



Universitat Autònoma de Barcelona

DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA

**Caracterización de los
mecanismos de captación de
hierro de *Pasteurella multocida***

Montserrat Bosch Gallego

Abril 2003

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA I MICROBIOLOGIA

**Caracterización de los mecanismos
de captación de hierro de
*Pasteurella multocida***

Memoria presentada para
optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas por la
Universidad Autónoma de
Barcelona por

Montserrat Bosch Gallego

Vo Bo de los co-Directores de la Tesis

Dra. Montserrat Llagostera Casas

Dr. Jordi Barbé García

A mis padres

"Y donde está el final, lo descubrirás
cuando llegues a él."

Balada del Viejo de Leningrado

RESUMEN

Los objetivos de la presente tesis doctoral han sido la caracterización de los mecanismos de captación de hierro de *Pasteurella multocida*, con el fin de contribuir al diseño de una vacuna contra este patógeno basada en la sobreexpresión de proteínas de membrana externa, receptoras de hemoglobina y/o hemina, o en la expresión constitutiva de las proteínas de membrana reguladas por hierro (IROMPs).

Los resultados obtenidos han permitido la publicación de tres artículos (Anexo II) y se resumen a continuación:

Se ha identificado el gen *fur* de *P. multocida* y se ha estudiado el perfil electroforético de las proteínas de membrana externa de dicho patógeno, descubriéndose un control de la expresión de una proteína mayoritaria de membrana (OmpH) por parte de la proteína Fur. Se ha construido un mutante *fur* y se ha demostrado que la mutación de este gen no presenta ningún efecto sobre la virulencia de la cepa.

Así mismo, se ha caracterizado la región cromosómica de *P. multocida* que contiene los genes *exbB*, *exbD* y *tonB*, detectándose la existencia de promotores internos en dicha región y por lo tanto la expresión independiente de cada uno de los tres genes del sistema. Se ha estudiado la regulación de la expresión de todos ellos, demostrándose que pertenecen al regulón Fur, y se han construido mutantes en los genes *exbB*, *exbD* y *tonB*. Se ha calculado la dosis letal 50 (DL₅₀) de cada una de las cepas construidas, determinándose que cada uno de estos genes es imprescindible para el desarrollo normal de una infección por *P. multocida*, ya que en todos los casos se obtuvo un incremento de la DL₅₀ superior a los tres órdenes de magnitud con respecto la cepa salvaje.

Por otro lado, se ha analizado el genoma de *P. multocida* Pm70 y se han estudiado 9 proteínas que, por similitud con los receptores descritos en el banco de datos, podrían actuar como receptores de hemoglobina y/o hemina. Así se ha podido determinar que algunas de ellas son capaces de unir hemoglobina y hemina (PM0040, PM0236, PM0300, PM0741, PM1081 y PM1428), mientras que otras tan sólo interaccionan con la hemoglobina (PM0576) o la hemina (PM1282), y que otra (PM1078) no reconoce ninguna de estas fuentes de hierro.

Resumen

De entre todas estas proteínas se ha elegido la PM0300, que se ha denominado HgbA, para realizar un estudio más detallado de este tipo de receptores de membrana. Así, se ha demostrado que el gen *hgbA* forma una unidad transcripcional con los genes PM0298 y PM0299. Estos genes presentan similitud con *hugX* y *hugZ* de *Plesiomonas shigelloides* respectivamente, y están implicados en procesos de detoxificación de hierro. Se ha demostrado que, en *P. multocida*, las proteínas PM0298 y PM0299 son esenciales para la viabilidad de la cepa. Por otro lado, se ha determinado que el gen *hgbA* se expresa en las primeras dos horas de la infección y que, *in vitro*, su expresión se induce en ausencia de hierro. Además, se ha construido un mutante deficiente para esta proteína y se ha comprobado que no presenta disminuida ni su capacidad de unir hemoglobina *in vitro* ni su virulencia. Por otro lado, se ha comprobado la distribución prácticamente universal de este gen en cepas de *P. multocida* de distintos serotipos y orígenes animales, hecho que propone a esta proteína como candidata para el desarrollo de un método de identificación rápido y específico de este microorganismo.

Por último, se ha analizado la capacidad inmunogénica y protectora de los receptores de hemina y/o hemoglobina. Así, se ha demostrado que por lo menos tres de estas proteínas (PM0236, PM0741 y HgbA) son inmunogénicas. Sin embargo, la inoculación en ratones de las proteínas HgbA y PM0741, ya sea de forma individual o conjunta, no induce protección ante un enfrentamiento homólogo.

