *yctCBA* E *yrpAB*

Los estudios de regulación de los genes *yctCBA* y *yrpAB* se realizaron con las cepas *Y. ruckeri* 150RivIX y *Y. ruckeri* 150RyrpB, respectivamente. Estas cepas contienen fusiones transcripcionales de los respectivos promotores con los genes *lacZY* del vector pIVET8 integrado en su cromosoma. Para el análisis de la expresión de los promotores en diferentes condiciones, se inocularon matraces de 250 ml que contenían 20 ml del medio de cultivo apropiado con 0,2 ml de un cultivo en la fase estacionaria temprana de crecimiento de las cepas mencionadas y, seguidamente, se incubaron a 18 °C y 28 °C a 250 rpm. A continuación, durante la fase de crecimiento exponencial, se tomaron muestras por triplicado de 1 ml que se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos. El sedimento obtenido se conservó a -20 °C hasta su posterior utilización. Una vez recogidas y congeladas todas las muestras de cada experimento, se ensayó su actividad β-galactosidasa siguiendo el protocolo de Miller (1972) y utilizando como sustrato O-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG). La actividad β-galactosidasa se expresó en Unidades Miller = $\{1000 \times DO_{420}\} / \{t \text{ (minutos)} \times v \text{ (ml)} \times DO_{600}\}$ donde t es el tiempo de incubación con el sustrato y v el volumen de células permeabilizadas utilizado en el ensayo. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante el test de análisis de la varianza (ANOVA) y se consideraron significativos los p-valores inferiores a 0,05.

En el caso de los genes *yctCBA* se analizó la influencia sobre su expresión de la presencia de citrato e isocitrato en el medio de cultivo. Para ello, se realizaron los ensayos en el medio M9C con citrato trisódico (25 mM) o isocitrato trisódico (25 mM). Asimismo, para valorar el papel de la glucosa se utilizó el medio M9CG con citrato trisódico (25 mM). Igualmente, se realizaron ensayos con el medio M9C con un 10% (v/v) de STA y SFB.

En el caso de los genes *yrpAB*, se analizó la influencia de la presión osmótica sobre la expresión génica añadiendo al medio NaCl para alcanzar una concentración final de 335,56

mM. Asimismo, se determinó la influencia del pH utilizando como base el medio M9. Para el ensayo del pH 5 y 6, se utilizó como tampón el ácido (2-N-morfolina) etanosulfónico (MES) a 50 mM; para el pH 7, 7,5 y 8 el ácido [4-(2-hidroxietil)-piperazino] etanosulfónico (HEPES) a 25 mM. Por otro lado, se analizó la influencia sobre su expresión de la presencia de peptona o gelatina en el medio de cultivo. Con ese objetivo, se añadieron al medio M9CG, diferentes concentraciones de peptona de caseína (triptona, Merck) o gelatina (Pronadisa) en el rango 0,5 a 10% (p/v) y 0,5 a 1% (p/v), respectivamente. Asimismo, se estudió el efecto sobre la actividad promotora de la presencia en el medio de cultivo M9 con peptona (5% p/v) de compuestos como casaminoácidos (0,2-5% p/v), glucosa (0,5-5% p/v), o los aminoácidos glutamina (30-100 mM), leucina (30-100 mM) o prolina (30-100 mM). Para valorar el efecto que los iones amonio podrían tener sobre la expresión de los genes *yrpAB*, se aumentó, sobre la propia del medio de cultivo M9, la concentración de NH_4Cl hasta una concentración final de 218,7 mM. La expresión de los genes *yrpAB* se analizó también en el medio complejo CN. Finalmente, se valoró también el efecto sobre la expresión de condiciones de microaerobiosis utilizando para ello el sistema anaerocult C (Merck) que permite definir una atmósfera con baja concentración de oxígeno (5-7% v/v) y rica en dióxido de carbono (8-10% v/v) en una jarra de 2,5 l.

II.9. LOCALIZACIÓN GENÓMICA DEL GEN *yraS*

Para este estudio se utilizaron las siguientes cepas: *Y. ruckeri* 150 y *Y. ruckeri* 956 (**Tabla 1**). La extracción del ADN genómico de estas cepas se realizó con el sistema comercial "GenElute Bacterial Genomic DNA" (Sigma Aldrich Co.), mientras que el ADN plasmídico se obtuvo según el protocolo descrito por Kado y Liu en 1981. El ADN fue separado por electroforesis en geles de agarosa al 0,75% (p/v) y el análisis de la localización del gen *yraS* se realizó mediante Southern blot. La hibridación se llevó a cabo utilizando como sonda un fragmento interno del gen *yraS* amplificado por PCR con los oligonucleótidos *yraS*-a (5'-ACCGAAGCGCCAGCAGA-3') e *yraS*-b (5'-AGTGTCGCTGGATTACC-3') y marcado con digoxigenina. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, seguido de 25 ciclos de amplificación: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 52 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto; y finalmente una etapa de elongación a 72 °C durante 15 minutos. Los amplicones generados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 0,75% (p/v).

II.10. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL GEN *yraS* EN DIFERENTES CEPAS DE *Y. ruckeri*

Veinticinco cepas de *Y. ruckeri* procedentes de diferentes hábitats y lugares geográficos, fueron utilizadas para determinar en ellas la presencia o ausencia del gen *yraS*. Las cepas fueron: 150, 146, 147, 148, 149, 955, 956, 43/19, 35/85, 13/86, A100, A102, 150/05, 158/05, 382/05, ATCC 29473, Yr.V187/09/115, RD38, NCTC 10478, AL 3017, 137/76, 138/76, Yr.V187/09/700, NCMB 1315 y NCMB 1316 (**Tabla 1**). Todas las cepas pertenecen al serotipo I biotipo 1 excepto la cepa 956 que pertenece al serotipo II y las cepas 150/05, 158/05 y 382/05 que pertenecen al biotipo 2. El análisis de la presencia o ausencia del gen *yraS* en cada una de las cepas se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos *yraS*-a (5'-ACCGAAGCGCCAGCAGA-3') e *yraS*-b (5'-AGTGTCGCTGGATTACC-3'). Las condiciones de la PCR se describen en el **apartado II.19**.

II.11. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-MASAS (GC-MS)

Cultivos en la fase estacionaria de crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150R y 150R*yraS* fueron utilizados para inocular (1:100) matraces de 250 ml con 20 ml del medio CN con SDS al 0,25% (p/v). Después de 24 horas de incubación a 28 °C y 250 rpm, los cultivos se filtraron a través de filtros de 0,45 µm de poro (Pall Life Sciences). Los filtrados se desecaron por evaporación al vacío y se resuspendieron en 1 ml de cloroformo. Las muestras así obtenidas fueron sometidas a análisis mediante cromatografía de gases-masas. Se empleó un cromatógrafo de gases-masas Agilent modelo 6890N-5975B (Santa Clara, California, EUA), equipado con una columna capilar Agilent 19091J-433 HP-5 (30 m X 0,25 mm d.i. X 0,25 µm de espesor de película, Agilent Technologies, California, EUA). Para el análisis se inyectó 1 µl de una dilución 1:400 de cada muestra. La inyección fue de 1 minuto y sin división de flujo. La velocidad lineal del gas portador (helio) fue 36 cm/s (1ml/min). El horno se programó de la siguiente manera: de 40 a 250 °C a 20 °C/min, de 250 a 300 °C a 10 °C/min y 5 min isotérmico a la temperatura final. Las temperaturas del inyector, la fuente, la interfase y el cuadrupolo fueron 270 °C, 230 °C, 280 °C y 150 °C, respectivamente. La energía de ionización fue de 70 eV. El espectro de masas se obtuvo de forma continua de 20 a 550 m/z.

II.12. NÚMEROS DE ACCESO DE LAS SECUENCIAS EN LAS BASES DE DATOS

El número de acceso en la base de datos del NCBI de las secuencias de los genes del operón *yctCBA* es HM991732. Todas las secuencias de los genes estudiados aparecen recogidas en el **apartado VII** de la presente memoria.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

III.1. EL SISTEMA TRANSPORTADOR DE CITRATO YctCBA

III.1.1. Análisis *in silico* del operón *yctCBA*

La tecnología IVET ha permitido identificar en *Y. ruckeri* catorce genes inducidos específicamente durante el proceso infeccioso en trucha arcoíris (Fernández y col., 2004). En este trabajo se ha caracterizado uno de esos genes, el correspondiente al clon *ivilX*. La secuenciación de la región adyacente al lugar de inserción del plásmido pIVET en el ADN del clon *ivilX* reveló la presencia de un marco abierto de lectura que consta de 981 pb y codifica una proteína de 326 aminoácidos que comparte una elevada identidad (79%) con la proteína TctC de *Salmonella typhimurium* (Sweet y col., 1984), una hipotética proteína transportadora de tricarboxilatos (86%) de *Serratia proteamaculans* (nº de acceso en la base de datos del NCBI: YP_001479568) y BctC (62%), la proteína homóloga de *Bordetella pertussis* (Antoine y col., 2005). Debido a los resultados de homología el gen fue denominado *yctC* (*Yersinia* *c*itrato

III. Resultados

transporter). El análisis de la secuencia aminoacídica predice un péptido señal de 23 aminoácidos y una localización periplásmica. Desde un punto de vista funcional, el programa Blastp sitúa a la proteína YctC dentro de la familia TctC, integrada por receptores extracitoplásmicos de unión a sustrato que forman parte de transportadores tripartitos de tricarboxilatos.

La secuenciación completa de la zona próxima a este locus, permitió la identificación de otros dos marcos abiertos de lectura adyacentes y orientados en el mismo sentido. Uno de ellos, de 432 pb, se localiza 16 pb en sentido 3' del gen *yctC*. El producto de este gen presenta un alto porcentaje de identidad (66%) con TctB de *S. typhimurium* (Widenhorn y col., 1988a; Widenhorn y col., 1988b) y una proteína hipotética (76%) de *Serratia odorífera* (ZP_06191120). También, aunque en menor medida, muestra identidad (35%) con BctB de *B. pertussis* (Antoine y col., 2005). El gen, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, fue denominado *yctB*. El análisis de la proteína mediante los programas informáticos PSORTb y TOPCONS predice, respectivamente, que ésta, está localizada en la membrana citoplasmática y contiene 5 regiones transmembrana. Desde el punto de vista funcional la proteína YctB está englobada dentro de la familia TctB, constituida por proteínas integrales de membrana que forman parte de transportadores tripartitos de tricarboxilatos.

Finalmente, el tercer marco abierto de lectura, de 1518 pb, se halla 8 pb en sentido 3' del gen *yctB*. Codifica una proteína de 505 aminoácidos que presenta una identidad significativa con TctA (87%) de *S. typhimurium* (Widenhorn y col., 1988a; Widenhorn y col., 1988b), proteínas hipotéticas (94%) de *S. proteamaculans* (YP_001479570) y *S. odorífera* (ZP_06191121) y BctA (59%) de *B. pertussis* (Antoine y col., 2005). Debido a estas identidades y a la relación con los loci *yctC* e *yctB* contiguos, éste gen se denominó *yctA*. El análisis del producto de traducción del gen sugiere que YctA es una proteína de la membrana citoplasmática con 12 regiones transmembrana y una señal de anclaje. Desde el punto de vista funcional la proteína YctA está dentro de la familia TctA, constituida por proteínas integrales de membrana que o bien forman parte de transportadores tripartitos de tricarboxilatos, o bien aparecen solas sin la presencia de las proteínas homólogas de TctB y TctC, como ocurre en muchas bacterias y en las arqueas.

Los tres loci (*yctC*, *yctB* e *yctA*) están flanqueados en su extremo 5' por una secuencia promotora hipotética y en su extremo 3' por un terminador de la transcripción independiente

de rho (**Figura 8**). De acuerdo con los resultados de identidad obtenidos y del análisis del tamaño de los espacios intergénicos, los genes *yctC*, *yctB* e *yctA* formarían un operón (**Figura 8**) que codifica tres proteínas implicadas en el transporte de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos al interior de la célula.

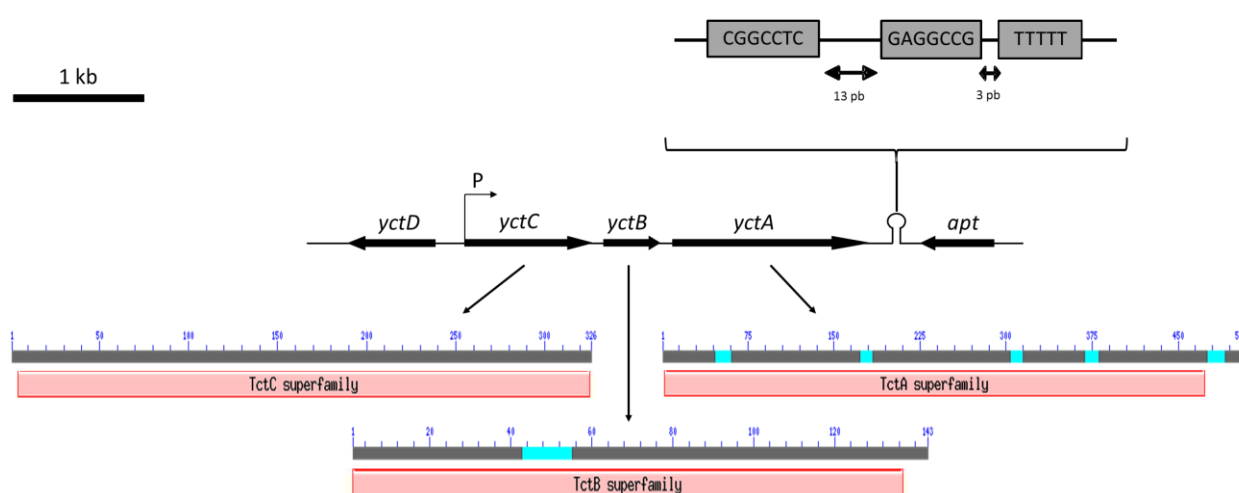


Figura 8. Organización cromosómica de la región que contiene el operón *yctCBA* y características de los productos de los genes. En la parte superior se muestra la localización del promotor (P, ver **Figura 9**) y se indica, ampliada, la hipotética secuencia del terminador de la transcripción independiente de rho del operón *yctCBA*. *yctD*: gen que codifica un regulador de la transcripción de unión a ADN que constituye el regulador de respuesta de un sistema de dos componentes, *apt*: gen que codifica una adenina fosforribosiltransferasa. En la parte inferior se muestran la longitud referida al número de aminoácidos de cada proteína y en rojo claro los dominios correspondientes a cada una de las proteínas producto de los genes del operón. En azul claro se indican las regiones cuya composición es sesgada y que el programa Blast no utiliza en su búsqueda de dominios en las bases de datos.

III.1.2. Regulación del operón *yctCBA*

La cepa *Y. ruckeri* *ivilX* es portadora de una fusión transcripcional entre el gen *yctC* y los genes *lacZY* del plásmido pIVET8 (**Figura 9**). Con el fin de definir los factores implicados en la regulación del operón *yctCBA* se analizó en esta cepa la actividad β -galactosidasa bajo diferentes condiciones de cultivo.

III. Resultados

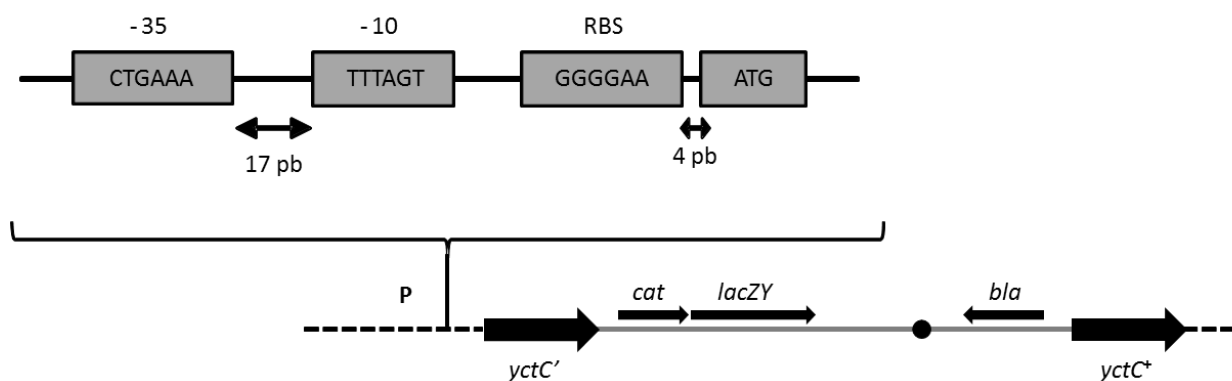


Figura 9. Esquema de la inserción del plásmido pIVET8 en el cromosoma del clon *iviX*. En la parte superior, se indica ampliada la posible secuencia promotora (P) del operón *yctCBA* con las secuencias correspondientes a las regiones -10 y -35 así como el RBS (GGGGAA) y el codón de iniciación (ATG). *cat*: gen que confiere resistencia al cloranfenicol (sin promotor), *lacZY*: genes que confieren actividad β -galactosidasa (sin promotor), *bla*: gen que confiere resistencia a la ampicilina. *yctC'*: copia incompleta del gen *yctC*, *yctC+*: copia completa del gen *yctC*.

El estudio de la regulación del promotor del operón *yctCBA* mostró que la presencia en el medio de cultivo de citrato trisódico o isocitrato trisódico incrementaba la expresión de los genes *yctCBA* (**Tabla 5**). Asimismo, se determinó que la concentración mínima de citrato para obtener una inducción significativa del promotor fue de 50 μ M, y se constató que, una concentración de citrato de 1 mM era suficiente para lograr la máxima actividad del promotor (resultados no presentados). Por otro lado, cuando la glucosa, además del citrato, estaba presente en el medio de cultivo en, al menos, una concentración del 0,5% (p/v), se inhibía totalmente el efecto de inducción del citrato. (**Tabla 5**).

En relación a la regulación por la temperatura, se observó un mayor nivel de expresión del gen a 18 °C (**Tabla 5**), la temperatura alrededor de la cual tiene lugar el desarrollo del proceso infeccioso, que a 28 °C, la temperatura óptima de crecimiento de *Y. ruckeri*.

Con el objetivo de definir por qué el operón *yctCBA* había sido seleccionado como clon *ivi*, se trató de determinar si la incubación de la bacteria en presencia del suero del animal, ocasionaba un incremento de la actividad del operón. Los resultados indicaron que cuando el suero de trucha STA o el SFB fueron añadidos al medio M9C, la actividad del promotor se incrementó en un $24,25\% \pm 5,57\%$ y $48,36\% \pm 7,79\%$, respectivamente (**Tabla 5**).

Tabla 5. Actividad β -galactosidasa determinada durante el crecimiento de la cepa *Y. ruckeri* 150RivIX en diferentes condiciones de cultivo. La actividad se presenta en Unidades Miller. El valor 100% es el de referencia con el que se comparan las actividades β -galactosidasa obtenidas en las diferentes condiciones ensayadas.

Factor estudiado	Condiciones del cultivo (medio de cultivo y temperatura)	Actividad β -galactosidasa		Análisis estadístico: ANOVA (p-valor)
		Unidades Miller	% de expresión	
Presencia de citrato (25 mM) en el medio	M9C, 18 °C	894±26	100%	8,2E ⁻⁰⁶
	M9C + citrato, 18 °C	3080±127	344,46%±11,82%	
Presencia de isocitrato (25 mM) en el medio	M9C, 18 °C	868±153	100%	1,8E ⁻⁰³
	M9C + isocitrato, 18 °C	3697±643	427,07%±34,34%	
Presencia de glucosa (0,5% p/v) en el medio	M9C + citrato, 18 °C	3496±373	100%	2,7E ⁻⁰⁴
	M9CG + citrato, 18 °C	862±54	24,83%±2,79%	
Temperatura	M9C + citrato, 18 °C	3205±158	100%	2E ⁻⁰⁴
	M9C + citrato, 28 °C	1557±152	48,80%±6,87	
Presencia de STA (10% v/v) en el medio	M9C 18, °C	946±61	100%	3,7E ⁻⁰³
	M9C + STA, 18 °C	1174±24	124,25% ± 5,57%	
Presencia de SFB (10% v/v) en el medio	M9C, 18 °C	873±53	100%	3,2E ⁻⁰⁴
	M9C + SFB, 18 °C	1293±35	148,36% ± 7,79%	

III.1.3. Determinación mediante HPLC del contenido en citrato del suero de trucha arcoíris

La inducción del promotor observada al añadir STA o SFB al medio de cultivo sugirió que éstos, podrían contener en su composición citrato, lo que fue confirmado mediante el análisis por HPLC. Los resultados revelaron la presencia en los sueros STA y SFB de concentraciones de citrato de aproximadamente 100 μ M y 200 μ M, respectivamente.

III.1.4. Caracterización de la cepa mutante *Y. ruckeri* 150RyctC

Con el fin de conocer la importancia y el papel que puede tener en la fisiología de *Y. ruckeri* el sistema de transporte de citrato, se realizó un seguimiento del crecimiento de una cepa mutante isogénica para el gen *yctC* (150RyctC) en relación al de la cepa parental en condiciones de ausencia y presencia de citrato. Las cepas mencionadas fueron incubadas en los medios M9C, M9CG y M9C con 25 mM de citrato. Como se puede observar en la **Figura 10**, las curvas de crecimiento de las dos cepas fueron semejantes en los medios M9C y M9CG, mientras que, la cepa mutante 150RyctC presentó una pendiente y crecimiento menores en relación a la cepa parental cuando se incubaron en el medio M9C con citrato (**Figura 10**). Por otro lado, una vez conocida la relativamente alta concentración de citrato presente en el STA y el SFB, se hizo un seguimiento del crecimiento de las cepas 150R y 150RyctC en estos sueros. Los resultados indicaron que no existía una diferencia en el crecimiento de ambas cepas (resultados no presentados).

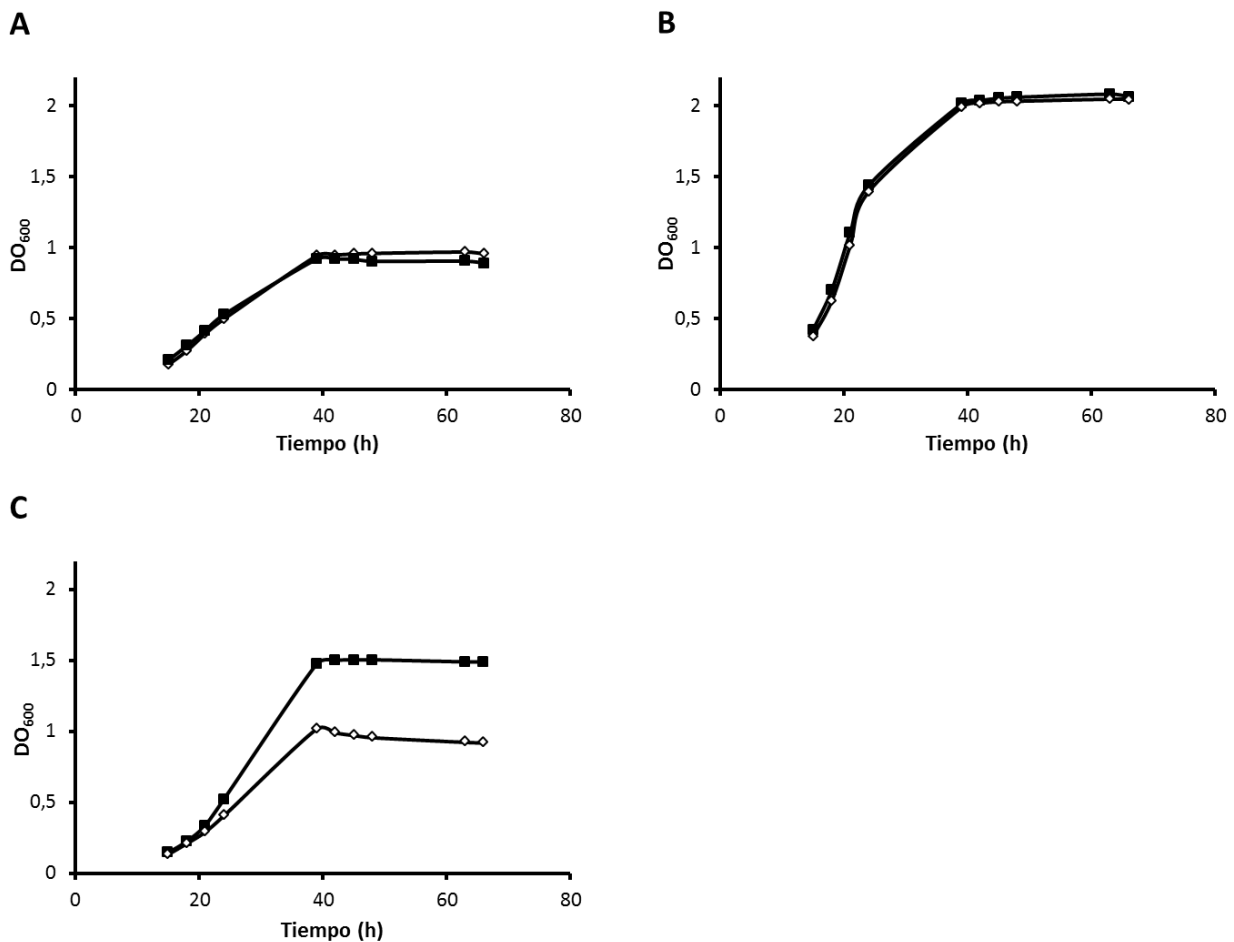


Figura 10. Curva de crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150R (■) y 150RyctC (◇) en el medio M9C (A), medio M9CG (B) y medio M9C con 25 mM de citrato (C). La incubación se realizó a 18 °C. Los valores representan la media de tres experimentos independientes.

El análisis de la utilización de citrato por las cepas parental y mutante en el medio agar citrato de Simmons, mostró que la cepa mutante, a diferencia de la parental, no era capaz de crecer en este medio y, por lo tanto, de utilizar citrato como única fuente de carbono (**Figura 11**). Este resultado se confirmó mediante la correspondiente prueba bioquímica incluida en el sistema de identificación API 10S (**Figura 11**).

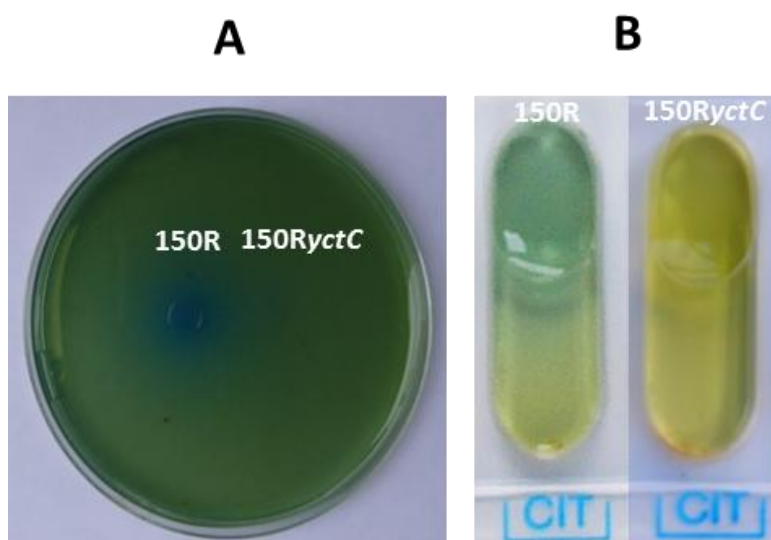


Figura 11. Utilización de citrato como única fuente de carbono por *Y. ruckeri*. Las cepas parental y mutante 150RyctC fueron sembradas en (A) medio agar citrato de Simmons, donde se puede observar el crecimiento, exclusivamente, de la cepa parental y (B) tira test de diagnóstico API10S con la actividad positiva en el pocillo correspondiente a la cepa parental 150R.

Una vez definido el papel determinante de la proteína YctC en la utilización de citrato, así como el notable contenido de éste en el STA, se procedió a la realización de experimentos de DL_{50} para saber si el sistema YctCBA estaba implicado en la virulencia de la bacteria, hecho probable puesto que el gen *yctC* fue seleccionado como un gen *ivi*. Los experimentos realizados en peces indicaron sin embargo, que no había diferencias significativas entre la DL_{50} de la cepa parental (3.6×10^5 UFC) y la DL_{50} de la cepa mutante (1.9×10^5 UFC).

III.2. EL OPERÓN *yrpAB*

III.2.1. Análisis *in silico* del operón *yrpAB*

La secuenciación de las regiones adyacentes al gen *iviX* (Méndez y col., 2011) permitió la identificación de dos marcos abiertos de lectura situados en su extremo 3', orientados en el mismo sentido y flanqueados en su extremo 5' por una secuencia promotora hipotética y en el 3' por un terminador de la transcripción independiente de rho. El número de nucleótidos que conforman el espacio intergénico (12 pb) induce a pensar que estos dos genes podrían formar un operón (**Figura 12**). El primer marco abierto de lectura consta de 996 pb y codifica una proteína de 331 aminoácidos que presenta un 88% de identidad con las proteínas YP_002236432 de *Klebsiella pneumoniae*, NP_289734 de *Escherichia coli* (88%), YP_404821 de *Shigella dysenteriae* o EHC45316 de *Salmonella enterica* y un 85% con la proteína STM-proteaseA de *Proteus mirabilis* (Zhao y col., 1999). Al gen que codifica esta proteína se le denominó *yrpA* (*Yersinia ruckeri* protease A) (**Figura 12**). El análisis de la proteína mediante los programas informáticos SignalP y PSORTb predice, respectivamente, que esta, carece de péptido señal y está localizada en el citoplasma.

El segundo marco abierto de lectura consta de 879 pb y codifica una proteína de 292 aminoácidos que presenta un 84% de identidad con las proteínas YP_001722436 de *Yersinia pseudotuberculosis* y EIS91064 de *Yersinia pestis*, un 80% con la proteína EKF66684 de *Serratia plymuthica* y un 79% con las proteínas YP_003332207 de *Dickeya dadantii* o YP_003016184 de *Pectobacterium carotovorum*. A este segundo gen se le denominó *yrpB* (*Yersinia ruckeri* protease B). El análisis de la proteína mediante los programas informáticos SignalP y PSORTb predice, respectivamente, que esta, carece de péptido señal y está localizada en el citoplasma.

El análisis *in silico* predice que ambas proteínas, YrpA e YrpB, poseen los dominios Cl03113, presente en las peptidasas de tipo U32, y COG0826, típico de colagenasas y proteasas emparentadas con aquellas. Ambos dominios se encuentran en la proteasa STM-protease A de *Proteus mirabilis* (AAC64577) (Zhao y col., 1999) y en la colagenasa PrtC de *Porphyromonas gingivalis* (Takahashi y col., 1991; Kato y col., 1992).

Por otra parte, los microorganismos que poseen un operón homólogo al operón *yrpAB* de *Y. ruckeri* son anaerobios o anaerobios facultativos. Así, el análisis *in silico* de las secuencias nucleotídicas mediante el programa Blastx indicó que el operón *yrpAB* también está presente

en microorganismos como *K. pneumoniae* (KPN_03566 y KPN_03567), *Enterobacter aerogenes* (ST548_p3910 y ST548_p3911), *Citrobacter koseri* (CKO_04553 y CKO_04554), *E. coli* (EC042_3447 y EC042_3448), *Klebsiella oxytoca* (KOX_03610 y KOX_03615), *Shigella flexneri* (S3416 y S3417) y *Shigella dysenteriae* (SDY_3337 y SDY_3338). Además, el operón también se encuentra en las especies del género *Yersinia*, incluidas las especies patógenas para el hombre *Y. enterocolitica* (YE0450 y YE0449), *Y. pestis* (YPN_0608 y YPN_0607) y *Y. pseudotuberculosis* (YPTB0495 y YPTB0494).

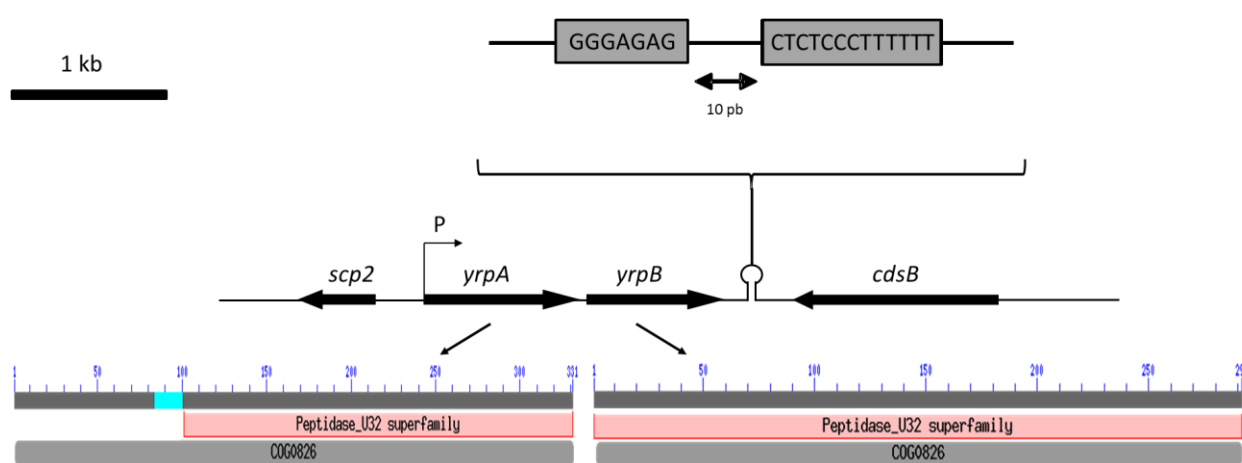


Figura 12. Organización cromosómica de la región que contiene el operón *yrpAB* y características de los productos de estos genes. En la parte superior se muestra la localización del promotor (P, ver **Figura 13**) y se indica, ampliada, la hipotética secuencia del terminador de la transcripción independiente de rho. *scp2*: gen que codifica una proteína transportadora de esteroides, *cdsB*: gen que codifica una L-cisteína desulfidasa. En la parte inferior se muestran la longitud relativa al número de aminoácidos y los dominios en rojo claro y gris, correspondientes a cada una de las proteínas producto de los genes del operón. En azul claro se indica una región cuya secuencia tiene una composición sesgada y que no es utilizada por el programa Blast para la búsqueda de dominios en las bases de datos.

