



Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado
Universidad de Oviedo



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DEL PATÓGENO DE
PECES *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM***

Mario García Domínguez
21 de Julio de 2014

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DEL PATÓGENO DE
PECES *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM***

Mario García Domínguez

Firma

José Agustín Guijarro Atienza

María Jesús Cañal Villanueva

Firma

Firma

AGRADECIMIENTOS

El trabajo ha sido fruto de muchas personas, quienes han hecho que haya evolucionado en el terreno profesional y personal.

En primer lugar, agradecer a Esther Gómez López por la excesiva dedicación al presente trabajo y en segundo lugar, agradecer a José Agustín Guijarro Atienza por haberme brindado la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación, la realización del trabajo y la confianza depositada en mí.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, por la paciencia que habéis tenido. Agradecer a Anais, desde hace mucho tiempo que nos conocemos y nos une una amistad y siempre ahí has estado para ayudarme en todo lo que necesitara; Jessica, a quién siempre recurrimos y nos ayuda con una sonrisa y Desirée en el que gracias a ti pude aprender muchas cosas.

Gracias a mis amigos de carrera Marina, Víctor, Carlos, Marcos y Lucía a quien os deseo todo lo mejor en vuestra vida personal y profesional. En Especial, Xurde y Leticia me habéis dado grandes tardes de comidas y cafés e hicisteis que desconectara un rato de la monotonía. También, agradecer a mis compañeros del Máster por todo el cariño mostrado.

Agradecer a mis profesores de carrera por haber adquirido todos los conocimientos que poseo, pero en especial quiero agradecer a un profesor que recientemente nos ha dejado, Manuel Benjamín Manzanal Sierra. En primer lugar, agradecerte aquellas clases tan entretenidas y productivas que nos has dado en Microbiología, Diversidad de Procariotas y MiPaSa; aquellos consejos que nos proporcionabas con esa sabiduría que rebosabas y aquellas discusiones deportivas que todos los días teníamos. Te recordaremos para siempre Benjamín.

Por último, quiero agradecer a mis padres y mi hermano (María del Carmen, Francisco José y Jorge) y amigos (Alberto, José Antonio, Samuel, Álvaro, Víctor, Adri, Javi, Sergio y Pablo) todo el cariño y los buenos momentos que me he habéis proporcionado y sobre todo haberme apoyado en los momentos tan difíciles que últimamente he estado atravesando y haberme permitido ser realmente como soy.

RESUMEN-ABSTRACT

El presente trabajo se centra en la caracterización de varios mutantes de *Flavobacterium psychrophilum*. Esta bacteria Gram-negativa, es el agente etiológico de la “Enfermedad de agua fría” que afecta principalmente a salmónidos.

Esta bacteria es considerada como “fastidiosa” debido a que presenta muchas dificultades para su cultivo, crecimiento y manipulación.

Los factores de virulencia con los que cuenta la bacteria están muy poco estudiados e incluyen adhesinas, toxinas y proteasas. Además, presenta un movimiento particular por deslizamiento conocido como “gliding”, cuyos fundamentos son poco conocidos.

En el presente trabajo se seleccionaron cuatro mutantes de una genoteca de *F. psychrophilum* obtenida mediante transposición. El análisis *in silico* de los genes interrumpidos por el transposón Tn4351 indicó que estos codificaban las siguientes proteínas: chaperona con actividad ATPasa (*ClpB*), proteína reguladora del sistema de secreción (*PorY*), proteína implicada en la síntesis de exopolisacáridos (*Wzc*) y una fungalisina con actividad proteolítica (*FpfB*). La caracterización fenotípica de estos mutantes en parámetros como crecimiento, actividad proteolítica extracelular y deslizamiento de la colonia en un medio sólido indicó que no había diferencias significativas entre ellos y la cepa parental. El mutante en el gen *clpB*, se estudió más en profundidad, encontrándose que su comportamiento difería frente al H₂O₂ y al choque térmico en relación a la cepa parental.

Los resultados de la valoración de la DL₅₀ indicaron que el mutante *clpB* presentaba diferencias significativas respecto a la cepa parental.

The present study focuses on the phenotypic characterization of several mutants of *Flavobacterium psychrophilum*. This Gram-negative bacterium is the etiological agent of the “cold water disease” that usually affects salmonids.

This microorganism is considered a rather fastidious bacterium because it is very difficult to isolate and handle.

Virulence factors of *F. psychrophilum* are little known. Several molecules secreted have been described as involved in virulence, such as proteases, toxins and adhesins. In addition, *F. psychrophilum* has a particular way to move over wet surface named gliding.

In this work, four mutants were selected from a *F. psychrophilum* transposition library. The *in silico* analysis of the interrupted gene by the Tn4351 transposon showed that they coded for the following proteins: An ATPase chaperone activity (*ClpB*), a secretion system regulatory protein (*PorY*), a protein involved in exopolysaccharide synthesis (*Wzc*), and a fungalsin with proteolytic activity (*FpfB*). Mutants characterization in parameters such as growth, extracellular proteolytic activity and colony spreading on a solid medium showed that there were not differences between the mutants and the parental strains. Further analysis of the *clpB* mutant showed significant differences in its behavior against H₂O₂ and thermal shock in relation to the parental strain, although it presented similar LD₅₀.

ABREVIATURAS

Agua MQ: Agua Milli-Q

AN: Agar nutritivo

ANC: Agar nutritivo charcoal

CN: Caldo nutritivo

CWD: Cold water disease

DL₅₀: Dosis letal 50

EPS: Exopolisacáridos

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique (Instituto Nacional de la Investigación Agronómica)

PBP: Pencillin-binding protein

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PIPES: piperazina-N,N'-bis(2-ácido etanosulfónico)

p.p.m.: Partes por millón

RBS: Sitio de unión del ribosoma

ROS: Especies reactivas de oxígeno

r.p.m.: Revoluciones por minuto

Ta: Temperatura de anillamiento

TCA: Ácido tricloroacético

U.E./mL: Unidades enzimáticas por mililitro

u.f.c.: Unidades formadoras de colonia

I. Introducción	1
II. Material y métodos	4
II.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	4
II.2. Obtención de los mutantes mediante mutagénesis por transposición	4
II.3. Técnicas generales de manipulación del DNA	5
II.3.1. Extracción del DNA	5
II.3.2. Técnica de hibridación “Southern-Blot”	5
II.3.3. Determinación de la orientación y del lugar de inserción del transposón Tn4351	5
II.3.4. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias	7
II.4. Caracterización fenotípica de los mutantes	8
II.4.1. Curvas de crecimiento	8
II.4.2. Análisis de la actividad proteolítica extracelular	8
II.4.3. Análisis del deslizamiento de la colonia	8
II.4.4. Determinación de la virulencia de las cepas mutantes. Ensayo presuntivo	9
II.5. Caracterización del mutante P15.02	9
II.5.1. Análisis del crecimiento	9
II.5.2. Análisis de la resistencia al H ₂ O ₂ y NaCl	9
II.5.3. Efecto del choque térmico	9
II.5.4. Determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀)	10
III. Resultados	11
III.1. Análisis de los genes interrumpidos en las cepas mutantes seleccionadas	11
III.1.1. Inserción del transposón Tn4351 en el genoma de las cepas mutantes	11
III.1.2. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias interrumpidas en los mutantes	11
III.2. Caracterización fenotípica de los mutantes	16
III.2.1. Curvas de crecimiento	16
III.2.2. Análisis de la actividad proteolítica extracelular	17
III.2.3. Análisis del deslizamiento de la colonia	18
III.2.4. Determinación presuntiva de la virulencia de las cepas mutantes	19
III.3.4. Caracterización del mutante P15.02	19
III.3.1. Análisis del crecimiento	19
III.3.2. Determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀) de la cepa P15.02	19
III.3.3. Análisis de la resistencia al H ₂ O ₂ y NaCl	20
III.3.4. Efecto del choque térmico	22
IV. Discusión	23
V. Conclusiones	26
VI. Referencias bibliográficas	27

I. INTRODUCCIÓN

La **acuicultura** se define como el cultivo de organismos acuáticos entre los que se incluyen peces, moluscos, crustáceos y plantas, dirigido al aumento de su producción (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Durante los últimos años (2006-2011), la acuicultura intensiva ha tenido un incremento de la producción a nivel mundial de alrededor de un 30% con un fuerte componente de la acuicultura continental (FAO, 2012).

Debido a este desarrollo y a características propias del sistema de producción, uno de los problemas que afecta a la producción en la acuicultura y que se traduce en grandes pérdidas económicas a nivel mundial es la incidencia de enfermedades infecciosas tipo bacteriano y vírico. Entre ellas se encuentra la denominada “**Enfermedad del agua fría**” (cold water disease, CWD) que afecta, principalmente, a salmónidos. El agente etiológico de esta patología es *Flavobacterium psychrophilum*, una bacteria Gram negativa, aerobia estricta, psicrotrofa (crece en un rango de 4-23°C), poco tolerante al NaCl (crece hasta el 0,8% de NaCl) y que en cultivo en medios sólidos forma colonias de color amarillo debido a la síntesis del pigmento flexirrubina (Fig. I.1.A). Es una bacteria definida como “fastidiosa” por la dificultad que presenta su cultivo y manipulación. Morfológicamente, son bacterias filamentosas con un tamaño de alrededor de 7.5 x 0.5 µm (Fig. I.1.B). *F. psychrophilum* es catalasa y oxidasa positivo y es capaz de degradar caseína, gelatina y, algunas cepas, son capaces de degradar tirosina, esculina, quitina, almidón y xantina (Austin y col., 2012).

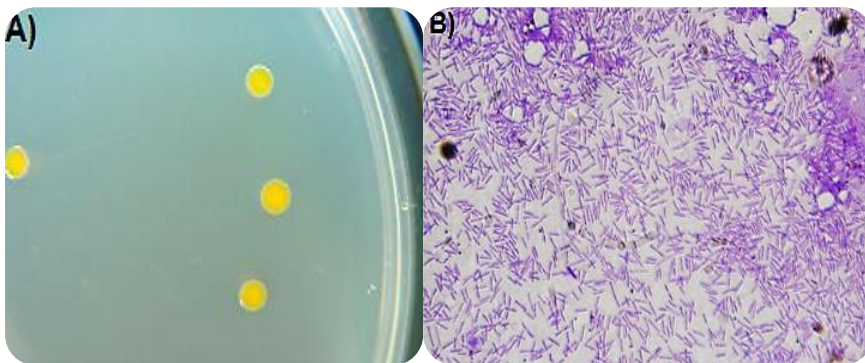


Figura I.1. A) Colonias en un medio sólido con el característico color amarillo de *F. psychrophilum*; B) Morfología de células de *F. psychrophilum* visualizadas mediante Microscopía óptica de campo claro, teñidas en cristal violeta y observada a 1000x, imagen obtenida de Starliper, 2011.

Aunque el proceso infeccioso no está aún bien establecido, los datos indican que *F. psychrophilum* coloniza la superficie de los peces y puede entrar a través de las erosiones y heridas de la piel, produciendo una degradación de los tejidos, particularmente en la zona del pedúnculo y la aleta caudal, ocasionando heridas importantes y necrosis de tejidos. A continuación, el patógeno pasa directamente a la sangre provocando una septicemia y la muerte del animal. La CWD puede llegar a presentar en alevines una tasa de mortalidad de hasta el 90% (Nilsen y col., 2011) debido a que no tienen un sistema inmune desarrollado (Crump y col., 2005).

La enfermedad ocurre típicamente a temperaturas del agua entre 10 y 14°C por lo que los brotes aparecen especialmente en los meses de otoño e invierno (Starliper, 2011).

Los signos de la enfermedad son oscurecimiento, erosiones y ulceraciones en la piel (Figuras I.2.A y I.2.B), necrosis en las aletas, exoftalmia bilateral y anemia. Los peces evidencian un comportamiento con desorientación, letargia y anorexia, entre otros (Bernardet, 1988, Lorenzen

I. INTRODUCCIÓN

y col., 1997). Los casos severos exhiben descamación completa de la aleta caudal con exposición abierta de la espina en el área del pedúnculo caudal (Figuras 1.2.A y 1.2.B). También han sido observadas hemorragias en la base de las aletas y ano (Bustos y col., 1995). En general, las infecciones provocadas derivan en septicemias.



Figuras 2A y 2B. Representaciones de unos ejemplares de *O.mykiss* infectados con *F. psychrophilum*, en los que se observan las manifestaciones de la CWD.

En la actualidad no existe vacuna comercializada que permita la prevención de la enfermedad por lo que la única manera de controlar los brotes es mediante la aplicación de antibióticos como oxitetraciclina, amoxicilina y florfenicol (Cipriano y Holt, 2005).

En los últimos años, se han publicado diferentes estudios que han proporcionado un conocimiento más amplio de *F. psychrophilum*. Así, se han desarrollado métodos de diagnóstico molecular (Del Cerro y col., 2002), de serotipado (Mata y col., 2002), de tipificación (Arai y col., 2007), medios de cultivo más apropiados (Álvarez y col., 2007) y sistemas genéticos para su manipulación (Álvarez y col., 2004). Junto a esto, la obtención de la secuencia completa del genoma de la cepa *F. psychrophilum* JIP02/86 (Duchaud y col., 2007) ha posibilitado el estudio de algunos determinantes de virulencia de la bacteria (Dumetz y col., 2008) y abre nuevas perspectivas para futuros estudios.