ÍNDICE

	pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia del hierro en la infección	1
1.1.1. Reducción de la concentración de hierro	2
1.2. Mecanismos de captación de hierro	
1.2.1. Control de la expresión de los genes implicados en la captación de hierro: la proteína Fur	4
1.2.1.1.La caja Fur	5
1.2.1.2.El regulón Fur	6
1.2.2. Sideróforos	7
1.2.3. Receptores de membrana externa	12
1.2.3.1.Receptores de transferrinas y lactoferrinas	13
1.2.3.2.Receptores de hemina y hemoglobina	15
1.2.3.3.Receptores de hemopexina	16
1.2.4. El sistema <i>exbB-exbD-tonB</i>	16
1.2.4.1.Estructura de las proteínas ExbB-ExbD-TonB	17
1.2.4.2.Mecanismo de acción	18
1.2.4.3.Organización genética del sistema <i>exbB-exbD-tonB</i>	19
1.2.4.4.Otras funciones del sistema <i>tonB</i>	20
1.2.5. Transporte de hierro a través de la membrana citoplasmática	21
1.2.6. Almacenamiento de hierro en el interior de las células bacterianas	23
1.3. Antigenicidad de las estructuras receptoras de hierro	23
1.3.1. Células inactivadas	24
1.3.2. Proteínas purificadas	25
2. OBJETIVOS	27
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. Aislamiento y caracterización del gen <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>	29
3.1.1. Aislamiento del gen <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>	29

	Índice
3.1.2. Secuenciación del gen <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>	30
3.1.3. Construcción de un mutante <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>	32
3.1.4. Análisis de la expresión del gen <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>	34
3.1.5. Estudio del perfil electroforético de las proteínas de membrana externa del mutante <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>	36
3.1.6. Análisis de la expresión del gen <i>ompH</i> de <i>P. multocida</i>	38
3.1.7. Virulencia del mutante <i>fur</i> de <i>P. multocida</i>	39
3.2. Aislamiento y estudio de la organización genética del sistema <i>exbB-exbD-tonB</i> de <i>P. multocida</i>	42
3.2.1. Aislamiento de los genes <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> de <i>P. multocida</i>	42
3.2.2. Organización transcripcional del cluster <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> de <i>P. multocida</i>	45
3.2.3. Regulación de la transcripción de los genes del cluster <i>tonB</i> de <i>P. multocida</i>	48
3.2.4. Construcción de mutantes <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> de <i>P. multocida</i>	51
3.2.5. Crecimiento de los mutantes <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> en diferentes condiciones de cultivo	54
3.2.6. Efecto de las mutaciones <i>exbB</i> , <i>exbD</i> y <i>tonB</i> sobre la virulencia de <i>P. multocida</i>	56
3.3. Caracterización de las proteínas de membrana receptoras de hemina y/o hemoglobina de <i>P. multocida</i>	57
3.3.1. Identificación y clonación de posibles receptores de hemina y/o hemoglobina de <i>P. multocida</i>	58
3.3.2. Determinación de la unión de hemina	59
3.3.3. Determinación de la unión de hemoglobina	61
3.3.4. Caracterización de la organización genética de la región PM0298-PM0299- <i>hgbA</i> de <i>P. multocida</i>	64
3.3.5. Construcción de mutantes de <i>P. multocida</i> deficientes para PM0298, PM0299 y <i>hgbA</i>	66
3.3.6. Unión de hemoglobina por el mutante <i>hgbA</i> de <i>P. multocida</i>	68
3.3.7. Estudio de la presencia del gen <i>hgbA</i> en diferentes serotipos de <i>P. multocida</i>	70

	Índice
3.3.8. Estudio de la regulación de la expresión del operón PM0298-PM0299- <i>hgbA</i>	72
3.3.9. Estudio de la capacidad inmunogénica y protectora de los receptores de hemina y/o hemoglobina de <i>P. multocida</i>	76
4. CONCLUSIONES	80
5. BIBLIOGRAFÍA	82
6. ANEXOS	
6.1. Anexo I: Materiales y métodos	96
6.2. Anexo II: Artículos	99
AGRADECIMIENTOS	

1. INTRODUCCIÓN

Las interacciones entre huésped y patógeno son muy complejas. Los huéspedes han desarrollado, a lo largo de la evolución, una serie de mecanismos dirigidos a impedir la invasión de organismos extraños y los patógenos se han adaptado a dichos mecanismos de defensa y han diseñado distintas estrategias para superarlos.