III.2.2. Regulación del operón *yrpAB*

Con el fin de definir qué factores podrían estar implicados en la regulación del operón *yrpAB*, se analizó la actividad β -galactosidasa de la cepa *Y. ruckeri* 150R*yrpB*, que contiene una fusión transcripcional entre el gen *yrpB* y los genes *lacZY* del plásmido pIVET8, bajo diferentes condiciones de cultivo (**Figura 13**).

III. Resultados

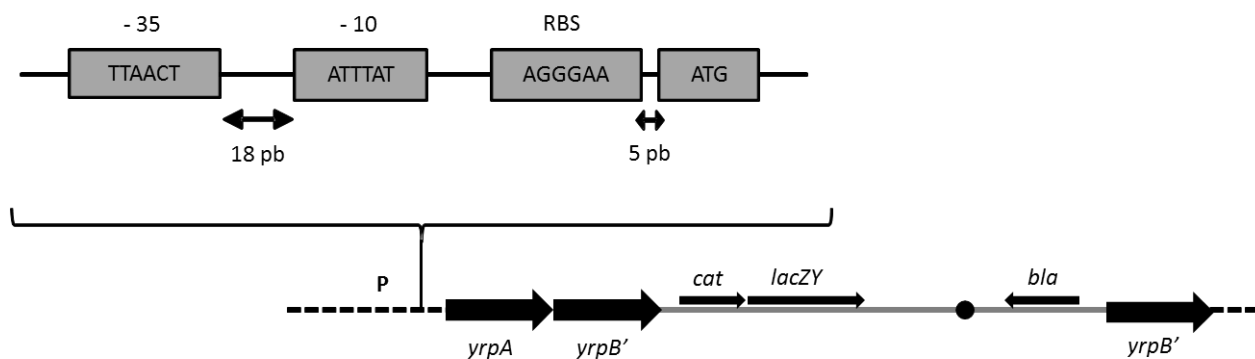


Figura 13. Esquema de la inserción del plásmido pIVET8 en el cromosoma de la cepa mutante *Y. ruckeri* 150YrpB. En la parte superior, se indica ampliada la posible secuencia promotora (P) del operón *yrpAB* con las secuencias correspondientes a las regiones -10 y -35 así como el RBS (AGGGAA) y el codón de iniciación (ATG). *cat*: gen que confiere resistencia al cloranfenicol (sin promotor), *lacZY*: genes que confieren actividad β-galactosidasa (sin promotor), *bla*: gen que confiere resistencia a la ampicilina. *yrpA*: copia completa del gen *yrpA*, *yrpB'*: copia incompleta del gen *yrpB*.

Los estudios de regulación realizados con ésta cepa mostraron que la presencia en el medio de cultivo M9CG de una concentración de 5% (p/v) de peptona de caseína, producía un incremento significativo de la actividad β-galactosidasa (**Tabla 13**). Por otro lado, se observó un mayor nivel de expresión del gen cuando la bacteria se incubó en condiciones de microaerobiosis (5-7% v/v de oxígeno) en relación a cuando se hacía en un ambiente oxigenado (**Tabla 13**).

Además, se pudo también constatar que la combinación de ambas condiciones, presencia de peptona en el medio y ambiente de microaerobiosis, ocasionaba un incremento considerable en la actividad del promotor, ocasionando pues un efecto sinérgico (**Tabla 13**).

La modificación de diferentes factores físicos como la temperatura de incubación (18 °C y 28 °C) (**Tabla 13**), la presión osmótica o el pH no modificaron la expresión del promotor (resultados no presentados). Por otro lado, la presencia en el medio de cultivo M9 con peptona (5% p/v) de 0,2% (p/v) de casaminoácidos o 0,5% (p/v) de glucosa no produjo una variación significativa en la actividad del promotor (**Tabla 13**). Además, la presencia de aminoácidos como leucina (30-100 mM), glutamina (30-100 mM) y prolina (30-100 mM) o diferentes cantidades de NH₄Cl (18,7-218,7 mM), tampoco ocasionó una alteración en la actividad promotora.

Tabla 13. Ensayos de actividad β -galactosidasa con la cepa *Y. ruckeri* 150Ryrb en diferentes condiciones de cultivo. La actividad se expresa en Unidades Miller. El valor 100% es el de referencia con el que se comparan las actividades β -galactosidasa obtenidas en las diferentes condiciones ensayadas.

Factor estudiado	Condiciones del cultivo (medio de cultivo y temperatura)	Actividad β -galactosidasa		Análisis estadístico: ANOVA (p-valor)
		Unidades Miller	% de expresión	
Presencia de peptona (5% p/v) en el medio	M9CG, 18 °C	666±102	100%	4,2E ⁻⁰²
	M9CG + peptona, 18 °C	973±150	146,16%±1,34%	
Microaerobiosis	M9CG, 18 °C	622±107	100%	8,3E ⁻⁰³
	M9CG 5-7% O ₂ , 18 °C	1100±132	177,96%±9,78%	
Peptona (5% p/v) y microaerobiosis	M9CG, 18 °C	894±108	100%	8,8E ⁻⁰⁸
	M9CG + peptona 5-7% O ₂ , 18 °C	4228±182	475,58%±36,02%	
Temperatura	M9CG + peptona 5-7% O ₂ , 18 °C	3419±218	100%	0,23
	M9CG + peptona 5-7% O ₂ , 28 °C	3077±184	90,03%±0,37%	
Presencia de glucosa (0,5% p/v) en el medio	M9 + peptona, 18 °C	1097±85	100%	0,13
	M9G + peptona, 18 °C	1213±67	111,04%±9,58%	
Presencia de casaminoácidos (0,2% p/v) en el medio	M9 + peptona, 18 °C	1097±85	100%	0,59
	M9C + peptona, 18 °C	1057±81	96,67%±9,28%	

III.2.3. Caracterización de las cepas mutantes *Y. ruckeri* 150yrpA y 150Ryrb

Con el fin de conocer la importancia y el papel en la fisiología de *Y. ruckeri* de las proteasas hipotéticas YrpA e YrpB, se realizó un seguimiento del crecimiento de las cepas mutantes isogénicas para los genes *yrpA* e *yrpB* en relación al de la cepa parental en el medio

III. Resultados

mínimo M9CG y en el medio complejo CN. Como se puede observar en la **Figura 14**, las cepas mutantes mostraron un crecimiento similar al de la cepa parental tanto en el medio M9CG como en el medio CN.

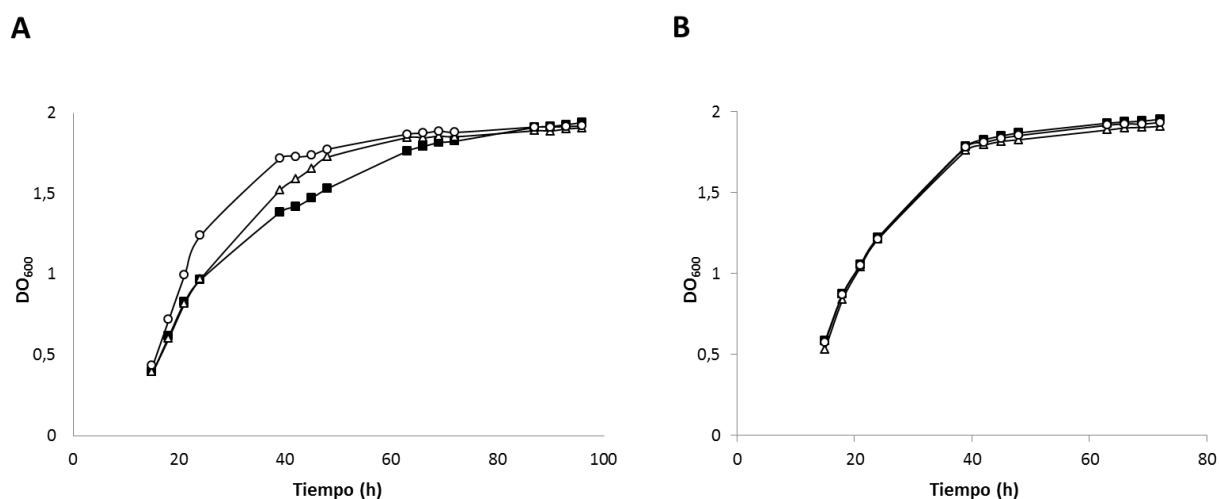


Figura 14. Curva de crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150 (■), 150yrpA (Δ) y 150RyrpB (○) en el medio M9CG (A) y en el medio CN (B). La incubación se realizó a 28 °C. Los valores representan la media de tres experimentos independientes.

Para determinar si la mutación de los genes *yrpA* y *yrpB* alteraba la actividad proteolítica de estos mutantes en relación a la cepa parental, se llevaron a cabo ensayos de actividad proteolítica con los sobrenadantes libres de células y los extractos celulares de la cepa parental y las cepas mutantes 150yrpA y 150RyrpB, crecidas en las condiciones de máxima inducción de la actividad promotora de estos genes, utilizando como sustratos azocoll y azocaseína. Ninguna de las cepas presentó actividad proteolítica cuando el sustrato utilizado fue el azocoll, independientemente de las diferentes condiciones del cultivo de las cepas (medios CN y M9CG con un 5% p/v de peptona, en aerobiosis y microaerobiosis, respectivamente, a 18 y 28 °C) y de las variantes ensayadas en las condiciones de la reacción enzimática. En cambio, cuando el sustrato utilizado fue la azocaseína, se observó actividad proteolítica tanto en la cepa parental como en las cepas mutantes sin que se apreciaran diferencias significativas entre ellas, cuando los sobrenadantes procedían de cultivos crecidos a 18 °C en el medio CN (resultados no

presentados). Cuando los sobrenadantes procedían de cultivos crecidos en el mismo medio pero a 28 °C, no se obtuvo actividad proteolítica alguna (resultados no presentados).

Ante esta ausencia de resultados diferenciales en cuanto a la actividad proteolítica, entre la cepa parental y las cepas mutantes se trató de buscar técnicas alternativas que nos las pudiesen de manifiesto, caso de que existiesen. Se realizaron de esta manera zimogramas empleando como sustratos caseína y gelatina, y utilizando para ello muestras de sobrenadante concentrado procedentes de cultivos incubados en condiciones de microaerobiosis en el medio M9CG con peptona. En estos zimogramas, se observó una banda de hidrólisis de aproximadamente 50 kDa, tanto en el que el sustrato era la caseína como en el de gelatina y, para las muestras procedentes de las cepas parental y mutantes (**Figura 15**).

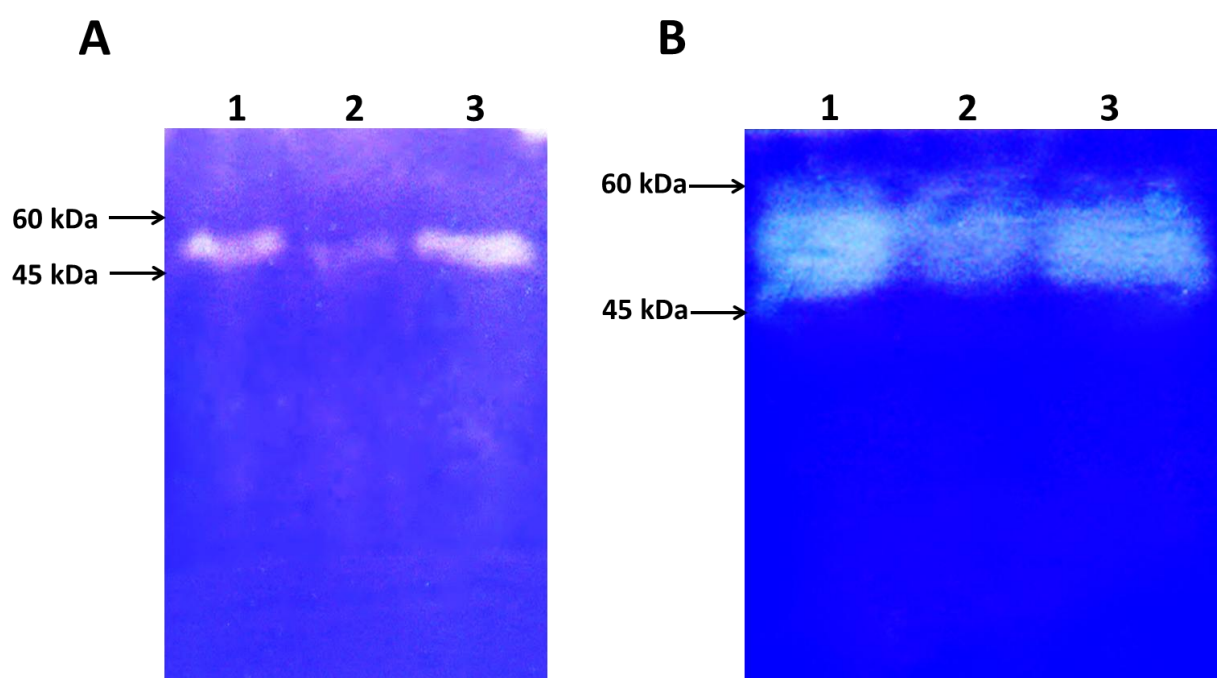


Figura 15. Análisis mediante zimograma en SDS-PAGE con caseinato sódico (1% p/v) (A) y gelatina (1% p/v) (B) de los sobrenadantes de cultivos de las cepas *Y. ruckeri* 150, 150yrpA y 150RyrpB. Alícuotas del sobrenadante concentrado de las cepas *Y. ruckeri* 150 (1), 150yrpA (2) y 150yrpB (3) se cargaron y sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida (12% p/v) con SDS. Tras la electroforesis el gel se lavó con Triton X-100 (2,5% v/v) y se incubó a 28 °C durante 18 horas en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) con 5 mM de CaCl₂.

III. Resultados

Con el objetivo de comprobar si diferentes sustratos naturales como colágeno de tipo I, colágeno de tipo IV, laminina, vitronectina y fibronectina, eran digeridos diferencialmente, muestras del sobrenadante concentrado procedentes de cultivos de la cepa parental y de la cepa mutante 150*yrpA* se incubaron con estas proteínas de la matriz extracelular. El análisis tras la electroforesis mostró que la laminina y la fibronectina sufrieron una digestión parcial, pero sin que se apreciaran diferencias entre la muestra de la cepa parental y la muestra de la cepa mutante, mientras que la vitronectina y el colágeno de tipo IV no sufrieron alteración alguna tras la reacción (**Figura 16**), mismo caso que el del colágeno de tipo I (**Figura 17**).

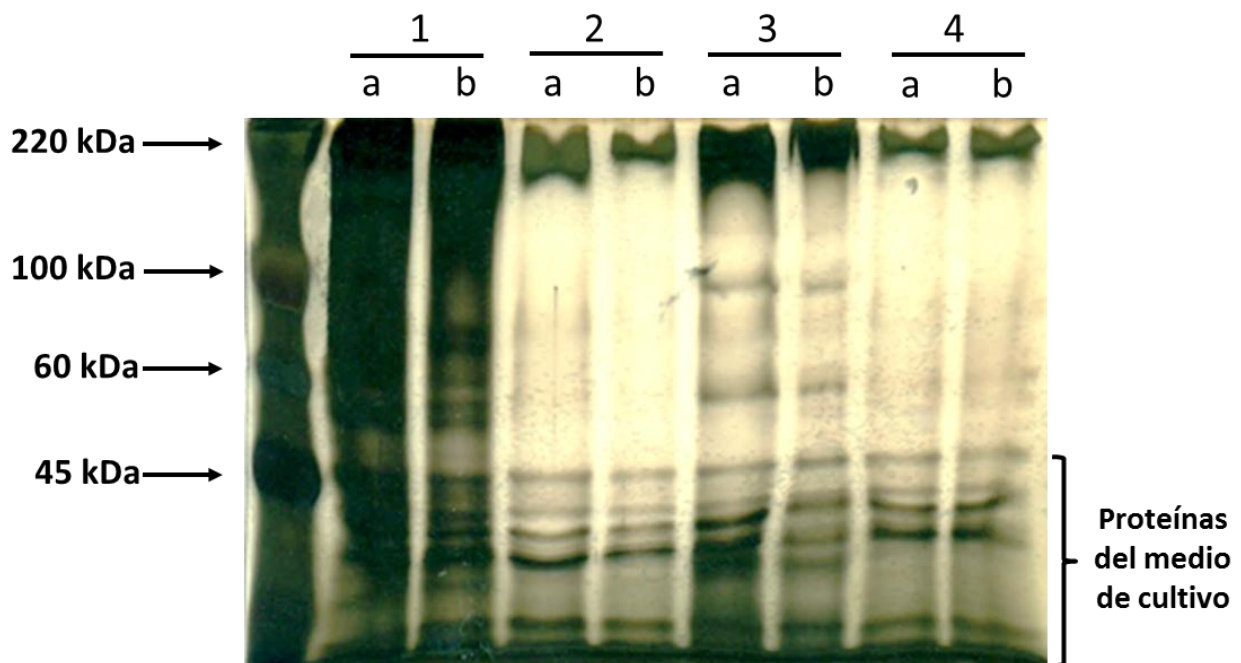


Figura 16. Análisis mediante SDS-PAGE de la degradación de diferentes proteínas de la matriz extracelular por sobrenadantes de cultivo de las cepas *Y. ruckeri* 150 y 150*yrpA*. Cada proteína se incubó con el sobrenadante concentrado de las cepas *Y. ruckeri* 150 (a) y 150*yrpA* (b) a 28 °C durante 18 horas. Las muestras se cargaron y sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida (10% p/v) con SDS. Tras la electroforesis el gel se tiñó con una solución de nitrato de plata (0,2% p/v). Calles: 1, laminina; 2, vitronectina; 3, fibronectina; 4, colágeno tipo IV. Se indica en la parte derecha la posición de las proteínas presentes en el medio de cultivo.

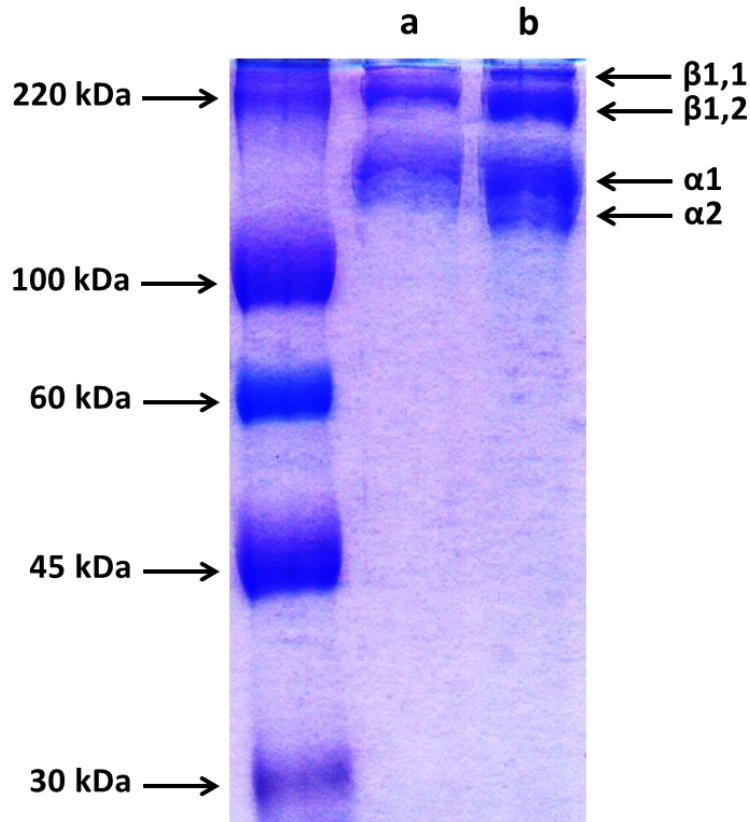


Figura 17. Análisis mediante SDS-PAGE de la degradación del colágeno de tipo I por sobrenadantes de cultivo de las cepas *Y. ruckeri* 150 y 150yrpA. El colágeno de tipo I se incubó con el sobrenadante concentrado de las cepas *Y. ruckeri* 150 (a) y 150yrpA (b) a 28 °C durante 18 horas. Las muestras se cargaron y sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida (10% p/v) con SDS. Tras la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie (0,1% p/v). Se indican en la parte derecha las cadenas α_1 y α_2 que forman la triple hélice del colágeno, así como los componentes β , dímeros formados por dos cadenas α .

Es conocido el importante papel que desempeñan las proteasas extracelulares como factores de virulencia en los procesos infecciosos de muchas bacterias. Por ello, se procedió a determinar si las proteasas hipotéticas YrpA e YrpB podrían tener algún papel relevante en la enfermedad producida por *Y. ruckeri*. Los experimentos de DL_{50} indicaron que el mutante en el gen *yrpA* presentó una DL_{50} de $1,8 \times 10^2$ UFC, mientras que en la cepa parental fue de $1,1 \times 10^4$ UFC, lo que demuestra la implicación del operón *yrpAB* en el proceso infeccioso.

III.3. LA ALQUIL SULFATASA YraS

III.3.1. Construcción de una genoteca de mutantes con el transposón mini-Tn5 Km2 y selección de mutantes con fenotipo HSF⁻

Para la identificación del gen que codifica el factor sensible al calor (HSF), relacionado con la virulencia de la bacteria por Furones y col. (1990), se construyó una genoteca de mutantes por transposición con el transposón mini-Tn5 Km2. Para la selección de los mutantes que presentaban el fenotipo HSF⁻ (Furones y col., 1993), la genoteca, de unos 10.000 mutantes, fue analizada en el medio TSA con 1% de SDS y 0,01% del colorante aniónico Coomassie brilliant blue (**Figura 18A**). Se identificaron cuatro colonias que presentaban el fenotipo buscado, es decir, absorbían el colorante y carecían del depósito cremoso alrededor de la colonia (**Figura 18B**).

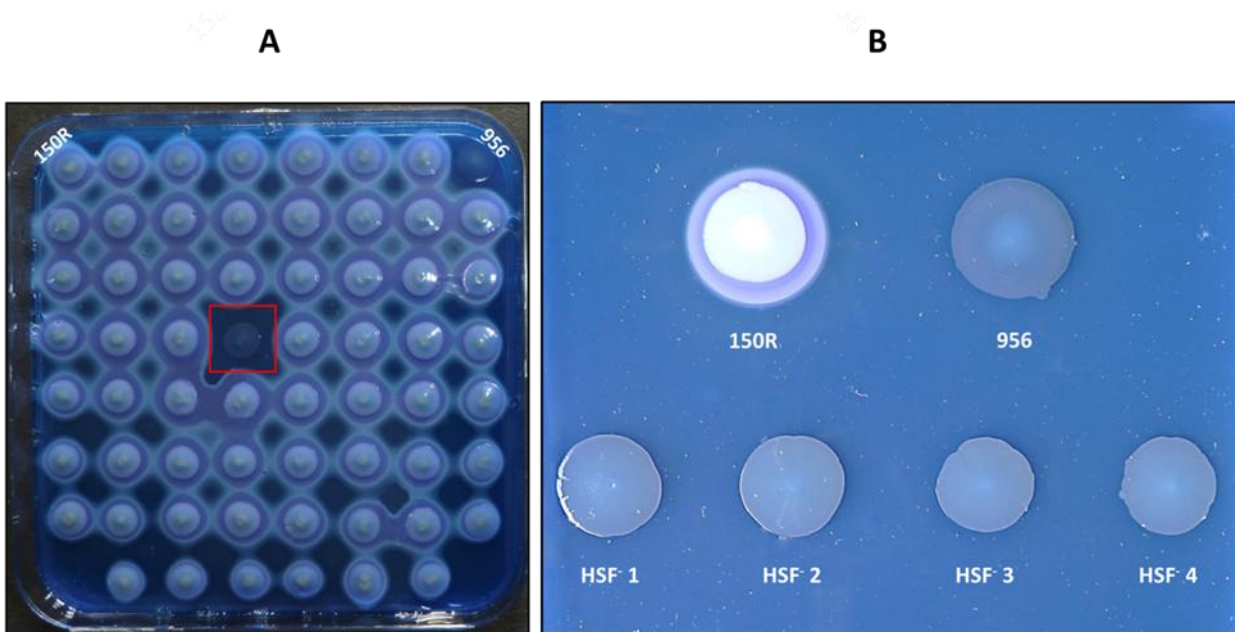


Figura 18. (A) Colonias de la genoteca de mutantes por transposición en el medio TSA con SDS (1% p/v) y el colorante azul de Coomassie (0,01% p/v). En los cuadrantes superiores izquierdo y derecho de la placa se muestran las colonias de las cepas *Y. ruckeri* 150R y 956, que representan los fenotipos HSF⁺ y HSF⁻, respectivamente. Remarcado se presenta uno de los mutantes seleccionados con fenotipo HSF⁻. (B) Morfología de las colonias de los cuatro mutantes con fenotipo HSF⁻ seleccionados en el análisis de la genoteca. Se presentan en la parte superior de la fotografía las colonias de las cepas *Y. ruckeri* 150R y 956 con fenotipos HSF⁺ y HSF⁻, respectivamente.

III.3.2. Análisis *in silico* del gen *yraS*

La secuenciación de la región adyacente al lugar de inserción del transposón mini-Tn5 Km2 en el ADN de uno de los cuatro mutantes seleccionados y el posterior análisis mediante PCR de los tres mutantes restantes, reveló que, en los cuatro casos, se había interrumpido el mismo marco abierto de lectura. El estudio de uno de estos mutantes, denominado HSF⁻ 1 (cepa 150R*yraS*) definió que el marco abierto de lectura interrumpido consta de 2124 bp y codifica una proteína de 708 aminoácidos. Esta presenta un alto porcentaje de identidad con otras proteínas descritas como alquil sulfatasas o SDS hidrolasas de diferentes bacterias como CCI04676 (71%) de *Microcystis aeruginosa*, YP_006413521 (63%) de *Thiocystis violascens*, EGS71352 (52%) *Vibrio cholerae* o SdsA1 (51%) de *P. aeruginosa* (Hagelueken y col., 2006). Este marco abierto de lectura no se encontró en las bases de datos en ninguna otra especie del género *Yersinia*. Al gen identificado se le denominó *yraS* (*Yersinia ruckeri* al_kyl_sulfatase). El gen *yraS* se halla flanqueado por una secuencia promotora hipotética y un terminador de la transcripción independiente de rho (**Figura 19**). Adyacente a su extremo 5' y en su mismo sentido de la transcripción, se localiza un gen que codifica una proteína hipotética y, separado 54 pb de su extremo 3', pero en sentido opuesto, se presenta otro gen que codifica una decarboxilasa de aminoácidos aromáticos (**Figura 19**). El análisis *in silico* predice que la proteína YraS contiene en su extremo N-terminal un péptido señal de 24 residuos y los dominios cl00446 y COG2015, característicos de las superfamilias de las metalo-beta-lactamasas y de las alquil sulfatasas e hidrolasas, respectivamente (**Figura 19**). Ambos dominios están presentes en las alquil sulfatasas SdsA (AAA25989) y SdsA1 (NP_249431) de *Pseudomonas* sp. ATCC19151 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, respectivamente. Estas, constituyen un nuevo grupo de sulfatasas que catalizan la descomposición de ésteres de sulfato en alcohol y sulfato inorgánico y se caracterizan entre otras cosas, por presentar el motivo "THxHxDHxGG-102-E-18-AE-44-H" de unión a zinc. En la **Figura 20** se muestra el alineamiento de la secuencia de este motivo de diferentes proteínas incluida la proteína YraS de *Y. ruckeri*. Se puede observar que solo dos aminoácidos pertenecientes a la secuencia de la alquil sulfatasa de *Pseudomonas* sp. ATCC19151 difieren entre las secuencias comparadas. Estos aminoácidos se corresponden con la serina y la glicina de las posiciones 190 y 198.

III. Resultados

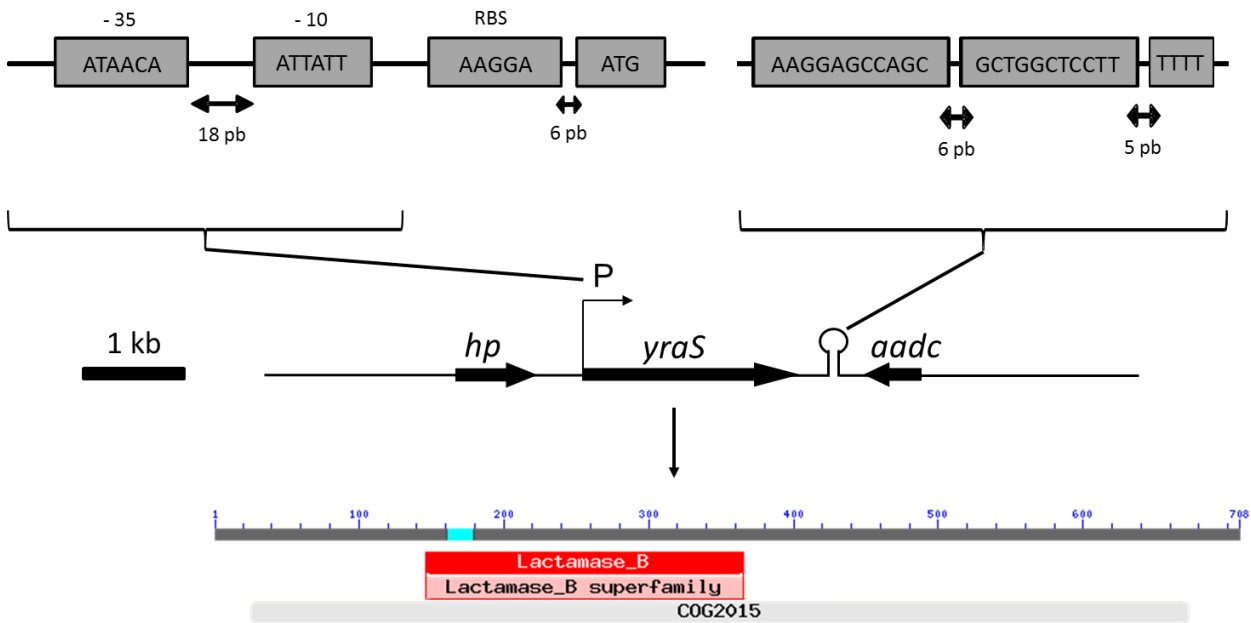


Figura 19. Organización genética de la región que contiene el gen *yraS*. En la parte superior se muestra la localización del potencial promotor (P) con sus secuencias correspondientes a las regiones -10 y -35 así como el RBS (AAGGA) y el codón de iniciación (ATG). Se indica, asimismo ampliada, la hipotética secuencia del terminador de la transcripción independiente de rho. *hp*: gen que codifica una proteína hipotética, *aadc*: gen que codifica una aminoácido aromático descarboxilasa. En la parte inferior se muestran la longitud relativa al número de aminoácidos del producto del gen *yraS* y los dominios COG2015 en gris y beta-lactamasa en rojo. En azul claro se indica una región cuya secuencia tiene una composición sesgada y que el programa Blast no utiliza en la búsqueda de dominios en las bases de datos.

	190	198	302	321	366
Yras	AVVF SHSHVDH FGGV RG		TE APAEMNTYFPQFKAFWA AE NVTG		SHS
CCI04676	AVVY SHSHVDH YGGV RG		TE APAEMNTYFPDWKAFWA AE NICG		SHS
YP_006413521	AVIY SHDHADH WGGV RG		TE APTEMNTWFPDTKVLWMA AE NVMA		AHH
NP_249431	TVIY SHAHADH FGGV RG		TE SPAEMNIWLPRQKALLMA AE NVVG		VHN
EGS71352	AVVY SHAHADH FGGV KG		TE SPAEMNTYFPQFKALWMA AE NTVG		SHT
AAA25989	AIVY THFHPDH INGV KA		SE APDEIVLYLPDNRVLIS AE VTQG		LHG

Figura 20. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del dominio de unión a zinc de proteínas homólogas a la proteína YraS de *Y. ruckeri*: AAA25989 (*Pseudomonassp.* ATCC19151), NP_249431 (*P. aeruginosa*), CCI04676 (*M. aeruginosa*), YP_006413521 (*Thiocystisviolascens*) y EGS71352 (*Vibrio cholerae*). Los aminoácidos correspondientes a las posiciones 190 y 198, en negrita, no están conservados entre las secuencias de las proteínas incluidas en el análisis. Así, en la proteína AAA25989 de *Pseudomonas sp.* ATCC19151, aparecen treonina (T) y asparagina (N) en las posiciones 190 y 198, en lugar de la serina (S) y la glicina (G). Los aminoácidos implicados en la unión al zinc que forman parte del sitio activo de la enzima aparecen en negrita y subrayados.