Sin embargo, la mayoría de los aspectos relacionados con la fisiología de *F. psychrophilum* y sobre todo, los involucrados en su virulencia están aún por determinar. Esta bacteria tiene un particular mecanismo de movimiento mediante deslizamiento “gliding” (McBride, 2004). Se ha sugerido la *adherencia bacteriana* como factor de virulencia (Nematollahi y col., 2003) y se ha identificado un antígeno de superficie como posible adhesina (Crump y col., 2005).

Otros estudios implican en la virulencia de esta bacteria a una *tiol oxidoreductasa* (Álvarez y col., 2006) y a un *sistema de captación de hierro* (Álvarez y col., 2008). En otros trabajos se ha encontrado una correlación entre la *actividad proteolítica extracelular* y la virulencia (Bertolini y col., 1994). En este sentido, las proteasas extracelulares pueden proporcionar nutrientes a la bacteria y además, facilitan su diseminación por los tejidos del pez. En ese ámbito, Secades y col. (2001; 2003) identificaron, purificaron y caracterizaron dos metaloproteasas extracelulares, denominadas Fpp1 y Fpp2 que eran capaces de degradar componentes de la matriz y tejido muscular. Sin embargo, cepas que presentaron mutaciones en estos genes no perdían el carácter virulento (Pérez-Pascual y col., 2011). Los datos apuntan a que la actividad proteolítica extracelular puede ser un factor determinante en la patogenicidad de la bacteria, pero no se ha conseguido demostrar de forma directa su implicación.

I. INTRODUCCIÓN

Por último, se ha publicado un trabajo en el que se han identificado una serie de genes que se expresan bajo a temperaturas próximas a las que hay cuando tienen lugar los brotes de la enfermedad que en aquellas temperaturas más próximas al óptimo de crecimiento, concluyendo los autores que, probablemente muchos de estos genes pueden estar directamente relacionados con la virulencia de la bacteria (Hesami y col., 2011).

Actualmente, las técnicas de manipulación genética son imprescindibles para el estudio de cualquier microorganismo. Sin embargo, hasta los últimos años, por el carácter “fastidioso” de *F. psychrophilum* no ha sido posible el establecimiento de algunos sistemas de manipulación genética. Entre ellos están la interrupción de genes mediante transposición (Álvarez y col., 2004) y por mutagénesis insercional (Pérez-Pascual y col., 2011). Ello ha permitido el inicio del estudio de determinados genes y la relación que estos tenían con la virulencia de la bacteria (Álvarez y col., 2004). Uno de los logros más relevantes en este desarrollo de sistemas genéticos fue la construcción de una genoteca de mutantes por transposición en *F. psychrophilum* utilizando el transposón Tn4351 (Álvarez y col., 2004). El transposón tiene un tamaño de 6,2 Kb y está constituido por varios componentes: I) Dos secuencias de inserción, denominadas IS4351, en cada extremo; II) Un gen que confiere resistencia a la eritromicina (*ermF*); III) Un gen que confiere resistencia a la tetraciclina (*tetX*) (Álvarez y col., 2004). Se consiguió así un total de 347 mutantes con la inserción del transposón Tn4351 en la región estructural de cada gen (Gómez E., 2014).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el interés biológico y la importancia como agente patógeno que tiene *F. psychrophilum* en la acuicultura, en este trabajo se plantearon los siguientes **objetivos**:

- I. Análisis de la inserción del transposón Tn4351 en cuatro mutantes obtenidos previamente mediante transposición.
- II. Caracterización fenotípica de estos mutantes.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las características de las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo se muestran en la tabla II.1.

Tabla II.1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepa	Descripción o genotipo	Referencia
<i>F. psychrophilum</i>		
THC02-90	Parental	(Chakroun y col., 1998)
P15.02	Mutante en el gen <i>clpB</i>	Gómez, E. Universidad de Oviedo
P12.03	Mutante en el gen <i>porY</i>	Gómez, E. Universidad de Oviedo
P5.46	Mutante en el gen <i>wzc</i>	Gómez, E. Universidad de Oviedo
P4.39	Mutante en el gen <i>fpfB</i>	Gómez, E. Universidad de Oviedo

Las cepas de *F. psychrophilum* fueron cultivadas en los siguientes medios: Caldo nutritivo, (**CN**), cuya composición consiste en 5 g/L de peptona y 3 g/L de extracto de carne (VWR, España); Agar nutritivo (**AN**), resultado de la adición de agar en una concentración final de 15 g/L (Bacto-agar, Oxoid, Reino Unido) y Agar nutritivo charcoal (**ANC**), resultado de la adición al AN de carbón activo en una proporción de 0,05% (p/v) (Sigma-Aldrich Co., EEUU).

Los cultivos en el medio líquido de *F. psychrophilum* fueron incubados a 12°C, 18°C, 20°C y 22°C en un incubador con agitación orbital a 250 r.p.m. Los cultivos en el medio sólido fueron incubados a 12°C y 20°C. En aquellos casos en los que fue necesario, se adicionó a los medios de cultivo eritromicina a una concentración final de 10 µg/mL.

El seguimiento del crecimiento de los cultivos en medio líquido se realizó mediante la determinación de la densidad óptica a 525 nm (DO_{525}), en un espectrofotómetro Hitachi U2900.

II.2 OBTENCIÓN DE LOS MUTANTES MEDIANTE MUTAGÉNESIS POR TRANSPOSICIÓN

Las cepas mutantes P15.02, P12.03, P5.46 y P4.39 se obtuvieron en el Área de Microbiología de la Universidad de Oviedo y forman parte de la genoteca de mutantes por transposición generada en *F. psychrophilum* (Gómez E., comunicación personal 2014). La mutagénesis por transposición consistió en la conjugación entre la cepa donante *E.coli* BW19851 (Metcalf y col., 1994), portadora del plásmido pEP4351 (Fig. II.1), el cual lleva incorporado el transposón Tn4351 y la cepa receptora *F. psychrophilum* THC02-90. El plásmido pEP4351 no se puede replicar en *F. psychrophilum* y en consecuencia la única manera de obtener después de la conjugación colonias resistentes a la eritromicina es que el transposón se haya incorporado al genoma de esta bacteria. Esta incorporación tiene lugar al azar (Álvarez y col., 2004). Los mutantes se seleccionaron en el medio sólido ANC con 10 µg/mL de eritromicina. Estos mutantes fueron secuenciados mediante PCR inversa semi-

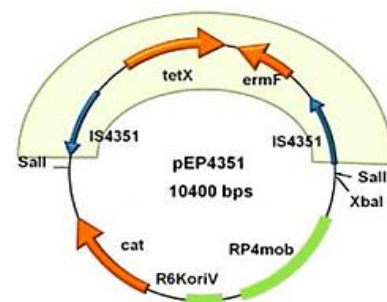


Figura II.1. Representación gráfica del plásmido pEP4351 utilizado para la conjugación, con el fin de introducir el transposón en el genoma de *F. psychrophilum*. Con el arco verde se representa el transposón Tn4351, delimitado por las secuencias de inserción IS4351 en azul. El gen *tetX* es el responsable de la resistencia a tetraciclina y el gen *ermF* a eritromicina. (Imagen obtenida de Pérez-Pascual, 2011).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

automatizada, tal y como se describe en el trabajo de Álvarez y col. (2004).

II.3. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN DEL DNA

II.3.1. Extracción de DNA

El DNA de las diferentes cepas de *F. psychrophilum* fue obtenido utilizando el sistema comercial "Gen Elute Bacterial Genomic DNA" (Sigma Aldrich Co., EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la purificación del DNA a partir de los geles de agarosa, se utilizó el sistema denominado "PCR DNA and Gel Band Purification kit" (GE Healthcare, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.3.2. Técnica de hibridación "Southern-Blot"

Una vez extraído el DNA de cada una de las cepas, se procedió a su digestión con los enzimas de restricción necesarios para cada caso. A continuación, los fragmentos de DNA así obtenidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa (a una concentración de 0,75 %), y fueron transferidos por capilaridad durante al menos dos horas, a membranas de nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences, Reino Unido). Posteriormente, el DNA se fijó a la membrana por exposición a luz UV durante 3 minutos. Seguidamente, la membrana se incubó durante 90 minutos y a 60°C con una solución de prehibridación a la que posteriormente se le añadió la sonda correspondiente. Esta sonda procede de la digestión del plásmido pEP4351 con el enzima de restricción *SalI* y el fragmento resultante de tamaño de 6,2 Kb fue marcado mediante el kit comercial "DIG labeling and detection" (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras un período de incubación de 90 minutos y a 60°C, la membrana se lavó sucesivamente y se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina.

El revelado se llevó a cabo incubando la membrana con una solución que contiene el sustrato quimioluminiscente de la fosfatasa alcalina del sistema comercial "CDP-Star" (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Posteriormente, la membrana se expuso a una película de radiografía "Hyperfilm MP" (Amersham Biosciences, Reino Unido) durante unos 30 minutos. A continuación, la película se reveló, fijó y lavó, para su análisis y conservación.

II.3.3. Determinación de la orientación y del lugar de inserción del transposón Tn4351

La amplificación de los fragmentos de DNA que delimitan el lugar de inserción de Tn4351 y la determinación de su orientación fue llevada a cabo mediante reacciones de PCR en un termociclador Perkin-Elmer modelo 9700 GeneAmp utilizando los oligonucleótidos recogidos en la tabla II.2 y en las condiciones que se indican en la tabla II.3.

La Figura II.2 muestra la localización de los oligonucleótidos dentro del gen interrumpido por el transposón Tn4351. Las reacciones de PCR han requerido la presencia de controles negativos (DNA de la cepa parental y de todos los componentes de la PCR sin el DNA) para la validación de la reacción de PCR.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla II.2. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.

Oligonucleótidos	Secuencia	Ta
Transposón Tn4351		
IS4351-F	5' TCAGAGTGAGAGAAAGGG 3'	54°C
340	5' GACTTGGATACCTCACGCC 3'	60°C
Mutantes		
P15.02	R 5' ATCGATCTAATAAAATAATGCTATCGG 3' M 5' ATCGAATGGCTTCAATTTCAATCTCT 3'	58°C 58°C
P12.03	R 5' ATCGATCCTTCCGTTGTGGTATTC 3' M 5' ATCGTTCGACCCAACCAATGAGAG 3'	58°C 60°C
P5.46	R 5' ATCGTAACCATAGCCTAACCATAG 3' M 5' ATCGTCATTTTTAACCGCATAAGACA 3'	58°C 58°C
P4.39	R 5' ATGCTTTAATTTCGTCTCCGTCTATTTT 3' M 5' ATCGGGTAAATGTATTGTCAGCTGC 3'	60°C 60°C

Tabla II.3. Condiciones de PCR utilizadas para cada uno de los mutantes.

Reacción de PCR	Oligonucleótidos	Desnaturalización inicial	Amplificación	Elongación final
		1 ciclo	25 ciclos	1 ciclo
P15.02	IS4351-F+P15.02-R; IS4351-F+P15.02-M	94°C/ 5 min	94°C/ 30 s 52°C/ 30 s 72°C/ 2,30 min	68°C/ 7 min
	340+P15.02-R; 340+P15.02-M	94°C/ 5 min	94°C/ 30 s 56°C/ 30 s 72°C/ 2,30 min	68°C/ 7 min
P12.03	IS4351-F+P12.03-R; IS4351-F+P12.03-M	94°C/ 5 min	94°C/ 30 s 52°C/ 30 s 72°C/ 1,30 min	68°C/ 7 min
	340+P15.02-R; 340+P15.02-M	94°C/ 5 min	94°C/ 30 s 56°C/ 30 s 72°C/ 1,30 min	68°C/ 7 min
P5.46	IS4351-F+P5.46-R; IS4351-F+P-5.46-M	94°C/ 5 min	94°C/ 30 s 52°C/ 30 s 72°C/ 2,30 min	68°C/ 7 min
	340+P5.46-R; 340 +P5.46-M	94°C/ 5 min	94°C/ 30 s 56°C/ 30 s 72°C/ 2,30 min	68°C/ 7 min
P4.39	IS4351-F+P4.39-R; IS4351-F+P-4.39-M	94°C/ 5 min	94°C/ 30 s 52°C/ 30 s 72°C/ 2,30 min	68°C/ 7 min
	340+P4.39-R; 340 +P-4.39-M	94°C/ 5 min	94°C/ 30 s 58°C/ 30 s 72°C/ 2,30 min	68°C/ 7 min

II. MATERIAL Y MÉTODOS

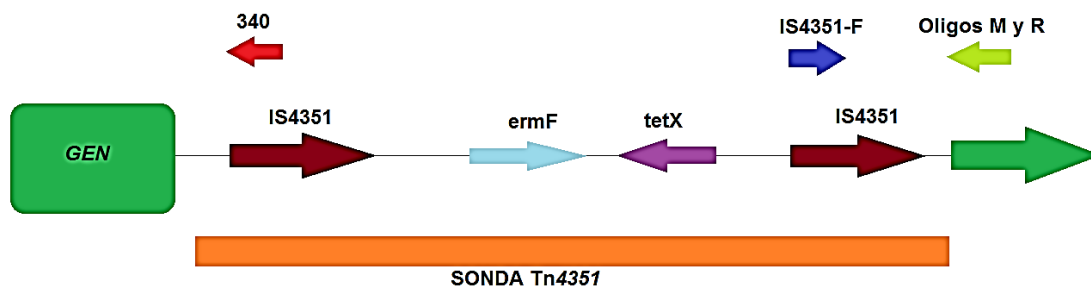


Figura II.2. Representación de la situación generada por la interrupción de un gen (verde oscuro) por la inserción del transposón Tn4351 (naranja) en el genoma de *F. psychrophilum*. En la imagen se muestra la localización de la sonda generada por PCR del transposón que fue utilizada para la hibridación con el DNA de los diferentes mutantes analizados y en la parte superior se indica la situación de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de amplificación por PCR: 340 (rojo claro), IS4351-F (azul oscuro) y los oligonucleótidos específicos diseñados (verde claro) para definir el sentido de la orientación del transposón en cada uno de los mutantes.