Los sistemas de defensa del huésped están basados fundamentalmente en su sistema inmunitario y en la reducción de la disponibilidad de nutrientes, entre ellos el hierro, dificultando así el crecimiento bacteriano.

Los microorganismos patógenos han desarrollado una serie de estrategias para evadir los ataques de los distintos componentes del sistema inmune y han diseñado mecanismos para captar los distintos nutrientes del huésped. Todas estas estrategias contribuyen a la capacidad del patógeno para inducir un proceso infeccioso, por lo cual se les considera factores de virulencia.

1.1. Importancia del hierro en la infección

El hierro es un factor de crecimiento esencial para prácticamente todas las bacterias, puesto que forma parte de algunas proteínas, como catalasas, peroxidases, oxidasas y citocromos; participa en la síntesis de pirimidinas y aminoácidos, en el ciclo de los ácidos carboxílicos, en la cadena de transporte de electrones y es un cofactor importante debido a su potencial redox (Braun & Killmann, 1999; Crosa, 1997; Ratledge & Dover, 2000).

Las bacterias necesitan una concentración de hierro de entre 10^{-6} y 10^{-8} M (Pradel *et al.*, 2000) para su crecimiento, lo cual significa que una célula requiere alrededor de 10^5 - 10^6 iones de hierro por generación (Wandersman & Stojiljkovic, 2000).

En condiciones anaeróbicas el hierro se encuentra en su forma reducida, Fe(II), que es lo suficiente soluble como para que pueda ser capturado por las bacterias sin necesidad de mecanismos especializados (Braun & Killmann, 1999). De la misma forma, en condiciones de acidez (pH 3) la concentración de Fe(III) soluble es de 10^{-8}

M (Braun & Killmann, 1999), suficiente para cubrir las necesidades de la mayoría de bacterias acidófilas. Sin embargo, en las mucosas y tejidos la concentración de hierro libre en solución es de 10^{-18} M (Ratledge & Dover, 2000). Esta baja concentración de hierro libre constituye una de las primeras líneas de defensa del huésped frente a las infecciones bacterianas.

1.1.1. Reducción de la concentración de hierro

Los organismos superiores disponen de mecanismos constitutivos para mantener un bajo nivel extracelular de hierro basados en proteínas que secuestran los iones de hierro como transferrinas, hemoglobina, hemopexina, ferritina y albúmina.

El hierro que se asimila de la dieta a través de las células de las mucosas del yeyuno pasa al torrente sanguíneo donde es transportado hacia el hígado unido a la **transferrina** (Ratledge & Dover, 2000). Las transferrinas son glicoproteínas extracelulares capaces de unir hierro. Su peso molecular varía entre 75.000 y 80.000 daltons (Otto *et al.*, 1992). Existen tres tipos de transferrinas: la **serotransferrina** que se encuentra en el plasma y líquido linfático; la **lactoferrina**, que se localiza en el interior de los neutrófilos y en la mayoría de fluidos extracelulares (saliva, lágrimas, secreciones nasales, fluidos seminales e intestinales, moco cervical, leche, etc.); y la **ovotransferrina** que se halla en la albúmina de los huevos (Ratledge & Dover, 2000). Las transferrinas tienen dos centros, similares pero no idénticos, de unión de hierro. Casi nunca se encuentran saturadas, aspecto importante porque permite neutralizar cualquier liberación de hierro adicional que se pudiera producir durante una infección, asegurando que los niveles extracelulares de este elemento se mantengan controlados (Ratledge & Dover, 2000).

La **ferritina** es la principal proteína de almacenamiento de hierro. Se localiza en la mayoría de tejidos animales pero sobretodo en el hígado. Son proteínas solubles en agua y están presentes en los espacios extramitocondriales de las células. Su peso molecular es de alrededor de 500.000 daltons y está compuesta por 24 subunidades que forman una esfera que puede almacenar unos 4.500 átomos de hierro. Cuando hay un exceso de hierro, se sintetiza en el hígado una proteína llamada

hemosiderina, que tiene características parecidas a la ferritina (Otto *et al.*, 1992; Ratledge & Dover, 2000).