III. Resultados

construido con el programa MEGA, usando el modelo WAG+G como el método de sustitución de aminoácidos y cuatro categorías gamma. La medida de confianza o fiabilidad de las ramas del árbol se realizó por análisis de bootstrap con 500 réplicas.

III.3.3. Localización del gen *yraS* en el genoma de *Y. ruckeri*

La localización del gen *yraS* en el genoma de *Y. ruckeri* se determinó mediante hibridación por Southern blot del ADN genómico de la cepa *Y. ruckeri* 150 con una sonda del gen *yraS*. En la **Figura 22A** se pueden observar los dos plásmidos que presenta esta cepa, uno de 75 MDa y otro más pequeño de 12,7 MDa (**Figura 22A**, calle 1), así como el ADN cromosómico (**Figura 22A**, calle 2). Como se ve en la **Figura 22B**, el resultado de la hibridación reveló la presencia de una sola banda a nivel del ADN cromosómico (**Figura 22B**, calle 2), lo que indica que el gen *yraS* se localiza en el cromosoma de la bacteria. Además, cuando la hibridación se realizó con el ADN de la cepa *Y. ruckeri* 956, que carece de ambos plásmidos (**Figura 22C**), no se observó banda de hibridación alguna a nivel cromosómico, mostrando que esta cepa carece del gen *yraS* (**Figura 22D**).

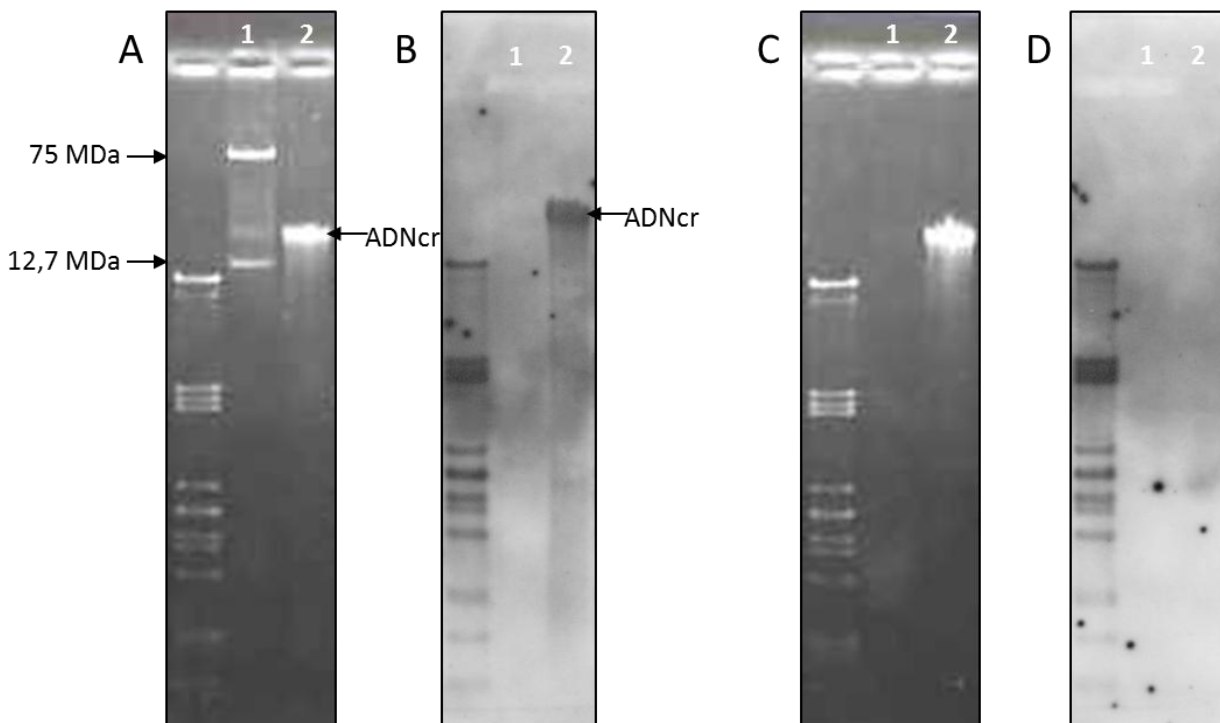
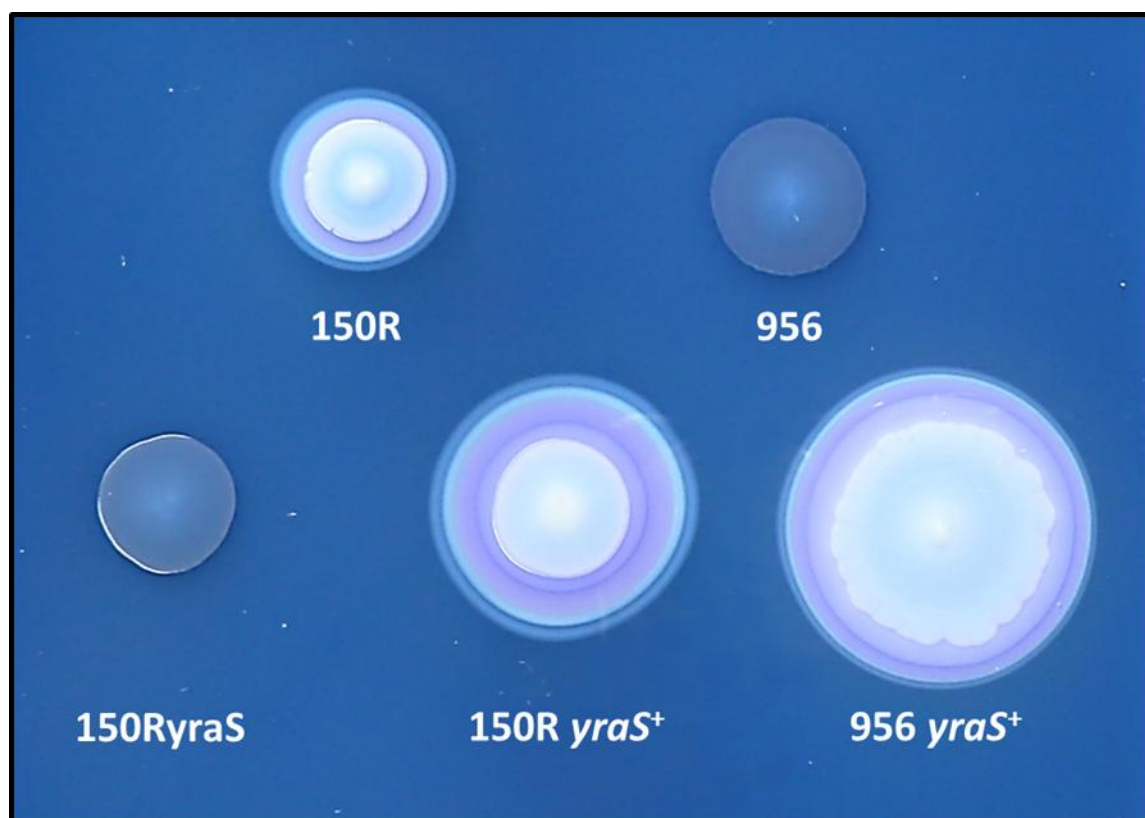


Figura 22. Identificación mediante Southern blot de la localización genómica del gen *yraS* en las cepas *Y. ruckeri* 150 y 956. Separación por electroforesis en gel de agarosa de 0,75% (p/v) de ADN de *Y. ruckeri* 150 (A) y *Y. ruckeri*

956 (C): (1) ADN plasmídico; (2) ADN cromosómico. (B) y (D): placas fotográficas obtenidas del resultado de la hibridación mediante Southern blot del ADN de los geles (A y C) con una sonda perteneciente al gen *yraS*.

III.3.4. Determinación del fenotipo HSF⁺/HSF⁻ de la cepa *Y. ruckeri* 150R*yraS* y las cepas complementadas *Y. ruckeri* 150R *yraS*⁺ y 956 *yraS*⁺

Con el objetivo de confirmar la relación existente entre la presencia en la bacteria del gen *yraS* y el fenotipo HSF⁺, definido por la formación de un depósito cremoso alrededor de la colonia y la ausencia de tinción con el colorante azul de Coomassie en medios con SDS, se complementó la cepa mutante 150R*yraS*, de fenotipo HSF⁻, con el plásmido pGBM5 portador del gen *yraS*. Como se puede observar en la **Figura 23**, se obtuvo una reversión completa del fenotipo HSF⁻ al fenotipo HSF⁺. Además, cuando el gen se introdujo en la cepa *Y. ruckeri* 956, perteneciente al serotipo II y con fenotipo HSF⁻, la morfología de la colonia cambió del fenotipo HSF⁻ al fenotipo HSF⁺ (**Figura 23**). Las cepas complementadas *Y. ruckeri* 150R *yraS*⁺ y 956 *yraS*⁺ formaron un depósito cremoso mayor que el de la cepa parental 150R probablemente debido a un efecto de dosis génica (**Figura 23**).



III. Resultados

Figura 23. Colonias de diferentes cepas de *Y. ruckeri* con fenotipo HSF⁺/HSF⁻ en el medio TSA con SDS (1% p/v) y el colorante azul de Coomassie (0,01% p/v). En la parte superior, las cepas parentales *Y. ruckeri* 150R y *Y. ruckeri* 956; en la parte inferior, la cepa mutante *Y. ruckeri* 150R*yraS* y las cepas complementadas 150R *yraS*⁺ y 956*yraS*⁺.

Para determinar si se podría mejorar la identificación del fenotipo HSF⁺, además del colorante azul de Coomassie, se ensayaron otros colorantes manteniendo la misma concentración de SDS (1% p/v). Estos experimentos pusieron de manifiesto que, el colorante de naturaleza catiónica rojo de rutenio en una concentración de 0,008% (p/v), incrementaba la diferencia entre el fenotipo HSF⁺ y el HSF⁻ (**Figura 24**). Las colonias de las cepas con fenotipo HSF⁻ no absorbieron el colorante, mientras que las colonias de las cepas con fenotipo HSF⁺, a diferencia de lo que ocurre con azul de Coomassie, sí lo hicieron y se tiñeron de rojo (**Figura 24**).

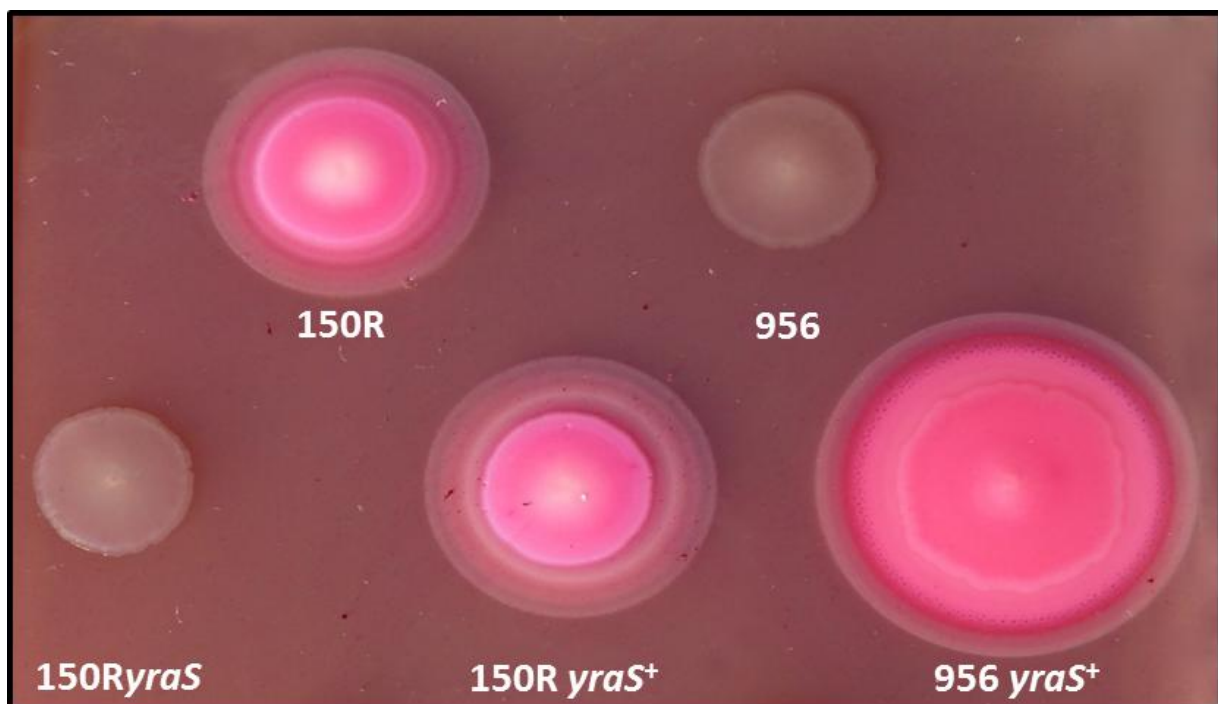


Figura 24. Colonias de diferentes cepas de *Y. ruckeri* con fenotipo HSF⁺/HSF⁻ en el medio TSA con SDS (1%p/v) y el colorante rojo de rutenio (0,008% p/v). En la parte superior, las cepas parentales *Y. ruckeri* 150R y *Y. ruckeri* 956; en la parte inferior, la cepa mutante *Y. ruckeri* 150R*yraS* y las cepas complementadas 150R *yraS*⁺ y 956 *yraS*⁺.

III.3.5. Correspondencia entre la presencia/ausencia del gen *yraS* y el fenotipo HSF⁺/HSF⁻ en diferentes cepas de *Y. ruckeri*

Los resultados obtenidos del análisis comparativo entre la presencia/ausencia del gen *yraS* y el fenotipo HSF⁺/HSF⁻ de distintas cepas de *Y. ruckeri* procedentes de diferentes lugares geográficos, revelaron una correspondencia directa entre la formación del depósito blanco cremoso alrededor de la colonia en un medio con SDS (fenotipo HSF⁺), y la presencia en las cepas que lo forman del gen *yraS* (**Figura 25**). Igualmente, todas las cepas que carecían del gen inequívocamente presentaron el fenotipo HSF⁻ (**Figura 25**).

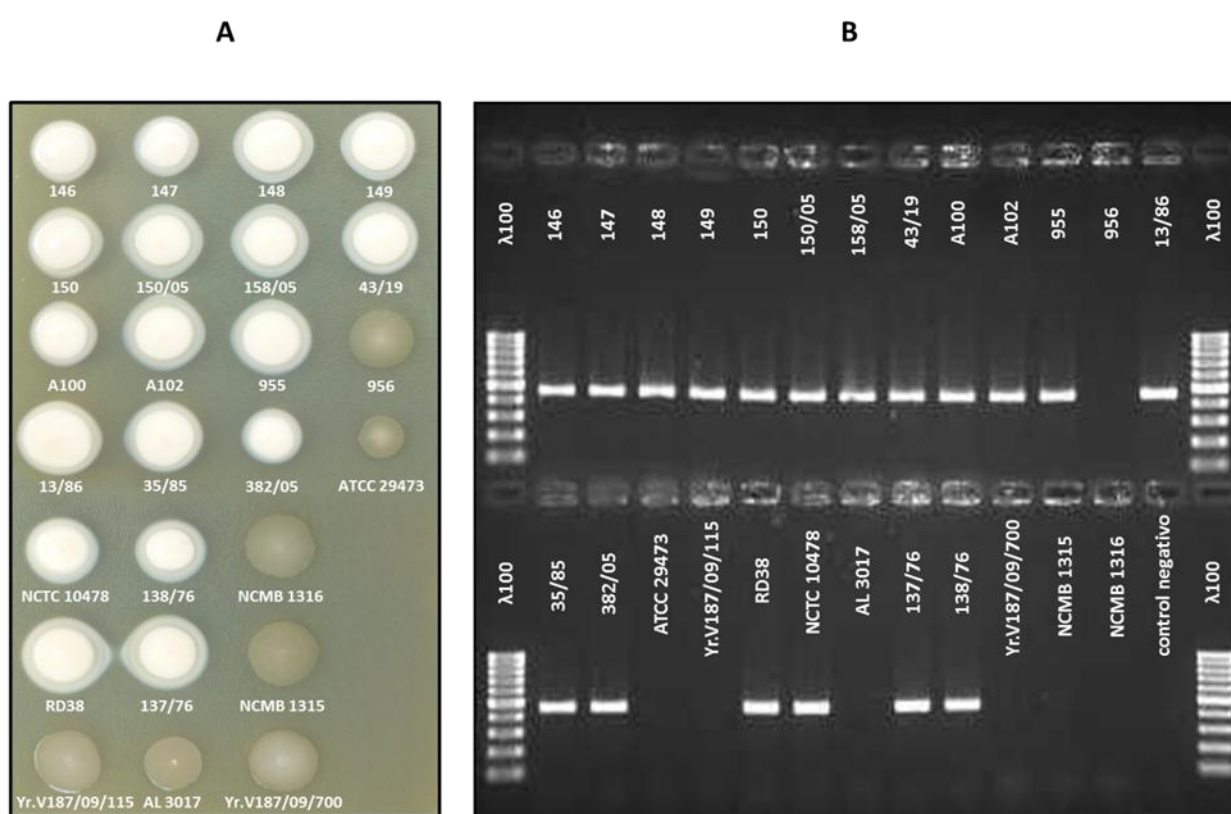


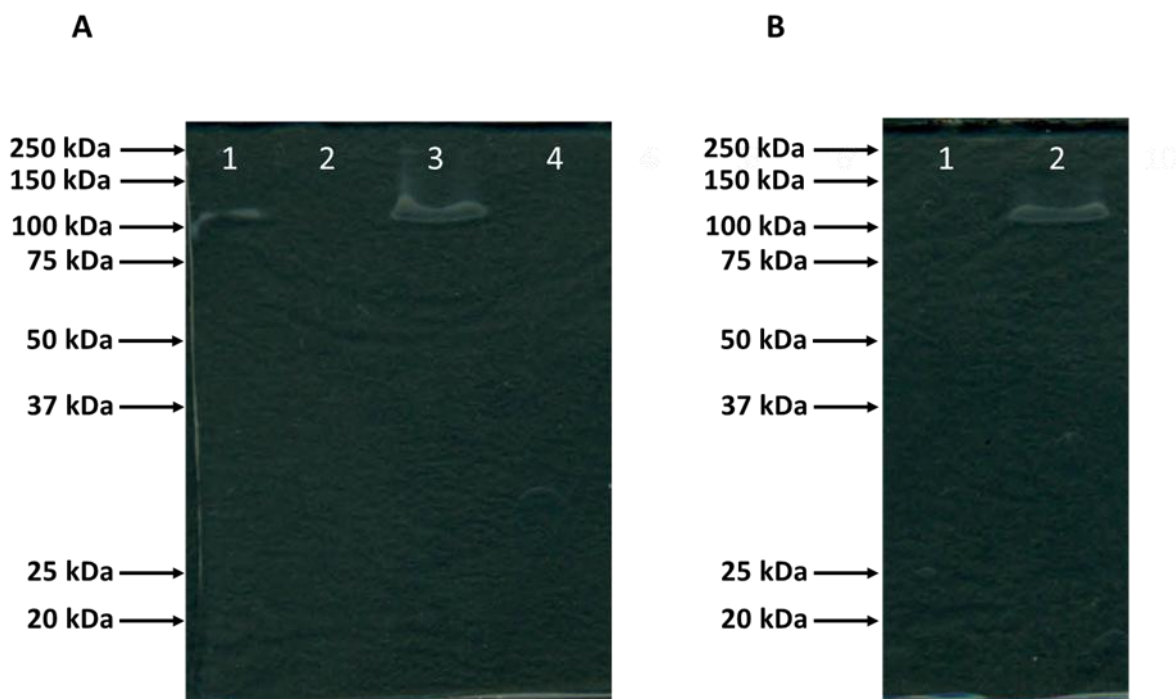
Figura 25. Relación entre el fenotipo HSF⁺/HSF⁻ y la presencia del gen *yraS* en diferentes cepas de *Y. ruckeri*. (A) Colonias de diferentes cepas de *Y. ruckeri* crecidas en el medio TSA con SDS (1% p/v). (B) Gel de agarosa mostrando el producto amplificado por PCR de 455 bp, correspondiente a un fragmento interno del gen *yraS*.

III.3.6. Actividad SDS hidrolasa en SDS-PAGE

Furones y col. (1990) establecieron una relación directa entre el fenotipo HSF⁺/HSF⁻ y la presencia/ausencia de una banda opaca de aproximadamente 120 kDa en geles de

III. Resultados

poliacrilamida-SDS, cuando los extractos celulares de las cepas eran separados mediante electroforesis. Para comprobar que el gen *yraS* era el responsable de la presencia de la banda de 120 kDa, los extractos de las cepas parentales 150R y 956, mutante 150R*yraS* y complementadas 150R *yraS*⁺ y 956 *yraS*⁺, se separaron mediante SDS-PAGE, siguiendo el mismo procedimiento llevado a cabo por Furones y col. (1990). Tras incubar los geles a 20 °C durante 4 horas, se observó una banda de aproximadamente 120 kDa en el extracto de la cepa parental 150R, que no estaba presente en el extracto de la cepa mutante 150R*yraS* y que se hacía más intensa en el extracto de la cepa complementada 150R*yraS*⁺ (**Figura 26A**). Es importante destacar que cuando se trataba el extracto de la cepa parental a 100 °C durante 10 min, antes de ser sometido a la electroforesis, la banda no aparecía (**Figura 26A**). Además, si la cepa 956, que no presentaba la banda de 120 kDa, era complementada con el gen *yraS*, la banda aparecía (**Figura 26B**). De acuerdo con estos resultados y con la función asignada a la proteína YraS, parece que la banda de 120 kDa es el producto de la degradación por la alquil sulfatasa del SDS presente en el gel. Por otro lado, cuando los geles, tras la incubación de 4 horas a 20 °C, fueron teñidos, por inmersión, en una solución del colorante negro Sudán pudo observarse la presencia de una banda azulada de 120 kDa, como también había sido descrito por Furones y col. (1990) (**Figura 26C**).



*Geles sobre fondo negro para la visualización de las bandas

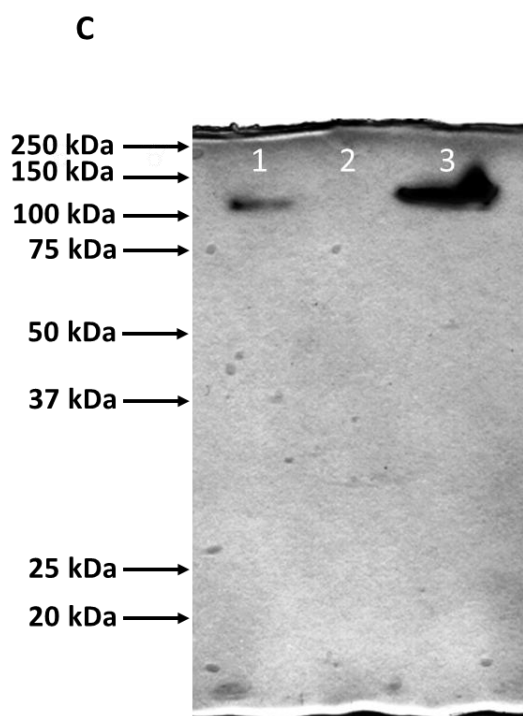


Figura 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (p/v) de extractos de diferentes cepas de *Y. ruckeri*. Los extractos fueron obtenidos mediante tratamiento de las células con ultrasonidos y tras centrifugación, el sobrenadante fue sometido a electroforesis. Posteriormente, los gels fueron incubados a 20 °C durante 4 horas. (A) Calle 1, 150R; calle 2, 150R $YraS$; calle 3, 150R $YraS^+$; calle 4, extracto de la cepa 150R tratado a 100 °C durante 10 min antes de ser sometido a electroforesis. (B) Calle 1, 956; calle2, 956 $YraS^+$. (C) Gel teñido con negro Sudán. Calle 1, 150R; calle 2, 150R $YraS$; calle 3, 150R $YraS^+$. Los gels A y B se fotografiaron sobre un fondo oscuro para contrastar mejor la banda de 120 kDa.

III.3.7. Susceptibilidad al SDS de diferentes cepas de *Y. ruckeri*

El SDS es un detergente que, incluso a bajas concentraciones, produce alteraciones importantes en la célula bacteriana y por ello le resulta tóxico. Puesto que la alquil sulfatasa YraS es capaz de degradar el SDS, esta podría conferir a la bacteria una mayor resistencia a este detergente. En este contexto, se determinó la CMI para el SDS de diferentes cepas de *Y. ruckeri*. Como puede observarse en la **Tabla 14**, no hubo diferencias en la CMI de las cepas 150R, 150R $YraS$ y 150R $YraS^+$ (3,2% p/v SDS). Tampoco se observaron diferencias entre las CMI de las

III. Resultados

cepas 956 y 956 *yraS*⁺ (0,8% p/v SDS), aunque en este caso la CMI fue inferior a la de la cepa 150R.

Tabla 14. CMI para el SDS (% p/v) de las distintas cepas de *Y. ruckeri*. La CMI se realizó en el medio CN a 28 °C durante 24 h, con concentraciones crecientes de SDS desde 0,0015625% hasta 6,4% (p/v). Los experimentos fueron repetidos tres veces.

Cepa	CMI (% p/v)
150R	3,2
150R <i>yraS</i>	3,2
150R <i>yraS</i> ⁺	3,2
956	0,8
956 <i>yraS</i> ⁺	0,8

III.3.8. Crecimiento de *Y. ruckeri* en presencia de SDS

Con el fin de tratar de conocer el papel que la proteína YraS podría tener en la fisiología de *Y. ruckeri*, se realizó una curva de crecimiento de las cepas parental y mutante 150R*yraS* en el medio CN con un 0,25% (p/v) de SDS. Como se puede observar en la **Figura 27** durante la fase exponencial de la curva, ambas cepas presentaron una pendiente similar. Sin embargo, durante la fase estacionaria de crecimiento se produjo un descenso más acusado de la viabilidad de las células de la cepa mutante respecto a la parental. Por otro lado, y como puede observarse en la **Figura 27**, la cepa parental 150R fue capaz de degradar completamente el SDS tras 24 horas de incubación, mientras que en el cultivo de la cepa mutante, no se observó hidrólisis alguna del detergente a lo largo del tiempo. Por otro lado, la cepa parental no fue capaz de degradar

totalmente el SDS cuando la concentración utilizada fue del 0,5% y 1% (p/v) (resultados no presentados).

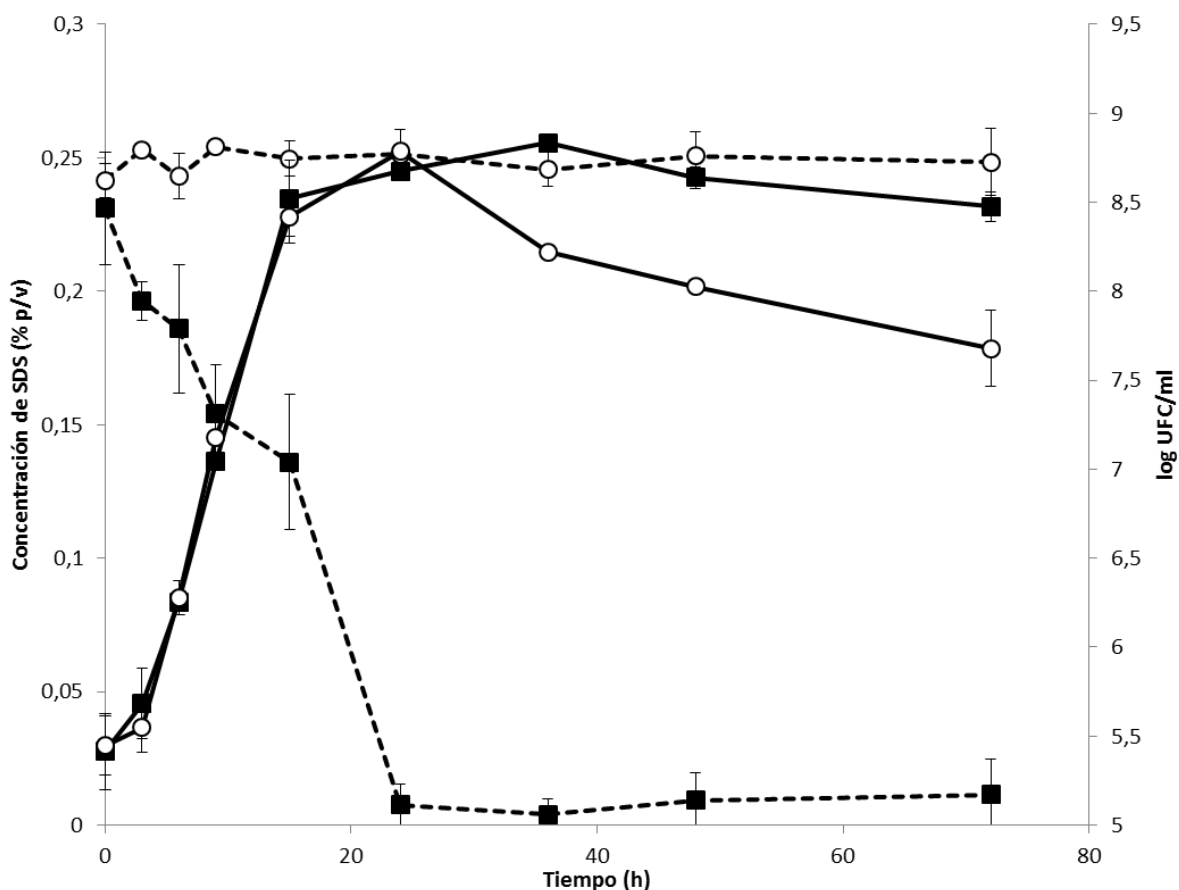


Figura 27. Curva de crecimiento (—) y degradación de SDS (---) de las cepas *Y. ruckeri* 150R (■) y 150RyraS (○). Los cultivos se incubaron en CN con SDS (0,25% p/v) a 28 °C y en agitación. La concentración de células (UFC/ml) se determinó mediante el método de diluciones seriadas y posterior recuento de viables en placa. Los valores representan la media ± desviación típica de tres experimentos independientes.

III.3.9. Identificación mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) del producto de la degradación del SDS por *Y. ruckeri*

Alícuotas del sobrenadante de los cultivos de las cepas 150R y 150RyraS crecidas en presencia de SDS fueron analizadas mediante cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas. Como puede observarse en la **Figura 28B**, en el caso de la muestra del cultivo de la cepa parental 150R, se obtuvo una señal bien definida con un pico que

III. Resultados

presentaba un tiempo de retención de 9,89 min. Este pico es totalmente coincidente con el del compuesto 1-dodecanol utilizado como patrón y producto esperado de la degradación del SDS por una alquil sulfatasa (**Figura 28A**). Este compuesto no estaba presente en el medio de cultivo procedente de la cepa mutante 150Ryrs (**Figura 28C**).

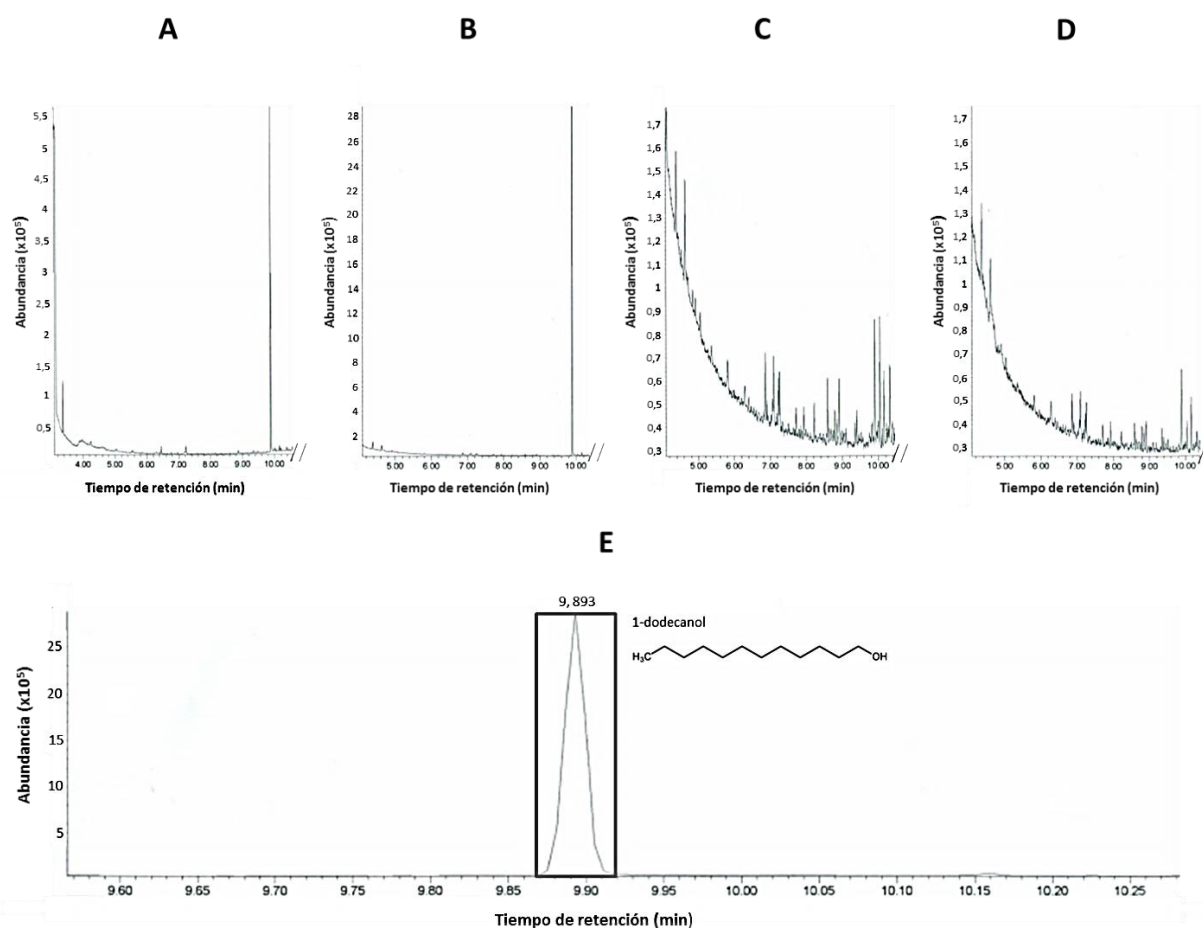


Figura 28. Cromatogramas obtenidos mediante GC-MS. (A) 1-dodecanol comercial (patrón). (B, C y D) Muestras procedentes de los cultivos de la cepa parental 150R, mutante 150Ryrs y del medio de cultivo sin inocular (control). (E) Ampliación del cromatograma de la muestra de la cepa parental (B). Se presenta encuadrado el pico correspondiente al 1-dodecanol con un tiempo de retención de 9,893 min.