II.3.4. Análisis *in silico* de las secuencias

La secuenciación rutinaria de los productos de amplificación de PCR se llevó a cabo siguiendo el método de terminación de la cadena por didesoxinucleótidos en un secuenciador de DNA automático ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EEUU), mientras que los generados mediante PCR inversa fueron analizados en un secuenciador ABI 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, EEUU).

Las secuencias obtenidas de DNA se compararon con las disponibles en bases de datos como la específica de *F. psychrophilum*, desarrollada por la plataforma bioinformática **MIGALE** perteneciente al **INRA** (Francia) (disponible en la dirección web <http://migale.jouy.inra.fr>) o en bases de libre acceso como **BlastX** (disponible en la dirección web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que permite a partir de una secuencia de nucleótidos conocida, compararla con otras secuencias de otros organismos para conocer el grado de identidad existente entre ellas. Gracias al programa **Findterm**, dentro de la plataforma bioinformática **Softberry** (disponible en la dirección web <http://www.softberry.com/>), puede identificar secuencias terminadoras de la transcripción. Para la búsqueda de la secuencia RBS y promotoras se utilizó la información proporcionada por el trabajo de Chen y col. (2007).

Para el análisis de las secuencias de los productos génicos, existen diversos programas entre los que se encuentra el **BlastP** (disponible en la dirección web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que permite la comparación de la secuencia de aminoácidos (extraída de la plataforma bioinformática **MIGALE** y la propia secuencia en la base de datos del Blast y además, BlastP permite conocer los dominios de las proteínas dominios). El programa **MEMSAT3** permite junto al programa **Psipred** (disponibles en la dirección web <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) la predicción de la estructura secundaria y la topología de las hélices transmembrana. Para la predicción de la existencia de péptidos señal en la secuencia proteica, se utilizó el programa **SignalP** (disponible en la dirección web <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES

II.4.1. Curvas de crecimiento

Las diferentes cepas se cultivaron en el medio CN con CaCl_2 a una concentración de 1 mM y a una temperatura de 12°C y 250 r.p.m. El crecimiento fue seguido midiendo la DO_{525} de cada uno de los cultivos a diferentes tiempos durante 5 días.

II.4.2. Análisis de la actividad proteolítica extracelular

La actividad proteolítica extracelular fue determinada de dos maneras diferentes:

A. Ensayos en medio sólido en placa con el medio AN con caseína al 1% (Sigma Aldrich Co., EEUU) y CaCl_2 a una concentración de 10 mM. El medio se preparó añadiendo la caseína al medio AN y una vez autoclavado, se adicionó el CaCl_2 que había sido también esterilizado. Las placas fueron inoculadas con 8 μL que se depositaron sobre la superficie del medio, procedentes de un cultivo en la fase estacionaria de crecimiento ($\text{DO}_{525} = 1.3-1.5$) de cada una de las cepas. Las placas fueron, a continuación, incubadas a una temperatura de 12°C durante 120 horas. Para un mejor contraste y observación de la actividad proteolítica de cada una de las colonias, finalizado el periodo de incubación se añadió al medio HCl en una concentración de 1 N. El halo alrededor de las colonias formado por la degradación de la caseína se fotografió con una cámara Panasonic Lumix TZ8. En todos los casos se hicieron tres ensayos para cada cepa de forma independiente.

B. Ensayos en medio líquido a lo largo de la curva de crecimiento utilizando como sustrato azocaseína (Sigma Aldrich Co., EEUU). El procedimiento seguido fue básicamente el descrito por Secades y col. (2001). Brevemente, se añadieron 350 μL de una solución de azocaseína al 1 % (disuelta en tampón PIPES 25 mM y CaCl_2 5 mM, pH 6,5) a 250 μL del sobrenadante del cultivo. La reacción se incubó durante 2 horas a 30°C, y se paró añadiendo 600 μL de TCA a una concentración final del 10%, y se mantuvo en hielo, al menos, durante 30 minutos. A continuación, se centrifugó la muestra a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, y 800 μL del sobrenadante se neutralizaron con 200 μL de NaOH 1,8 M. La intensidad del color obtenido se midió en un espectrofotómetro Hitachi U2900 a 420nm (DO_{420}). El ensayo se realizó por triplicado. Se definió la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que incrementa la DO_{420} en 0,01 unidades, a 30°C durante 2 horas de incubación.

II.4.3. Análisis del deslizamiento de la colonia

Para el análisis del deslizamiento de la colonia, se preparó una dilución 1/6 del medio CN, en el que además, la concentración de agar añadida fue de 7,5 g/L (1/6AN). El medio una vez esterilizado se añadió a placas de Petri y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 15 minutos en una cabina de seguridad biológica con exposición a luz UV. A continuación, estos medios fueron inoculados con 8 μL de cultivos de cada una de las cepas crecidos en CN hasta la fase estacionaria de crecimiento ($\text{DO}_{525} = 1.3-1.5$) y las placas se incubaron a 20°C. El deslizamiento de las colonias en el medio de cultivo se cuantificó midiendo el diámetro de la colonia cada 24 horas de incubación durante un total de 5 días. Finalizando el tiempo de incubación, se obtuvieron imágenes de las colonias con una cámara Panasonic Lumix TZ8. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y para observar si existen diferencias significativas entre el deslizamiento de las colonias de las diferentes cepas a las 120 horas de incubación, se procedió a la realización de una prueba T utilizando el Programa SPSS 19.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.4.4. Determinación de la virulencia de las cepas mutantes. Ensayo presuntivo

La determinación de la virulencia de las cepas mutantes se llevó a cabo en alevines de trucha arcoíris (*O. mykiss*) con un peso de 5-8 g. Los peces se mantuvieron en tanques con 60 l de agua de clorada, a una temperatura de $12\pm 1^{\circ}\text{C}$. Los cultivos de cada una de las cepas se crecieron en el medio CN a 250 r.p.m. y 12°C hasta la fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{525}= 0.6-0.7$) y se lavaron con PBS a 4°C mediante centrifugación.

A partir de estos cultivos, se prepararon diluciones seriadas con base 10 en PBS, desde 10^4 hasta 10^7 u.f.c. para la cepa parental; de 10^6 y 10^7 u.f.c. para los mutantes. Volúmenes de 50 μL de cada una de las diluciones fueron inyectadas intramuscularmente, a nivel de la aleta dorsal, a grupos de diez peces. Como control, se inyectó 50 μL de PBS a un grupo de 10 peces. Al cabo de 10 días se cuantificó la mortalidad en cada caso a la dosis de 10^6 u.f.c..

II.5. CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE P15.02

II.5.1. Análisis del crecimiento

El procedimiento seguido fue similar al descrito en el apartado II.4.1. de Material y Métodos. La única diferencia es que, se procedió al análisis del crecimiento del mutante P15.02 con respecto a la cepa parental a una temperatura de 22°C .

II.5.2. Análisis de la resistencia al H_2O_2 y NaCl

Las cepas THC02-90 y P15.02 se cultivaron en el medio CN a 18°C y a 250 r.p.m. hasta la fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{525}=0,8$). De este cultivo se tomaron alícuotas de 100 μL de cada cepa que se depositaron en el centro de placas con el medio ANC y se distribuyeron por la superficie del medio con bolas de vidrio. A continuación, se depositaron discos estériles de tamaño $\frac{1}{4}$ " de diámetro (Difco Laboratories, EEUU) a los que se añadieron 15 μl de las diferentes concentraciones de H_2O_2 en un rango de 30 a 120 p.p.m. y porcentajes de NaCl en un rango de 0,3% al 4%. A continuación, las placas se incubaron a 20°C durante 120 horas y se midieron los halos de inhibición del crecimiento. El experimento se realizó tres veces y cada con tres réplicas independientes.

II.5.3. Efecto del choque térmico

Las cepas THC02-90 y P15.02 se cultivaron en el medio CN a 18°C y a 250 r.p.m. hasta la fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{525}=0,8$). Alícuotas de 100 μL de estos cultivos fueron utilizadas para someterlas a choque térmico que consistió en incubarlas a 40°C durante 10 minutos. Tras el tratamiento, las suspensiones celulares fueron pasadas a un baño de hielo y mantenidas en él durante 5 minutos. A continuación, se realizaron diluciones con base 5 desde la 10^7 hasta la 10^4 u.f.c. Como control se utilizaron alícuotas de 100 μL de los mismos cultivos que no fueron sometidas al choque térmico. Seguidamente, se tomaron 8 μL de cada una de las diluciones y se depositaron sobre la superficie del medio.

En cada placa se introdujeron tres réplicas de la cepa mutante y parental de cada tratamiento y el experimento se realizó por triplicado de forma independiente. Las placas se incubaron a 20°C durante 120 horas y las colonias se fotografiaron con una cámara Panasonic Lumix TZ8.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.5.4. Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀)

La determinación de los valores de DL₅₀ se llevó a cabo en alevines de trucha arcoíris (*O. mykiss*) con un peso de 5-8 g. Los peces se mantuvieron en tanques con 60 l de agua de clorada, a una temperatura de 12±1°C. Los inóculos bacterianos fueron preparados a partir de cultivos de las cepas parental y P15.02 que se crecieron en el medio CN a 250 r.p.m. y 12°C hasta la fase exponencial de crecimiento (DO₅₂₅= 0.6-0.7). A continuación, estos cultivos se lavaron con PBS mediante centrifugación.

Se prepararon diluciones seriadas con base 10, desde la 10⁷ hasta 10³ u.f.c. para la cepa parental y de 10⁸ hasta 10⁵ u.f.c. para la cepa mutante. Volúmenes de 50 µL de cada una de las diluciones fueron inyectadas intramuscularmente, a nivel de la aleta dorsal, a grupos de diez peces. Como control se inyectaron 50 µL de PBS a un grupo de 10 peces. El experimento duró 10 días en los que se fueron anotando los peces que iban muriendo y la DL₅₀ se calculó usando el programa Probit del SPSS 19.

III. RESULTADOS

III.1. ANÁLISIS DE LOS GENES INTERRUMPIDOS EN LAS CEPAS MUTANTES SELECCIONADAS

III.1.1. Inserción del transposón Tn4351 en el genoma de las cepas mutantes

Con el fin de definir si el transposón Tn4351 se había insertado solamente una vez en el genoma de los cuatro mutantes elegidos se llevó a cabo una hibridación, mediante Southern-Blot, entre el DNA digerido con el enzima *Xba*I de cada uno de estos mutantes y una sonda marcada que comprendía prácticamente la totalidad del transposón Tn4351. El resultado mostró que solamente había una banda de hibridación para cada uno de los mutantes (Fig.III.1). Así en el caso del mutante P15.02 (Fig. III.1, calle 4) se observó una banda de hibridación de 7 Kb. Para los mutantes P14.39, P12.03 y P5.46 (Fig. III.1, calles 5, 6 y 7 respectivamente) las bandas identificadas se correspondieron con 14, 11,5 y 9 Kb respectivamente. Como era esperable no se detectó ninguna banda de hibridación en el DNA de la cepa parental (Fig.III.1, calle 2). Estos resultados indican claramente que el transposón se insertó una única vez en los genomas de las respectivas cepas mutantes que hemos estudiado.

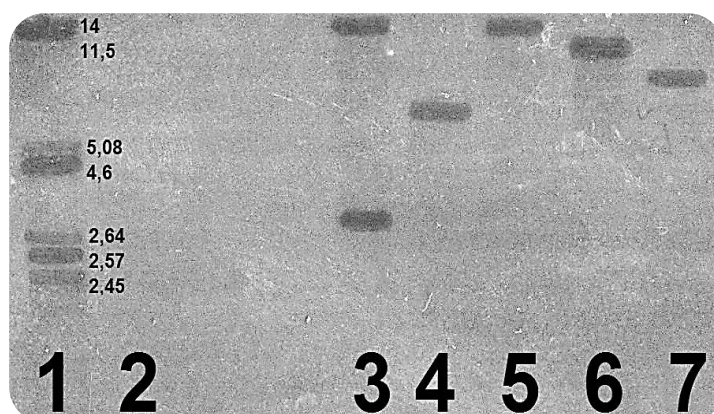


Figura III.1. Hibridación del DNA de las diferentes mutantes digerido con el enzima *Xba*I con la sonda marcada del transposón Tn4351. Calle 2 DNA de la cepa parental THC02-90; Calle 3 DNA de la cepa P1.31, control de doble inserción del transposón Tn4351; Calles 4, 5 y 6 y 7 DNA de las cepa mutantes P15.02; P4.39; P12.03 y P5.46, respectivamente.; Calle 1, DNA del virus λ digerido con el enzima *Pst*I como referencia de tamaños de DNA en kb.

III.1.2. Análisis *in silico* de las secuencias interrumpidas en los mutantes

El transposón en el **mutante P15.02 (*clpB*)** se insertó en la posición 1.000 del locus **THC0290_0942** del genoma. La determinación de la orientación del transposón indicó que estaba situado en el mismo sentido que el de transcripción del gen interrumpido (datos no presentados).