III.3.10. Utilización del SDS como nutriente por *Y. ruckeri*

Durante la realización de experimentos de crecimiento con las cepas *Y. ruckeri* 150R y 150Ryrs se observó que cuando se añadía glucosa (0,5% p/v) al medio M9C con SDS (1% p/v) la cepa parental 150R no degradaba el SDS tras 96 horas de incubación (**Figura 29**).

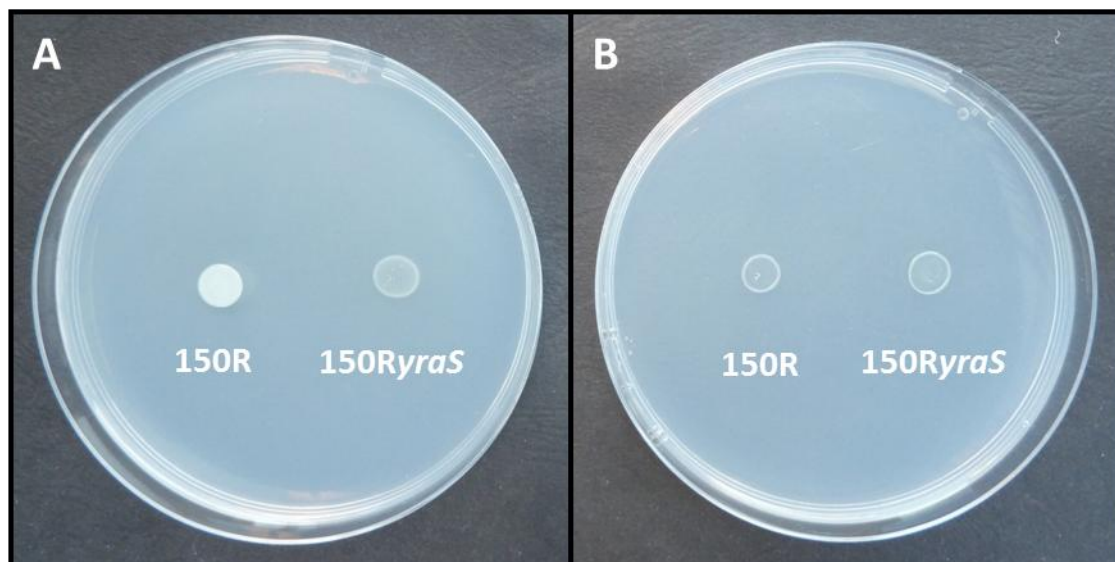


Figura 29. Crecimiento a las 96 horas de las cepas *Y. ruckeri* 150R y 150RyraS en el medio M9C con SDS (1% p/v) (A) y en el mismo medio con glucosa (0,5% p/v) (B). Puede observarse como en el medio con glucosa (B), la cepa parental 150R no forma el depósito blanquecino producto de la degradación del SDS.

Esta ausencia de degradación del SDS en presencia de glucosa sugería por un lado, la existencia de un mecanismo de regulación mediante represión catabólica y, por otro, que el SDS podría ser, en ausencia de glucosa, una fuente de carbono para la bacteria. Para determinar esto, el medio M9 líquido y sólido, con distintas concentraciones de SDS (en un rango de 0,1 al 1% p/v), fue inoculado con las cepas parental y mutante y sus crecimientos fueron seguidos a lo largo del tiempo. En ningún caso se observó crecimiento alguno de las cepas en estas condiciones.

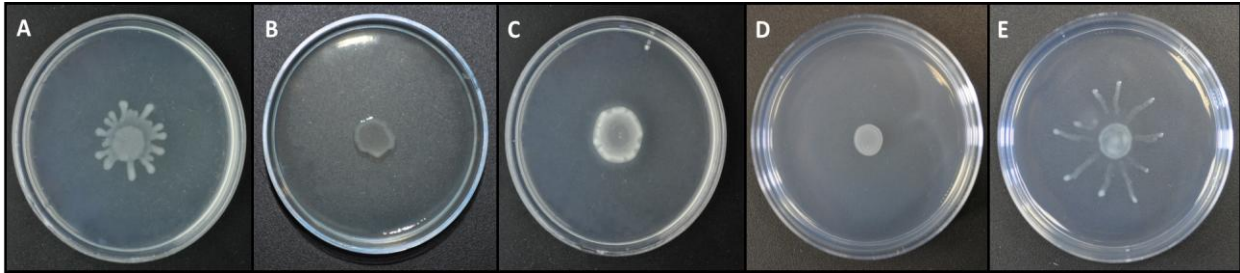
Por otro lado, la presencia de diferentes concentraciones de sulfato (0,1-10 mM) en el mismo medio de cultivo, no produjo modificación alguna en el proceso de degradación de SDS por la cepa parental.

III.3.11. Efecto del gen *yraS* sobre la motilidad de *Y. ruckeri*

Durante el estudio de las cepas parental y mutante en el gen *yraS* se observó que, cuando la cepa parental se incubaba en una placa del medio agar triptona semisólido (0,6% p/v agar) con SDS al 0,1% (p/v), se producía una motilidad definida como de tipo “swarming” (**Figura 30A**), que no tenía lugar en la cepa mutante (**Figura 30B**). Esta motilidad era dependiente de la presencia en el medio del SDS, y se inhibía en presencia de glucosa. Por otro

III. Resultados

lado, cuando la cepa *Y. ruckeri* 956 que carecía de esta motilidad (**Figura 30D**) fue complementada con el gen *yraS* se convirtió en una cepa motil (**Figura 30E**). En cambio, la cepa complementada *Y. ruckeri* 150R *yraS*⁺ no presentó el fenotipo de motilidad (**Figura 30C**), probablemente debido a un efecto de dosis génica.



30. Morfología de las colonias de las cepas *Y. ruckeri* 150R (A), 150R*yraS* (B), 150R *yraS*⁺ (C), 956 (D) y 956*yraS*⁺ (E) en medio agar triptona semisólido (0,6% p/v, agar) con SDS al 0,1% (p/v).

III.3.12. Determinación de la virulencia de la cepa mutante 150*yraS*

La presencia del factor HSF en cepas de *Y. ruckeri* ha sido asociada con una mayor virulencia de estas (Furones y col., 1990). Los experimentos de infección de trucha arcoíris realizados mediante inyección de las cepas parental y mutante en el gen *yraS* dieron un valor de DL₅₀ para la cepa parental de $1,3 \times 10^3$ UFC y mayor de 10^7 UFC para la mutante. Esto indica la implicación del gen *yraS* en el proceso infeccioso.

III.4. LA BOMBA DE EXPULSIÓN DE COMPUESTOS TÓXICOS AcrAB-TolC

III.4.1. Obtención de un mutante sensible al SDS

Una genoteca de aproximadamente 10.000 mutantes de *Y. ruckeri* 150R, construida por transposición del transposón mini-Tn5 Km2, fue utilizada para la obtención de mutantes sensibles al SDS. La genoteca fue analizada por réplica en placa en TSA y TSA con 0,5% de SDS (p/v). Esto permitió la identificación de una colonia incapaz de crecer con SDS.

III.4.2. Análisis *in silico* del operón *acrAB* y del gen regulador *acrR*

La secuenciación de la región adyacente al lugar de inserción del transposón mini-Tn5 en el ADN del mutante seleccionado, reveló la presencia de un marco abierto de lectura de 1179 pb que codifica una proteína de 392 aminoácidos que comparte una elevada identidad aminoacídica con proteínas homólogas a la proteína AcrA de diferentes microorganismos como ZP_04625766 (88%) de *Yersinia kristensenii*, ZP_04639025 (88%) de *Yersinia mollaretii* y ZP_04620399 (88%) de *Yersinia aldovae*, SdeX (78%) de *Serratia marcescens* (Chen y col., 2003) y AcrA (75%) de *E. coli* (Ma y col., 1993). El análisis de la secuencia predice un péptido señal de 24 aminoácidos y una localización en la superficie de la cara periplásmica de la membrana interna. La proteína AcrA de *Y. ruckeri* posee los dominios conservados pfam13437 (familia de proteínas de secreción HlyD, constituida por los translocadores de hemolisinas) y PRK15030 (transportador AcrA de sistema de expulsión de múltiples drogas). La secuenciación de las regiones próximas a este locus permitió la identificación de un segundo marco abierto de lectura de 3153 pb y separado 17 pb en sentido 3' de *acrA*. El producto de este gen consta de 1050 aminoácidos y presenta un alto porcentaje de identidad con AcrB (84%) de *E. coli* (Ma y col., 1993), SdeY (82%) de *S. marcescens* (Chen y col., 2003) y con hipotéticas proteínas homólogas a la proteína AcrB de diferentes microorganismos como ZP_04627600 (94%) de *Y. bercovieri*, ZP_04639026 (94%) de *Y. mollaretii* o YP_001402028 (93%) de *Y. pseudotuberculosis*. El análisis de la secuencia aminoacídica predice que la proteína está localizada en la membrana citoplasmática y contiene 12 regiones transmembrana. La proteína AcrB posee los dominios conservados PRK15127 (proteína AcrB de sistema de expulsión de múltiples drogas) y cl14618 (superfamilia secD_secF, que son proteínas de membrana exportadoras de proteínas). En su conjunto, la región *acrAB* está flanqueada en su extremo 5' por una secuencia promotora hipotética y en su extremo 3' por un terminador de la transcripción independiente de rho (**Figura 31**). De acuerdo con los resultados de identidad obtenidos y el pequeño espacio intergénico hallado (17 pb), los genes *acrA* e *acrB* formarían el operón *acrAB* de *Y. ruckeri* (**Figura 31**). Adyacente a este operón, 142 pb en sentido 5' del gen *acrA* y, en sentido opuesto, se halla un marco abierto de lectura de 651 pb (**Figura 31**). Esta secuencia codifica una proteína de 216 aminoácidos que presenta una identidad significativa con proteínas homólogas a la proteína AcrR como NP_668381 (80%) de *Y. pestis*, YP_004297361 (79%) de *Y. enterocolitica* y YP_001477360 (76%) de *S. proteamaculans*, AcrR

III. Resultados

(65%) de *Enterobacter cloacae* (Pérez y col., 2007) y AcrR (64%) de *E. coli* (Petersen y col., 2006) y *K. pneumoniae* (Källman y col., 2008). La proteína AcrR posee los dominios conservados pfam08361 (familia de represores de la transcripción implicados en el control de la expresión de proteínas de resistencia a múltiples drogas), pfam00440 (proteínas reguladoras de la familia TetR) y PRK10668 (represor de la transcripción de unión a ADN AcrR) (**Figura 31**).

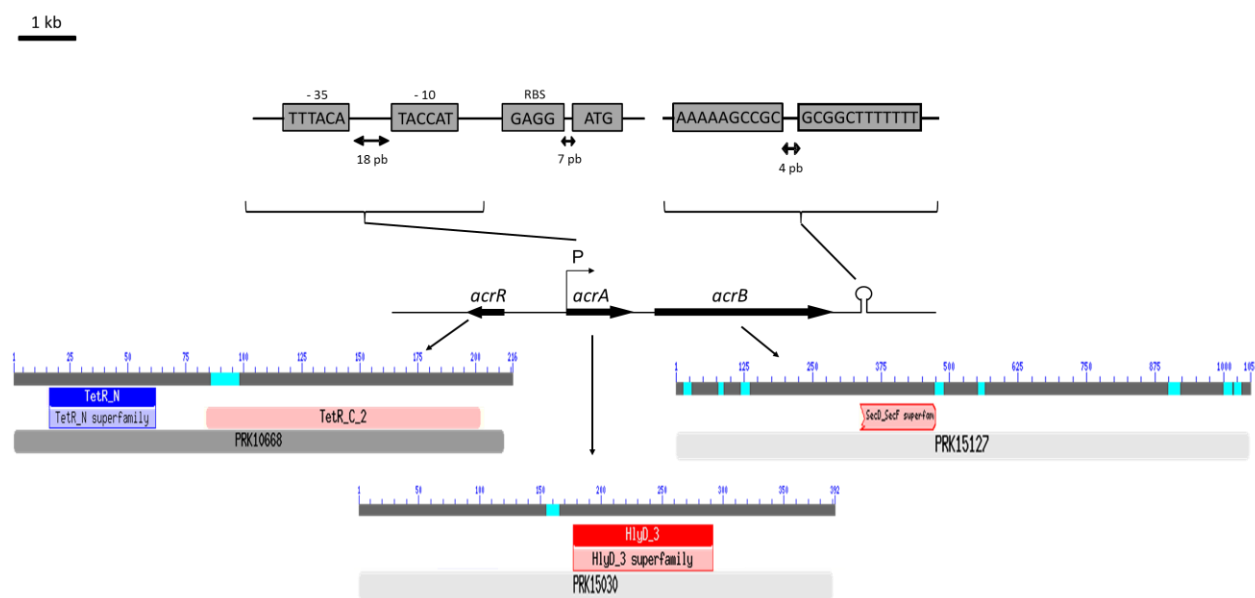


Figura 31. Organización genética de la región que contiene los genes *acrA*, *acrB* y *acrR* de *Y. ruckeri*. En la parte superior se muestra la localización del potencial promotor (P) con sus secuencias correspondientes a las regiones -10 y -35 así como el RBS (GAGG) y el codón de iniciación (ATG). Se indica, asimismo ampliada, la hipotética secuencia del terminador de la transcripción independiente de rho. En la parte inferior, se muestra la longitud relativa al número de aminoácidos del producto de los genes *acrR*, *acrA* y *acrB*. En diferentes colores se indican los dominios de cada proteína: AcrR, dominios PRK10668 en gris, pfam00440 (TetR_N) en azul y pfam08361 (TetR_C_2) en rojo claro; AcrA, dominios PRK15030 en gris claro y pfam13437 (HlyD) en rojo; AcrB, dominios PRK15127 en gris claro y cl14618 (SecD_SecF) en rojo claro. En azul claro se indican las regiones cuya secuencia tiene una composición sesgada y que el programa Blast no utiliza para la búsqueda de dominios en las bases de datos.

III.4.3. Caracterización de la cepa mutante *Y. ruckeri* 150RacrA

III.4.3.1. Susceptibilidad a diferentes detergentes y agentes antimicrobianos

La importancia del sistema AcrAB-ToIC en la expulsión de compuestos tóxicos en muchas bacterias Gram-negativas está ya bien definida. Para determinar el papel que este

sistema puede tener en *Y. ruckeri*, en relación a la resistencia de la bacteria al SDS, se valoró la CMI de este detergente en la cepa parental y la cepa mutante *Y. ruckeri* 150RacrA. Los resultados (**Tabla 15**) indicaron que la cepa mutante tenía una CMI de 0,00625 % (p/v) con respecto al 3,2 % (p/v) de la cepa parental. Ello indicó que el sistema AcrAB es el principal responsable de la resistencia de la bacteria al SDS. Para confirmar si el sistema AcrAB de *Y. ruckeri* estaba también relacionado con la resistencia a otros compuestos tóxicos para la célula, se determinó la CMI de distintos antimicrobianos (rango 0,01 a 20,48 µg/ml), y de los detergentes Triton X-100 (rango 0,0015625 a 12,8% v/v) y sales biliares (0,0015625 a 12,8% p/v). En todos los casos, la cepa parental *Y. ruckeri* 150R mostró una mayor resistencia a los antimicrobianos testados que la cepa mutante *Y. ruckeri* 150RacrA, así como al detergente sintético Triton X-100 y a las sales biliares (**Tabla 15**).

Tabla 15. Valores de la CMI de antimicrobianos (µg/ml) y de los detergentes Triton X-100 (% v/v), SDS (% p/v) y sales biliares (% p/v) para las cepas 150R y 150RacrA de *Y. ruckeri*.

Antimicrobiano o detergente	CMI cepa <i>Y. ruckeri</i> 150R	CMI cepa <i>Y. ruckeri</i> 150RacrA
Acriflavina	10,24	2,56
Ciprofloxacina	0,32	0,08
Cloranfenicol	2,56	1,28
Tetraciclina	0,32	0,16
Ácido oxolínico	5,12	1,28
Oxitetraciclina	0,32	0,16
Triton X-100	12,8	0,0125
SDS	3,2	0,00625
Sales biliares	12,8	0,05

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

IV.1. EL SISTEMA TRANSPORTADOR DE CITRATO YctCBA DE *Y. ruckeri*

El análisis *in silico* de las proteínas YctC, YctB e YctA mostró una clara homología con las proteínas TctC, TctB y TctA de *S. typhimurium*. En esta bacteria, se han descrito tres sistemas diferentes de utilización de citrato (TctI, TctII y TctIII), pero sólo el TctI, correspondiente al sistema TctCBA y homólogo a YctCBA, ha sido bien caracterizado (Widenhorn y col., 1988a; Widenhorn y col., 1988b). Un operón similar está presente en *Corynebacterium glutamicum* (Polen y col., 2007) y *B. pertussis* (Antoine y col., 2005). Además de los operones *tctCBA* de *S. typhimurium* y *C. glutamicum* y *bctCBA* de *B. pertussis*, se han encontrado varios operones que codifican sistemas homólogos en varios géneros de bacterias, pero su función y regulación permanecen desconocidas (Winnen y col., 2003). La familia de transportadores tripartitos de tricarbóxilatos (TTT), cuyo prototipo es el sistema TctCBA de *S. typhimurium*, es tras la de los transportadores ABC, y la de los transportadores periplásmicos tripartitos ATP-independientes (TRAP-T), la tercera familia descrita de sistemas transportadores que dependen de proteínas

IV. Discusión

periplásmicas de unión a sustrato (Nikaido y Hall, 1998; Rabus y col., 1999; Kelly y col., 2001; Winnen y col., 2003). El sistema TctCBA difiere de los dos sistemas de transporte anteriores en que sólo está presente en las bacterias, no habiendo sido descrito en las arqueas (Winnen y col., 2003). Sin embargo, proteínas homólogas a la proteína TctA de *S. typhimurium* aparecen en diferentes arqueas que carecen de las proteínas homólogas de TctB y TctC, al igual que ocurre en otras bacterias. Esto sugiere que la aparición del sistema tripartito de transporte de tricarboxilatos, ha surgido en un tiempo evolutivo relativamente reciente, posterior a la separación de las arqueas y los eucariotas de las bacterias (Winnen y col., 2003).

La regulación de la expresión del operón *yctCBA* de *Y. ruckeri* es multifactorial. La temperatura juega un papel relevante al ser la expresión mayor a 18 °C, temperatura alrededor de la cual ocurren los procesos infecciosos, que a 28 °C, temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. Esta regulación por la temperatura ha sido hallada en otros genes de *Y. ruckeri* seleccionados por el sistema IVET (Fernández y col., 2007; Méndez y col., 2009). La regulación de la expresión de potenciales factores de virulencia dependiente de temperatura también se ha hallado en otras bacterias. Así, en *F. psychrophilum* se han identificado algunos genes que se inducen a temperatura próxima a la que se producen los brotes de la enfermedad, inferior a la óptima de crecimiento (Hesami y col., 2011). Algo similar ocurre con los genes que codifican la flagelina (Karlsen y col., 2008) o la producción de sideróforos de *Vibrio salmonicida* que se expresan más a baja temperatura (Colquhoun y Sørum, 2001). También podemos encontrar ejemplos en patógenos de plantas. Así, dos toxinas, la faseolotoxina (Arrebola y col., 2011; Ullrich y col., 2000) y la coronatina (Weingart y col., 2004) de *Pseudomonas syringae* se expresan más a 18°C que a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria (28 °C) La temperatura también regula la capacidad de adherencia de algunos microorganismos (Cappello y col., 2006; Brown y col., 2002), la síntesis de fimbrias (Walker y col., 1999; Loker y col., 2011) y la formación de biofilm (White-Ziegler y col., 2008; Fitzpatrick y col., 2005).

Otro factor que influyó en la expresión del operón *yctCBA* fue la presencia en el medio de glucosa. Una concentración de glucosa del 0,5% (p/v) fue suficiente para bloquear completamente la expresión del promotor *yctCBA*, siendo un claro ejemplo de represión catabólica. Se ha descrito también que el operón *tctCBA* está sometido a represión catabólica por glucosa (Widenhorn y col., 1989). Este fenómeno esperable desde un punto de vista metabólico, no es un hecho generalizado en todas las bacterias, dado que en *C. glutamicum* el

transporte de citrato no se halla bajo el control de este sistema de regulación (Polen y col., 2007).

Por otra parte, y como era de esperar, la presencia en el medio de los ácidos tricarboxílicos citrato e isocitrato indujo significativamente la expresión del operón *yctCBA*, indicando que está sometido a un sistema de regulación positiva. Mediante el análisis *in vitro* se pudo establecer que a partir de 50 μM y hasta 1 mM de citrato en el medio había un incremento progresivo de la actividad del promotor por lo que podemos concluir que el promotor responde a un modelo de respuesta dosis-dependiente. En los sueros STA y SFB se han hallado concentraciones de citrato de aproximadamente 100 μM y 200 μM , respectivamente. Considerando los aumentos de expresión del promotor *yctCBA* del 24% y 48% al añadir los sueros STA y SFB al medio, respectivamente, se constata que existe una inducción proporcional entre la cantidad de citrato presente en cada suero y el incremento en la actividad β -galactosidasa. Al haber sido diluidos los sueros en una proporción 1:10 en el medio M9C, los resultados obtenidos indican que concentraciones de citrato de 10 μM y 20 μM serían suficientes para inducir el promotor *yctCBA*. No obstante, los experimentos de regulación realizados con M9C y diferentes concentraciones de citrato indicaron que la concentración mínima de este compuesto necesaria para desencadenar la inducción del promotor era 50 μM , por lo que no se puede descartar que otros inductores del operón estén presentes en los sueros. La inducción en presencia de citrato de sistemas transportadores de tricarboxilatos se ha visto en otras bacterias. Un ejemplo es el operón *bctCBA* de *B. pertussis* (Antoine y col., 2005). En esta bacteria la proteína BctC tiene un papel clave en esta inducción por citrato, siendo, al mismo tiempo, el componente periplásmico del sistema transportador y el de la cascada de señalización que, en presencia de citrato, se une a éste y desencadena un aumento de la expresión del operón *bctCBA* (Antoine y col., 2005). En *S. typhimurium*, también el citrato y el isocitrato, y en menor medida el cis-aconitato, inducen el sistema TctCBA (M.H. Saier Jr., resultados no publicados).

El resultado encontrado en el análisis del STA indica que el citrato está presente en el suero en concentraciones que lo hacen útil como nutriente. A pesar de ello, no se obtuvieron diferencias en el crecimiento entre la cepa parental 150R y la cepa mutante 150R*yctC* cuando estas cepas se crecieron en el medio M9 con un 5% de STAo. Parece ser que, en medios nutricionales complejos, la utilización del citrato no es esencial para el crecimiento bacteriano.

IV. Discusión

Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que en ciertas condiciones como la de escasez de nutrientes, la capacidad para usar citrato conceda una ventaja a *Y. ruckeri*. De hecho, los estudios de crecimiento realizados con citrato mostraron que la inactivación del gen *yctC* bloqueaba completamente la utilización de éste por la cepa mutante 150R*yctC*, siendo esta, al contrario que la cepa parental, incapaz de crecer cuando en el medio la única fuente de carbono presente era el citrato. Esto sugiere además, que, aunque podrían existir en *Y. ruckeri* otros sistemas transportadores de citrato, como se desprende del análisis del genoma de *Y. ruckeri* ATCC 29473 (ACCC00000000), en las condiciones ensayadas el sistema YctCBA era el único sistema activo capaz de transportar citrato. Sin embargo, en *S. typhimurium*, los mutantes que carecen del sistema TctCBA, aunque no crecían en isocitrato y cis-aconitato, sí que lo hacían, de manera pobre, en citrato (Somers y col., 1981).

A pesar de la considerable concentración de citrato en el STA y de haber sido seleccionado como un clon *ivi*, parece ser que el operón *yctCBA* no está implicado en la virulencia. Además, este operon, no es un sistema esencial para el crecimiento *in vivo* y no parece pues representar una ventaja para la supervivencia y la progresión de la bacteria en el hospedador. Estos resultados contrastan con los obtenidos en las bacterias fitopatógenas *Pectobacterium atrosepticum* (Urbany y col., 2008) y *Xanthomonas campestris* (Tamir-Ariel y col., 2007), en las cuales la absorción de citrato está implicada en virulencia.

En definitiva, el sistema transportador de citrato YctCBA de *Y. ruckeri* está constituido por tres proteínas, una periplásmica (YctC) y dos de membrana (YctB e YctA), implicadas en el transporte de tricarboxilatos al interior celular, donde estos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos pueden ser utilizados (**Figura 29**). El ciclo de los ácidos tricarboxílicos es de una importancia central para el metabolismo en general y para la producción de aminoácidos en particular, dado que provee los precursores biosintéticos de las familias de aminoácidos del aspartato y el glutamato (Polen y col., 2007). El transporte del citrato a través del sistema YctCBA y su posterior entrada en el ciclo permitirían el crecimiento de *Y. ruckeri* utilizando este sustrato como única fuente de carbono y energía. Dado el considerable nivel de citrato es posible que durante la infección pueda ser utilizado el citrato como una fuente de adicional de carbono de utilidad inmediata para la bacteria.

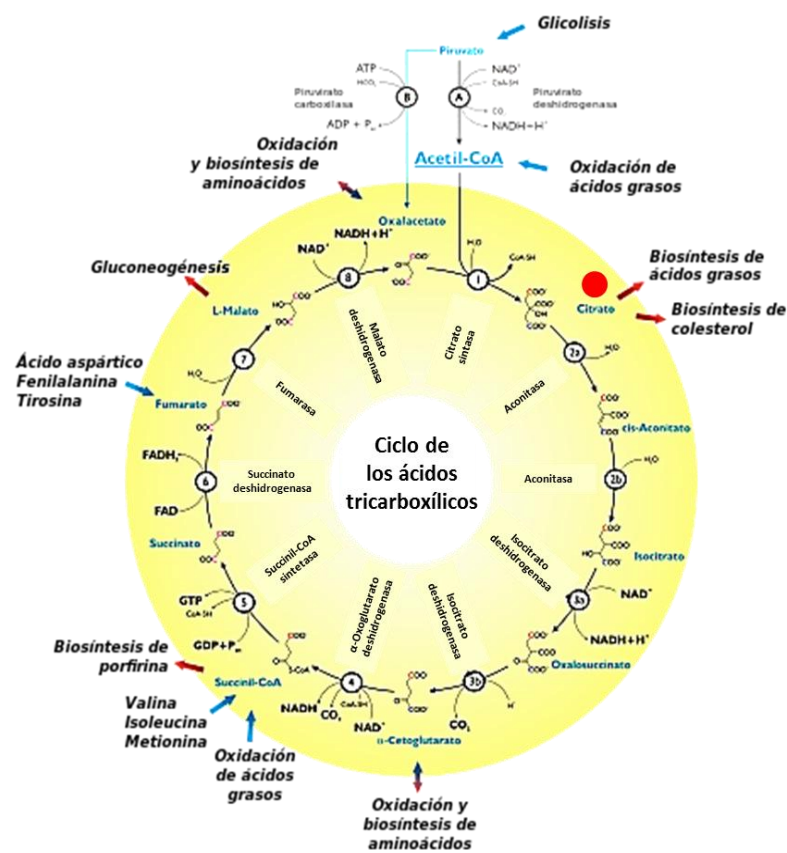
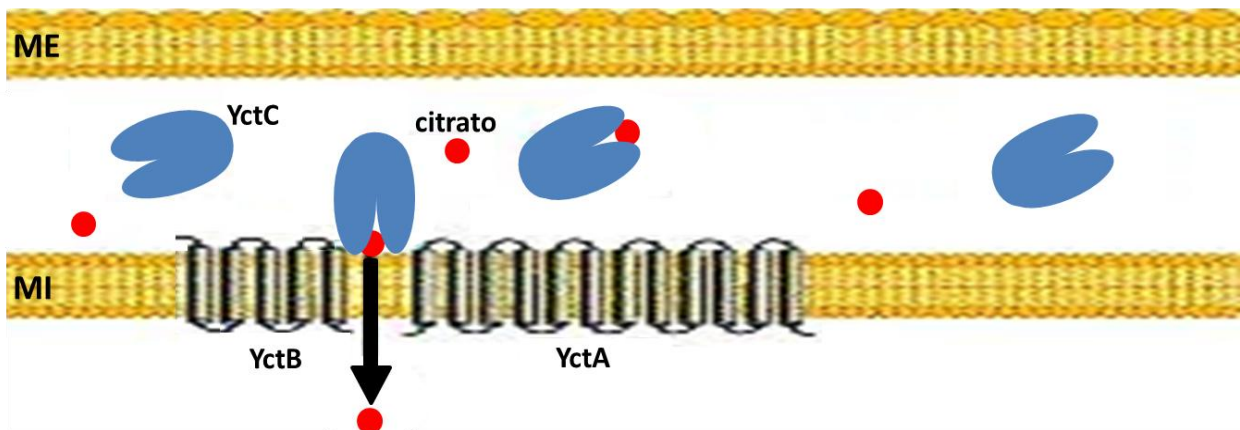


Figura 29. Modelo de transporte del citrato a través del sistema YctCBA de *Y. ruckeri* en base al análisis del operón *yctCBA* y de los estudios realizados en otros transportadores tripartitos de tricarbóxilatos. ME y MI, membranas externa e interna, respectivamente. Las proteínas YctC, YctB e YctA forman un sistema de transporte que permite la entrada del citrato al citoplasma desde el espacio periplásmico. Las proteínas YctB e YctA son proteínas integrales de membrana, mientras que YctC es una proteína soluble del periplasma. La unión de la proteína YctC con el citrato precede al transporte de este soluto a través de las proteínas YctB e YctA. Las flechas en rojo indican las diferentes rutas metabólicas en las que puede ser incorporado el citrato. (Imágenes tomadas y modificadas de Antoine y col. (2005) y https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ciclo_de_Krebs-es.svg)

IV.2. LAS PROTEASAS HIPOTÉTICAS YrpA E YrpB

Las proteasas hipotéticas YrpA e YrpB, por sus dominios y homologías, se pueden incluir en la familia de peptidasas U32, una amplia familia de enzimas cuyo centro catalítico es desconocido. La colagenasa PrtC de *Porphyromonas gingivales* es la mejor caracterizada de todas las peptidasas U32 (Kato y col., 1992), además de ser la primera en ser clasificada en esta familia. YrpA presenta sólo una identidad del 27% con la colagenasa de *P. gingivalis*. Por el contrario, con una proteasa de *P. mirabilis*, también perteneciente a la familia U32, que ha sido parcialmente caracterizada (Zhao y col., 1999), presenta una identidad del 85%. Esto refleja la heterogeneidad que existe entre los miembros de esta familia de enzimas proteolíticas. La familia de peptidasas U32 también está presente en bacterias Gram-positivas. Así, se han identificado miembros de esta familia en *Streptococcus mutans* (Ioannides, 2004; Carson, 2006) y *Streptococcus agalactiae* (Carson, 2006).

Las predicciones realizadas en el análisis de los productos proteicos de los genes *yrpA* e *yrpB* con los programas informáticos PSORTb y SignalP, que postulan la posible localización celular y la existencia o no de péptido señal, respectivamente, coinciden con las definidas para las proteasas de *P. gingivalis* (Kato y col., 1992) y *P. mirabilis* (Zhao y col., 1999). En todos los casos, serían proteínas sin péptido señal y de localización citoplásmica. Estas características no se ajustan a los resultados presentados en los respectivos trabajos, puesto que, estos apoyan la idea de que las proteasas son secretadas (Kato y col., 1992; Zhao y col., 1999). Asimismo, los resultados de los experimentos realizados con la colagenasa de *H. pylori* (Kavermann y col., 2003) sugieren también que ésta es secretada. El hecho de que la familia de endopeptidasas U32 es de constitución relativamente reciente y que está poco caracterizada, podría explicar la ausencia de concordancia entre las predicciones de los programas PSORTb y SignalP y los resultados obtenidos en la experimentación. No obstante, si parece haber una coincidencia clara entre la carencia de un péptido señal clásico en el extremo amino-terminal de estas proteasas y la predicción del programa SignalP. Kavermann y col. (2003) sugieren que la colagenasa analizada de *H. pylori* debe de ser secretada por un mecanismo específico apoyándose en esa carencia de un péptido señal típico.

Los microorganismos que poseen un operón homólogo al operón *yrpAB* de *Y. ruckeri* son anaerobios o anaerobios facultativos. Curiosamente, el operón *yrpAB* se halla adyacente al operón *cdsAB* (Méndez y col., 2011), que también se encuentra exclusivamente en

microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos y cuyo promotor *Pcds* se induce en el interior del pez y en condiciones de limitación de oxígeno (Méndez y Guijarro, 2013). Es conocido que el intestino de los vertebrados tiene microambientes anaerobios y microaerobios. La limitación de oxígeno en el intestino parece ser uno de los desencadenantes de la expresión de genes de virulencia en bacterias patógenas que colonizan el intestino como *V. cholerae* (Liu y col., 2011), *Shigella* (Marteyn y col., 2010), *Salmonella* (Francis y col., 1992; Khullar y col., 2003) y *E. coli* (Schüller y Phillips, 2010), si bien, los mecanismos implicados en su regulación aún no están bien definidos. Todos los datos apuntan a que algo similar podría ocurrir en *Y. ruckeri*, en el cual tendría lugar una inducción, en el ambiente microaerobio de la superficie de la mucosa intestinal, de las proteasas hipotéticas YrpA e YrpB. En este sentido, hay que tener en cuenta que Méndez y Guijarro (2013) han determinado que el intestino de la trucha arcoíris es el principal órgano afectado en infecciones por *Y. ruckeri*.

Otro factor que indujo la expresión del operón *yrpAB* fue la presencia en el medio de cultivo de peptona de caseína. Se conocen otras proteasas cuya producción es inducida por peptona. Así, Robbertse y col. (1978) y Reid y col. (1980) demostraron la inducción de la síntesis de una colagenasa en presencia de peptona en *Vibrio alginolyticus*, Sin embargo, y como ocurre en el caso de las proteasas hipotéticas YrpA e YrpB, la gelatina, no tenía efecto alguno sobre la producción de la colagenasa en *V. alginolyticus* (Robbertse y col., 1978). Robbertse y col. (1978) concluyeron que, puesto que la colagenasa de *V. alginolyticus* era inducida por el colágeno y sus fragmentos de alto peso molecular (Keil-Dlouha y col., 1976), la peptona probablemente contuviese esos fragmentos con capacidad inductora, fragmentos que no se hallaban en la gelatina, a pesar de ser un producto de la degradación del colágeno. Es posible que la peptona de caseína utilizada en los experimentos con *Y. ruckeri* contenga fragmentos de alto peso molecular con capacidad para inducir la síntesis de las proteasas potenciales YrpA e YrpB.

El hecho de que cuando se asociaron ambas condiciones, es decir, la presencia del hidrolizado enzimático de caseína en el medio de cultivo junto a la microaerobiosis, se produjese una inducción mucho mayor del operón *yrpAB* (del orden de cuatro veces más) indica que se produce una sinergia. De esto se puede deducir que la respuesta que provocan estos dos factores en *Y. ruckeri* ha de estar mediada por secuencias y elementos reguladores diferentes.

IV. Discusión

Por otro lado, se observó que el operón *yrpAB* no estaba sometido a regulación por glucosa, casaminoácidos, leucina, glutamina, prolina o amonio. La producción de muchas proteasas bacterianas está regulada, en general de manera negativa, en presencia de distintas fuentes de carbono o nitrógeno, probablemente como un sistema de ahorro energético. Así, la síntesis de la proteasa Yrp1 de *Y. ruckeri* es reprimida por amonio y por glucosa y otras fuentes de carbono, y parece hallarse bajo represión catabólica (Secades y Guijarro, 1999). El exceso de amonio o glucosa reprime la producción de una serina proteasa de *Bacillus licheniformis* (Hanlon y col., 1982). La síntesis de dos colagenasas de *V. alginolyticus* es inhibida por casaminoácidos y glucosa (Robbertse y col., 1978; Reid y col., 1980). La producción de otra colagenasa de *V. alginolyticus* (Reid y col., 1978) se halla sometida a represión por glucosa y otras fuentes de carbono, casaminoácidos, amonio y varios aminoácidos, incluyendo la prolina, la leucina y la glutamina. Puesto que, las distintas fuentes de carbono o nitrógeno ensayadas no ejercen efecto alguno en la regulación de la expresión del operón *yrpAB*, siendo este un aspecto diferencial con lo que ocurre en la regulación de una gran parte de las proteasas estudiadas, incluida la proteasa Yrp1 de *Y. ruckeri* (Secades y Guijarro, 1999), se puede sugerir que, probablemente, la función del operón *yrpAB* no sea de tipo nutricional y esta, esté más relacionada con aspectos relativos al progreso del proceso infeccioso como factor de virulencia, hecho apoyado por los resultados de DL_{50} obtenidos para el mutante en el gen *yrpA*.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los muestras de sobrenadante procedentes de cultivos de la cepa parental de *Y. ruckeri* no degradaron colágeno de tipo I en las condiciones ensayadas. Tampoco degradaron colágeno de tipo IV, gelatina o caseína, ni glicoproteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, la vitronectina o la laminina. Por otra parte, en los ensayos de actividad proteolítica utilizando el sustrato azocaseína, solo se detectó actividad cuando el sobrenadante utilizado procedía de cultivos a 18 °C en el medio CN, pero no cuando procedía de cultivos a 28 °C o de cultivos en el medio M9CG con peptona. Probablemente, la actividad observada se debe a la proteína Yrp1, cuya producción es reprimida por la presencia en el medio de cultivo de glucosa y amonio, componentes del medio M9CG, y es bloqueada completamente a 28 °C (Secades y Guijarro, 1999). Sin embargo, estos resultados son incongruentes con los observados en los zimogramas con gelatina y caseína, pues a pesar de que las muestras utilizadas procedían de cultivos en microaerobiosis a 28 °C y en el medio M9CG con peptona, se detectó una banda de hidrólisis de aproximadamente 50

kDa, compatible con el peso molecular de la proteasa Yrp1, de 47 kDa (Secades y Guijarro, 1999), tanto en la cepa parental 150 como en las cepas mutantes 150*yrpA* y 150*RyrpB*. Aunque la diferente naturaleza de los ensayos utilizados podría justificar estos resultados, en principio no concordantes, tampoco se puede descartar que la banda de hidrólisis observada en los zimogramas sea consecuencia de la actividad de una nueva proteasa de *Y. ruckeri*.

Las hipotéticas proteasas codificadas por los genes YrpA e YrpB no parecen estar implicadas en la degradación de sustratos que otras proteasas de la familia de peptidasas U32 sí son capaces de hidrolizar. No obstante, en muchos casos, como el de la proteasa STM-proteaseA de *P. mirabilis* el sustrato natural se desconoce, pues los ensayos que permitieron su caracterización se llevaron a cabo con el sustrato azocaseína (Zhao y col., 1999), mientras que, la colagenasa de *H. pylori* degrada colágeno de tipo I (Kavermann y col., 2003). La colagenasa PrtC de *P. gingivalis*, es la única enzima, miembro de la familia de peptidasas U32, que ha sido caracterizada bioquímicamente, definiéndose como una metaloproteasa dependiente de calcio que degrada colágeno de tipo I (Kato y col., 1992). Las colagenasas Smcol1 y Smcol2 de *S. mutans* y las colagenasas Gbscol1 y Gbscol2 de *S. agactiae* degradan colágeno de tipo I y gelatina (Ioannides, 2004; Carson, 2006). En cambio, la colagenasa PrtC de *P. gingivalis* no degrada gelatina (Kato y col., 1992), siendo esto una muestra más de la heterogeneidad de esta familia de proteasas. Dada la variabilidad que caracteriza a la familia de proteasas U32, es posible que las proteasas hipotéticas YrpA e YrpB tengan un sustrato muy distinto del que tienen las proteasas homólogas de los otros microorganismos. Por otro lado, y aunque se ensayaron diferentes variables en la reacción siempre con extractos obtenidos en las condiciones óptimas de inducción del operón *yrpAB*, no se puede descartar que las éstas no hayan sido las apropiadas para detectar actividad de las proteasas potenciales YrpA e YrpB.

Los experimentos de DL₅₀ realizados con alevines de trucha arcoíris confirmaron la implicación en la virulencia del operón *yrpAB*. Las proteasas de la familia de peptidasas U32 de *P. mirabilis* (Zhao y col., 1999) y *H. pylori* (Kavermann y col., 2003) también son factores de virulencia.

En conclusión, tanto los ensayos de regulación de la expresión realizados que determinan que el operón *yrpAB* se induce en condiciones que se dan típicamente en el interior del pez, como sobre todo los experimentos de DL₅₀, indican que el operón *yrpAB* está implicado en el desarrollo del proceso infeccioso de *Y. ruckeri*. En este sentido, dadas las coincidencias

IV. Discusión

que han sido señaladas con otros sistemas semejantes, y a pesar de la falta de resultados obtenida en el uso de sustratos como colágeno, laminina, etc, las proteasas hipotéticas YrpA e YrpB podrían estar implicadas en la degradación de proteínas de la matriz extracelular que proveyera de aminoácidos y péptidos a *Y. ruckeri* y que, a su vez, permitiera la diseminación de la bacteria a través de los tejidos. De manera alternativa, estas proteasas hipotéticas podrían ser importantes para la degradación de componentes de los sistemas inmunes innato y adquirido, como se ha demostrado en algunos patógenos de mucosas (Pohlner y col., 1987). Sin lugar a dudas, es necesario llevar a cabo más estudios para dilucidar la naturaleza y función de las proteasas hipotéticas que codifican los genes *yrpAB*. La heterogeneidad de la familia de peptidasas U32 así como el desconocimiento existente sobre su sitio activo y su mecanismo catalítico dificultan a la vez que hacen muy atractiva la investigación de esta familia de enzimas.

IV.3. LA ALQUIL SULFATASA YraS

El análisis *in silico* de la proteína YraS mostró que existía una clara identidad (51%) entre esta proteína y la alquil sulfatasa SdsA1 de *P. aeruginosa* (Hagelueken y col., 2006). Las proteínas YraS y SdsA1 pertenecen a un grupo de sulfatasas definidas recientemente, que se caracterizan por contener, además de los dominios cl00446 y COG2015, característicos de la superfamilia de las metalo-beta-lactamasas y de alquil sulfatasas e hidrolasas, respectivamente, un motivo de unión a zinc (THxHxDHxGG-102-E-18-AE-44-H), que también las relaciona con las metalo-β-lactamasas (Hagelueken y col., 2006). La proteína YraS presenta la máxima identidad (72%) con la proteína YP_001155864 de *P. necessarius* y tiene también porcentajes de identidad variables con proteínas de multitud de microorganismos, muy distantes evolutivamente de *Y. ruckeri*, como también, diversos desde el punto de vista del nicho ecológico que ocupan. La ausencia en las bases de datos de secuencias de proteínas con un porcentaje de identidad mayor de este 72% con la secuencia de la proteína YraS, sugiere que la adquisición del gen *yraS* por *Y. ruckeri* podría tener su origen en algún reservorio de bacterias con genomas todavía sin secuenciar que comparten nicho ecológico con *Y. ruckeri*, aunque sean filogenéticamente distantes. El árbol filogenético construido en este trabajo con las secuencias de proteínas homólogas a YraS apoya esta hipótesis, pues son las bacterias evolutivamente más alejadas de *Y. ruckeri* las que se encuentran más próximas a ella, mientras que las más cercanas, como son las enterobacterias *K. oxytoca*, *K. variicola* y *S. enterica*, aparecen en las

ramas más distantes. Aunque la adquisición del gen *yraS* por *Y. ruckeri* no se pueda inferir a partir de este árbol, es probable que el entorno haya ejercido una presión selectiva que ayude al mantenimiento del gen. Las bacterias más próximas en el árbol a *Y. ruckeri* son todas de vida acuática, con la excepción de *Sinorhizobium meliloti*. La pertenencia a este ámbito concreto puede favorecer la transferencia horizontal del gen desde algún microorganismo, distante evolutivamente, a *Y. ruckeri* al compartir nicho con él en alguna fase de su ciclo vital. En ese sentido, cabe destacar la adquisición por transferencia horizontal en *Saccharomyces cerevisiae* de un gen de origen bacteriano que codifica una alquil sulfatasa (Hall y col., 2005). El gen parece proceder de las α -proteobacterias y la enzima que codifica le permite a *S. cerevisiae* utilizar sulfato a partir de diferentes fuentes orgánicas (Hall y col., 2005). Otro resultado interesante en este aspecto, es que se ha encontrado una proteína homóloga de la proteína YraS en varios virus aislados del simbiote *Paramecium bursaria* chlorella (Jeanniard y col., 2013). Los virus participan en la transferencia horizontal de genes a través del mecanismo de la transducción, y habrían podido actuar como vectores en la adquisición de este gen por *Y. ruckeri*. Un análisis detallado de las especies que poseen una proteína homóloga a la proteína YraS y de sus ecosistemas refuerza la tesis de que han sido las condiciones ambientales las que han ocasionado la permanencia de este enzima en estos microorganismos. En ese sentido, por ejemplo, esta el hecho de que muchos microorganismos que habitan la rizosfera como *S. meliloti* y *P. fluorescens* (Duan y col., 2013) o las cepas de *Pseudomonas* sp., recientemente aisladas de la rizosfera de *Populus deltoides* (Brown y col., 2012) poseen una alquil sulfatasa homóloga a la proteína YraS. Además, en otro trabajo se halló una mayor presencia de alquil sulfatasas en las bacterias aisladas de un sitio contaminado de un río respecto a las bacterias aisladas de un sitio sin contaminar del mismo río (White y col., 1985), apoyando esto también la existencia de una presión selectiva ejercida por el ambiente sobre esta clase de enzimas.

Un dato a considerar es que aunque, como se ha descrito, proteínas homólogas de YraS están presentes en muchas especies diferentes de bacterias, hasta ahora, no se ha encontrado ninguna homología de esta con ninguna proteína de otras especies del género *Yersinia*. Esto sugiere de forma clara que la adquisición por *Y. ruckeri* del gen que la codifica puede ser un hecho evolutivo relativamente reciente. Tanto la sugerida transmisión horizontal como la hipótesis de la adquisición reciente por *Y. ruckeri* del gen *yraS*, viene apoyado también por el hecho de que no todas las cepas analizadas de esta especie eran portadoras del gen. En *Y.*

IV. Discusión

ruckeri se ha observado un exceso de haplotipos únicos recientes, así como indicios de aislamiento por distancia (Bastardo, 2012). De hecho, existe una correlación entre las distancias genéticas y geográficas (Bastardo, 2012). Estos resultados revelan cambios en la población de *Y. ruckeri* inducidos por fuerzas biogeográficas, y pueden explicar en parte el hecho de que el gen *yraS* esté presente solo en determinadas cepas. Por otro lado, la alta diversidad genética y la estructura poblacional clonal definida para esta bacteria (Bastardo y col., 2012b), sugiere una adaptación a distintos nichos ecológicos, lo que también podría explicar la presencia diferencial del gen *yraS* en las distintas cepas de *Y. ruckeri*.

Los experimentos de crecimiento en medio sólido con SDS, permitieron establecer una relación inequívoca entre la presencia del gen *yraS* en la cepa y el fenotipo HSF⁺. Esta se confirmó cuando la cepa mutante 150R*yraS* y la cepa 956, ambas con fenotipo HSF⁻, fueron complementadas con el gen *yraS*. Este fenotipo es pues el resultado de la acción de la hidrolasa sobre el SDS del medio de cultivo, que lo degrada hasta 1-dodecanol, que se acumula en el medio proporcionando a la colonia el fenotipo característico HSF⁺. Este fenómeno también se ha observado en bacterias con alquil sulfatasas como *P. aeruginosa* (Hagelueken y col., 2006) y *Vibrio vulnificus* (Bryant y col., 1987). La extensión de esta relación *yraS*/HSF⁺ encontrada en el análisis de 25 cepas de *Y. ruckeri* de diferentes orígenes, permitió consolidar de manera inequívoca que el gen *yraS* es el responsable del mencionado fenotipo.

El examen de los extractos celulares de diferentes cepas de *Y. ruckeri* permitió confirmar que la proteína YraS es el factor HSF, definido por Furones y col. (1990) como una banda de aproximadamente 120 kDa en SDS-PAGE. Los experimentos realizados muestran que la presencia del gen *yraS* se asocia inequívocamente con una banda de 120 kDa que se tiñe con negro Sudán, y cuya producción es inactivada por calor, tal y como habían observado Furones y col. (1990) previamente. La banda observada se debe a la hidrólisis del SDS por la proteína YraS. Como consecuencia de esta hidrólisis se produce el ya mencionado 1-dodecanol, que es insoluble en agua y precipita formando una banda opaca en el gel de poliacrilamida. Esta identificación se pudo confirmar posteriormente mediante los experimentos de cromatografía de gases-espectrometría de masas. Aunque la proteína YraS consta de 708 aminoácidos y tiene una masa molecular estimada de 78,7 kDa, la banda de hidrólisis que se observó tenía un tamaño aproximado de 120 kDa. La formación de un dímero por la proteína YraS, como lo hace

la alquil sulfatasa SdsA1 de *P. aeruginosa* (Hagelueken y col., 2006), daría explicación a este hecho.

La capacidad de degradación de SDS que presentaron las cepas con fenotipo HSF⁺ sugería una posible implicación de la proteína YraS en la elevada resistencia al detergente que muestra *Y. ruckeri*. Sin embargo, los experimentos de determinación de la CMI del SDS han revelado que las cepas que poseen el gen *yraS* no presentan por ello una mayor resistencia al detergente. Estos resultados indican que la alquil sulfatasa YraS no participa al menos de manera relevante en este fenotipo de tolerancia a una alta concentración del SDS y que debe de haber otro sistema responsable del mismo. Hasta la fecha, no se ha demostrado la implicación en la resistencia bacteriana al SDS de ninguna enzima del tipo alquil sulfatasa

Los experimentos de crecimiento realizados en el medio CN con 0,25% (p/v) de SDS en los que la cepa mutante 150R*yraS* una vez alcanzada la fase estacionaria, sufría una disminución en la viabilidad de las células con respecto a la cepa parental, muestran una mayor susceptibilidad al SDS de las células carentes de la proteína YraS. Esto indica que, si bien la enzima no es un mecanismo relevante en el proceso de resistencia al SDS, una vez en la fase estacionaria, cuando las células inician su deterioro, este es más rápido en la cepa carente de la proteína YraS. Esta proteína, que es secretada, puede constituir mediante la degradación del SDS un mecanismo no esencial pero sí importante de resistencia al detergente, en determinados estadios fisiológicos de la bacteria.

Por otro lado, la cepa mutante no presentó degradación alguna del SDS, mientras que la cepa parental degradó totalmente el SDS tras 24 horas de incubación, confirmándose la actividad SDS hidrolasa de la proteína YraS. Cuando la concentración de SDS fue del 0,5% y 1% (p/v), la cepa parental no fue capaz de degradar totalmente el detergente, probablemente debido al agotamiento de los nutrientes antes de que todo el detergente pudiera ser degradado. Aunque la tasa de degradación de SDS que presenta *Y. ruckeri* es considerable, otras bacterias también son capaces de degradar el detergente con una tasa parecida o incluso mayor. Así, *Pseudomonas* ATCC19151 (Jovcic y col., 2009) degrada una concentración de 0,5% (p/v) hasta una concentración residual de 0,01% (p/v) en apenas 12 horas, y *P. putida* (Chaturvedi y Kumar, 2011) degrada totalmente una concentración de 0,3% (p/v) en 24 horas. En este último caso, de manera similar a lo que ocurre en *Y. ruckeri*, la bacteria no es capaz de degradar totalmente concentraciones de SDS del 0,4% y 0,5% (p/v). Con respecto a las

IV. Discusión

enterobacterias, *K. oxytoca* (Shukor y col., 2009) degrada una concentración del 0,1% (p/v) en 72 horas, presentando por lo tanto una tasa de degradación muy inferior a la observada en *Y. ruckeri*. También se halló una tasa sensiblemente inferior en dos cepas aisladas de lodo activado pertenecientes a las especies *Pseudomonas betelli* y *Acinetobacter johnsoni*, pues estas degradaron en cinco días, el 93,6% y 84,6%, respectivamente, de una concentración inicial de 522 mg/l de SDS (Hosseini y col., 2007).

La expresión del gen *yraS* parece ser constitutiva, puesto que la proteína se produce en el medio TSA sin SDS. La producción de alquil sulfatasas en ausencia de alquil sulfatos que actúan como inductores ha sido hallada también en la bacteria Gram-positiva *Rhodococcus ruber* (Pogorevc y Faber, 2003). Esta bacteria produce en un medio complejo sin la presencia de alquil sulfatos dos alquil sulfatasas secundarias y al menos una alquil sulfatasa primaria. Otra bacteria Gram-positiva, *Pectococcus niger*, un anaerobio estricto intestinal, produce una arilsulfatasa de manera constitutiva (Van Eldere y col., 1991). Por otro lado, en los experimentos en los cuales se añadió glucosa al medio M9C con SDS se observó una inhibición de la degradación del SDS en la cepa parental 150R, mostrando el mismo fenotipo que la cepa mutante 150R*yraS*. Este resultado podría ser la consecuencia de un mecanismo de represión catabólica implicado en la regulación del gen *yraS*. Esta represión por glucosa también se observó en una alquil sulfatasa que le permite a *P. aeruginosa* utilizar el sustrato hexil sulfato como fuente de carbono y azufre (Fitzgerald y Knight, 1977). Por lo tanto, sería posible que *Y. ruckeri* utilizara el SDS como una fuente adicional de carbono. Sin embargo, cuando las cepas parental y mutante se incubaron en el medio M9 tanto líquido como sólido con diferentes concentraciones de SDS, no se observó crecimiento alguno. Este resultado contrasta con lo observado en otras bacterias que degradan el detergente. Así, *P. aeruginosa* (Hagerlueken y col., 2006) es capaz de crecer con 0,1% (p/v) de SDS como única fuente de carbono. También *Pseudomonas* ATCC 19151 (Jovcic y col., 2009) y *P. putida* (Chaturvedi y Kumar, 2011) pueden crecer cuando la única fuente de carbono presente en el medio es el SDS. Además, cuando se añadieron diferentes concentraciones de SDS al medio M9C, tampoco se observó un mayor crecimiento de la cepa parental con respecto a la cepa mutante. En definitiva, en *Y. ruckeri* la degradación del SDS mediante la proteína YraS no está relacionada con la utilización de este detergente como fuente de carbono. La incapacidad de *Y. ruckeri* 150R para utilizar el SDS

como fuente de carbono podría deberse a la ausencia de proteínas transportadoras de 1-dodecanol o de enzimas que oxiden este compuesto.

Por otro lado, la presencia en el medio de cultivo de diferentes concentraciones de sulfato, no produjo alteración alguna en la degradación del SDS, lo que sugiere que el sulfato no está implicado en la regulación del gen *yraS*. En *P. niger*, la inducción de dos esteroide sulfatasas es suprimida por dos formas reducidas de azufre, la taurina y el sulfito, que además inhiben la actividad de estas enzimas y de una arilsulfatasa (Van Eldere y col., 1991). El sulfato también inhibe las actividades arilsulfatasa y esteroide sulfatasa de los extractos celulares de la bacteria (Van Eldere y col., 1991). Los resultados de este trabajo sugieren que la función principal de estas enzimas en *P. niger* es la de proveer de azufre a la bacteria. En otras bacterias se ha descrito la regulación de la síntesis de sulfatasas en condiciones limitantes de sulfato. Así, la arilsulfatasa AtsA de *P. aeruginosa* (Boltes y col., 2001) y la alquil sulfatasa AtsK de *P. putida* (Kahnert y Kertesz, 2000; Müller y col., 2004) y *P. aeruginosa* (Quadroni y col., 1999) se producen en condiciones de escasez de sulfato. El conjunto de resultados observados en otras bacterias contrasta con los resultados obtenidos en *Y. ruckeri*, y sugiere que la proteína YraS podría tener una función muy distinta a la de esas otras sulfatasas.

Los experimentos realizados con las diferentes cepas de *Y. ruckeri* en medio semisólido con SDS permitieron identificar un fenotipo de motilidad de tipo swarming en la cepa parental 150R y en la cepa complementada 956 *yraS*⁺, fenotipo que no estaba presente en las cepas 150R*yraS* y 956. Estos resultados sugieren que la expresión del gen *yraS* en determinados ambientes naturales que contienen SDS podría facilitar la motilidad de tipo swarming en *Y. ruckeri*. Las células que presentan desplazamiento de tipo swarming sufren una diferenciación morfológica que las distingue de las células en estado planctónico. Estas células, que se hallan en el frente de migración, se caracterizan por ser hiperflageladas y mucho más alargadas y por desplazarse en grupos de células conectadas entre sí lateralmente conocidos como rafts (Köhler y col., 2010; Rashid y Kornberg, 2000; Julkowska y col., 2004). El significado ecológico de la motilidad de tipo swarming permanece desconocido. Sin embargo, en *S. typhimurium* se ha observado que las células que se desplazan activamente con motilidad de tipo swarming muestran una elevada resistencia a determinados antibióticos con respecto a las células no diferenciadas (Kim y col., 2003). Esta mayor resistencia a los antibióticos en células que presentan el fenómeno del swarming también se ha observado en *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S.*

IV. Discusión

marcescens, *Burkholderia thailandensis* y *B. subtilis* (Lai y col., 2009). Es posible que las cepas de *Y. ruckeri* que poseen la proteína YraS respondan ante la presencia de SDS en ambientes muy concretos con un desplazamiento de tipo swarming para protegerse de este compuesto tóxico. Por otro lado, los surfactantes como el SDS, además de promover el fenómeno del swarming, aumentan la biodisponibilidad mediante el incremento de la solubilidad de los hidrocarburos o de la hidrofobicidad de la superficie de los consumidores de hidrocarburos (Arino y col., 1998; Zhang y Miller, 1992; Zhang y Miller, 1994), y son potentes agentes antimicrobianos (Andersen y col., 2003; Carrillo y col., 2003). Los compuestos hidrofóbicos están frecuentemente asociados a superficies, y los surfactantes junto con el fenómeno del swarming podrían contribuir a la nutrición bacteriana (Kearns y col., 2010). Alternativamente, la motilidad de tipo swarming podría funcionar como una estrategia en la cual los surfactantes utilizados para el desplazamiento sobre una superficie simultáneamente previenen la colonización y crecimiento de los microorganismos competidores (Kearns y col., 2010). Por lo tanto, son varios los mecanismos a través de los cuales *Y. ruckeri* podría sacar provecho del desplazamiento de tipo swarming observado en medio semisólido con SDS.

La presencia en una cepa del factor HSF, ahora redefinido como la proteína YraS, había sido asociada previamente con la virulencia (Furones y col., 1990; Furones y col., 1993). Los experimentos de DL_{50} llevados a cabo en trucha arcoíris mediante inyección intraperitoneal de las cepas parental 150 y mutante 150*yraS* han determinado que efectivamente la proteína YraS está implicada en el proceso infeccioso de *Y. ruckeri*. Se trata en este caso de un factor de virulencia esencial, sin el cual la bacteria es incapaz de producir la enfermedad, puesto que la cepa mutante 150*yraS* se comportó en los experimentos de DL_{50} como una cepa avirulenta. No está claro cómo una alquil sulfatasa puede desempeñar un papel tan importante en la virulencia de *Y. ruckeri*. Apenas existen trabajos que relacionen enzimas de tipo sulfatasa con la patogenicidad bacteriana. Es posible que la proteína YraS le permita a la bacteria resistir la acción citotóxica de compuestos producidos por el pez. En ese sentido, cabe destacar el aislamiento en animales acuáticos de alquil sulfatos con actividad citotóxica y/o antiproliferativa. Estos compuestos bioactivos se han hallado sobre todo en equinodermos (Findlay y col., 1990; Findlay y col., 1991; Roccatagliata y col., 1997) y ascidias (Tsukamoto y col., 1994; Fujita y col., 2002; Crispino y col., 1994; Aiello y col., 1997a; Aiello y col., 1997b; De Rosa y col., 1997; Aiello y col., 2000; Aiello y col., 2001; Imperatore y col., 2012), aunque

también en esponjas (Nakao y col., 1993). *Y. ruckeri* por medio de la actividad hidrolasa de la proteína YraS podría degradar un compuesto de este tipo y, una vez eludido este mecanismo de defensa del pez, producir la enfermedad. Por otra parte, una clase de sulfatasas, las mucina sulfatasas, han sido relacionadas con la patogenicidad de varias bacterias. Las mucinas contienen antígenos de grupos sanguíneos, incluidos los grupos sialil y sulfosialil implicados en procesos de reconocimiento bacteriano y en el tráfico de leucocitos (Nieuw y col., 1998). Una de las funciones primordiales de las mucinas es la de hacer de barrera protectora entre las células epiteliales y los agentes potencialmente dañinos que hay en el lumen del tracto gastrointestinal, como por ejemplo las bacterias que lo colonizan (Corfield y col., 2001). Existen evidencias de que la sulfatación podría proteger a las mucinas de la degradación por las glicosidasas bacterianas, puesto que la desulfatación por las mucina sulfatasas es el paso limitante en la degradación bacteriana (Roberton y Wright, 1997). Este hecho podría explicar los niveles incrementados de ésteres de sulfato en las mucinas con mayor población bacteriana, como las del colon y la boca (Roberton y Corfield, 1999). *H. pylori* es una de las pocas bacterias en las cuales se ha sugerido una relación entre la posesión de sulfatasas y la patogenicidad. Así, se detectaron bajos niveles de sulfomucina en las muestras gástricas de pacientes infectados con la bacteria (Slomiany y col., 1992). Aunque se desconoce si la degradación de la mucina por mucina sulfatasas es la causa principal de la enfermedad, sí se cree que contribuye a la severidad de la misma (Roberton y Corfield, 1999). También se ha sugerido que las mucina sulfatasas pueden jugar un papel en la invasión del tejido pulmonar por los patógenos oportunistas *P. aeruginosa* y *B. cepacia*, especialmente en pacientes con depuración de mucosa disminuida, lo cual es común en la fibrosis quística (Jansen y col., 1999; Govan y Deretic, 1996). Se ha propuesto que todas estas sulfatasas aparte de proveer de azufre y nutrientes, podrían exponer sitios de adhesión a las bacterias que las poseen. En ese sentido, es posible que *P. aeruginosa* use las mucina sulfatasas para eliminar grupos sulfato y así poder acceder a los dominios de unión a mucina Gal(β -1,3)GlcNAc y Gal(β -1,4)GlcNAc (Jansen y col., 1999; Ramphal y col., 1991; Scharfman y col., 1996). La sulfomucina inhibe la unión de *H. pylori* a su elemento normal de adhesión, el galactoesfingolípid-3S, lo que sugiere que la sulfatación puede ser crítica para la colonización inicial patogénica (Piotrowski y col., 1991). Esta idea fue reforzada por el descubrimiento de que dos drogas anti-úlceras comunes, el nitecapone y el sucralfato, que son eficaces contra la infección por *H. pylori*, disminuían de manera significativa la actividad desulfatasa de las mucina sulfatasas (Murty y col., 1992; Slomiany y col., 1992). Los

IV. Discusión

sulfátidos, como las mucinas, son también sustratos de distintas sulfatasas. Así, en un clado (linaje) que agrupa a cepas virulentas de *V. vulnificus* se ha hallado una isla genómica (región XII) que contiene los genes codificantes de cuatro arilsulfatasas y una alquil sulfatasa (Cohen y col., 2007; Gulig y col., 2010), enzimas que degradan los sulfátidos. Estos gangliósidos son componentes importantes del tejido conectivo implicados en la adhesión celular y funcionan como receptores de varios microbios patógenos como el VIH (Bhat y col., 1991), *B. pertussis* (Hannah y col., 1994) y *H. pylori* (Kamisago y col., 1996). La presencia de las sulfatasas en cepas virulentas de *V. vulnificus* podría permitir la invasión a través de los tejidos, que es característica de la infección por esta bacteria. Además, la existencia en la isla genómica de genes codificantes de arilsulfatasas, condroitinasas y enzimas relacionadas con el transporte y el metabolismo del azufre sugieren que esta región puede tener una función en la absorción de grupos sulfato de componentes del hospedador, proveyendo de esta manera fuentes de azufre y/o carbono y permitiendo la supervivencia de la bacteria en el ser humano, en el cual el azufre libremente disponible es limitado. La región XII podría conferirle a las cepas de *V. vulnificus* que la poseen una ventaja selectiva en el hospedador humano, en el ambiente acuático o en ambos (Cohen y col., 2007). Gulig y col. (2010) también han sugerido la implicación en la virulencia de la isla genómica, dado que esta se halla de manera predominante en un clado en el que se agrupan mayoritariamente cepas clínicas (Cohen y col., 2007). Aparte de las mucinas y los sulfátidos, otro sustrato de las sulfatasas son los glicosaminoglucanos. La capacidad de las bacterias para sobrevivir con glicosaminoglucanos como único nutriente se conoce desde hace tiempo (Dodgson y col., 1982). Se han caracterizado enzimas de este tipo en *Proteus vulgaris*, *Bacteriosides theitomicron* y *Flavobacterium heparinum* (Hanson y col., 2004). Además, Mougous y col. (2002) han hipotetizado que en las microbacterias estas enzimas podrían actuar sobre los glicosaminoglucanos extracelulares, modulando de esta manera la adhesión bacteriana y participando en la interacción hospedador-patógeno. Por otro lado, en *E.coli* K1, uno de los agentes causales de la meningitis, el gen codificante de una sulfatasa hipotética dota a la bacteria con una mayor capacidad para colonizar el fluido cerebroespinal (Hoffman y col., 2000). Aunque este trabajo establece una relación interesante entre las sulfatasas bacterianas y la patogenicidad, se desconoce la función exacta de esta sulfatasa potencial. Por lo tanto, y a pesar de que son varios los trabajos que relacionan las sulfatasas con la capacidad para producir enfermedad de las bacterias, la proteína YraS es la primera sulfatasa procariótica cuya implicación en virulencia ha sido demostrada. La alquil sulfatasa YraS tiene probablemente una

función pleiotrópica, y aparte de participar en el proceso infeccioso de *Y. ruckeri*, le podría permitir a la bacteria habitar nichos ecológicos no accesibles a otros microorganismos. Hagelueken y col. (2006) también han sugerido una función pleiotrópica para la alquil sulfatasa SdsA1. Así, observaron una mayor concentración de N-acil homoserina lactonas y una elevada secreción de proteasa en un mutante por transposición que no produce la proteína SdsA1. Por lo tanto, esta enzima podría no solo estar relacionada con el metabolismo y la adquisición del azufre, sino que podría también afectar indirectamente al quorum sensing en *P. aeruginosa*. En el caso de *Y. ruckeri*, la proteína YraS, además de desarrollar un papel esencial para la virulencia, puede contribuir a la nutrición de la bacteria, ya sea de manera directa al utilizar alquil sulfatos como los sulfolípidos de cadena larga presentes en algas (Dodgson y col., 1982), o indirectamente a través del mecanismo asociado al fenómeno del swarming anteriormente descrito. Por otro lado, la proteína YraS, también mediante mecanismos asociados al desplazamiento de tipo swarming, podría contribuir a la resistencia de *Y. ruckeri* frente a los agentes antimicrobianos o a la supervivencia y predominio de la bacteria en situaciones de competición con otros microorganismos.