El gen *clpB* codifica una proteína de 866 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 96,96 KDa. El análisis *in silico* de esta proteína reveló una serie de dominios (Fig. III.2) implicados en la unión de la proteína a un ligando (**ClpN**, de la posición 92 a la 143); actividad chaperona asociada a ATPasa (**AAA⁺**, de las posiciones 179 a la 338 y 569 a la 717); y suministro de energía para el funcionamiento de la proteína (**clpB_D2**, de la posición 770 a la 859). En su estructura se define una hélice transmembrana y un segmento extracelular, con lo que es posible que esta proteína esté localizada en la membrana citoplasmática.

III. RESULTADOS

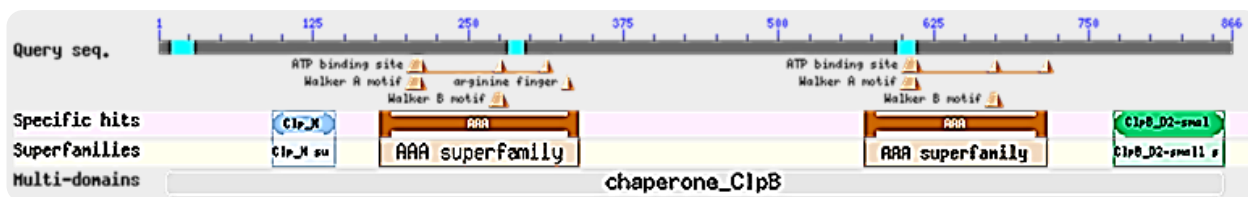


Figura III.2. Organización estructural y dominios de la proteína *ClpB* de la cepa de *F. psychrophilum* THC02-90. Imagen obtenida gracias al Programa **BlastP**. La proteína consta de una serie de dominios: **ClpN**, implicada en la unión de la proteína a un ligando; **AAA⁺**, implicado en la actividad chaperona asociada a ATPasa y **clpB_D2**, cuya función es el suministro de energía para el funcionamiento de la proteína. Dentro del dominio AAA⁺, se encuentra la zona de unión del ATP y los motivos Walker A y B cuya secuencia permite unir moléculas como ATP, para la ejecución de la función citada.

Esta proteína presenta una identidad del 99% (864/866) sobre el 100% de la secuencia proteica (E-valor 0,0) con una proteína *ClpB* de la cepa de *F. psychrophilum* JIP02/86 (Número de acceso al GenBank YP_001296639.1). También presenta una identidad del 93% (799/863) sobre el 99% de la secuencia proteica (E-valor 0,0) con una proteína ATPasa con actividad chaperona perteneciente a la cepa *Flavobacterium branchiophilum* FL-15 (Número de acceso al GenBank YP_004842628.1). En tercer lugar, presenta una identidad del 92% (800/867) sobre el 100% de la secuencia proteica (E-valor 0,0) con la chaperona *ClpB* perteneciente a la cepa *Flavobacterium* sp. ACAM (Número de acceso al GenBank WP_016991314.1), entre otras.

Este locus (**THC0290_0942**) (Figura III.3) tiene un tamaño de 2.061 nucleótidos y carece en su extremo 5' de una secuencia promotora definida, aunque sí tiene un RBS con una secuencia TAAA, igual a la secuencia consenso para el género *Flavobacterium* descrita por Chen y col. (2007). En el otro extremo 3' del gen, se encontró una secuencia palindrómica de terminación de la transcripción.

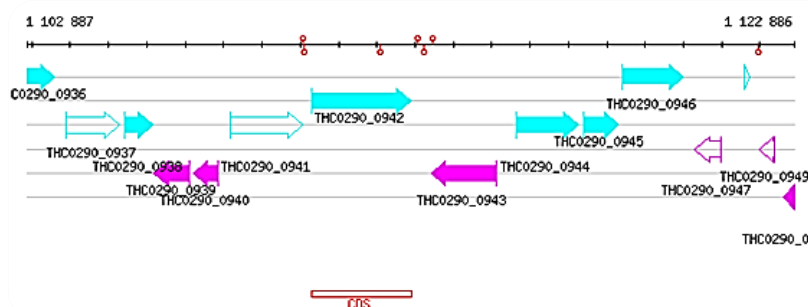


Figura III.3. Representación del contexto genético del gen *clpB*.

El mutante **P12.03 (porY)**, tiene el transposón Tn4351 insertado en la posición 800 del locus **THC0290_2275** del genoma y orientado en sentido inverso al de la transcripción del gen (datos no presentados). Esta secuencia codifica una proteína de 381 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 44,08 KDa. El análisis *in silico* de esta proteína reveló una serie de dominios (Fig. III.4) implicados en su dimerización (**HisKA**, de la posición 183 a la 227) y en la unión a ATP (**HATPase_c**, de la posición 284 a la 379). En su estructura se definieron dos hélices transmembrana y una región extracelular, por lo que como en el caso anterior parece estar localizada en la membrana citoplasmática.

III. RESULTADOS

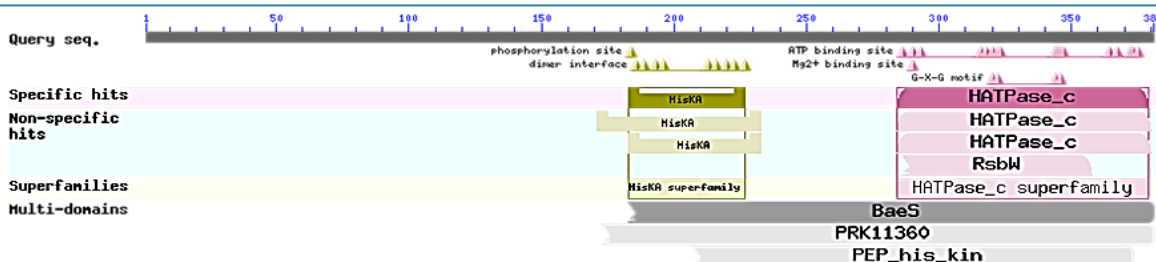


Figura III.4. Organización estructural y dominios de la proteína *PorY* de la cepa de *F. psychrophilum* THC02-90. Imagen obtenida gracias al programa **BlastP**. La proteína consta de dos dominios: **HisKA**, implicada en la dimerización de la proteína y **HATPase_c**, en el que contiene secuencias de unión a ATP.

La proteína presenta una identidad 100% sobre el total de la secuencia proteica (E-valor 0,0) con un sistema de dos componentes histidina-quinasa de la cepa *F. psychrophilum* JIP02/86 (Número de acceso al GenBank YP_001297205.1). También muestra una identidad del 69% sobre el 99% (E-valor 5^{-180}) con la secuencia proteica de una histidina-quinasa de la especie *Flavobacterium frigidum* (Número de acceso al GenBank WP_007137441.1). Por último, muestra también una identidad del 66% sobre el 100% de la secuencia proteica (E-valor 7^{-178}) con el sensor histidina-quinasa de la especie *Flavobacterium enshiense* (Número de acceso al GenBank WP_023573287.1).

El locus **THC0290_2275**, tiene un tamaño de 1.148 nucleótidos y se encuentra en un clúster de 4 genes (desde el 2275 hasta el 2272) (Figura III.5), los cuales codifican para una probable

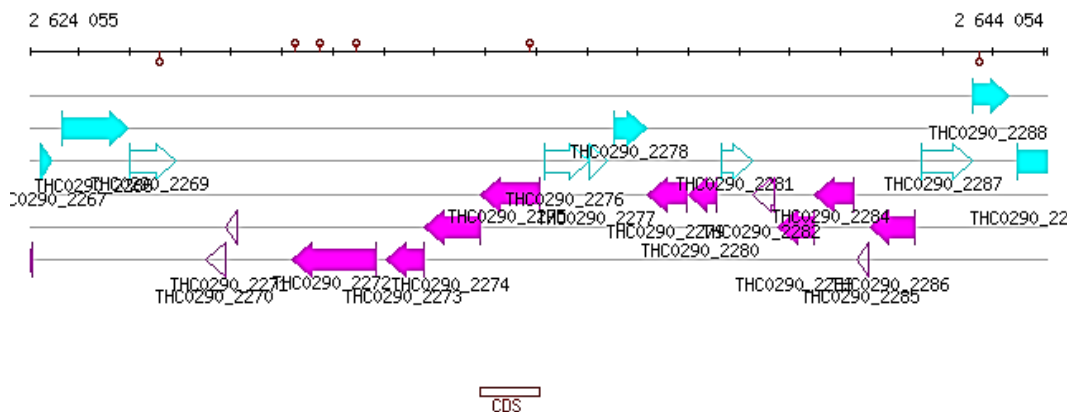


Figura III.5. Representación del contexto genético del gen *porY*.

oxidorreductasa (THC0290_2274), una transglicolasa del peptidoglicano (THC0290_2273) y una probable peptidasa perteneciente a la familia S41 (THC0290_2272). No se identificó una secuencia promotora definida en el extremo 5' del clúster ni delante del gen *porY*, pero sí el RBS con una secuencia TAAAA. En el extremo 3' del clúster, se encontró una secuencia palindrómica de terminación de la transcripción.

El **mutante P5.46 (wzc⁻)** presentó el transposón Tn4351 insertado en la posición 300 del locus **THC0290_2054** del genoma y orientado en el mismo sentido que el de la transcripción del gen (datos no presentados). Su secuencia codifica una proteína de 815 aminoácidos con una masa molecular teórica de 92,93 KDa. El análisis *in silico* de esta proteína reveló la presencia de un dominio (Fig. III.6) con capacidad de unirse a grupos fosfato de determinados compuestos, como el ATP (**AAA_31**, de la posición 601 a la 745). En su estructura tiene dos hélices transmembrana y una porción extracelular por lo que probablemente la proteína esté localizada en la membrana citoplasmática.

III. RESULTADOS

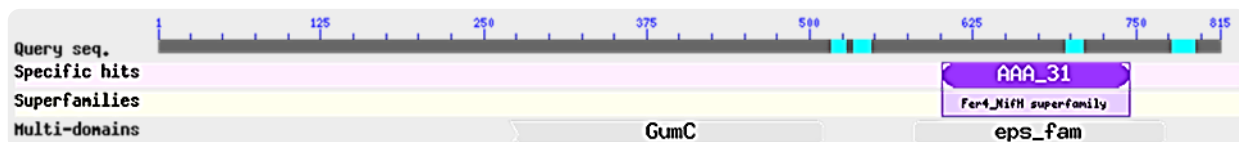


Figura III.6. Organización estructural y dominios de la proteína *Wzc* de la cepa de *F. psychrophilum* THCO2-90. Imagen obtenida gracias al programa **BlastP**. La proteína consta de un dominio **AAA_31** con capacidad de unión a ATP.

Esta proteína presenta una identidad del 99% sobre el 99% de la secuencia proteica (E-valor 0,0) con una proteína transportadora de azúcar de la cepa *Flavobacterium psychrophilum* JIP02/86 (Número de acceso al GenBank YP_001296192.1) y una identidad del 68% (532/783, E-valor 0,0), 67% (510/777, E-valor 0,0) sobre el 95% de la secuencia proteica con tirosinasquinas involucradas en la biosíntesis de exopolisacáridos en *Flavobacterium saliperosum* (Número de acceso al GenBank WP_023577277.1) y *Flavobacterium cauense* (Número de acceso al GenBank WP_023570305.1), respectivamente.

El locus **THC0290_2054** tiene un tamaño de 2.448 nucleótidos y se encuentra formando parte de un clúster de 18 genes (desde el locus **THC0290_2056** hasta el **THC0290_2039**) los cuáles codifican una serie de enzimas implicadas en la biosíntesis de EPS (Fig. III.7). No se pudo identificar una región promotora en la posición 5' del clúster aunque sí un posible RBS con una secuencia TAAAT. Tampoco se pudo definir la secuencia palindrómica de terminación de la transcripción del clúster.

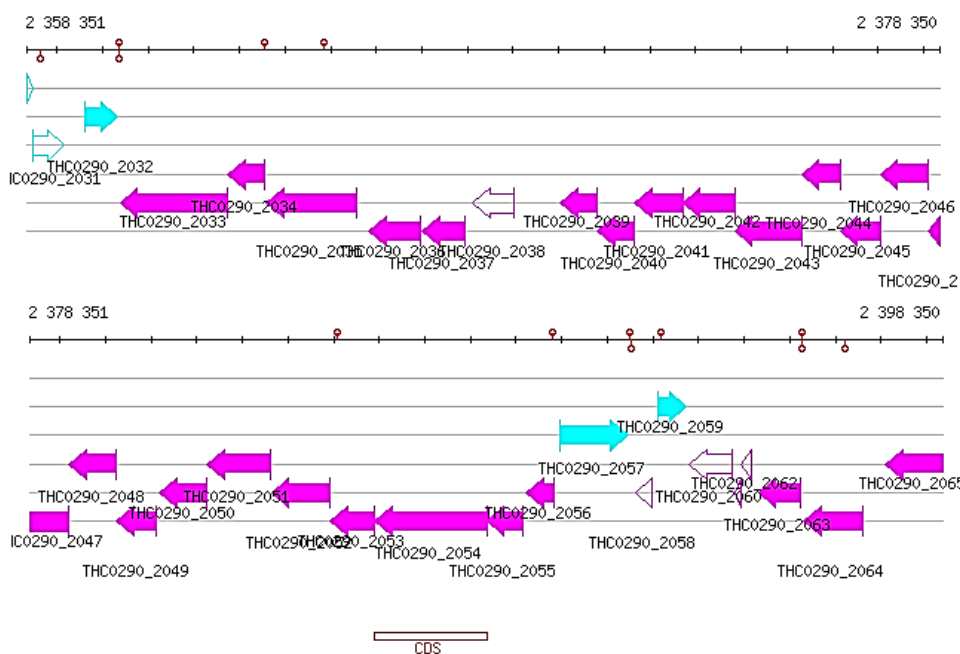


Figura III.7. Representación del contexto genético del gen *wzc*.