Los experimentos realizados con la cepa 150R no excluyen la posibilidad de que la bacteria pueda usar alquil sulfatos distintos del SDS como fuente de carbono gracias a la proteína YraS. En ese sentido, Hagelueken y col. (2006) sugieren que la alquil sulfatasa SdsA1, homóloga de la proteína YraS, podría reconocer una variedad mucho más amplia de sustratos, además del SDS. De hecho, la proteína SdsA1 degrada al menos decil sulfato, octil sulfato y hexil sulfato (Hagelueken y col., 2006). La acción de las enzimas hidrolíticas mayoritariamente sintetizadas y liberadas al entorno por microorganismos permite que el azufre contenido en compuestos orgánicos pueda pasar a formar parte del azufre disponible. Estas enzimas, que incluyen alquil sulfatasas, arilsulfatasas y sulfonatasas, liberan el sulfato de los compuestos orgánicos que lo contienen (Grossman y col., 2009). El anión sulfato, generalmente la forma de azufre más abundante, puede ser tomado por los microorganismos, activado y posteriormente usado para la sulfatación de lípidos, polisacáridos y proteínas. El sulfato activado también puede ser reducido e incorporado en varios compuestos, como los aminoácidos cisteína y metionina. Es posible que *Y. ruckeri* pueda utilizar la enzima YraS para asimilar el carbono y el azufre de los alquil sulfatos de cadena larga presentes en algas (Dodgson y col., 1982) (**Figura 33**). En ese sentido, cabe destacar el hecho de que *Y. ruckeri* haya sido aislada de algas (Coquet

IV. Discusión

y col., 2002). Se ha propuesto que los sustratos fisiológicos de las alquil sulfatasas procarióticas son los alquil diol disulfatos clorinados y no clorinados (Dodgson y col., 1982). Un compuesto sintético relacionado con estos, el octadecano-1,12-disulfato, es un sustrato de alquil sulfatasas primarias y secundarias de *Pseudomonas* C12B (Payne y Painter, 1971). La posible utilización de compuestos sulfatados presentes en algas implicaría la hidrólisis de estos a través de la acción de la proteína YraS, la oxidación catalizada por alcohol deshidrogenasas de los alcoholes producidos, y la posterior oxidación de los aldehídos resultantes a través de aldehído deshidrogenasas (**Figura 33**). Finalmente, los ácidos grasos generados como resultado de la última reacción, mediante su utilización en la ruta metabólica de la β -oxidación (**Figura 33**), harían posible que *Y. ruckeri* obtuviera el carbono y la energía necesaria para crecer.

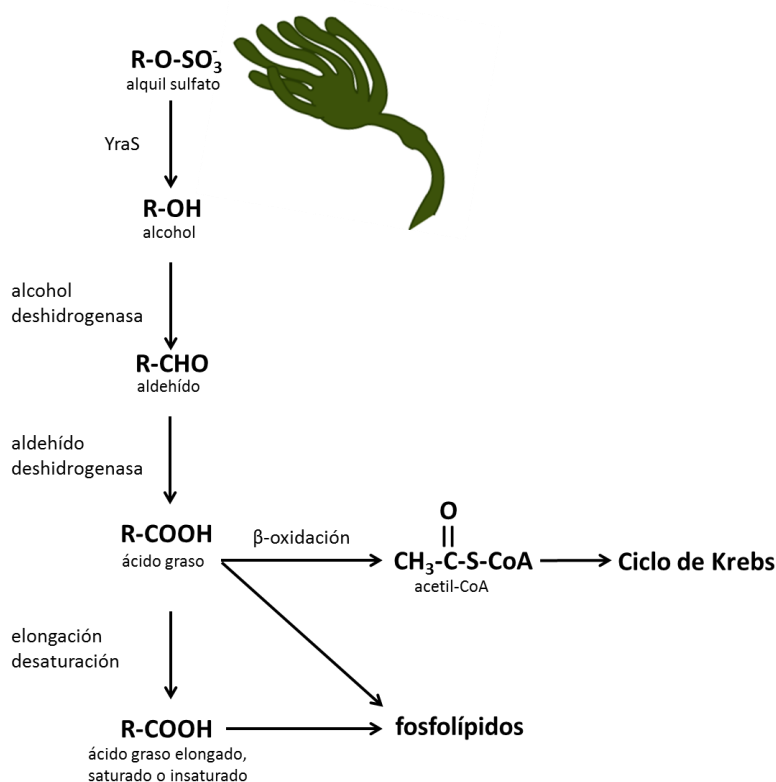


Figura 30. Ruta de degradación hipotética de los alquil sulfatos presentes en algas por *Y. ruckeri*. La primera reacción es catalizada por la proteína YraS. Los productos finales de la vía metabólica son fosfolípidos y acetil-CoA. Este último a través de su entrada en el ciclo de Krebs puede proporcionarle a *Y. ruckeri* la energía necesaria para crecer, además de servir como fuente de carbono mediante su participación en diversas rutas anabólicas.

IV.4. LA BOMBA DE EXPULSIÓN DE COMPUESTOS TÓXICOS AcrAB-TolC

Con el objetivo de hallar el sistema responsable de la elevada resistencia al SDS que presenta *Y. ruckeri*, se construyó una genoteca de mutantes con el transposón mini-Tn5 Km2. El cribado de esta genoteca permitió la selección de un mutante incapaz de crecer con una concentración de SDS del 0,5% (p/v). El gen cuya interrupción es responsable de este fenotipo de elevada sensibilidad al SDS codifica una proteína homóloga de la proteína AcrA, que es un componente del sistema AcrAB-TolC. Este está implicado en la expulsión de una variedad de compuestos que incluye detergentes y antibióticos en bacterias como *E. coli* y *S. enterica* (Nikaido y Zgurskaya, 2001; Baucheron y col., 2004). Los experimentos realizados para determinar la CMI para distintos detergentes y antimicrobianos de la cepa parental 150R y una cepa mutante en el gen *acrA* indican que el sistema AcrAB-TolC de *Y. ruckeri* es el mecanismo responsable de la elevada resistencia al SDS que presenta la bacteria. Además, estos experimentos han permitido demostrar que el sistema AcrAB-TolC también expulsa las sales biliares, el detergente Triton X-100, la acriflavina y los antimicrobianos tetraciclina, oxitetraciclina, ciprofloxacina, cloranfenicol y ácido oxolínico. La CMI para el SDS de la cepa mutante 150R*acrA* fue de un 0,00625% (p/v), muy inferior a la CMI que presentó la cepa parental para este detergente, que fue del 3,2% (p/v). Este resultado indica que, aunque no se puede descartar que *Y. ruckeri* posea otros mecanismos de resistencia al SDS, la bomba de expulsión de compuestos tóxicos AcrAB-TolC es el principal mecanismo de resistencia a este detergente en esta bacteria.

Por otro lado, la considerable diferencia entre la CMI para las sales biliares de la cepa parental (12,8% p/v) y la de la cepa mutante (0,05% p/v), sugiere que el sistema AcrAB-TolC podría contribuir a la capacidad de colonización del intestino que presenta *Y. ruckeri* (Méndez y Guijarro, 2013), al permitirle a la bacteria tolerar las sales biliares que hay en este órgano. Dado que es conocido el importante papel que desempeña el sistema AcrAB-TolC en los procesos infecciosos de muchas bacterias patógenas (Pérez y col., 2012; Padilla y col., 2010; Buckley y col., 2006), se hace imprescindible la realización de experimentos de DL₅₀ que permitan comparar la cepa mutante con la cepa parental y así poder definir si el sistema AcrAB-TolC constituye o no otro mecanismo de patogenicidad de *Y. ruckeri*. Para poder causar infección, las bacterias patógenas han de evitar los efectos causados por los compuestos producidos por el hospedador, y las bombas de expulsión pueden colaborar en esta tarea (Pidcock, 2006).

IV. Discusión

En definitiva, el sistema AcrAB-TolC de *Y. ruckeri* está constituido por tres proteínas implicadas en la expulsión de diferentes compuestos tóxicos al exterior celular. Así, la proteína de la membrana citoplásmica AcrB, se acopla a través de la proteína adaptadora periplásmica AcrA con el canal que forma en la membrana externa la proteína TolC, permitiendo la excreción desde la membrana citoplásmica hacia el medio externo de diferentes compuestos, incluido el SDS (Figura 31).

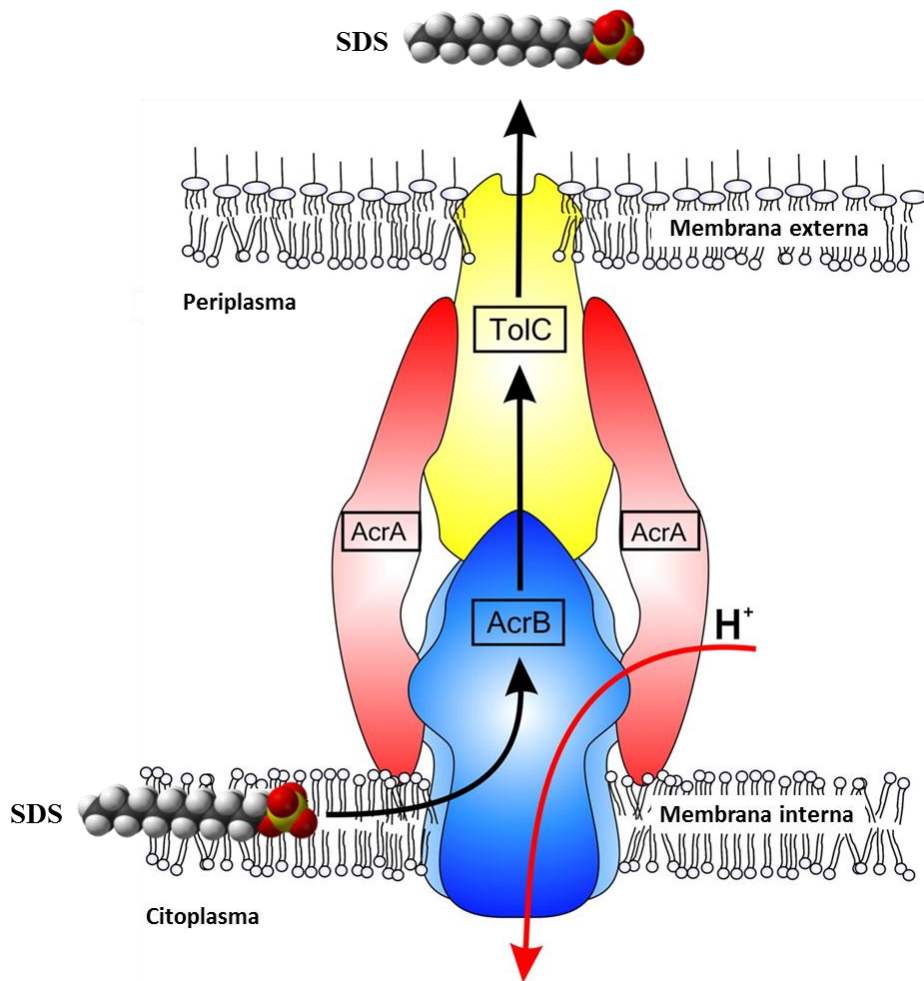


Figura 31. Esquema de la bomba de expulsión de múltiples drogas AcrAB-TolC de *Y. ruckeri* en base al análisis del operón *acrAB* y a los estudios realizados en los sistemas AcrAB-TolC homólogos de otras bacterias.

(Imágenes tomadas y modificadas de Pos (2009) y http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_dodecyl_sulfate)

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. *Y. ruckeri* posee un sistema de transporte de citrato, constituido por una proteína periplásmica de unión a sustrato, YctC, y por dos proteínas de membrana, YctB e YctA. Este sistema se induce en presencia de citrato e isocitrato, se inhibe en presencia de glucosa y está regulado también por la temperatura.
2. El sistema YctCBA le confiere a *Y. ruckeri* la capacidad de crecer utilizando citrato como única fuente de carbono.
3. Las proteasas hipotéticas YrpA e YrpB pertenecen a la familia de peptidasas U32 y están relacionadas con la virulencia de *Y. ruckeri*. Su expresión se induce en presencia de peptona y se halla regulada también por la concentración de oxígeno.
4. La alquil sulfatasa YraS es la proteína responsable del factor sensible al calor (HSF). Esta enzima degrada el detergente SDS y su producción se inhibe en presencia de glucosa.
5. La alquil sulfatasa YraS es un factor de virulencia esencial para *Y. ruckeri*. Su ausencia implica la pérdida de la capacidad patogénica que posee la bacteria.
6. La bomba de expulsión AcrAB-TolC constituye el principal mecanismo de resistencia al SDS en *Y. ruckeri*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- **Abbass, A., Sharifuzzaman, S. M. & Austin, B.** Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* **33**, 31–37 (2010).
- **Abolghait, S. K. et al.** *Aeromonas hydrophila* PepO outer membrane endopeptidase activates human big endothelin-3 in vitro and induces skin ulcer in goldfish (*Carassius auratus*). *Vet. Microbiol.* **145**, 113–121 (2010).
- **Adamowicz, M., Kelley, P. M. & Nickerson, K. W.** Detergent (sodium dodecyl sulfate) shock proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 229–233 (1991).
- **Aiello, A. et al.** Novel bioactive sulfated alkene and alkanes from the mediterranean ascidian *Halocynthia papillosa*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1590–1592 (2000).
- **Aiello, A., Carbonelli, S., Fattorusso, E., Iuvone, T. & Menna, M.** New bioactive sulfated metabolites from the Mediterranean tunicate *Sidnyum turbinatum*. *J. Nat. Prod.* **64**, 219–221 (2001).
- **Aiello, A., Fattorusso, E., Menna, M., Carnuccio, R. & D'Acquisto, F.** Novel antiproliferative alkyl sulfates from the Mediterranean tunicate *Ascidia mentula*.

- Tetrahedron* **53**, 5877–5882 (1997).
- **Aiello, A., Fattorusso, E., Menna, M., Carnuccio, R. & Iuvone, T.** A new antiproliferative sulfated alkene from the Mediterranean tunicate *Microcosmus vulgaris*. *Tetrahedron* **53**, 11489–11492 (1997).
 - **Alfano, J. R. & Collmer, A.** Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *Plant Cell* **8**, 1683–1698 (1996).
 - **Alfano, J. R. & Collmer, A.** Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 385–414 (2004).
 - **Altinok, I., Grizzle, J. M. & Liu, Z.** Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.* **44**, 29–34 (2001).
 - **Ammendola, S. et al.** High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **75**, 5867–5876 (2007).
 - **Andersen, J. B. et al.** Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology* **149**, 37–46 (2003).
 - **Antoine, R. et al.** The periplasmic binding protein of a tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *J. Mol. Biol.* **351**, 799–809 (2005).
 - **Arias, C. R. et al.** First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the USA. *J. Aquat. Anim. Health* **19**, 35–40 (2007).
 - **Arino, S., Marchal, R. & Vandecasteele, J. P.** Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 769–776 (1998).
 - **Arrebola, E., Cazorla, F. M., Pérez-García, A. & Vicente, A. de.** Genes Involved in the Production of Antimetabolite Toxins by *Pseudomonas syringae* Pathovars. *Genes* **2**, 640–660 (2011).
 - **Aspedon, A. & Nickerson, K. W.** A two-part energy burden imposed by growth of *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli* in sodium dodecyl sulfate. *Can. J. Microbiol.* **39**, 555–561 (1993).
 - **Austin, D. A., Robertson, P. A. W. & Austin, B.** Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 127–131 (2003).

VI. Bibliografía

- **Bastardo, A.** Estudio polifásico del patógeno de peces *Yersinia ruckeri*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (2012).
- **Bastardo, A., Ravelo, C. & Romalde, J. L.** A polyphasic approach to study the intraspecific diversity of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in salmonid culture. *Vet. Microbiol.* **160**, 176–182 (2012a).
- **Bastardo, A., Ravelo, C. & Romalde, J. L.** Multilocus sequence typing reveals high genetic diversity and epidemic population structure for the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Environ. Microbiol.* **14**, 1888–1897 (2012b).
- **Baucheron, S. et al.** AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3729–3735 (2004).
- **Bercovier, H & Mollaret, H. H.** in *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Krieg, N.R.) **1**, 498–506 (Williams and Wilkins, 1984).
- **Bertolini, J. M., Wakabayashi, H., Watral, V. G., Whipple, M. J. & Rohovec, J. S.** Electrophoretic Detection of Proteases from Selected Strains of *Flexibacter psychrophilus* and Assessment of Their Variability. *J. Aquat. Anim. Health* **6**, 224–233 (1994).
- **Bhat, S., Spitalnik, S. L., Gonzalez-Scarano, F. & Silberberg, D. H.** Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7131–7134 (1991).
- **Birnboim, H. C. & Doly, J. A.** rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523 (1979).
- **Bjornsdottir, B. et al.** Characterisation of an extracellular vibriolysin of the fish pathogen *Moritella viscosa*. *Vet. Microbiol.* **136**, 326–334 (2009).
- **Boltes, I. et al.** 1.3 Å Structure of Arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* Establishes the Catalytic Mechanism of Sulfate Ester Cleavage in the Sulfatase Family. *Structure* **9**, 483–491 (2001).
- **Bott, M.** Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria. *Arch. Microbiol.* **167**, 78–88 (1997).
- **Brenner, D. J., Krieg, Noel R, Staley, J. T. & Garrity, M. George, G.** *Bergey's manual of systematic bacteriology.* (Springer, 2005).

- **Brown, N. F., Boddey, J. A., Flegg, C. P. & Beacham, I. R.** Adherence of Burkholderia pseudomallei cells to cultured human epithelial cell lines is regulated by growth temperature. *Infect. Immun.* **70**, 974–980 (2002).
- **Bryant, R. G., Jarvis, J. & Janda, J. M.** Use of sodium dodecyl sulfate-polymyxin B-sucrose medium for isolation of *Vibrio vulnificus* from shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1556–1559 (1987).
- **Buckley, A. M. et al.** The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **8**, 847–856 (2006).
- **Bullock, G. L., Maestrone, G., Starliper, C. & Schill, B.** Potentiated Sulfonamide Therapy of Enteric Redmouth Disease. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40**, 101–102 (1983).
- **Busch, R. A. & Lingg, A. J.** Establishment of an Asymptomatic Carrier State Infection of Enteric Redmouth Disease in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* **32**, 2429–2432 (1975).
- **Busch, R. A.** Protective vaccines for mass immunisation of trout. *Salmonid* **1**, 10–22 (1978).
- **Busch, R. A.** Enteric Redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). in *Antigens of Fish Pathogens*. (Anderson, D. P., Dorson, M. & Dubourget, P.) 201–223 (1982).
- **Capkin, E. & Altinok, I.** Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 1147–1153 (2009).
- **Cappello, S. & Guglielmino, S. P. P.** Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Braz. J. Microbiol.* **37**, 205–207 (2006).
- **Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J. & Ortiz, A.** Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta* **1611**, 91–97 (2003).
- **Carson, V.** Cloning and Analysis of Putative Collagenases of the U32 Family in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci). Master of Science Thesis. University of South Florida (2006).
- **Cascon, A. et al.** Cloning, characterization, and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.* **23**, 49–59 (2000).
- **Chaturvedi, V. & Kumar, A.** Bacterial utilization of Sodium Dodecyl Sulfate. *Int. J. Appl.*

- Biol. Pharm. Tech.* **3**, 1126-1131 (2010).
- **Chaturvedi, V. & Kumar, A.** Isolation of a strain of *Pseudomonas putida* capable of metabolizing anionic detergent sodium dodecyl sulfate (SDS). *Iran. J. Microbiol.* **3**, 47–53 (2011).
 - **Cipriano, R. C. & Ruppenthal, T.** Immunization of salmonids against *Yersinia ruckeri*: significance of humoral immunity and cross protection between serotypes. *J. Wildl. Dis.* **23**, 545–550 (1987).
 - **Cohen, A. L. V., Oliver, J. D., DePaola, A., Feil, E. J. & Boyd, E. F.** Emergence of a virulent clade of *Vibrio vulnificus* and correlation with the presence of a 33-kilobase genomic island. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5553–5565 (2007).
 - **Colquhoun, D. J. & Sørum, H.** Temperature dependent siderophore production in *Vibrio salmonicida*. *Microb. Pathog.* **31**, 213–219 (2001).
 - **Coquet, L. et al.** Occurrence and phenotypic characterization of *Yersinia ruckeri* strains with biofilm-forming capacity in a rainbow trout farm. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 470–475 (2002).
 - **Corfield, A. P., Carroll, D., Myerscough, N. & Probert, C. S.** Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front. Biosci.* **6**, D1321–1357 (2001).
 - **Cossarini-Dunier, M.** Protection against enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterin. *J. Fish Dis.* **9**, 27–33 (1986).
 - **Crane, J. K., Naeher, T. M., Shulgina, I., Zhu, C. & Boedeker, E. C.** Effect of zinc in enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* **75**, 5974–5984 (2007).
 - **Crispino, A. et al.** A Sulfated Normonoterpenoid from the Ascidian *Polycitor adriaticus*. *J. Nat. Prod.s* **57**, 1575–1577 (1994).
 - **Dahiya, I. & Stevenson, R. M. W.** The ZnuABC operon is important for *Yersinia ruckeri* infections of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* **33**, 331–340 (2010a).
 - **Dahiya, I. & Stevenson, R. M. W.** The UvrY response regulator of the BarA-UvrY two-component system contributes to *Yersinia ruckeri* infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Microbiol.* **192**, 541–547 (2010b).
 - **Daly, J. G., Lindvik, B. & Stevenson, R. M. W.** Serological heterogeneity of recent isolates of *Yersinia ruckeri* from Ontario and British Columbia. *Dis. Aquat. Org.* **1**, 151–

- 152 (1986).
- **Davies, R. L.** O-serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates. *Vet. Microbiol.* **22**, 299–307 (1990).
 - **Davies, R. L.** Clonal analysis of *Yersinia ruckeri* based on biotypes, serotypes and outer membrane protein-types. *J. Fish Dis.* **14**, 221–228 (1991a).
 - **Davies, R. L.** Virulence and serum-resistance in different clonal groups and serotypes of *Yersinia ruckeri*. *Vet. Microbiol.* **29**, 289–297 (1991b).
 - **Davies, R. L. & Frerichs, G. N.** Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *J. Fish Dis.* **12**, 357–365 (1989).
 - **Dawson, A. M., Trenchard, D. & Guz, A.** Small bowel tonometry: assessment of small gut mucosal oxygen tension in dog and man. *Nature* **206**, 943–944 (1965).
 - **De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & Timmis, K. N.** Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 6568–6572 (1990).
 - **De Rosa, S., Milone, A., Crispino, A., Jaklin, A. & De Giulio, A.** Absolute Configuration of 2,6-Dimethylheptyl Sulfate and Its Distribution in Ascidiacea. *J. Nat. Prod.* **60**, 462–463 (1997).
 - **Dear, G.** *Yersinia ruckeri* isolated from Atlantic salmon in Scotland. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **8**, 18–20 (1988).
 - **Del Cerro, A., Marquez, I. & Guijarro, J. A.** Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5177–5180 (2002).
 - **Denkin, S. M. & Nelson, D. R.** Regulation of *Vibrio anguillarum* empA metalloprotease expression and its role in virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4193–4204 (2004).
 - **Dodgson, K. S.** *Sulfatases of microbial origin*. (CRC Press, 1982).
 - **Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W.** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127–6145 (1988).
 - **Dridger, D., Bekal, S. & Prévost, H.** Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. *Genet. Mol. Res.* **3**, 273–281 (2004).
 - **Edgar, R. C.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797 (2004).

VI. Bibliografía

- **Ewing, W. H., Ross, A. J., Brenner, D. J. & Fanning, G. R.** *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Redmouth (RM) Bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 37–44 (1978).
- **FAO.** National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - España. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. In: *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO* [en línea]. Roma. (2005-2013).
- **Fernandez, L. et al.** In vitro and in vivo studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7328–7335 (2003).
- **Fernández, L., Márquez, I. & Guijarro, J. A.** Identification of specific in vivo-induced (ivi) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5199–5207 (2004).
- **Fernández, L., Secades, P., Lopez, J. R., Márquez, I. & Guijarro, J. A.** Isolation and analysis of a protease gene with an ABC transport system in the fish pathogen *Yersinia ruckeri*: insertional mutagenesis and involvement in virulence. *Microbiology* **148**, 2233–2243 (2002).
- **Fernández, L., Méndez, J. & Guijarro, J. A.** Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Vet. Microbiol.* **125**, 1–10 (2007).
- **Findlay, J. A., He, Z. -Q. & Calhoun, L. A.** Forbesin: A novel sulfated glycolipid from the starfish *Asterias forbesi*. *J. Nat. Prod.* **53**, 1015 – 1018 (1990).
- **Findlay, J. A., Yayli, N. & Calhoun, L. A.** Novel sulfated hydrocarbons from the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *J. Nat. Prod.* **54**, 302 – 304 (1991).
- **Fitzgerald, J. W. & Kight, L. C.** Physiological control of alkylsulfatase synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: effects of glucose, glucose analogs, and sulfur. *Can. J. Microbiol.* **23**, 1456–1464 (1977).
- **Fitzpatrick, F., Humphreys, H. & O'gara, J. P.** Evidence for low temperature regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* **54**, 509–510 (2005).
- **Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P. & Auffray, Y.** Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2416–2420 (1996).
- **Fouz, B., Zarza, C. & Amaro, C.** First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in

- Spain. *J. Fish Dis.* **29**, 339–346 (2006).
- **Francis, C. L., Starnbach, M. N. & Falkow, S.** Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grown under low-oxygen conditions. *Mol. Microbiol.* **6**, 3077–3087 (1992).
 - **Franza, T., Mahé, B. & Expert, D.** *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol. Microbiol.* **55**, 261–275 (2005).
 - **Fuhrmann, H., Bohm, K. H. & Schlotfeldt, H.-J.** An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany. *J. Fish Dis.* **6**, 309–311 (1983).
 - **Fujita, M., Nakao, Y., Matsunaga, S., Nishikawa, T. & Fusetani, N.** Sodium 1-(12-hydroxy)octadecanyl sulfate, an MMP2 inhibitor, isolated from a tunicate of the family Polyclinidae. *J. Nat. Prod.* **65**, 1936–1938 (2002).
 - **Furones, M. D., Gilpin, M. J., Alderman, D. J. & Munn, C. B.** Virulence of *Yersinia ruckeri* serotype I strains is associated with a heat sensitive factor (HSF) in cell extracts. *FEMS Microbiol. Lett.* **54**, 339–343 (1990).
 - **Furones, M. D., Gilpin, M. L. & Munn, C. B.** Culture media for the differentiation of isolates of *Yersinia ruckeri*, based on detection of a virulence factor. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 360–366 (1993).
 - **Gabbianelli, R. et al.** Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. *BMC Microbiol.* **11**, 36 (2011).
 - **Garcia, J. A., Dominguez, L., Larsen, J. L. & Pedersen, K.** Ribotyping and plasmid profiling of *Yersinia ruckeri*. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 949–955 (1998).
 - **Geigy, R., Jenni, L., Kauffmann, M., Onyango, R. J. & Weiss, N.** Identification of *T. brucei*-subgroup strains isolated from game. *Acta Trop.* **32**, 190–205 (1975).
 - **Gibello, A. et al.** Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 346–350 (1999).
 - **Gibello, A. et al.** Analysis of the *gyrA* gene of clinical *Yersinia ruckeri* isolates with reduced susceptibility to quinolones. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 599–602 (2004).
 - **Glenn, A. R.** Production of extracellular proteins by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 41–62 (1976).
 - **Glover, R. E., Smith, R. R., Jones, M. V., Jackson, S. K. & Rowlands, C. C.** An EPR investigation of surfactant action on bacterial membranes. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**,

- 57–62 (1999).
- **González de Llano, D., Rodríguez, A. & Cuesta, P.** Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening—analysis by HPLC. *J. Appl. Microbiol.* **80**, 570–276 (1996).
 - **Govan, J. R. & Deretic, V.** Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**, 539–574 (1996).
 - **Green, M. & Austin, B.** The identification of *Yersinia ruckeri* and its relationship to other representatives of the Enterobacteriaceae. *Aquaculture* **34**, 185–192 (1983).
 - **Gromova, I. & Celis, J.** in *Cell Biology* **4**, 219–223 (Elsevier, 2006).
 - **Grossman, A. R., Gonzalez-Ballester, D., Shibagaki, N., Pootakham, W. & Moseley, J.** in *Abiotic Stress Adaptation in Plants* (Pareek, A., Sopory, S. K. & Bohnert, H. J.) 307–348 (Springer Netherlands, 2009).
 - **Guilvout, I., Quilici, M. L., Rabot, S., Lesel, R. & Mazigh, D.** BamHI restriction endonuclease analysis of *Yersinia ruckeri* plasmids and their relatedness to the genus *Yersinia* 42- to 47-megadalton plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2594–2597 (1988).
 - **Gulig, P. A. et al.** SOLiD sequencing of four *Vibrio vulnificus* genomes enables comparative genomic analysis and identification of candidate clade-specific virulence genes. *BMC Genomics* **11**, 512 (2010).
 - **Gunnlaugsdóttir, B. & Gudmundsdóttir, B. K.** Pathogenicity of atypical *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon compared with protease production. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 542–551 (1997).
 - **Hagelueken, G. et al.** The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 7631–7636 (2006).
 - **Haines, T. H.** Halogen- and Sulfur-Containing Lipids of *Ochromonas*. *Annu. Rev. Microbiol.* **27**, 403–412 (1973).
 - **Hall, C., Brachat, S. & Dietrich, F. S.** Contribution of Horizontal Gene Transfer to the Evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **4**, 1102–1115 (2005).
 - **Hanlon, G. W., Hodges, N. A. & Russell, A. D.** The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 845–851 (1982).
 - **Hannah, J. H., Menozzi, F. D., Renauld, G., Locht, C. & Brennan, M. J.** Sulfated

- glycoconjugate receptors for the Bordetella pertussis adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect. Immun.* **62**, 5010–5019 (1994).
- **Hanson, S. R., Best, M. D. & Wong, C.-H.** Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 5736–5763 (2004).
 - **Helenius, A. & Simons, K.** Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 29–79 (1975).
 - **Hesami, S., Metcalf, D. S., Lumsden, J. S. & Macinnes, J. I.** Identification of cold-temperature-regulated genes in *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1593–1600 (2011).
 - **Hoffman, J. A., Badger, J. L., Zhang, Y., Huang, S. H. & Kim, K. S.** Escherichia coli K1 asIA contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* **68**, 5062–5067 (2000).
 - **Horne, M. T. & Barnes, A. C.** in *Fish Diseases and Disorders* (Woo, P. T. K. & Bruno, D. W.) **3**, 455–477 (CABI Publishing, 1999).
 - **Hosseini, F., Malekzadeh, F., Amirmozafari, N. & Ghaemi, N.** Biodegradation of anionic surfactants by isolated bacteria from activated sludge. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **4**, 127-132 (2007).
 - **Hultgren, S. J. et al.** Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* **73**, 887–901 (1993).
 - **Hunter, V. A., Knittel, M. D. & Fryer, J. L.** Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* **3**, 467–472 (1980).
 - **Hurst, M. R. H., Becher, S. A., Young, S. D., Nelson, T. L. & Glare, T. R.** *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 844–849 (2010).
 - **Hurst, M. R. H., O’Callaghan, M. & Glare, T. R.** Peripheral sequences of the *Serratia entomophila* pADAP virulence-associated region. *Plasmid* **50**, 213–229 (2003).
 - **Imperatore, C. et al.** New Bioactive Alkyl Sulfates from Mediterranean Tunicates. *Molecules* **17**, 12642–12650 (2012).
 - **Ioannides, M.** Detection, Cloning, and Analysis of a U32 Collagenase in *Streptococcus*

- mutans GS-5. Master of Science Thesis. University of South Florida (2004).
- **Jansen, H. J., Hart, C. A., Rhodes, J. M., Saunders, J. R. & Smalley, J. W.** A novel mucin-sulphatase activity found in Burkholderia cepacia and Pseudomonas aeruginosa. *J. Med. Microbiol.* **48**, 551–557 (1999).
 - **Joh, S. J. et al.** Characterization of Yersinia ruckeri isolated from the farm-cultured eel Anguilla japonica in Korea. *Korean J. Vet. Res.* **50**, 29–35 (2010).
 - **Jovcic, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L. & Kojic, M.** Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain Pseudomonas sp. ATCC19151. *Arch. Biol. Sci.* **61**, 159–164 (2009).
 - **Julkowska, D.** Branched swarming patterns on a synthetic medium formed by wild-type Bacillus subtilis strain 3610: detection of different cellular morphologies and constellations of cells as the complex architecture develops. *Microbiology* **150**, 1839–1849 (2004).
 - **Kado, C. I. & Liu, S. T.** Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**, 1365–1373 (1981).
 - **Kahnert, A. & Kertesz, M. A.** Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from Pseudomonas putida S-313. *J. Biol. Chem.* **275**, 31661–31667 (2000).
 - **Kamisago, S. et al.** Role of sulfatides in adhesion of Helicobacter pylori to gastric cancer cells. *Infect. Immun.* **64**, 624–628 (1996).
 - **Kanai, K. & Wakabayashi, H.** Purification and some properties of protease from Aeromonas hydrophila. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* **50**, 1367–1374 (1984).
 - **Karlsen, C. et al.** Motility and flagellin gene expression in the fish pathogen Vibrio salmonicida: effects of salinity and temperature. *Microb. Pathog.* **45**, 258–264 (2008).
 - **Kato, T., Takahashi, N. & Kuramitsu, H. K.** Sequence analysis and characterization of the Porphyromonas gingivalis prtC gene, which expresses a novel collagenase activity. *J. Bacteriol.* **174**, 3889–3895 (1992).
 - **Kavermann, H. et al.** Identification and characterization of Helicobacter pylori genes essential for gastric colonization. *J. Exp. Med.* **197**, 813–822 (2003).
 - **Kawula, T. H., Lelivelt, M. J. & Orndorff, P. E.** Using a new inbred fish model and cultured fish tissue cells to study Aeromonas hydrophila and Yersinia ruckeri pathogenesis. *Microb. Pathog.* **20**, 119–125 (1996).
 - **Kay, W. W. & Cameron, M.** Citrate transport in Salmonella typhimurium. *Arch. Biochem.*

- Biophys.* **190**, 270–280 (1978).
- **Kearns, D. B.** A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 634–644 (2010).
 - **Keeling, S. E. et al.** Development and validation of real-time PCR for the detection of *Yersinia ruckeri*. *J. Fish Dis.* **35**, 119–125 (2012).
 - **Keil-Dlouha, V., Misrahi, R. & Keil, B.** The induction of collagenase and a neutral proteinase by their high molecular weight substrates in *Achromobacter iophagus*. *J. Mol. Biol.* **107**, 293–305 (1976).
 - **Kelly, D. J. & Thomas, G. H.** The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 405–424 (2001).
 - **Khullar, M., Singh, R. D., Smriti, M. & Ganguly, N. K.** Anaerobiosis-induced virulence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium: role of phospholipase Cgamma signalling cascade. *J. Med. Microbiol.* **52**, 741–745 (2003).
 - **Kim, D.-H. & Austin, B.** Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol.* **21**, 513–524 (2006).
 - **Kim, W., Killam, T., Sood, V. & Surette, M. G.** Swarm-Cell Differentiation in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Results in Elevated Resistance to Multiple Antibiotics. *J. Bacteriol.* **185**, 3111–3117 (2003).
 - **Klebensberger, J., Rui, O., Fritz, E., Schink, B. & Philipp, B.** Cell aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 as an energy-dependent stress response during growth with sodium dodecyl sulfate. *Arch. Microbiol.* **185**, 417–427 (2006).
 - **Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. & Pechere, J.-C.** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *J. Bacteriol.* **182**, 5990–5996 (2000).
 - **Kotetishvili, M. et al.** Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2674–2684 (2005).
 - **Kramer, V. C., Calabrese, D. M. & Nickerson, K. W.** Growth of *Enterobacter cloacae* in the presence of 25% sodium dodecyl sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 973–976 (1980).
 - **Kramer, V. C. & Nickerson, K. W.** A transport-dependent energy burden imposed by growth of *Enterobacter cloacae* in the presence of 10% sodium dodecyl sulfate. *Can. J. Microbiol.* **30**, 699–702 (1984).

- **Kramer, V. C., Nickerson, K. W., Hamlett, N. V. & O'Hara, C.** Prevalence of extreme detergent resistance among the Enterobacteriaceae. *Can. J. Microbiol.* **30**, 711–713 (1984).
- **Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- **Lai, S., Tremblay, J. & Déziel, E.** Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environ. Microbiol.* **11**, 126–136 (2009).
- **Ledo, A., Dopazo, C. P., Romalde, J. L., Toranzo, A. E. & Barja, J. L.** Effectiveness of different chemotherapeutic agents for controlling bacterial fish diseases. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **7**, 20–22 (1987).
- **Lehman, J., Sturenberg, F. J. & Mock, D.** The changes of the haemogram of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to an artificial and a natural infection with *Yersinia ruckeri*. *J. Appl. Ichthyol.* **3**, 174–183 (1987).
- **Lesel, R., Lesel, M., Gavini, F. & Vuillaume, A.** Outbreak of enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in France. *J. Fish Dis.* **6**, 385–387 (1983).
- **Letunic, I. & Bork, P.** Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* **23**, 127–128 (2007).
- **Letunic, I. & Bork, P.** Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.* **39**, W475–478 (2011).
- **Leung, K. Y. & Stevenson, R. M.** Tn5-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infect. Immun.* **56**, 2639–2644 (1988).
- **Liem, P. Q. & Laur, M. H.** [Aliphatic alcohol sulfates: new polar lipids isolated from various Fucacea]. *Biochimie* **58**, 1381–1396 (1976).
- **Liu, Z. et al.** *Vibrio cholerae* anaerobic induction of virulence gene expression is controlled by thiol-based switches of virulence regulator AphB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 810–815 (2011).
- **Llewellyn, L. C.** A bacterium with similarities to the redmouth bacterium and *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) causing mortalities in hatchery reared salmonids in Australia. *J. Fish Dis.* **3**, 29–39 (1980).
- **Loker, S. B., Temple, L. M. & Preston, A.** The *Bordetella avium* BAV1965-1962 fimbrial locus is regulated by temperature and produces fimbriae involved in adherence to turkey tracheal tissue. *Infect. Immun.* **79**, 2423–2429 (2011).

- **Magnadóttir, B.** Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* **20**, 137–151 (2006).
- **Mahan, M. J., Slauch, J. M. & Mekalanos, J. J.** Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**, 686–688 (1993).
- **Marteyn, B. et al.** Modulation of Shigella virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature* **465**, 355–358 (2010).
- **McArdle, J. F. & Dooley-Martin, C.** Isolation of *Yersinia ruckeri* type 1 (Hagerman strain) from goldfish *Carassius auratus* (L). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **5**, 10–11 (1985).
- **Méndez, J.** *Yersinia ruckeri*: genes relacionados con la virulencia y progresión del proceso infeccioso. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo (2012).
- **Méndez, J. et al.** A chromosomally located traHIJKLMN operon encoding a putative type IV secretion system is involved in the virulence of *Yersinia ruckeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 937–945 (2009).
- **Méndez, J. & Guijarro, J. A.** In vivo monitoring of *Yersinia ruckeri* in fish tissues: progression and virulence gene expression. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 179–185 (2013).
- **Méndez, J. et al.** A novel cdsAB operon is involved in the uptake of L-cysteine and participates in the pathogenesis of *Yersinia ruckeri*. *J. Bacteriol.* **193**, 944–951 (2011).
- **Merhej, V., Adékambi, T., Pagnier, I., Raoult, D. & Drancourt, M.** *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 779–784 (2008).
- **Miller, J. H.** *Experiments in molecular genetics.* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1972).
- **Miyoshi, S. & Shinoda, S.** Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.* **2**, 91–98 (2000).
- **Mougous, J. D., Green, R. E., Williams, S. J., Brenner, S. E. & Bertozzi, C. R.** Sulfotransferases and sulfatases in mycobacteria. *Chem. Biol.* **9**, 767–776 (2002).
- **Müller, I. et al.** Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: insights into the catalytic mechanism of the Fe(II) alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily. *Biochemistry* **43**, 3075–3088 (2004).
- **Münzinger, M., Budzikiewicz, H., Expert, D., Enard, C. & Meyer, J. M.** Achromobactin, a new citrate siderophore of *Erwinia chrysanthemi*. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* **55**, 328–332 (2000).
- **Mujica, A., Romero, G. & Hernandez-Montes, H.** Human semen ribonuclease. Location, properties and inhibition by sodium dodecyl sulfate, zinc sulfate and EDTA. *Int. J. Fertil.*

- 109–113 (1976).
- **Murros-Kontinen, A. et al.** *Yersinia nurmii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 2368–2372 (2010).
 - **Murros-Kontinen, A. et al.** *Yersinia pekkanenii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 2363–2367 (2010).
 - **Murty, V. L., Piotrowski, J., Morita, M., Slomiany, A. & Slomiany, B. L.** Inhibition of *Helicobacter pylori* glycosulfatase activity toward gastric sulfomucin by nitecapone. *Biochem. Int.* **26**, 1091–1099 (1992).
 - **Nakao, Y., Matsunaga, S. & Fusetani, N.** Toxadocin A: A novel thrombin inhibitor from the marine sponge *Toxadocia cylindrica*. *Tetrahedron Letters* **34**, 1511–1514 (1993).
 - **Nickerson, K. W. & Aspedon, A.** Detergent-shock response in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* **6**, 957–961 (1992).
 - **Nieuw Amerongen, A. V., Bolscher, J. G., Bloemena, E. & Veerman, E. C.** Sulfomucins in the human body. *Biol. Chem.* **379**, 1–18 (1998).
 - **Nikaido, H. & Hall, J. A.** Overview of bacterial ABC transporters. *Meth. Enzymol.* **292**, 3–20 (1998).
 - **Nikaido, H. & Vaara, M.** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**, 1–32 (1985).
 - **Nikaido, H. & Zgurskaya, H. I.** AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 215–218 (2001).
 - **Norqvist, A., Norrman, B. & Wolf-Watz, H.** Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **58**, 3731–3736 (1990).
 - **Padilla, E. et al.** *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 177–183 (2010).
 - **Payne, W. J. & Painter, B. G.** Resolution by acrylamide gel electrophoresis of alkyl sulphatases and alcohol dehydrogenase. *Microbios* **3**, 199–206 (1971).
 - **Pérez, A. et al.** Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2084–2090 (2012).
 - **Pérez-Pascual, D. et al.** Comparative analysis and mutation effects of fpp2-fpp1 tandem genes encoding proteolytic extracellular enzymes of *Flavobacterium psychrophilum*.

Microbiology **157**, 1196–1204 (2011).

- **Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P. & Battistoni, A.** The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *J. Bacteriol.* **192**, 1553–1564 (2010).
- **Piotrowski, J., Slomiany, A., Murty, V. L., Fekete, Z. & Slomiany, B. L.** Inhibition of *Helicobacter pylori* colonization by sulfated gastric mucin. *Biochem. Int.* **24**, 749–756 (1991).
- **Pogorevc, M. & Faber, K.** Purification and characterization of an inverting stereo- and enantioselective sec-alkylsulfatase from the gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber* DSM 44541. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2810–2815 (2003).
- **Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. & Meyer, T. F.** Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**, 458–462 (1987).
- **Polen, T., Schluesener, D., Poetsch, A., Bott, M. & Wendisch, V. F.** Characterization of citrate utilization in *Corynebacterium glutamicum* by transcriptome and proteome analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**, 109–119 (2007).
- **Poole, K.** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 12–26 (2004).
- **Poole, K., Schiebel, E. & Braun, V.** Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **170**, 3177–3188 (1988).
- **Pritchard, T. J., Beliveau, C. M., Flanders, K. J. & Donnelly, C. W.** Environmental surveillance of dairy processing plants for the presence of *Yersinia* species. *J. Food. Prot.* **58**, 395–397 (1995).
- **Quadroni, M., James, P., Dainese-Hatt, P. & Kertesz, M. A.** Proteome mapping, mass spectrometric sequencing and reverse transcription-PCR for characterization of the sulfate starvation-induced response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Eur. J. Biochem.* **266**, 986–996 (1999).
- **Quentel, C. & Aldrin, J. F.** Blood changes in catheterised rainbow trout (*Salmo gairdneri*) intraperitoneally inoculated with *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture* **53**, 169–185 (1986).
- **Rabus, R., Jack, D. L., Kelly, D. J. & Saier, M. H., Jr.** TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. *Microbiology* **145**, 3431–3445 (1999).

VI. Bibliografía

- **Raida, M. K., Larsen, J. L., Nielsen, M. E. & Buchmann, K.** Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *J. Fish Dis.* **26**, 495–498 (2003).
- **Rainey, P. B., Heithoff, D. M. & Mahan, M. J.** Single-step conjugative cloning of bacterial gene fusions involved in microbe-host interactions. *Mol. Gen. Genet.* **256**, 84–87 (1997).
- **Rajagopal, S., Sudarsan, N. & Nickerson, K. W.** Sodium dodecyl sulfate hypersensitivity of *clpP* and *clpB* mutants of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4117–4121 (2002).
- **Ramphal, R. et al.** *Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing type 1 (Gal beta 1-3GlcNAc) or type 2 (Gal beta 1-4GlcNAc) disaccharide units. *Infect. Immun.* **59**, 700–704 (1991).
- **Rashid, M. H. & Kornberg, A.** Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4885–4890 (2000).
- **Reid, G. C., Woods, D. R. & Robb, F. T.** Peptone induction and rifampin-insensitive collagenase production by *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **142**, 447–454 (1980).
- **Reid, G. C., Robb, F. T. & Woods, D. R.** Regulation of Extracellular Collagenase Production in *Achromobacter iophagus*. *J. Gen. Microbiol.* **109**, 149–154 (1978).
- **Robbertse, P. J., Woods, D. R., Reay, A. H. & Robb, F. T.** Simple and Sensitive Procedure for Screening Collagenolytic Bacteria and the Isolation of Collagenase Mutants. *J. Gen. Microbiol.* **106**, 373–376 (1978).
- **Robertson, A. M. & Corfield, A. P.** Mucin degradation and its significance in inflammatory conditions of the gastrointestinal tract. in *Medical Importance of the Normal Microflora* (Tannock, G. W.) 222–261 (Springer US, 1999).
- **Robertson, A. M. & Wright, D. P.** Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. *Can. J. Gastroenterol.* **11**, 361–366 (1997).
- **Roccatagliata, A. J., Maier, M. S., Seldes, A. M., Zea, S. & Duque, C.** A New Sulfated Alkene from the Ophiuroid *Ophiocoma echinata*. *J. Nat. Prod.* **60**, 285–286 (1997).
- **Rodgers, C. J.** Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents in vitro. *Aquaculture* **196**, 325–345 (2001).
- **Romalde, J. L., Conchas, R. F. & Toranzo, A. E.** Evidence that *Yersinia ruckeri* possesses a

- high affinity iron uptake system. *FEMS Microbiol. Lett.* **64**, 121–125 (1991).
- **Romalde, J. L., Lemos, Conchas, Bandín, I. & Toranzo, A. E.** *Adhesive properties and other virulence factors in Yersinia ruckeri.* (Academic Press, 1990).
 - **Romalde, J. L. & Toranzo, A. E.** Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **11**, 147–149 (1991).
 - **Romalde, J. L. & Toranzo, A. E.** Pathological activities of Yersinia ruckeri, the enteric redmouth (ERM) bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**, 291–299 (1993).
 - **Ross, A. J., Rucker, R. R. & Ewing, W. H.** Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Microbiol.* **12**, 763–770 (1966).
 - **Rucker, R. R.** Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Off. Int. Epizoot.* **65**, 825–830 (1966).
 - **Ryckaert, J. et al.** Persistence of Yersinia ruckeri in trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* **29**, 648–655 (2010).
 - **Sabri, M., Houle, S. & Dozois, C. M.** Roles of the extraintestinal pathogenic Escherichia coli ZnuACB and ZupT zinc transporters during urinary tract infection. *Infect. Immun.* **77**, 1155–1164 (2009).
 - **Sakai, D. K.** Loss of virulence in a protease-deficient mutant of Aeromonas salmonicida. *Infect. Immun.* **48**, 146–152 (1985).
 - **Saleh, M., Soliman, H. & El-Matbouli, M.** Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of Yersinia ruckeri the causative agent of enteric red mouth disease in fish. *BMC Vet. Res.* **4**, 31 (2008).
 - **Sambrook, J.** *Molecular cloning: a laboratory manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).
 - **Scharfman, A., Van Brussel, E., Houdret, N., Lamblin, G. & Roussel, P.** Interactions between glycoconjugates from human respiratory airways and Pseudomonas aeruginosa. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, S163–169 (1996).
 - **Schüller, S. & Phillips, A. D.** Microaerobic conditions enhance type III secretion and adherence of enterohaemorrhagic Escherichia coli to polarized human intestinal epithelial cells. *Environ. Microbiol.* **12**, 2426–2435 (2010).
 - **Secades, P. & Guijarro, J. A.** Purification and characterization of an extracellular

- protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3969–3975 (1999).
- **Shukor, M. Y., Husin, W. S. W., Rahman, M. F. A., Shamaan, N. A. & Syed, M. A.** Isolation and characterization of an SDS-degrading *Klebsiella oxytoca*. *J Environ Biol* **30**, 129–134 (2009).
 - **Siwicki, A. K. et al.** Influence of HMB (beta-hydroxy-beta-methylbutyrate) on antibody secreting cells (ASC) after in vitro and in vivo immunization with the anti-*Yersinia ruckeri* vaccine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Res.* **32**, 491–498 (2001).
 - **Slomiany, B. L., Murty, V. L., Piotrowski, J., Grabska, M. & Slomiany, A.** Glycosulfatase activity of *H. pylori* toward human gastric mucin: effect of sucralfate. *Am. J. Gastroenterol.* **87**, 1132–1137 (1992).
 - **Smid, E. J., Jansen, A. H. & Tuijn, C. J.** Anaerobic Nitrate Respiration by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* during Potato Tuber Invasion. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3648–3653 (1993).
 - **Smith, A. M., Goldring, O. L. & Dear, G.** The production and methods of use of polyclonal antisera to the pathogenic organisms *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* and *Renibacterium salmoninarum*. *J. Fish Biol.* **31**, 225–226 (1987).
 - **Somers, J. M., Sweet, G. D. & Kay, W. W.** Fluorocitrate resistant tricarboxylate transport mutants of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **181**, 338–345 (1981).
 - **Sousa, Magarinos, Eiras, Toranzo & Romalde.** Molecular characterization of Portuguese strains of *Yersinia ruckeri* isolated from fish culture systems. *J. Fish Dis.* **24**, 151–159 (2001).
 - **Sprague, L. D., Scholz, H. C., Amann, S., Busse, H.-J. & Neubauer, H.** *Yersinia similis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 952–958 (2008).
 - **Sprague, L. D. & Neubauer, H.** *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 831–835 (2005).
 - **Stave, J. W., Cook, T. M. & Roberson, B. S.** Chemiluminescent responses of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), phagocytes to strains of *Yersinia ruckeri*. *J. Fish Dis.* **10**, 1–10 (1987).
 - **Stevenson, R. M.** Immunization with bacterial antigens: yersiniosis. *Dev. Biol. Stand.* **90**, 117–124 (1997).
 - **Stevenson, R., Flett, D. & Raymon, B. T.** Enteric Redmouth (ERM) and other

- enterobacterial infections. in *Bacterial Diseases of Fish* (Inglis, V., Roberts, R. I. & Bromage, N. R.) 80–106 (Blackwell Scientific Publications, 1993).
- **Stevenson, R. M. W. & Airdrie, D. W.** Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. *J. Fish Dis.* **7**, 247–254 (1984).
 - **Stevenson, R. M. W. & Daly, J. G.** Biochemical and Serological Characteristics of Ontario Isolates of *Yersinia ruckeri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **39**, 870–876 (1982).
 - **Sweet, G. D., Kay, C. M. & Kay, W. W.** Tricarboxylate-binding proteins of *Salmonella typhimurium*. Purification, crystallization, and physical properties. *J. Biol. Chem.* **259**, 1586–1592 (1984).
 - **Tacon, A. G. J., Metian, M., Turchini, G. M. & De Silva, S. S.** Responsible Aquaculture and Trophic Level Implications to Global Fish Supply. *Rev. Fish Sci.* **18**, 94–105 (2009).
 - **Takahashi, N., Kato, T. & Kuramitsu, H. K.** Isolation and preliminary characterization of the *Porphyromonas gingivalis* prtC gene expressing collagenase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**, 135–138 (1991).
 - **Tamir-Ariel, D., Navon, N. & Burdman, S.** Identification of genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* induced during its interaction with tomato. *J. Bacteriol.* **189**, 6359–6371 (2007).
 - **Tamura, K. et al.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739 (2011).
 - **Tang, D.-J. et al.** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* possesses a single gluconeogenic pathway that is required for virulence. *J. Bacteriol.* **187**, 6231–6237 (2005).
 - **Temprano, A. et al.** Rapid identification of *Yersinia ruckeri* by PCR amplification of *yruL-yruR* quorum sensing. *J. Fish Dis.* **24**, 253–261 (2001).
 - **Tinsley, J. W., Lyndon, A. R. & Austin, B.** Antigenic and cross-protection studies of biotype 1 and biotype 2 isolates of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Appl. Microbiol.* **111**, 8–16 (2011).
 - **Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F. & Chiers, K.** *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.* **30**, 257–268 (2007).
 - **Tsukamoto, S., Kato, H., Hirota, H. & Fusetani, N.** Antibacterial and antifungal sulfated alkane and alkenes from the hepatopancreas of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *J. Nat.*

- Prod.* **57**, 1606–1609 (1994).
- **Ullrich, M. S., Schergaut, M., Boch, J. & Ullrich, B.** Temperature-responsive genetic loci in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Microbiology* **146**, 2457–2468 (2000).
 - **Urbany, C. & Neuhaus, H. E.** Citrate uptake into *Pectobacterium atrosepticum* is critical for bacterial virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**, 547–554 (2008).
 - **Van Eldere, J., Parmentier, G., Asselberghs, S. & Eysen, H.** Partial characterization of the steroidsulfatases in *Peptococcus niger* H4. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 69–76 (1991).
 - **Vasil, M. L.** How we learnt about iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*: a series of very fortunate events. *Biometals* **20**, 587–601 (2007).
 - **Vendrell, D. et al.** Quantitative analysis of bacterial adhesion to fish tissue. *Colloids Surf B Biointerfaces* **71**, 331–333 (2009).
 - **Vipond, R. et al.** Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.* **66**, 1990–1998 (1998).
 - **Walker, S. L., Sojka, M., Dibb-Fuller, M. & Woodward, M. J.** Effect of pH, temperature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype Enteritidis. *J. Med. Microbiol.* **48**, 253–261 (1999).
 - **Weingart, H., Stubner, S., Schenk, A. & Ullrich, M. S.** Impact of temperature on in planta expression of genes involved in synthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 1095–1102 (2004).
 - **Welch, T. J. & Wiens, G. D.** Construction of a virulent, green fluorescent protein-tagged *Yersinia ruckeri* and detection in trout tissues after intraperitoneal and immersion challenge. *Dis. Aquat. Org.* **67**, 267–272 (2005).
 - **Whelan, S. & Goldman, N.** A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 691–699 (2001).
 - **White, G. F., Russell, N. J. & Day, M. J.** A survey of sodium dodecyl sulphate (SDS) resistance and alkylsulphatase production in bacteria from clean and polluted river sites. *Environ. Pollut. Ecol. Biol.* **37**, 1–11 (1985).
 - **White-Ziegler, C. A. et al.** Low temperature (23 degrees C) increases expression of

- biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **154**, 148–166 (2008).
- **Widenhorn, K. A., Boos, W., Somers, J. M. & Kay, W. W.** Cloning and properties of the *Salmonella typhimurium* tricarboxylate transport operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 883–888 (1988a).
 - **Widenhorn, K. A., Somers, J. M. & Kay, W. W.** Expression of the divergent tricarboxylate transport operon (tctl) of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **170**, 3223–3227 (1988b).
 - **Widenhorn, K. A., Somers, J. M. & Kay, W. W.** Genetic regulation of the tricarboxylate transport operon (tctl) of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **171**, 4436–4441 (1989).
 - **Willumsen, B.** Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. *J. Fish Dis.* **12**, 275–277 (1989).
 - **Winnen, B., Hvorup, R. N. & Saier, M. H., Jr.** The tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family. *Res. Microbiol.* **154**, 457–465 (2003).
 - **Wittstock, M., Schmidt, H., Flemmig, T. F. & Karch, H.** Heterogeneity of the prtC gene of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* **15**, 33–39 (2000).
 - **Wobeser, G.** An Outbreak of Redmouth Disease in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. *J. Fish. Res. Board Can.* **30**, 571–575 (1973).
 - **Zhang, Y. & Miller, R. M.** Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3276–3282 (1992).
 - **Zhang, Y. & Miller, R. M.** Effect of a *Pseudomonas rhamnolipid* biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2101–2106 (1994).
 - **Zhao, H., Li, X., Johnson, D. E. & Mobley, H. L.** Identification of protease and rpoN-associated genes of uropathogenic *Proteus mirabilis* by negative selection in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Microbiology* **145**, 185–195 (1999).

VII. ANEXO

VII. ANEXO

VII.1. SECUENCIAS DE LOS GENES DEL OPERÓN *yctCBA*VII.1.1. Secuencia del gen *yctC*

```

1  M K N I I I R A F T T S V L I F A A Q N
1  ATGAAAAATATAATTATCCGTGCTTTCACCACTTCTGTTCTGATTTTTGCCGCGCAAAAC

21  V L A ↓ M D P P K R T E C I A P A K P G G
61  GTGCTGGCGATGGATCCACCAAAACGCACCGAATGTATCGCACCCGCCAAACCCGGTGGT

41  G F D L T C K L I Q V S L Q E T K A I D
121 GGTTTTGACCTTACCTGCAAACCTCATTGAGTTTCACTACAAGAAACCAAAGCCATTGAT

61  R P M R V T Y M P G G V G A V A Y N A I
181 CGCCAATGCGGGTGACTTACATGCCCGGTGGCGTCGGTGCCGTGGCCTATAACGCCATC

81  V A Q R P A E F G T V V A F S G G S L L
241 GTGGACAACGTCCAGCCGAATTCGGCACCGTTGTCGCCTTTTCTGGCGGTTTCGCTACTT

101 N L S Q G K F G R Y N A N D V K W L A A
301 AATCTGTACAGGGCAAATTTGGTCGTTACAACGCCAATGATGTGAAGTGGTTGGCCGCG

121 I G T D Y G M I A V R S D S P Y K T L K
361 ATCGGAACTGACTACGGCATGATCGCCGTACGCAGTGATTCTCCGTACAAAACCTGAAA

141 D L M D A F K K D P N S V V F G A G A S
421 GATCTTATGGATGCATTTAAAAAAGATCCAAATAGCGTGGTATTTGGTGCTGGTGCCTCT

161 I G S Q D W M K T A L L A R E V G V D P
481 ATGGGAGCCAAGACTGGATGAAAACCCGCGCTGCTGGCGCGCAAGTGGGCGTGGACCCA

181 H K M R Y V A F E G G G E P V T A L L G

```

VII. Anexo

```
541 CACAAAATGCGCTATGTCGCCTTTGAGGGCGGCGCGAACC GGTAACAGCACTGCTGGGT
201 N H I Q A V S G D L S E M V P Y L S G D
601 AACACATTTCAGCCGTTTCAGGTGATTTAAGCGAGATGGTGCCTTATTTAAGCGCGAT
221 K L R V L A V Y A E Q R L P G Q L A D I
661 AAAGTGC GGTTGCTGGCGGTCTATGCCGAACAACGCCTGCCGGTCAATTAGCCGATATT
241 P T A K E Q G F N L V W P I I R G F Y V
721 CCTACCGCCAAAGAACAGGGTTTCAATTTGGTCTGGCCGATCATTCGTGGTTTCTATGTT
261 G P K V S D E E Y Q W W V D T F N T L M
781 GGACCAAAGTCAGCGATGAAGAATATCAATGGTGGGTGGATACCTTTAACACCCTGATG
281 K T E E F K K Q R D M R G L F E F N M T
841 AAAACCGAAGAATTTAAAAACAACGCGATATGCGCGGATTGTTTCAATTCAACATGACG
301 G Q A L D T Y V K Q Q V E L Y R E Q A K
901 GGTC AAGCGCTGGATACTTACGTCAAGCAGCAGGTTGAGCTGTATCGTGAGCAGGCTAAA
321 T F G L A K -
961 ACCTTCGGCCTAGCCAAGTAA
```

Secuencia de nucleótidos del gen *yctC* y secuencia de 326 aminoácidos deducida a partir de la misma. El posible punto de corte del péptido señal aparece señalado por una flecha.

VII.1.2. Secuencia del gen *yctB*

```
1 M S D R I F A G I W I L L C V S G L F I
1 ATGAGCGACCGCATTTTCGCCGCTATCTGGATTCTTTTATGTGTCAGTGGATTGTTTATC
21 G W G I Q S E Y S Y E P L G P R P F P I
61 GGTGGGGAATTC AAAGCGAGTACAGCTACGAACCGCTGGGGCAAGGCCTTTCCCTATC
41 T I L A L M A L C A V L L L L R K P D V
121 ACCATTTTGGCGCTGATGGCGCTGTGCGCGTATTACTGCTGTTACGTAAACCCGACGTG
61 V L W S P G K V L Q R L L V M I I T L V
181 GTGTTGTGGTACCTGGCAAGGTATTACAGCGCCTGCTGGTTATGATCATCACGCTAGTG
81 L Y A W S F E W L G F P L A T A L L T F
241 CTCTATGCCTGGAGTTTTCGAATGGCTTGGATTTCCTACTGGCTACCGGTTACTCACCTTC
101 S I A R L F Q A S L I Q A L L S A V T I
301 AGTATCGCACGGTTATTTCAAGCCAGTTTGATTTCAGGCGCTGCTGTCAGCAGTACCATC
121 G V S L F Y A F D Y L L D V T L P L G V
361 GCGTTTTCGCTATTCTACGCCTTCGATTATTTACTGGATGTCACCCTACCGCTCGGCGTA
141 W L N -
421 TGGCTGAACTAA
```

Secuencia de nucleótidos del gen *yctB* y secuencia de 143 aminoácidos deducida a partir de la misma. Las hélices transmembrana predichas con el programa TOPCONS aparecen subrayadas.

VII.2.2. Secuencia del gen *yctA*

1 M M E T W M Y L S Q G F E V A L V P Q N
 1 ATGATGAAACCTGGATGTATTTATCTCAAGGGTTTGAAGTGGCACTAGTGCCGCAAAAC

21 L M I A L I G C F I G T I V G L L P G L
 61 CTGATGATTGCCTTGATTGGCTGCTTTATTGGCACCATTGTTGGTTTGCTACCCGGACTG

41 G P I N G V A I L L P L A F A L K L P A
 121 GGGCAATCAACGGTGTGCCATCTTGCTGCCGCTGGCTTTGCGCTTAAAACTGCCCGCT

61 E S A L I L L A T V Y I G C E Y G G R I
 181 GAATCGGCACTGATATTATTGGCAACAGTCTACATTGGCTGCGAGTACGGCGGGCGCATC

81 S S I L L N V P G D A A A I M T A L D G
 241 TCGTCAATATTGCTCAACGTTCTGGTGATGCCGCTGCGATTATGACCGCACTTGATGGT

101 Y P M A Q Q G R A G V A L S I S A V S S
 301 TATCCCATGGCTCAACAAGGGCGTGCCGGGTTGCGCTGTCTATTTGCGGGTTAGTTCT

121 F V G S L I A I G G I I L F A P L L A Q
 361 TTTGTAGGTTTCATTAATCGCTATCGGTGGAATCATTCTATTTGCACCGCTATTGGCTCAA

141 W S L S F G P A E Y F A L M V F A I A C
 421 TGGTCATTATCCTTTGGACCGGCAGAATATTTTGCCTTAATGGTTTTGCGCATCGCCTGT

161 L G S M M S Q N P L K S L L A A L I G L
 481 CTTGGCAGCATGATGAGCCAAAACCCGCTGAAATCATTACTGGCAGCATTAATTGGTTTG

181 G L A T V G V D A N T G V Y R F T F D S
 541 GGTCTGGCAACCGTGGGAGTGCATGCCAACACCGGGTTTATCGATTCACTTTTGACAGT

201 V H L S D G I Q F I V V V I G L F S V S
 601 GTCCATCTTTCTGACGGTATCCAGTTTATTGTGGTCTGTGATTGGGCTGTTCTCCGTGACG

221 E I L L M L E S T S S G Q K L V R K T G
 661 GAGATCCTGCTGATGTGAAAGTACCAGCTCGGGACAAAACCTGGTGAGGAAAACCGGA

241 R L L F N R K E A A E C V G P T L R S S
 721 CGATTGTTGTTTAAATCGCAAAGAAGCAGCAGAGTGTGTTGGGCCAACGCTGCGTTCTCT

261 V I G F F V G I L P G A G A T I A S A L
 781 GTGATTGGTTTCTTCGTGGAATTTTACCCGGTGCCGGAGCCACCATGCCAGCGCACTG

281 T Y M T E K K I S G N S D S F G K G D I
 841 ACTTACATGACGGAGAAAAAATCAGTGGGAATAGCGACAGCTTCGGTAAAGGCGATATT

301 R G V A A P E A A N N A S A C G S F I P
 901 CGCGGTGTAGCAGCACCCGAAGCAGCTAACAATGCCTCTGCCTGCGGCTCATTATTCG

321 M L T L G V P G S G T T A V M M G A L T
 961 ATGCTGACACTGGGCGTTCCTGGTTCAGGCACCACGGCAGTCATGATGGGCGCACTGACA

341 L Y N I T P G P A M F T E Q P D I V W G
 1021 CTGTATAACATCACGCCCGCCCTGCGATGTTACCGAACAACCAGATATTGTCTGGGG

361 L I A S L L I A N V M L L L M N L P L V
 1081 CTGATTGCCTCACTGTTGATTGCTAACGTAATGTTGCTGTTGATGAACCTGCCTCTGGTC

381 G F F T R M L T I P L W F L V P A I A A
 1141 GGTTTTTTCACCCGATGCTCACGATCCCCCTATGGTTTCTGGTACCCGCAATCGCCGCA

401 V S A V G V Y A V H S T T F D L V L M V
 1201 GTGTCAGCGGTTGGCGTCTATGCGGTCCACAGTACTACCTTCGATCTGGTACTGATGGT

421 G L G I F G Y L L R K M N F P M S P L I
 1261 GGGCTGGGAATCTTTGGCTATCTACTGAGAAAAATGAACTTCCCGATGTCGCCACTGATT

VII. Anexo

```
441 L G F V L G E M L E Q N L R R A L S I S
1321 CTGGGGTTTTGTGCTGGGAGAAAATGCTCGAGCAGAATTTACGTCGCGCACTGTGATCAGT

461 N G D F G I L W S G A I A Q T L L G L A
1381 AATGGGGATTTTCGGTATTTTTGTGGAGTGGCGCTATTGCACAAACCTTGTGGGGTTGGCT

481 V A V L L L P L L L K R W R K H R Q N T
1441 GTCGCCGTGCTGTTGTTGCCTCTGCTACTGAAGCGCTGGCGCAAACATCGGCAGAACACA

501 L T R V E -
1501 CTAACTCGAGTGGAGTGA
```

Secuencia de nucleótidos del gen *yctA* y secuencia de 505 aminoácidos deducida a partir de la misma. Las hélices transmembrana predichas con el programa TOPCONS aparecen subrayadas.