El mutante **P4.39 (fpfB)**, presenta el transposón **Tn4351** insertado en la posición 1.500 del locus **THC0290_0300** del genoma, y orientado en sentido opuesto a la dirección de la transcripción del gen interrumpido (datos no presentados). La secuencia codifica una proteína de 919 aminoácidos y masa molecular teórica de 99,85 KDa. El análisis *in silico* de esta proteína reveló la presencia de un péptido señal (de la posición 1 a la 20) (Fig. III.8) y varios dominios como, el catalítico (**M36**, de las posiciones 297 a la 442 y de la posición 600 a la 797), el de reconocimiento del sustrato (**PA_subtilisin_1**, de la posición 481 a la 590) y una zona implicada en la secreción al exterior de la bacteria (**Por_Secre**, de la posición 645 a la 919). En su estructura tiene una hélice transmembrana y un segmento de localización extracelular.

III. RESULTADOS

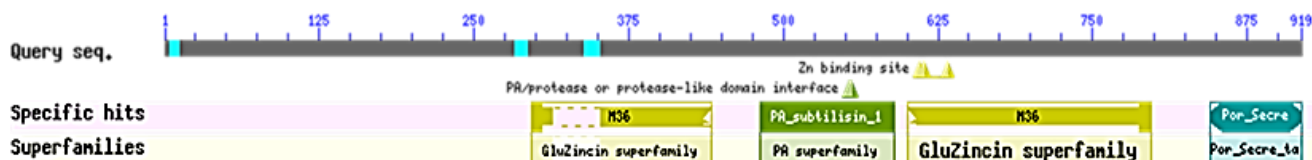


Figura III.8. Organización estructural y dominios de la proteína *FpfB* de la cepa de *F. psychrophilum* THC02-90. Imagen obtenida gracias al programa **BlastP**. La proteína consta de varios dominios: **M36**, en el que tiene función catalítica; **PA_subtilisin_1**, involucrado en el reconocimiento al sustrato y **Por_Secre**, siendo una zona implicada en la secreción al exterior de la bacteria.

Esta proteína presenta una identidad del 99% (906/919, E-valor 0,0), 88% (809/920, (E-valor 0,0) y 59% (544/923, E-valor 0,0) sobre el 100% de la secuencia con fungalisinas pertenecientes a la familia M36 de la cepa *F. psychrophilum* THC02-90 (Número de acceso al GenBank YP_001295215.1), *F. psychrophilum* JIP02/86 (Número de acceso al GenBank YP_001295214.1) y *Flavobacterium limnosediminis* (Número de acceso al GenBank WP_023578662.1), respectivamente.

El locus **THC0290_0300** tiene un tamaño de 2.760 nucleótidos y se encuentra formando parte de un clúster compuesto por 4 genes (desde el locus THC0290_303 hasta el THC0290_300), en el que los genes

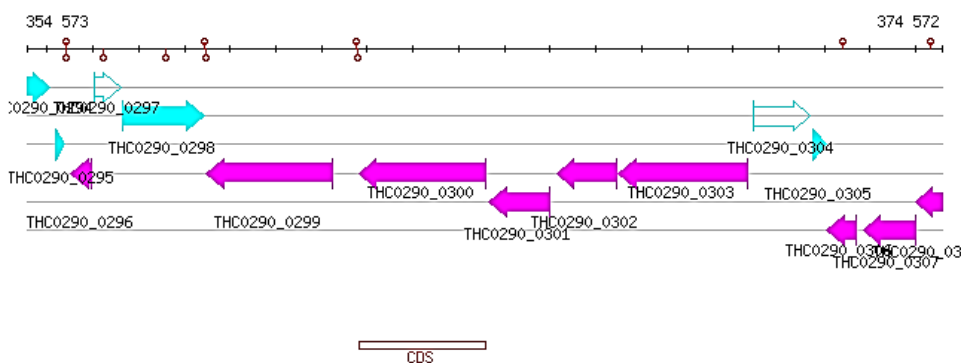


Figura III.9. Representación del contexto genético del gen *fpfB*.

codifican: una DNA polimerasa de tipo I implicada en la replicación (THC0290_303), un enzima que sintetiza un precursor de la **PBP** relacionado con la síntesis del peptidoglicano (THC0290_302), una GTPasa, que degrada GTP (THC0290_301) y la fungalisina (THC0290_300) (Fig III.9). En la posición 5' del gen THC0290_303 se localizó un promotor con una secuencia -7 (TAnnTTTG) y -33 (TTG), próxima a la descrita como secuencia consenso en *F. psychrophilum* (Chen y col., 2007), así como el RBS cuya secuencia es TATAA. En el extremo 3' del clúster, se encuentra una secuencia palindrómica característica de la terminación de la transcripción.

III. RESULTADOS

III.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES

III.2.1. Curvas de crecimiento

El estudio del crecimiento de los mutantes, en el medio CN a 12°C mostró que este era similar al de la cepa parental con la excepción del mutante P5.46 en el que se observó una ligera disminución, si bien esta diferencia resultó no ser significativa, de acuerdo con a la prueba T (Figuras III.10 A, B, C, D).

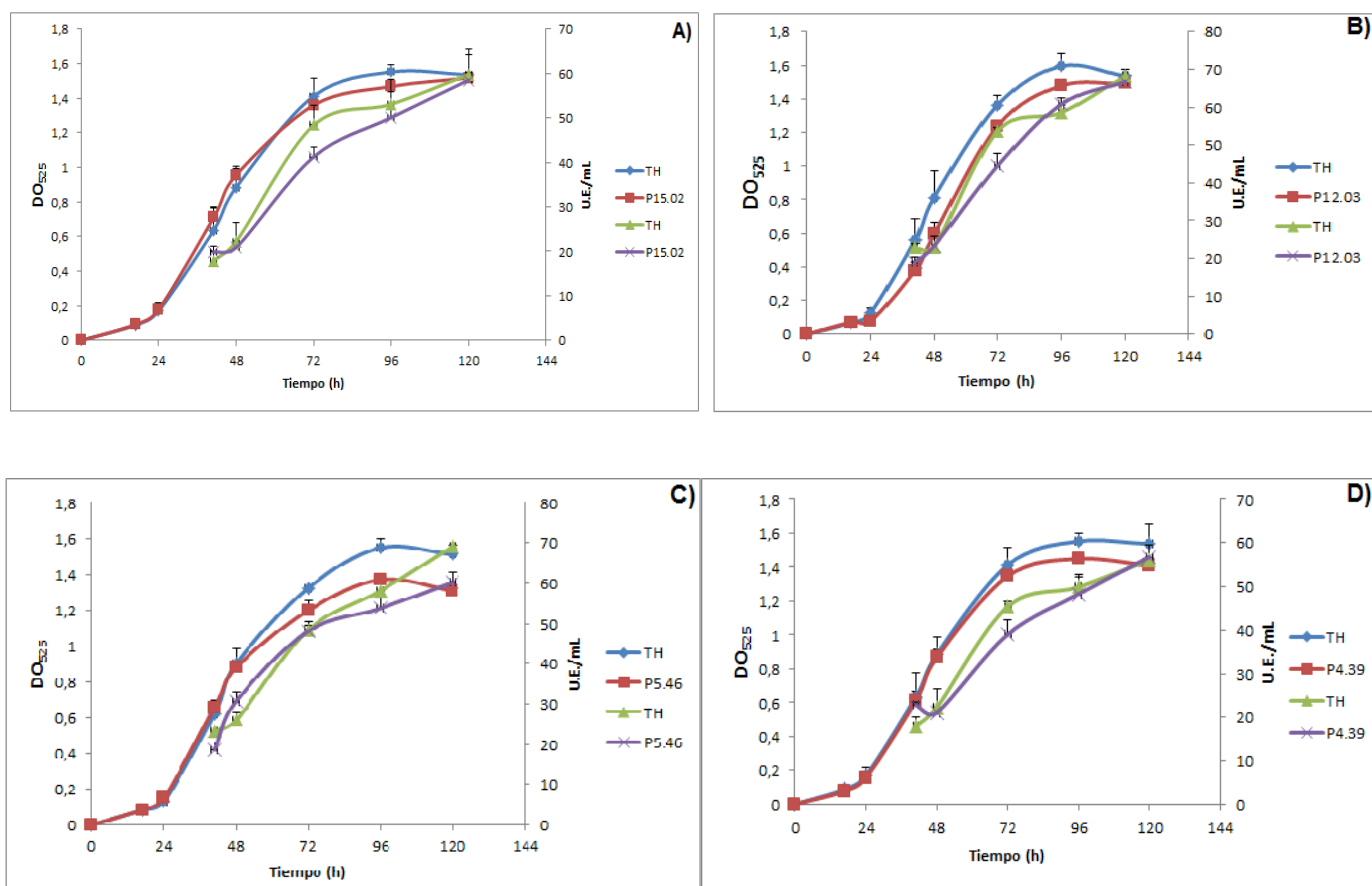


Figura III.10. Curvas de crecimiento y actividad proteolítica de los sobrenadantes de cultivo de los diferentes mutantes. El crecimiento fue medido a lo largo del tiempo valorando la DO₅₂₅ y la actividad proteolítica fue determinada mediante azocaseína. De izquierda a derecha, las curvas son: A) THCO2-90 y P15.02; B) THCO2-90 y P12.03; C) THCO2-90 y P5.46; D) THCO2-90 y P4.39.

III. RESULTADOS

III.2.2. Análisis de la actividad proteolítica extracelular

Los ensayos en el medio sólido AN con caseína y CaCl_2 indicaron que no había diferencias significativas en el diámetro del halo de degradación de la caseína entre las cepas mutantes y la cepa parental. (Fig. III.11).

Para definir mejor si había diferencias entre las cepas en relación a la actividad proteolítica dado que el procedimiento descrito anteriormente era simplemente cualitativo, se recurrió a la cuantificación de la actividad proteolítica del sobrenadante en un medio líquido tras el crecimiento de la bacteria. Los resultados revelaron, que no había una variación significativa de la actividad proteolítica extracelular de los mutantes con respecto a la cepa parental. (Tabla III.1).

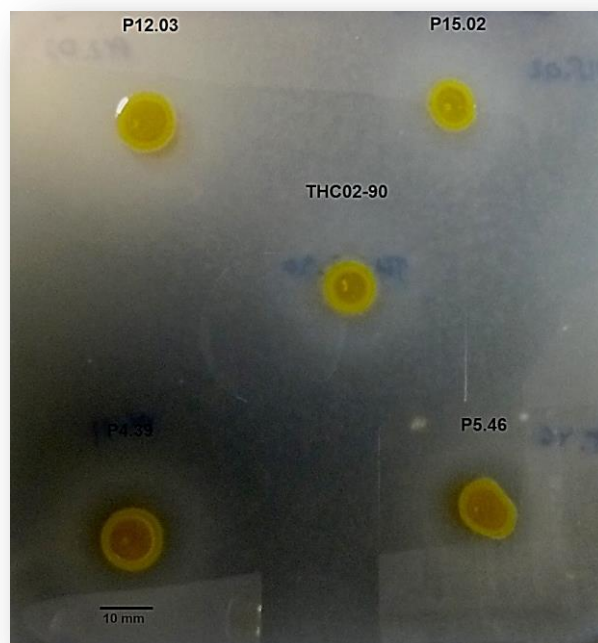


Figura III.11. Actividad proteolítica de las diferentes cepas de *F. psychrophilum* en el medio AN con caseína y CaCl_2 .

Tabla III.1. Actividad proteolítica extracelular de la cepa parental y mutantes. Los resultados corresponden a los valores medios y desviación típica de la actividad proteolítica, utilizando azocaseína como sustrato. La actividad se expresa en Unidades Enzimáticas (U.E.) por mL de sobrenadante de cultivo (SN), tomado a las 48 y 120 horas de incubación. Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que incrementa la DO_{420} en 0,01 unidades, a 30°C durante 2 horas de incubación.

	U.E./mL SN	
Tiempo (h)	THC02-90	P15.02
48	$48,4 \pm 4,09$	$41,7 \pm 1,62$
120	$59,8 \pm 5,56$	$58,3 \pm 1,55$
Tiempo (h)	THC02-90	P12.03
48	$53,73 \pm 2,83$	$44,6 \pm 3,32$
120	$68,2 \pm 1,92$	$66,8 \pm 3,11$
Tiempo (h)	THC02-90	P5.46
48	$48,4 \pm 1,1$	$48,1 \pm 2,19$
120	$60,2 \pm 0,33$	$69,13 \pm 2,55$
Tiempo (h)	THC02-90	P4.39
48	$22,26 \pm 1,13$	$21,06 \pm 3,38$
120	$56,2 \pm 0,55$	$56,8 \pm 2,54$

III. RESULTADOS

III.2.3. Análisis del deslizamiento de la colonia

El análisis del deslizamiento de la colonia se realizó en el medio 1/6 AN. El diámetro de las colonias se midió tras 120 horas de incubación a 20°C. Los mutantes presentaron un deslizamiento menor con respecto a la cepa parental. Además, los mutantes P15.02, P12.03 y P5.46, presentaron colonias con alteraciones morfológicas respecto a la parental con los bordes de la colonia redondeados y lisos (Fig. III.12).