VII.2. SECUENCIAS DE LOS GENES DEL OPERÓN *yprAB*

VII.2.1. Secuencia del gen *yprA*

```
1 M E L L C P A G N L P A L K A A V D N G
1 ATGGAGCTACTTTGTCTCTGCGGGCAACTTACCCGCACTGAAGGCCGCGGTTGATAACGGT

21 A D A V Y I G L K D D T N A R H F A G L
61 GCGGATGCCGTGTACATCGGCCTAAAAGATGATACCAATGCCCGCCATTTTGCCGGACTG

41 N F T E K K L Q E A V N Y V H N R K R K
121 AATTTTACCGAGAAAAAGCTGCAAGAAGCCGTTAATTACGTTTCATAACCGTAAACGTAAA

61 L H I A I N T F A H P D G F S R W Q R A
181 CTGCATATTGCCATCAATACNTTTCACATCCGGACGGTTTTTCCCGCTGGCAGCGCGCG

81 V D M A A Q L G A D A L I L A D L A M L
241 GTCGATATGGCGGCACAGCTTGGAGCCGATGCTCTGATTCTGGCCGATCTGGCCATGCTG

101 E Y A A E R Y P D V E R H V S V Q A S A
301 GAATATGCCGCCGAACGTTATCCCGACGTCGAACGACACGTTTCCGTTTCAGGCCCTCTGCA

121 T N D E A I R F Y Q R N F D V A R V V L
361 ACTAATGATGAAGCAATACGCTTTTATCAGCGTAACTTCGATGTGCCCCGCGTCTATTA

141 P R V L S M H Q V K Q L S R T S P V P L
421 CCCC GCGTGTATCCATGCATCAGGTA AACAGTTATCTCGCACCAGCCCGGTGCCGCTG

161 E V F A F G S L C I M A E G R C Y L S S
481 GAAGTTTTTGTCTTCGGCAGTCTGTGCATTATGGCGGAAGGTCGCTGTTATCTATCCTCC

181 Y L T G E S P N T V G A C S P A R Y V R
541 TATCTGACGGGTGAATCACC GAATACTGTGGGTGCCTGCTCGCCAGCCCGCTATGTGCGC

201 W Q H T P E G M E S R L N E V L I D R Y
601 TGGCAACACACGCCAGAAGGCATGGAATCTCGTCTGAATGAAGTGCTTATTGACCGTTAT

221 Q D D E N A G Y P T L C K G R Y L V D G
661 CAGGATGATGAAAATGCCGGTTACCCACGCTATGCAAAGGCCGCTATCTGGTTGATGGA

241 Q R Y H A L E E P T S L N T L A L L P E
721 CAGCGTTATCACGCATTGGAAGAGCCAACCAGCCTCAATACGCTGGCACTGCTGCCTGAG
```

```

261 L F A A N I A S V K I E G R Q R S P A Y
781 CTATTTGCCGCAATATCGCTTCGGTCAAAATCGAAGGCCGCAACGCAGCCCGCCTAC

281 V S Q V A K V W R Q A I D S Y Q R D P T
841 GTCAGCCAGGTGGCCAAAGTTTGGCGGCAGGCCATCGACAGTTATCAGCGGACCCGACA

301 K F E A K A E W M E Q L G S M S E G T Q
901 AAGTTCGAAGCGAAAGCGGAGTGGATGGAACAGTTGGGTTCCATGTTCGGAAGGTACCCAA

321 T T L G A Y H R K W Q -
961 ACCACGCTGGGCGCTTATCATCGTAAGTGGCAGTAA

```

Secuencia de nucleótidos del gen *yrpA* y secuencia de 331 aminoácidos deducida a partir de la misma.

VII.2.2. Secuencia del gen *yrpB*

```

1 M K Y S L G A V P Y Y W P K S D M E A F
1 ATGAAATATTCATTAGGCGCAGTACCTTATTACTGGCCGAAAAGCGATATGGAGGCTTTC

21 Y Q K A C Q S R A D I I Y L G E N V C A
61 TACCAAAAAGCCTGCCAAAGCCGTGCTGATATTATTTATCTCGGCGAAAATGTCTGTGCC

41 K R R E M K V A D W L D L A K Q V A S S
121 AAAAGACGTGAAATGAAAGTGGCCGATTGGCTGGATCTGGCGAAACAAGTGGCCTCCAGC

61 G K Q V V I S T L A L L Q A P S E L T E
181 GGCAAGCAGGTCGTTATTTTCGACCCTGGCTTTGCTACAAGCCCCCTCTGAGCTTACCAGAA

81 L K R Y I E N G E F L L E A N D F G T I
241 CTGAAGCGCTATATAGAAAATGGCGAATCTTGTGGAGCCAACGACTTTGGCACCATA

101 N M A V E R G L P F V A G H A L N C Y N
301 AACATGGCGGTGGAACGCGGGTTACCTTTTGTGCTGGCCATGCACCTTAATTGTTATAAC

121 A Y T L R I L H R Q G M T R W C M P V E
361 GCCTATACCTTGCCTATTTTGCACCGTCAGGGCATGACTCGCTGGTGTATGCCAGTGGAG

141 L S R D W L E N M L I Q C N E L G F R N
421 TTGTGCGGGGACTGGCTGGAAAACATGCTGATTGAGTGAACGAACTGGGGTTCCGCAAC

161 K F E V E V L A Y G Y L P L A Y S A R C
481 AAATTTGAAGTTGAGGTTCTGGCTTACGGTTATTTGCCATTAGCGTATTCGGCAGCTGCTG

181 F T A R S E N R A K D E C E T C C I K Y
541 TTTACCGCACGTTCCGAGAATCGCGCTAAAGACGAGTGGCAAACCTGCTGCATCAAATAT

201 P Q G R K V L S Q E N Q Q V F V L N G I
601 CCACAAGGGCGCAAAGTACTGTGCGCAAGAAAATCAGCAAGTCTTTGTACTTAATGGTATT

221 Q T Q S G Y C Y N L G N D L I S M Q G L
661 CAGACCCAAAGCGGTTACTGTTATAACCTGGGTAATGATTTGATTTCCATGCAGGGGTTG

241 V D I V R L S P H N T E A L S V I D Q F
721 GTGGATATCGTGCATGTTGTCCCTCATAATACCGAGGCGCTGAGTGTGATTGATCAATTC

261 R A N E E G L S P L T L A D K A D C N G
781 CGCGCTAATGAGGAAGTCTGTCTCCACTGACGTTGGCCGATAAAGCCGATTGCAACGGC

281 Y W R R V A G L E L V S -
841 TATTGGCGGGGTTGCCGATTGGAAGTGGTTTCCTGA

```

Secuencia de nucleótidos del gen *yrpB* y secuencia de 292 aminoácidos deducida a partir de la misma.

VII.3. SECUENCIA DEL GEN *yraS*

```

1   M K L S K I A Q F T A I I I A A N S L N
1   ATGAAATTAAGCAAGATTGCACAATTTACAGCCATTATCATTGCGGCTAATAGTCTCAAC

21  L V Y A↓A S D G V D V Y A N S D T E H F
61  CTCGTTTATGCCGCCAGCGATGGTGTGCGATGTTTACGCCAATAGCGACACTGAGCATTTC

41  H P Q G K P P S K Y T I D L Y N Q V K K
121 CATCCGCAGGGAAAGCCACCGTCAAAATATACTATTGATCTGTATAACCAAGTGAAGAAG

61  S L P F E D T R D F E E S Q K G L I A K
181 TCGTTACCTTTTGAAGATACTCGTGATTTTGAGGAATCACAAAAAGGACTCATTGCTAAA

81  P P F K Q I M A D A G N V A W D M G S Y
241 CCCCCGTTTAAACAGATTATGGCAGATGCAGGTAACGTGCTTGGGATATGGGTAGCTAT

101 E F L L Q G K D F P S I N P S L Q R Q A
301 GAGTTTCTGTGTGAAGGCAAGGATTTTCCCAGCATCAACCCCTCCTTACAGCGCCAGGCT

121 V L N M A Y G L Y E V L P D R I Y Q V R
361 GTGCTAAACATGGCCTATGGTCTGTATGAGGTGCTGCCAGATCGTATCTATCAGGTTTCGC

141 G F D L A N M T L I K G D T G W I I F D
421 GGATTTGATCTGGCGAATATGACACTGATTAAGGCGATACCGGTTGGATCATCTTTGAC

161 P L T A K E T A A A A L A F A N E K L G
481 CCGTTGACGGCCAAAGAAACGGCGGCAGCAGCACTGGCATTGTTGCAATGAAAACTGGGC

181 N R P V V A V V F S H S H V D H F G G V
541 AACCGCCCCGTAGTGGCCGTGTTCTTCTCTCACTCACACGTTGATCACTTTGGCGCGCTT

201 R G V V D E K D V Q S G K V P I I A P E
601 CGTGGTGTGGTTCGATGAAAAAGATGTGCAAAGCGCAAAGTCCCTATTATTGCCCTGAG

221 H F M Q A A I S E N V F S G N A M A R R
661 CATTTTATGCAAGCCGCGATCTCGGAGAATGTTTTTCCGGCAACGCAATGGCAAGACGA

241 V Q Y Q Y G V L L D R S P F G H V D Q A
721 GTTCAGTATCAATATGGTGTGTTGCTTGACCGCAGCCCATTGGTCATGTTGATCAGGCG

261 I G K N I A T G N T G L I A P T R F I T
781 ATCGGTAAGAATATTGCCACCGGTAATACGGGATTGATTGCCCCGACCCGTTTTATTACT

281 K D F E E I T I D G V K M V F Q N T P D
841 AAAGACTTTGAAGAGATAACCATAGATGGGGTCAAAATGGTGTTCAGAATACCCCTGAT

301 T E A P A E M N T Y F P Q F K A F W A A
901 ACCGAAGCGCCAGCAGAGATGAACACCTACTTCCCGCAGTTTAAAGCTTTCTGGGCGGCG

321 E N V T G T I H N I Y T L R G A E I R N
961 GAAAATGTCACCGGAACCATTCACAATATTTATACCTTGCGCGGTGCTGAAATTCGCAAT

341 A L N W S K Q I N N A L Y K F G D D V Q
1021 GCCCTGAACTGGTCAAAACAGATTAACAACGCACTTTATAAATTCGGTGATGATGTGCAA

361 V M F A S H S W P R W G N E R I Q E V L
1081 GTCATGTTTGCCTCTCATAGTTGGCCACGTTGGGGCAATGAACGTATCCAGGAAGTGCTG

381 R A Q R D L Y A N M N N Q V L H Y A N Q
1141 AGAGCCCAACGGGATCTCTATGCCAATATGAATAATCAGGTGCTGCACTACGCCAACCAA

401 G V T I N E I Q N V Y Q A P P S L Q R Q
1201 GGTGTCACCATCAACGAAATCCAAAATGTGTATCAGGCACCGCCGAGTTTACAACGCCAA

421 W A A R S Y H G S E G H N T R G I I N R
1261 TGGGCTGCACGTAGCTACCATGGTTTCAGAGGGGCATAATACCCGCGGATCATCAACCGT

```

```

441   Y L G Y W D G N P A T L V P L S P R E S
1321  TATTTAGGCTATTGGGATGGTAATCCAGCGACACTGGTTCCTTTATCTCCGCGGGAATCA

461   A P L Y V E M M G G A A K I L A K G K Q
1381  GCACCGCTGTATGTTGAGATGATGGGGGGGCGAGCGAAGATTCTGGCGAAAGGCAAGCAG

481   L N D Q G K Y L E A T E I L N K L V Y A
1441  TTGAACGACCAAGGTAATACTGGAAGCCACTGAAATACTGAACAAACTGGTTTATGCC

501   E P K N Q E A R N M L A D A F E Q L G Y
1501  GAACCGAAAAACCAGGAAGCCAGAAATATGCTGGCTGATGCGTTTGAACAACTCGGCTAT

521   Q K E S T S V R N S F L Q A A Y E L R T
1561  CAGAAAGAAAGCAGCAGCGTACGCAACAGTTTCTTGCAGGCGGCCCTATGAACTGCGTACT

541   G L P N A L A P K A T G P D V I R A L P
1621  GGTCTGCCCAATGCTTTGGCTCCAAAAGCAACCGGCCCTGATGTTATCAGAGCACTACCC

561   T A L W L D F L A I S M D S Q R A D G M
1681  ACCGCACTTTGGCTCGATTTCTGGCGATCAGCATGGATAGTCAGCGAGCCGATGGTATG

581   N F T I N L I T P D N N E K Y L I E M S
1741  AATTTACCATCAACCTCATCACGCCAGATAATAATGAGAAATACCTCATAGAAATGAGC

601   N A T L T N I A D Y Q A K K P T L T I T
1801  AATGCCACTCTAACAAACATTGCTGATTATCAGGCTAAAAAACCGACGCTGACCATTACC

621   V N R S D L N S V M M G I S T F E E L E
1861  GTCAACCGTTCTGACCTGAATAGTGTATGATGGGAATAAGCACCTTTGAAGAGTTGGAA

641   A A G K A K F E G D R T A Y D K L K S T
1921  GCCGCCGGTAAAGCGAAATTTGAAGGCGACCGTACCGCTTATGACAAGCTAAAAAGTACC

661   L V K F T P N F E I M P G T L N A S P T
1981  TTGGTCAAGTTTACGCCAAACTTTGAAATATGCCGGGAACCTTAAACGCCAGCCCAACC

681   P A S G N T N N T A P T Y N V K P F E Y
2041  CCGGCGTCAGGAAACACCAATAACACGGCACCGACCTATAACGTGAAACCTTTTGAGTAT

701   V I Y S A E E D -
2101  GTTATCTATTCAGCCGAAGAAGATTA

```

Secuencia de nucleótidos del gen *yraS* y secuencia de 708 aminoácidos deducida a partir de la misma. El posible punto de corte del péptido señal aparece señalado por una flecha.

VII.4. SECUENCIAS DE LOS GENES DEL OPERÓN *acrAB* Y DEL GEN *acrR*

VII.4.1. Secuencia del gen *acrA*

```

1   M S K N R G V M P L A A I L V L S G S L
1   ATGAGCAAAAACAGAGGGTAATGCCTCTGGCTGCAATTCTGGTACTTTCAGGCAGCTTG

21  V L I G ↓ C N D K D A P Q G A H A Q Q A P
61  GTACTTATAGGATGTAATGATAAAGACGCTCCGCAAGGCGCGCATGCACAACAAGCGCCT

41  E V G I V T L K A Q P L N I T T E L P G
121 GAAGTGGGTATCGTGACATTGAAAGCTCAACCTCTCAATATTACTACTGAGCTTCTGGT

```


VII. Anexo

```
61 R T S A F R V A E V R P Q V S G I I L K
181 CGCACGTCCGCATTCCGCGTCGCTGAGGTTTCGTCGCCAAGTGAGCGGAATTATCCTAAAA

81 R N Y V E G S D V T A G T S L Y Q I D P
241 CGAAATTATGTGGAAGGCAGTGACGTACCGCTGGGACTTCTCTGTATCAAATTGATCCT

101 A T Y Q A A Y D S A K G D L A K A Q A S
301 GCGACCTATCAGGCCGCTTATGACAGTGCAAAAGGCGATTTGGCCAAAGCACAGGCCAGT

121 A E I A R L T V N R Y K P L L G T N Y I
361 GCCGAAATCGCACGTTTACCCTTAACCGTTATAAACCGCTGCTGGGCACCAATTACATC

141 S K Q E Y D K A N S D F M Q A N A A V Q
421 AGCAAACAAGAATACGATAAAGCGAACTCTGATTTTATGCAGGCCAATGCTGCGGTTTCAG

161 S A K A A L E S A R I N L A Y T K V T S
481 TCAGCCAAAGCGGCACTGGAAAGTGCGCGTATCAATCTGGCTTATACCAAAGTGACCTCC

181 P I T G R T G K S S V T E G A L V S S G
541 CCTATTACCGGCCGCACTGGCAAGTCGAGTGTGACTGAAGGCGCATTAGTCAGTAGTGGT

201 Q A T A L T T V Q Q L D P M Y V D V T Q
601 CAGGCCACGGCATTAAACCACTGTTTCAGCAACTCGATCCAATGTATGTGGACGTGACGCAA

221 S S D E F L R L K Q E L A S G A M K Q E
661 TCCAGTGATGAGTTCCCTGCGCCTGAAACAAGAACTGGCCAGTGGAGCCATGAAACAAGAA

241 N G K A K V R L L L E N G T E Y S E T G
721 AACGGCAAAGCAAAGTGCGCCTGTTACTGGAAAACGGTACTGAATATAGCGAAAACCGGT

261 T L E F S G V T V D E T T G S I T I R A
781 ACGCTGGAGTTCTCTGGTGTGACGGTAGATGAAACCACCGGTTCCATTACTATCCGTGCC

281 I F P N P N E T L L P G M F V R A R L D
841 ATTTTCCCTAACCCGAATGAAACATTGTTGCCGGGAATGTTTGTACGCGCCCGTCTGGAT

301 E G V R D D A L L V P Q Q G I T R N P R
901 GAAGGCGTGAGAGACGATGCTCTGTTGGTTCCTCAACAAGGTATTACCCGTAATCCACGC

321 G E A T A L V V G E G D K V E L R T V T
961 GGTGAAGCAACGGCGCTGGTTGTCGGTGAAGGTGACAAAGTAGAGTTACGTACGGTAACG

341 A A Q A I G D K W L I T D G L K P G D R
1021 GCGGCTCAGGCAATTGGCGATAAGTGGCTGATTACCGACGGTCTGAAACCGGGCGATCGC

361 V I V T G L Q K I R P G V Q V K A Q E V
1081 GTCATTGTAACCGGTTTACAAAAAATCAGACCGGGCGTGCAGGTGAAAGCGCAGGAAGTT

381 S D A A P A E Q A K K S -
1141 TCTGATGCTGCACCAGCTGAACAAGCGAAGAAGTCTTAA
```

Secuencia de nucleótidos del gen *acrA* y secuencia de 392 aminoácidos deducida a partir de la misma. El posible punto de corte del péptido señal aparece señalado por una flecha.

VII.4.2. Secuencia del gen *acrB*

```
1 M A K Y F I E R P I F A W V I A I I I M
1 ATGGCTAAGTACTTTATAGAGCGCCCAATATTCGCATGGGTTATCGCCATCATTATCATG

21 L A G G L A I M K L P V A Q Y P T I A P
61 TTGGCGGGCGGACTAGCGATCATGAAGCTGCCAGTAGCGCAATATCCGACTATTGCACCA
```

41 P A I S I S A N Y P G A D A T T V Q N T
 121 CCGCAATTTCTATTTCTGCTAACTATCCAGGCGCAGATGCCACGACAGTTCAGAACACG

 61 V T Q V I E Q N M N G I D G L M Y M S S
 181 GTAACCTCAGGTTATCGAACAGAACATGAACGGCATCGATGGCCTGATGTATATGTCTTCG

 81 S S D S S G S V Q L T L T F N S G I D P
 241 AGCAGTGACTCGTCCGGTAGTGTACAGCTCACCTGACATTCAACTCAGGTATCGATCCG

 101 D I A Q V Q V Q N K L Q L A M P L L P Q
 301 GATATCGCGCAAGTTCAGTGCAGAATAAACTGCAACTGGCCATGCCGCTGTTACCGCAA

 121 E V Q Q Q G V S V Q K S S S S F L M V A
 361 GAAGTGCAACAACAAGGTGTTAGCGTTCAGAAGTCCAGTAGCAGCTTCTTGATGGTTGCC

 141 G F I S D D G T M K Q E D I A D Y V G S
 421 GGCTTTATTTCCGACGATGGCACCATGAAGCAGGAAGATATCGCTGACTACGTAGGTTCC

 161 N I K D P I S R T S G V G D V Q L F G S
 481 AACATTAAGGATCCTATTAGTCGAACTTCTGGGGTGGGCGACGTTCAACTGTTCCGGTTC

 181 Q Y A M R I W M D P H K L N N F K L T P
 541 CAGTACGCGATGCGTATTTGGATGGATCCACACAAGCTGAACAACCTCAAACCTGACACCC

 201 V D V I T A I K V Q N N Q V A A G Q L G
 601 GTTGATGTTATCACTGCGATTAAAGTGCAGAACAATCAGGTTGCCGCGAGCCAGTTAGGT

 221 G T P P V P G Q Q L N S S I I A Q T R L
 661 GGGACACCGCCCGTTCGGGGCCAGCAACTTAACTCGTCTATTATTGCGCAAACCCGTTTG

 241 T S A E E F S K I L L K V N T D G S Q V
 721 ACCTCGGCCGAAGAGTTCAGCAAGATTCTGCTGAAAGTGAACACCGATGGTTCTCAGGTT

 261 R L K D V A T V Q L G A E S Y N V I A R
 781 CGTTTGAAGACGTGGCTACCGTACAACCTGGGCGCTGAAAGTTATAACGTTATTGCCCCG

 281 F N G K P A A G I G I K L A T G A N A L
 841 TTTAACGGCAAACCCGCTGCCGGGATCGGTATCAAATTTGGCCACTGGGGCGAACGCCCTG

 301 N T S A A V K A E L A K L Q P F F P A S
 901 AACACCTCGGCAGCAGTAAAAGCCGAGCTGGCCAAGTTACAACCGTCTTCCCAGCCAGT

 321 L K V V Y P Y D T T P F V K I S I H E V
 961 CTGAAAGTGGTTTACCCGATGACACCACACCATTGCGTGAAGATTTGATCCACGAAGTG

 341 V K T L V E A I I L V F L V M Y L F L Q
 1021 GTGAAAACGCTGGTTGAAGCGATCATCTCGGTATTCTGGTGATGTATCTATTCTGCAA

 361 N F R A T L I P T I A V P V V L L G T F
 1081 AACTTCCGGGCGACCTGATTCCAACCTATCGCGGTCCCGTGGTGCTGTTGGGGACTTTC

 381 A I L A A F G Y S I N T L T M F G M V L
 1141 GCCATCTGGCGGCATTTGGCTATTTCGATAAACACCTAACGATGTTCCGGATGGTGTTG

 401 A I G L L V D D A I V V V E N V E R V M
 1201 GCGATAGGGCTATTGGTTGATGATGCCATCGTGGTGGTTCGAGAACGTTGAACGAGTGATG

 421 Q E E G L P P K E A T K K S M E Q I Q G
 1261 CAGGAGGAAGGGCTACCGCCGAAAGAAGCCACCAAGAAATCCATGGAACAAATCCAGGGT

 441 A L V G I A M V L S A V F I P M A F F G
 1321 GCCTTGGTGGGGATCGCGATGGTACTTTCTGCGGTATTTATCCCGATGGCCTTCTTTGGC

 461 G S T G A I Y R Q F S I T I V S A M V L
 1381 GGCTCTACCGGTGCTATTTACCGTCAGTCTCCATCACCATCGTTTCAGCCATGGTGCTG

 481 S V L V A L I L T P A L C A T M L K P I

VII. Anexo

1441 TCGGTTCTGGTGGCATTGATTCTGACTCCAGCACTGTGTGCCACCATGTTGAAGCCGATA
501 A K G S H G P K T G F F G W F N R M F D
1501 GCTAAAGGCTCTCATGGCCCGAAAACCGGTTTCTTCGGTTGGTTAATCGGATGTTTCGAT
521 K S T H H Y T D S V G N I L R S T G R Y
1561 AAGAGCACCCATCATTACACCGACAGCGTAGGCAATATTTTGGCGAGTACCGGCCGTTAT
541 L V I Y L A I V I G M G L L F L R L P S
1621 CTGGTGATTTATCTGGCAATTGTTATCGGCATGGGCTTGTGTTCTGCGCCTGCCGTCT
561 S F L P E E D Q G V F L T M V Q L P A G
1681 TCCTTCTTGCCAGAAGAAGATCAGGGTGTATTCCTGACCATGGTTCAATTGCCGGCTGGT
581 A T Q E R T Q K V L D H V T D Y Y L D K
1741 GCCACGCAAGAGCGTACCCAGAAAAGTGTAGACCATGTAACGGATTACTATCTGGATAAA
601 E K D V V N S V F T V N G F G F S G Q G
1801 GAAAAAGACGTTGTTAACTCAGTCTTTACCGTTAACGGCTTCGGTTTCAGTGGTCAAGGC
621 Q N T G L A F I S L K N W D E R Q G A E
1861 CAAAATACCGGTTTGGCGTTCATCAGCCTGAAAACTGGGATGAGCGCCAAGGTGCAGAG
641 N K V P A I V G R A S Q A F S R I K D G
1921 AATAAAGTGCCAGCAATTGTTGGCCGTGCTTCTCAAGCCTTCTCGAGAATCAAAGACGGT
661 L V F A F N L P A I V E L G T A T G F D
1981 TTGGTATTGCGCTTTAACCTACCAGCCATCGTCGAGTTGGGTACGGCAACTGGCTTCGCAG
681 F Q L I D Q A N L G H A K L T A A R N Q
2041 TTCCAACCTGATTGACCAGGCTAACCTTGGCCATGCAAAACTGACGGCGGCACGTAACCAG
701 L L G M A A Q H S D V L V G M R P N G L
2101 CTATTGGGTATGGCTGCTCAGCATTCTGATGTGCTGGTTCGGGATGCGTCCGAACGGTTTG
721 E D T P Q F K V E V D Q E K A Q A L G V
2161 GAAGATACACCACAGTTCAAAGTGAAGTTGACCAGGAAAAAGCACAAGCGCTGGGTGTT
741 A I S D I N T T L G S A M G G S Y V N D
2221 GCTATTTCCGATATCAATACCACTCTCGGTTCCGCCATGGGCGGAGCTATGTAAACGAC
761 F I D R G R V K K V Y V Q A D A P F R M
2281 TTTATCGACCGGGTTCGGGTGAAGAAAGTTTACGTGCAGGCTGATGCGCCGTTCCGTATG
781 L P S D I D K W Y V R N N E G Q M V S F
2341 TTACCGAGTGATATCGACAAGTGGTACGTGCGTAATAATGAAGGACAAATGGTTTCATTT
801 A T F S T A K W E Y G S P R L E R Y N G
2401 GCGACCTTCTCAACGGCGAAATGGGAATACGGCTCACCGGACTGGAACGTTATAACGGT
821 L P S M E I L G Q A A P G K S T G E A M
2461 TTGCCATCAATGGAAATTCGGGTTCAGGCGGCTCCGGGAAAAGTACCGGTGAAGCCATG
841 D L M Q E L A S K L P S G I G Y D W T G
2521 GATCTGATGCAGGAGTTGGCGTCTAAATTACCAAGCGGAATAGGCTATGACTGGACGGGT
861 M S Y Q E R L S G N Q A P A L Y A I S L
2581 ATGTCCTATCAGGAGCGTCTGTCTGGTAATCAGGCTCCAGCGCTGTATGCCATTTCTCTG
881 I V V F L C L A A L Y E S W S I P F S V
2641 ATTGTGGTATTCTGTGTCTGGCAGCATTGTATGAGAGCTGGTCAATTCCGTTCTCCGTA
901 M L V V P L G V V G A L L A A S L R G L
2701 ATGCTGGTGGTACCCTGGGTGCGTTGGTGCATTACTCGCAGCATCTCTACGGGTTTA
921 N N D V Y F Q V G L L T T I G L S A K N
2761 AACAAATGACGTTTACTTCCAGTGGGTCTATTAACCACCATTGGGCTATCGGCCAAAAAC

```

941  A I L I V E F A K D L M E K E G K G L V
2821 GCCATCTTGATTGTTGAGTTTCGCCAAGGACTTGATGGAAAAAGAAGGCAAAGGGCTGGTG

961  E S T L E A V R M R L R P I L M T S L A
2881 GAATCAACGTTGGAAGCCGTCCGTATGCGTCTACGCCCAATTCTGATGACCTCACTGGCG

981  F I L G V M P L V I S S G A G S G A Q N
2941 TTTATCCTTGGGGTAATGCCACTGGTCATCAGTAGCGGTGCCGGTTCAGGCGCACAAAAC

1001 A V G T G V M G G M V T A T V L A I F F
3001 GCCGTAGGTACTGGCGTAATGGGTGGGATGGTTACCGCAACCGTATTGGCTATCTTCTTT

1021 V P V F F V V V R R R F S K K S E D I E
3061 GTACCAGTGTCTTCGTGGTGGTTCGCCCGCTTTTAGCAAGAAGAGCGAAGACATTGAA

1041 H A H P V D H Q A K -
3121 CATGCTCATCCGGTTGATCATCAGGCAAATAA

```

Secuencia de nucleótidos del gen *acrB* y secuencia de 1050 aminoácidos deducida a partir de la misma. Las hélices transmembrana predichas con el programa TOPCONS aparecen subrayadas.

VII.4.3. Secuencia del gen *acrR*

```

1   M A R K T K Q Q A L E T R Q Q I L D A A
1   ATGGCACGAAAAACCAACAACAGGCCCTTGAGACCCGACAGCAAATTCTTGATGCTGCC

21  V K E F S E H G V S G T S L A D I A D S
61  GTAAAAGAATTCTCTGAACATGGCGTTTCAGGGACATCGCTCGCGGATATTGCTGATTCT

41  A G V T R G A I Y W H F K N K V D L F N
121 GCGGGCGTGA CTGCTGGTGC TATTTATTGGCATTTCAAAACAAAGTTGATCTGTTAAT

61  E I W A L A E F N I D Q L G I E Y Q A K
181 GAAATCTGGGCATTAGCGGAATTTAACATTGATCAACTTGAATAGAGTATCAGGCAAAA

81  F P D N P L R I L R E I L I Y I L I A T
241 TTTCTGATAATCCACTGCGGATTCTGCGTGAAATACTTATTTATATACTGATCGCTACT

101 Q D D D R R R A L M E I V F H K C E F V
301 CAGGACGACGATCGCCGTCGAGCATTGATGGAAATTGTTTTCCACAAATGTGAGTTCGTG

121 G E M T S V H N A R K V L Y L A S Y E R
361 GGAGAAATGACCTCGGTTTCATAACGCCAGAAAAGTCCTCTATCTCGCAAGTTATGAGCGA

141 I E T V L Q D C I A A Q Q L P P D L N T
421 ATTGAAACCGTTTTGCAAGACTGTATTGCGGCTCAACAGCTCCCGCCGATCTGAATACT

161 R R T A I I M R A Y I T G L M E N W L F
481 CGCCGGACCGCTATTATTATGCGTGCTTATATCACCGGCCTGATGGAAAATTGGTTATTT

181 T P E S F D L K Q E A T I L I D A F L E
541 ACGCCAGAATCCTTTGATCTAAAACAAGAGGCAACCATATTGATTGATGCTTTTCTTGAA

201 M I A Q C L T L R G E G I Q P K -
601 ATGATCGCGCAATGCCTCACCTACGAGGTGAGGGGATACAACCTAAATAA

```

Secuencia de nucleótidos del gen *acrR* y secuencia de 216 aminoácidos deducida a partir de la misma.