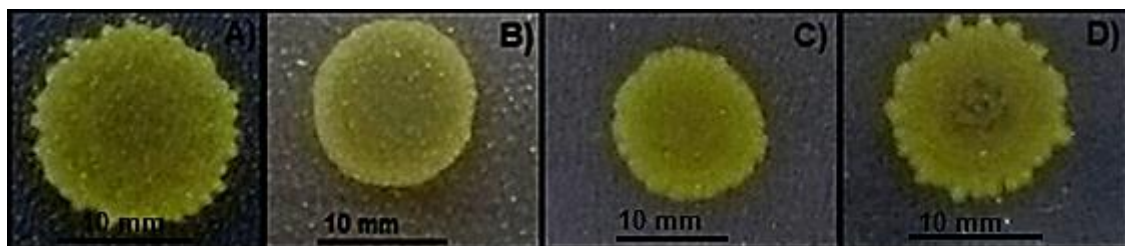


Figura III.12. Fotografía de las colonias formadas por las cepas THC02-90 (A), P12.03 (B), P5.46 (C), P4.39 (D), incubadas en medio 1/6AN, durante 120 horas a 20 °C.

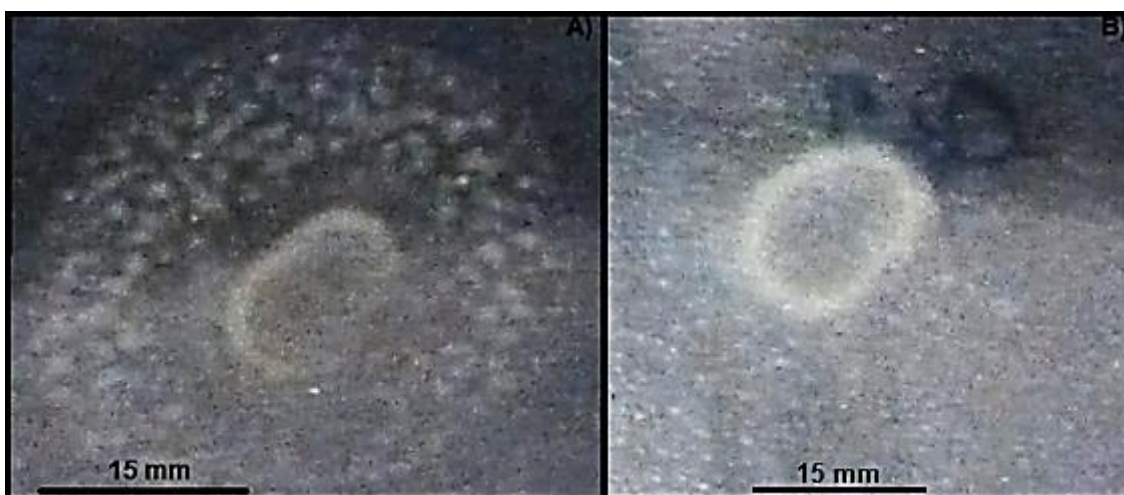


Figura III.13. Fotografía de las colonias formadas por las cepas THC02-90 (A) y P15.02 (B).

La realización de las pruebas t correspondientes, no mostró diferencias significativas entre el diámetro de la colonia de la cepa parental y el de los mutantes (p -valor $< 0,005$), salvo en el mutante P15.02 (Fig. III.13), en el que se definió una diferencia significativa (tabla III.2).

Tabla III.2. Diámetro de las colonias parental y mutante P15.02. Los resultados corresponden a la media de los diámetros de las colonias, expresado en milímetros tras 120 horas de incubación a 20°C.

Tiempo (h)	Diámetro medio de la colonia (mm)	
120 h	THC02-90	27±1,41
	P15.02	15,25±2,98

III. RESULTADOS

III.2.4. Determinación presuntiva de la virulencia de las cepas mutantes

Se realizó un test cuya finalidad fue comparar el efecto de las mutaciones en los genes *clpB*, *porY*, *wzc* y *fpfB* en la virulencia de *F. psychrophilum*. Este test indicó que la cepa P15.02 era presuntivamente menos virulenta que la cepa parental y que el resto de las cepas ocasionaban una mortalidad semejante a la que se definió en la parental.

Tabla III.3. Número de peces muertos a los 10 días después de la infección para cada cepa y a la dosis de 10^6 u.f.c.

Cepa	Dosis	Peces muertos
THC02-90	10^6	10
P15.02	10^6	7
P12.03	10^6	8
P5.46	10^6	9
P4.39	10^6	9

En la tabla III.3., se muestran los peces muertos 10 días después de inyectados con una dosis de 10^6 u.f.c.

III.3. CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE P15.02

III.3.1. Análisis del crecimiento

Con el fin de determinar si la mutación en el gen *clpB* tenía algún efecto sobre el crecimiento a una temperatura de incubación límite para la bacteria, se llevó a cabo una determinación del crecimiento a 22°C. Los resultados revelaron que a esta temperatura no hubo diferencias de crecimiento entre la cepa parental y la cepa mutante (Figura III.14).

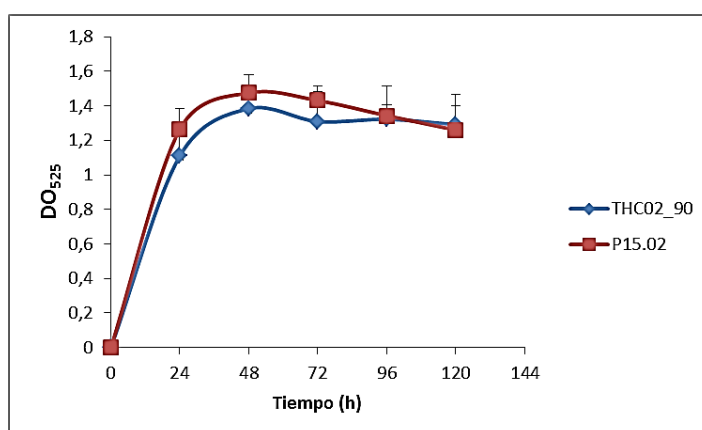


Figura III.14. Curva de crecimiento a 22°C de la cepa parental THC02-90 y mutante P15.02.

III.3.2. Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) de la cepa P15.02

Grupos de alevines de trucha arcoíris (*O. mykiss*) fueron inyectados intramuscularmente con diferentes dosis de la bacteria. Diez días después de la inyección, se determinó la DL₅₀ con el método Probit, cuyo resultado medio y los límites de confianza se muestran en la tabla III.4.

III. RESULTADOS

Tabla III.4. Resultados medios de los ensayos de DL₅₀ de las cepas THC02-90 y P15.02, así como los límites de confianza inferior y superior. La DL₅₀ se calculó mediante el método Probit, estableciendo unos límites de confianza del 95%. Los experimentos se realizaron por duplicado. Los datos se expresan en u.f.c.

Cepa	Límite inferior	DL ₅₀	Límite superior
THC02-90	-	1,02x10 ⁶	-
P15.02 x 1	1,96x10 ⁶	4,96x10 ⁶	1,29x10 ⁷
P15.02 x 2	3,41x10 ⁶	1,08x10 ⁷	4,03x10 ⁷

Existe un aumento de DL₅₀ de la cepa mutante con respecto a la cepa parental. El método Probit del SPSS 19 no ha podido determinar los límites de confianza de la DL₅₀ de la cepa parental.

Además de la diferencia de dosis letal, es reseñable la diferencia de velocidad de mortalidad de los peces, es decir, que los peces empezaron a morir más tarde en la cepa mutante (Fig. III.15).

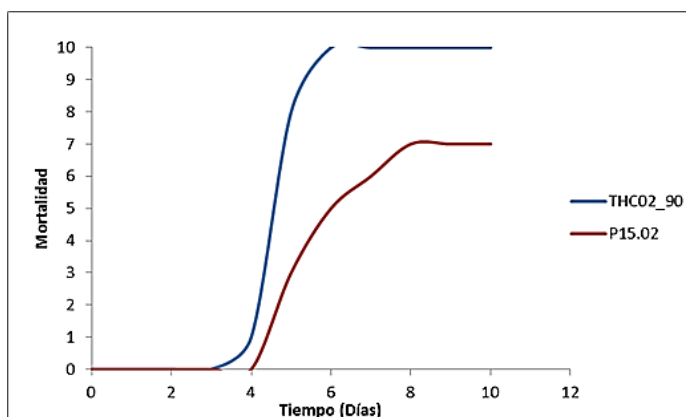
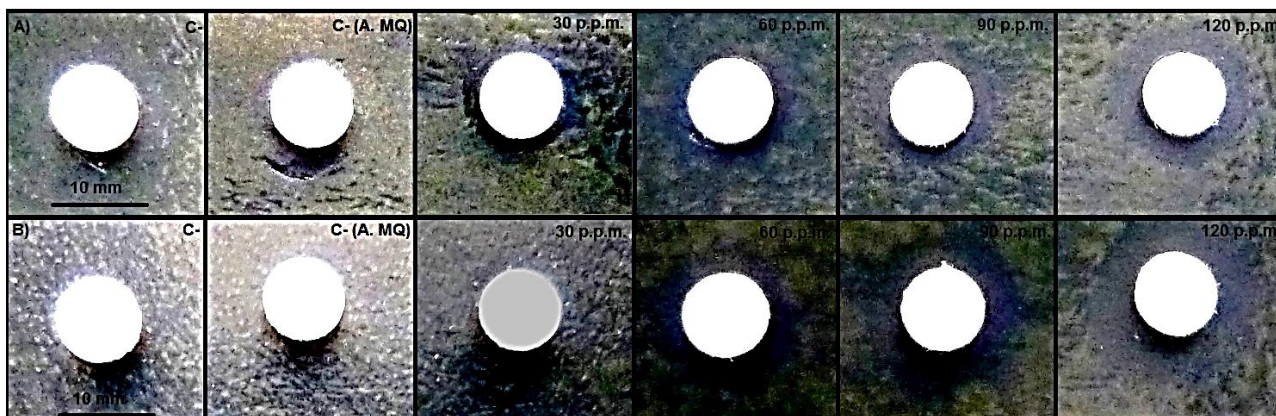


Figura III.15. Curva de mortalidad asociada a la dosis 10⁷ u.f.c., en el que muestra que bajo la infección con la cepa mutante P15.02, la mortalidad de los peces (*O.mykiss*) fue menor con respecto a la infección con la cepa parental THC02-90.

III.3.3. Análisis de la resistencia al H₂O₂ y NaCl

Para determinar el efecto que agentes estresantes tenían sobre la cepa mutante, se analizaron los halos de inhibición del crecimiento que ocasionaban diferentes concentraciones de agua oxigenada. Se puede apreciar que el diámetro del halo de inhibición del crecimiento en los discos que contenían 60 p.p.m. de H₂O₂, fue mayor en los de la cepa mutante P15.02 que en la parental, aumentando de forma progresiva la diferencia del diámetro entre ambas cepas según se fueron incrementando las concentraciones del agente (Figura III.16.A y III.16.B). Así, a 120 p.p.m. de H₂O₂ fue donde hubo mayores diferencias dentro de las concentraciones ensayadas (33.4%).

III. RESULTADOS



El estudio del efecto del NaCl determinado en un rango entre 0,3 y 4%, indicó que no había diferencias entre las dos cepas (Figura III.17.A y III.17.B).

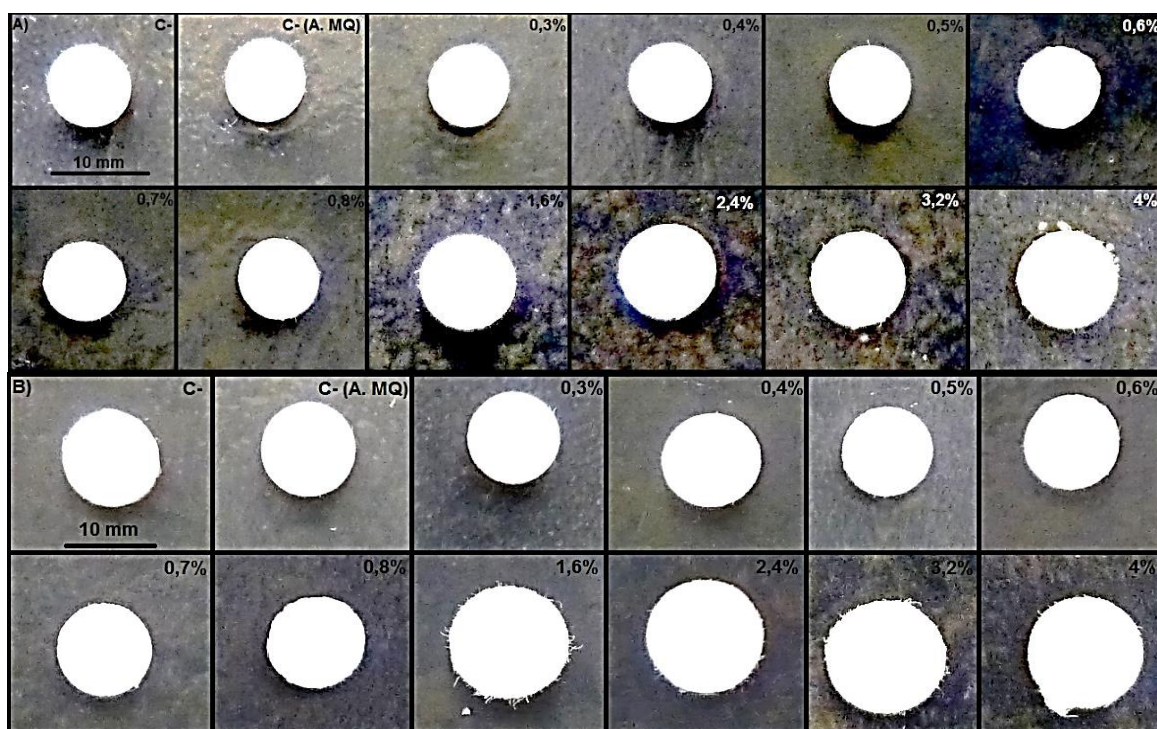


Figura III.17. Efecto del NaCl sobre el crecimiento de las cepas parental y mutante P15.02. Panel A: se muestran los halos de inhibición del crecimiento de la cepa parental y en el panel los de la cepa mutante. De izquierda a derecha: Control negativo (disco sin nada); Control negativo con agua; 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 1,6%, 2,4%, 3,2% y 4% de NaCl.

III. RESULTADOS

III.3.4. Efecto del choque térmico

Para definir si había alguna diferencia en relación a la resistencia a la temperatura entre la cepa P15.02 y la parental, ambas se sometieron a un choque térmico a una temperatura de 40°C durante 10 minutos. Como puede observarse en la Figura III.18 la cepa mutante fue más sensible a este tratamiento que la cepa parental puesto que a la 10^7 u.f.c. no se observó crecimiento de la cepa mutante, mientras que la cepa parental fue capaz de crecer hasta la 10^4 u.f.c. Como puede observarse en la Figura III.19, ambas cepas crecieron de forma similar hasta la 10^4 u.f.c. si no eran sometidas al tratamiento de choque térmico.

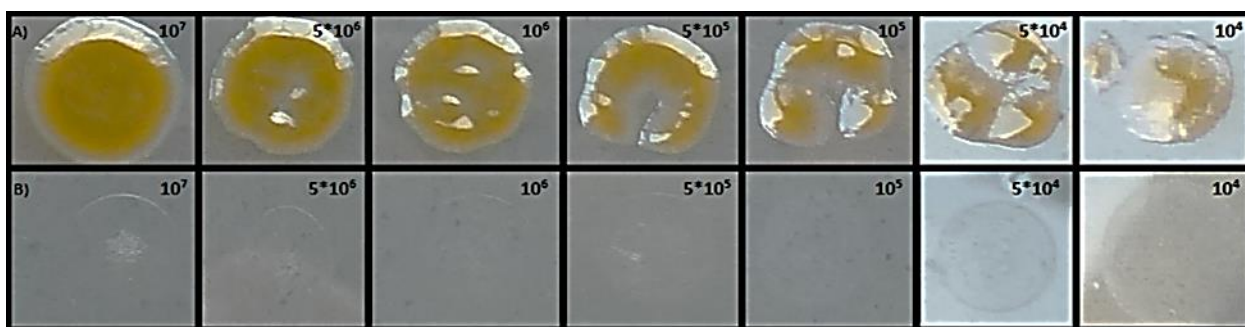


Figura III.18. Crecimiento de *F. psychrophilum* de la cepa parental (A) y mutante (B) después de un choque térmico a 40°C durante 10 minutos. De izquierda a derecha, los inóculos se corresponden con 10^7 , 5×10^6 , 10^6 , 5×10^5 , 10^5 , 5×10^4 y 10^4 u.f.c.

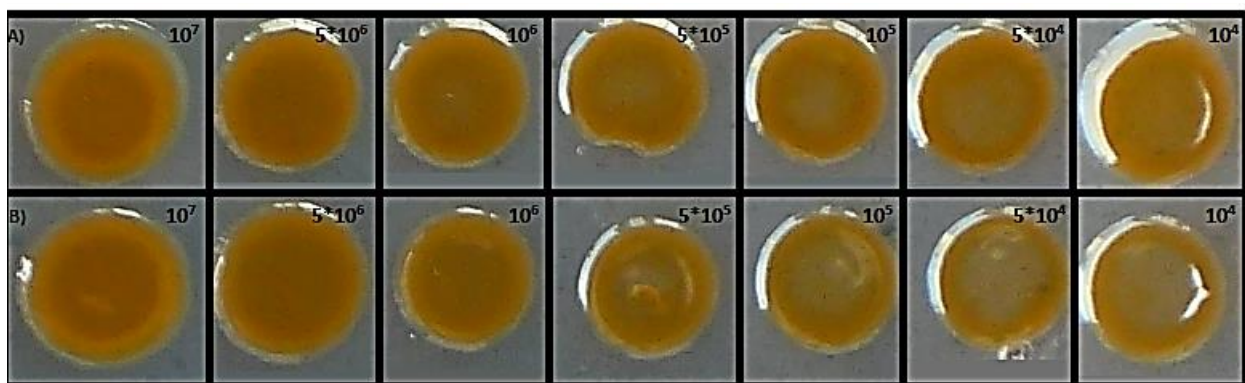


Figura III.19. Crecimiento de *F. psychrophilum* de la cepa parental (A) y mutante (B) sin tratamiento de choque térmico. De izquierda a derecha, los inóculos se corresponden con 10^7 , 5×10^6 , 10^6 , 5×10^5 , 10^5 , 5×10^4 y 10^4 u.f.c.

IV. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizaron cuatro mutantes de *F. psychrophilum* procedentes de una genoteca obtenida por transposición utilizando el transposón Tn4351 (Álvarez y col., 2004). En todos los mutantes obtenidos se identificó el gen mutado mediante PCR inversa. A continuación, se realizaron análisis mediante el programa informático BlastX, para determinar su posible función.

Es importante en este tipo de estudios comprobar que el transposón se ha insertado una única vez en el genoma de la bacteria. En ocasiones, el transposón puede integrarse simultáneamente en más de un lugar y, por tanto, los estudios fenotípicos y características del mutante no se corresponderían con la función de un solo gen sino de más de uno y sería imposible relacionar fenotipos específicos con la carencia de un gen concreto. La hibridación de la sonda del transposón Tn4351, con una única región del genoma mostró que el transposón se había insertado solamente una vez en el genoma en cada uno de los mutantes estudiados. Además, mediante el análisis por PCR se pudo determinar la orientación del transposón en relación al sentido de la transcripción del gen mutado. Esto es importante puesto que como fue descrito por Álvarez y col. (2004) la presencia en el transposón Tn4351 de secuencias promotoras en los extremos hace que puedan transcribirse a través de estas los genes situados aguas abajo del lugar de la inserción, ocasionando mutaciones no polares.

Los mutantes seleccionados tenían la inserción del transposón en genes que codificaban proteínas que por su función podían tener relación con el proceso infeccioso. Los mutantes P15.02 (*clpB*), P12.03 (*porY*), P5.46 (*wzc*) y P4.39 (*fpfB*) presentaron genes interrumpidos que codificaban proteínas con las siguientes funciones: I) *clpB* codifica una chaperona con actividad ATPasa que puede estar relacionada con la protección de la bacteria frente a diferentes tipos de estrés (Krajewska y col., 2014); II) *porY* codifica una proteína que forma parte del sistema de secreción *Por* relacionado con factores de virulencia, como adhesinas y quitinasas (McBride, 2013); III) *wzc* codifica una tirosina-quinasa localizada en la membrana celular y que forma parte de un complejo implicado en la síntesis de EPS y IV) *fpfB* codifica una fungalisina involucrada en la degradación de proteínas de la matriz extracelular, respectivamente.

El hecho de que las curvas de crecimiento de los diferentes mutantes no difirieron con la de la cepa parental significa que la mutación de estos genes no afecta para nada a su crecimiento en las condiciones ensayadas.

Del mismo modo, no hay afectación significativa de la actividad proteolítica extracelular en ninguno de los mutantes, quedando pues evidente que esta actividad, relacionada con la virulencia en *F. psychrophilum*, no parecen depender en modo alguno de la actividad de estos genes.

El estudio del deslizamiento de las colonias ha revelado que la cepa mutante *ClpB* mostró una reducción significativa en la movilidad con respecto a la cepa parental. Este resultado es semejante al descrito en el trabajo realizado por Badger y col. (2000), en el que la proteína *ClpB* está implicada en la movilidad de *Yersinia enterocolitica*, entre otras funciones. Los genes interrumpidos en los otros mutantes estudiados no parecen estar relacionadas con la movilidad de *F. psychrophilum*. Estos resultados, en particular en los mutantes *porY* y *wzc*, son contradictorios con los descritos para estos mismos genes en otros microorganismos. En *Flavobacterium johnsoniae*, el mutante *porY* tiene, entre otros, defectos en la movilidad. Esto parece ser consecuencia de que en esta bacteria *PorY* regula la expresión de otros genes, como el gen *porT* que está relacionado con la movilidad de la bacteria (Sato y col., 2009). Por ello, a pesar de la

IV. DISCUSIÓN

proximidad taxonómica entre ambas especies, los mecanismos implicados en la regulación de la movilidad parecen diferir. Hay que tener en cuenta que el genoma de *F. johnsoniae* es, aproximadamente, dos veces mayor que el de *F. psychrophilum*. Con respecto a la proteína *Wzc*, como ocurría en el caso anterior, en *F. johnsoniae*, el mutante *wzc*⁻ muestra una reducción en la movilidad, ya que esta proteína tiene relación con el movimiento por “gliding” (Borden y col., 2011). De nuevo este carácter diferencial respecto a *F. psychrophilum* hace que cada vez más se distancien estas dos especies. Los estudios sobre la movilidad de los diferentes mutantes analizados revelaron diferencias en la morfología de la colonia. Así, los mutantes *clpB*, *porY* y *wzc*⁻ presentaron colonias con los bordes redondeados, a diferencia de la cepa parental y del mutante *fpfB*, en el que los bordes se presentan como irregulares. Por ello, si se puede concluir que aunque en los mutantes *porY* y *wzc*⁻ no hay afectación clara de la movilidad, la interrupción de estos genes si tienen una clara manifestación fenotípica como es el cambio significativo de la morfología de la colonia. Con los datos que se tienen hasta el momento no es posible dar una explicación a este fenómeno.

Atendiendo al interés que esta bacteria tiene como agente causal de la enfermedad del agua fría, era importante definir si alguno de estos genes podría codificar un factor de virulencia o estar de algún modo relacionado con ella. Los resultados indicaron que no hubo reducción de la virulencia de los mutantes, salvo en el caso del mutante *clpB*. Inicialmente estos resultados no eran los esperables puesto que, en otros microorganismos los genes aquí estudiados están relacionados de un modo u otro con el proceso infeccioso. Así, la proteína *PorY* está relacionada con la virulencia de *P. gingivalis*, puesto que mutantes *porY* presentan una disminución de la secreción de proteínas como la gingipaína, una proteasa implicada en la virulencia de esta bacteria (Sato, 2011). En relación a la proteína *Wzc*, ésta, está relacionada con la virulencia de *E. coli* (Wugeditsch y col., 2001). Por último, en cuanto a la proteína *FpfB*, en el trabajo de Duchaud y col. (2007) se sugiere que por su homología con otras fungalisinas, que sí tienen relación con la virulencia (Brouta y col., 2001), el producto del gen *fpfB* que es una fungalisina en el que potencialmente podría estar relacionado con la virulencia de *F. psychrophilum*. Sin embargo, los resultados obtenidos parecen indicar que esta relación no haya sucedido en *F. psychrophilum*. Hay que señalar en este sentido que en el genoma de *F. psychrophilum* se han localizado dos genes que codifican sendas fungalisinas. Estos genes están dispuestos en tándem y puede ocurrir que el gen *fpfB* no tenga relevancia en relación a la virulencia y sí el segundo de los genes *fpfA*. Es posible también que en *F. psychrophilum*, la proteína *FpfB* sea una proteasa extracelular cuya actividad en el mutante sea compensada con la de otras proteasas extracelulares muy abundantes en esta bacteria (Duchaud y col., 2007). En hongos patógenos, como *Aspergillus flavus*, está descrita la intervención de la fungalisina en la virulencia del organismo puesto que, tiene actividad elastinolítica y actúa degradando la matriz extracelular del organismo hospedador (Mellon y col., 2007). Por otro lado, cepas de *Aspergillus fumigatus* no productoras de fungalisina son menos virulentas que las productoras (Monod y col., 1993).

Los resultados obtenidos indicaron que el mutante *clpB* presentaba una disminución de la virulencia en relación a la de la cepa parental. Esto junto a la implicación de la proteína *ClpB* en la respuesta al estrés en diversos microorganismos (Kannan y col., 2008; Yuan y col., 2007; Lourdault y col., 2011) llevó a estudiar este mutante en mayor profundidad. Los datos de la DL₅₀ para esta cepa indicaron que hay aproximadamente un orden de magnitud en relación a la DL₅₀ de cepa parental. Además, se ha podido determinar una diferencia en relación a la velocidad a la que mueren los peces entre las dos cepas. Esto puede ser debido a varios factores: 1) La proteína *ClpB* permite al patógeno soportar las condiciones de estrés presentes en el interior de los

IV. DISCUSIÓN

macrófagos de la trucha (Nematollahi y col., 2005; Decostere y col., 2001); y 2) La proteína *ClpB* interviene en algunas bacterias en el proceso de desagregación de proteínas que se encuentran agregadas o mal plegadas consecuencia de la existencia de algún tipo de estrés para la bacteria (Kannan y col., 2008; Yuan y col., 2007; Lourdault y col., 2011).

El hecho de que el crecimiento de la cepa mutante *clpB* a una temperatura límite para esta bacteria como son 22°C, no difiriese del de la cepa parental nos permite concluir que este gen no está relacionado con el crecimiento de la bacteria a esta temperatura. En el trabajo de Oplinger y col. (2013), se había determinado que a una temperatura de 40°C y durante 10 minutos como tiempo de exposición, el crecimiento de *F. psychrophilum* era limitado, resultando en una condición estresante. Por ello constituyen unas condiciones apropiadas para el estudio de la respuesta al efecto del choque térmico en el mutante *clpB*. Los resultados del estudio indicaron que en efecto, el gen *clpB* está relacionado con la respuesta al estrés por choque térmico. La función, al igual que fue descrito anteriormente puede ser la de desagregar o facilitar el cambio de plegamiento de determinadas proteínas que consecuencia del efecto estresante alteran su conformación. Ejemplos de esta implicación de proteínas homólogas a la *ClpB* de *F. psychrophilum* en otros microorganismos es el de *Synechococcus* sp., en el que la proteína *ClpB* favorece su resistencia a las altas temperaturas (Eriksson y col., 1996). En el trabajo de Yuan y col. (2007), la supervivencia de la cepa mutante *ClpB* de *P. gingivalis* frente a un choque térmico fue alrededor de un 10% menor en comparación con la de la cepa parental. Asimismo, en *L. interrogans* la proteína *ClpB* está implicada en la respuesta al choque térmico (Lourdault y col., 2011). Es en este sentido es altamente probable que la proteína *ClpB* sea en gran medida responsable de la capacidad de la célula para reparar proteínas termolábiles que son afectadas por el choque térmico (Mogk y col., 2003).

Con el fin de determinar si la proteína *ClpB* estaba también implicada en la respuesta a otros tipos de estrés para la célula, se analizó el efecto diferencial que el agua oxigenada, un agente altamente oxidante, podría tener sobre la cepa mutante en relación a la parental. El trabajo de Kumagai y col. (2004), había puesto de manifiesto que en un cultivo conteniendo 10^7 u.f.c./mL de *F. psychrophilum*, cuando se ponía en contacto con 120 p.p.m. de H_2O_2 durante 30 minutos, no había células que sobreviviesen al tratamiento. Fundamentado en estos resultados se eligió esta concentración de H_2O_2 como la máxima para estudiar la respuesta del mutante a este agente. Los resultados mostraron claramente que como ocurría en el caso del choque térmico la ausencia de la proteína *ClpB* ocasionaba una mayor sensibilidad de la cepa mutante a este agente que la que tenía la cepa parental. Este resultado es concordante con el obtenido en mutantes en el gen *clpB* de *L. interrogans*, utilizando como agente oxidante butilperóxido (Lourdault y col., 2011), y en *P. gingivalis* (Yuan y col., 2007). Finalmente, los estudios de resistencia al NaCl utilizando este mutante indicaron que la proteína *ClpB* no está implicada en la respuesta al estrés osmótico.

V. CONCLUSIONES

Durante la realización del presente trabajo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- I. Los fenotipos de los mutantes de *F. psychrophilum* estudiados se deben a una única introducción del transposón Tn4351 en su genoma.
- II. La mutación en los genes *clpB*, *porY*, *wzc* y *fpfB* no influyen en el deslizamiento de la colonia salvo en el caso del mutante *clpB* en el que hay una disminución de este.
- III. La actividad proteolítica extracelular valorada de forma cualitativa y cuantitativa fue semejante entre las 4 cepas mutantes y además, fue similar a la de la cepa parental.
- IV. El crecimiento de las cepas mutantes estudiadas con respecto a la cepa parental fue similar.
- V. El gen *clpB* está implicado en el proceso infeccioso de *F. psychrophilum*.
- VI. La Chaperona *ClpB* está relacionada con la resistencia de la bacteria al estrés oxidativo y térmico, pero no frente al estrés osmótico.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, B., Secades, P., McBride, M.J., Guijarro, J.A.** (2004) Development of Genetic Techniques for the Psychrotrophic Fish Pathogen *Flavobacterium Psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 581-587
- Álvarez, B., Secades, P., Prieto, M., McBride, M.J., Guijarro, J.A.** (2006) A Mutation in *Flavobacterium Psychrophilum* TlpB Inhibits Gliding Motility and Induces Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4044-4053
- Álvarez, B., Guijarro, J.A.** (2007) Recovery of *Flavobacterium psychrophilum* Viable Cells Using a Charcoal-Based Solid Medium. *Letters in Applied Microbiology* **44**: 569-72
- Álvarez, B., Álvarez, J., Menéndez, A., Guijarro, J.A.** (2008) A Mutant in One of Two ExbD Loci of a TonB System in *Flavobacterium Psychrophilum* Shows Attenuated Virulence and Confers Protection against Cold Water Disease. *Microbiology* **154**: 1144-1151
- Arai, H., Morita, Y., Izumi, S., Katagiri, T., Kimura, H.** (2007) Molecular typing by pulse-field gel electrophoresis of *Flavobacterium psychrophilum* derived from Japanese fish. *Journal of Fish Diseases* **30**: 345-355
- Austin, B., Austin, D.A.** (2012) Bacterial Fish pathogens, Disease of farmed and wild fish. Springer
- Badger, J.L., Young, B.M., Darwin, A.J., Miller, V.L.** (2000) *Yersinia enterocolitica* ClpB Affects Levels of Invasin and Motility. *Journal of Bacteriology* **182**(19): 5563-5571
- Bernardet, J.F., Baudin-Laurencin, F., Tixerant, G.** (1988) First identification of “*Cytophaga psychrophila*” in France. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists* **8**: 104-105
- Bertolini, J.M., Wakabayashi, H., Watral, V.G., Whipple, M.J., Rohovec, J.S.** (1994) Electrophoretic detection of proteases from selected strains of *Flexibacter psychrophilus* and assessment of their variability. *Journal of Aquatic Animal Health* **6**: 224-233
- Borden, L., Chesney, K., Fahey, E., Konop, A., Kosloske, G., Kozak, K., Liesenberg, M., Rose, C., Scherzer, N., Goetz, D., Rhodes, R.** (2011) Wzc's involvement in Polysaccharide Secretion and Gliding Motility in *Flavobacterium johnsoniae*. Comunicación Congreso de Modelado Molecular. Winsconsin, EEUU
- Brouta, F., Descamps, F., Fett, T., Losson, B., Gerday, C., Mignon, B.** (2001) Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. *Medical Mycology* **39**(3): 269-275
- Bustos, P., Calbuyahue, A., Maontaña, J., Opazo, B., Entrala, P., Solervicens, R.** (1995) First isolation of *Flavobacterium psychrophilum* as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) in Chile. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists* **15**: 162-164
- Chakroun, C., Grimont, F., Urdaci, M.C., Bernardet, J.F.** (1998) Fingerprinting of *Flavobacterium psychrophilum* isolates by ribotyping and plasmid profiling. *Diseases of Aquatic Organisms* **33**: 167-177

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chen, S., Bagdasarian, M., Kauman, M.G., Walker, E.D.** (2007) Characterization of Strong Promoters from an Environmental *Flavobacterium hibernum* Strain by Using a Green Fluorescent Protein-Based Reporter System. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1089-1100
- Cipriano, R.C., Holt, R.A.** (2005) *Flavobacterium psychrophilum* cause of bacterial cold water disease and rainbow trout fry syndrome. *Fish disease leaflet no. 86*. U.S. Department of Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Keameysville, WV
- Crump, E.M., Burian, J., Allen, P.D., Kay, W.W.** (2005) Identification and Expression of a Host-Recognized Antigen, FspA, from *Flavobacterium Psychrophilum*. *Microbiology* **151**: 3127-35
- Decostere, A., D'Haese, E., Lammens, M., Nelis, H. and Haesebrouck, F.** (2001) In vivo study of phagocytosis, intracellular survival and multiplication of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) spleen phagocytes. *Journal of Fish Diseases* **24**: 481–487
- Del Cerro, A., Mendoza, M.C., Guijarro, J.A.** (2002) Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* **93**: 149-156
- Duchaud, E., Boussaha, M., Loux, V., Bernardet, J.F., Michel, C., Kerouault, B., Mondot, M., Nicolas, P., Bossy, R., Caron, C., Bessieres, P., Gibrat, J.F., Claverol, S., Dumetz, F., Le Hénaff, M., Benmansour, A.** (2007) Complete Genome Sequence of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nature Biotechnology* **25**: 763-769
- Dumetz, F., Duchaud, E., Claverol, S., Orieux, N., Papillon, S., Lapaillerie, D., Le Hénaff, M.** (2008) Analysis of the *Flavobacterium psychrophilum* outer-membrane subproteome and identification of new antigenic targets for vaccine by immunomics. *Microbiology* **154**(6): 1793-1801
- Eriksson, M.-J., Clarke, A.** (1996) The Heat Shock Protein ClpB Mediates the Development of Thermotolerance in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **178**(16): 4839-4846
- FAO** (2012) El estado mundial de la pesca y acuicultura (SOFIA). Roma, Italia
- Gómez, E.** (2014) Nuevas técnicas de manipulación genética y caracterización de mutantes en *Flavobacterium psychrophilum*. Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo
- Hesami, S., Metcalf, D.S., Lumsden, J.S., Macinnes, J.I.** (2011) Identification of Cold-Temperature-Regulated Genes in *Flavobacterium Psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 1593-1600
- Kannan, T.R., Musatovova, O., Gowda, P., Baseman, J.B.** (2008) Characterization of a Unique ClpB Protein of *Mycoplasma pneumoniae* and Its Impact on Growth. *Infection and immunity* **76**(11): 5082-5092
- Krajewska, J., Kędzierska-Mieszkowska, S.** (2014) AAA⁺ ClpB chaperone as a potential virulence factor of pathogenic microorganisms: Other aspect of its chaperone function. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **5**: 31-35

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kumagai, A., Nakayasu, C., Oseko, N.** (2004) No Evidence for the Presence of *Flavobacterium psychrophilum* within Ayu Eggs. *Fish Pathology* **39**(4): 183-187
- Lorenzen, E., Dalsgaard, I., Bernardet, J.F.** (1997) Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I: Phenotypic and genomic studies. *Diseases of Aquatic Organisms* **31**: 197–208
- Lourdault, K., Cerqueira, G.M., Wunder, E.A., Picardeau, M.** (2011) Inactivation of *clpB* in the Pathogen *Leptospira interrogans* Reduces Virulence and Resistance to Stress Conditions. *Infection and Immunity* **79**(9): 3711-3717
- Mata, M., Skarmela, A., Santos, Y.** (2002) A proposed serotyping system for *Flavobacterium psychrophilum*. *Letters in Applied Microbiology* **35**: 166-170
- McBride, M.J.** (2004) Cytophaga-flavobacterium gliding motility. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **7**(1-2): 63-71
- McBride, M.J., Zhu, Y.** (2013) Gliding motility and Por secretion system genes are widespread among members of the phylum bacteroidetes. *Journal of Bacteriology* **195**(2): 270-278
- Mellon, J.E., Cotty, P.J., Dowd, M.K.** (2007) *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**: 497-504
- Metcalfe, W. W., Jiang W, Wanner BL** (1994) Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K origin plasmids at different copy numbers. *Gene* **138**:1–7
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E., Bukau, B.** (2003) Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular Microbiology* **50**(2): 585-595
- Monod, M., Paris, S., Sarfati, J., Jatou-Ogay, K., Ave, P., Latgé, J.P.** (1993) Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters* **1**(106): 39-46
- Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F.** (2003) Adhesion of high and low virulence *Flavobacterium psychrophilum* strains to isolated gill arches of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* **55**: 101-107
- Nematollahi, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Decostere, A.** (2005) Early interactions of *Flavobacterium psychrophilum* with macrophages of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* **64**: 23–28
- Nilsen, H., Olsen, A.B., Vaagnes, Ø., Hellberg, H., Bottolfson, K., Skjelstad, H., Colquhoun, J.D.** (2011) Systemic *Flavobacterium psychrophilum* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) farmed in fresh and brackish water in Norway. *Journal of Fish Diseases* **34**: 403-408
- Oplinger, R.W., Eric J. Wagner, E.J.** (2013) Control of *Flavobacterium psychrophilum*: Tests of Erythromycin, Streptomycin, Osmotic and Thermal Shocks, and Rapid pH Change. *Journal of Aquatic Animal Health* **25**(1): 1-8

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pérez-Pascual, D., Gómez, E., Álvarez, B., Méndez, J., Reimundo, P., Navais, R., Duchaud, E., Guijarro, J.A.** (2011) Comparative analysis and mutation effects of fpp2-fpp1 tandem genes encoding proteolytic extracellular enzymes of *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiology* **157**(4): 1196-1204
- Sato, K., Naito, M., Yukitake, H., Hirakawa, H., Shoji, M., McBride, M.J., Rhodes, R., Nakayama, K.** (2009) A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(1): 276-281
- Sato, K.** (2011) Por Secretion of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Oral Biosciences* **53**(3): 187-196
- Secades, P., Álvarez, B., Guijarro, J.A.** (2001) Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2436-2444
- Secades, P., Álvarez, B., Guijarro, J.A.** (2003) Purification and Properties of a New Psychrophilic Metalloprotease (Fpp2) in the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *FEMS Microbiology Letters* **226**: 273-279
- Starliper, C.E.** (2011) Bacterial Coldwater Disease of Fishes Caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research* **2**: 97-108
- Wugeditsch, T., Paiment, A., Hocking, J., Drummel-Smith, J., Forrester, C., Whitfield, C.** (2001) Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**(4): 2361-2371
- Yuan, L., Rodrigues, P.H., Bélanger, M., Dunn, W., Progulske-Fox, A.** (2007) The *Porphyromonas gingivalis* clpB gene is involved in cellular invasion in vitro and virulence in vivo. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **51**(2): 388-98