La **hemoglobina** es la proteína encargada del transporte de oxígeno en los glóbulos rojos, está compuesta por dos cadenas polipeptídicas, α y β . Contiene un grupo hemo localizado en un dominio hidrofóbico de cada una de ellas. Su peso molecular es de unos 64.500 daltons (Otto *et al.*, 1992). Si se produce hemólisis y la consiguiente liberación de hemoglobina al torrente sanguíneo, ésta se une a la **haptoglobina** en una relación 1:1. Si se satura la haptoglobina, la hemoglobina libre en el plasma se oxida, disociándose así en globina y el grupo hemo, el cual se une específicamente a una proteína de unión a hemo llamada **hemopexina**. Ambos complejos, hemoglobina-haptoglobina y hemopexina-hemo, son conducidos al hígado donde el grupo hemo es degradado a bilirrubina o bien es incorporado a los citocromos P450. Una pequeña parte de las moléculas de hemo se desintegra en protoporfirina y hierro, el cual se une a la transferrina que lo transporta hasta la ferritina (Otto *et al.*, 1992).

La **albúmina** es una proteína globular de alrededor de 68.000 daltons que constituye casi el 60% de las proteínas totales del plasma. Se ha descrito que una molécula de albúmina puede unir hasta 10 átomos de hierro (Genco & Dixon, 2001).

Además de todos estos mecanismos, el huésped es capaz de reducir aún más la cantidad del hierro extracelular durante un proceso infeccioso. Este fenómeno, conocido como hipoferremia de la infección, se realiza incrementando la síntesis de ferritina en el hígado y la liberación de lactoferrina por parte de los neutrófilos (Otto *et al.*, 1992).

Las células del huésped también responden directamente a la invasión de un patógeno alterando el estatus del hierro intracelular. Se han descrito unas proteínas de resistencia natural asociadas a macrófagos, llamadas Nramp1 y Nramp2, que intervienen en este proceso. Nramp1 es una proteína de transmembrana que actúa

incrementando la captación de hierro desde la transferrina al macrófago, cuando los macrófagos y otros fagocitos profesionales han sido activados por la invasión de un patógeno. Este aporte adicional de hierro estimula la formación de formas reactivas de oxígeno, $\cdot\text{OH}$ y O^{2+} , que contribuyen a la destrucción de las bacterias fagocitadas (Ratledge & Dover, 2000).

Los organismos responden también a la infección suprimiendo la asimilación de hierro de la dieta, aumentando la secreción de haptoglobina y hemopexina desde el hígado, inhibiendo el crecimiento de las bacterias dentro de los fagosomas de los macrófagos o mediante el secuestro por los macrófagos de las formas de lactoferrina cargadas de hierro (Weinberg, 1995).

1.2. Mecanismos de captación de hierro

Como se ha comentado anteriormente, el hierro es un elemento esencial para el crecimiento de las bacterias y la disponibilidad de hierro dentro del huésped es muy escasa (Ratledge & Dover, 2000). Los microorganismos patógenos se han visto obligados a desarrollar estrategias para captar hierro de las diferentes fuentes disponibles *in vivo*. Estos sistemas de captación de hierro se pueden clasificar en dos grupos: aquellos que implican una interacción directa con las proteínas del huésped que transportan el hierro (transferrinas, lactoferrina, hemoglobina, etc.) y los que implican la síntesis y liberación de moléculas de bajo peso molecular, llamadas sideróforos, con gran afinidad por hierro y que lo capturan de las moléculas del huésped (Ratledge & Dover, 2000).

Además de estos mecanismos, algunos patógenos producen enzimas que incrementan la eficiencia de estos sistemas. Así, ciertos microorganismos sintetizan unas proteasas que son secretadas al medio y degradan a las proteínas transportadoras de hierro del huésped (Genco & Dixon, 2001). Por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* sintetiza la proteinasa Kgp, que se une y degrada a la hemoglobina, hemopexina y transferrina. Algunas bacterias producen unas hemolisinas que son secretadas y lisan a los eritrocitos, liberándose así el contenido celular, muy rico en hemoglobina (Genco & Dixon, 2001).

Por otro lado, un exceso en la concentración intracelular de hierro puede ser tóxico para las células, ya que estimula la formación de formas reactivas de oxígeno, generándose radicales hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss (Ratledge & Dover, 2000). Por este motivo las bacterias también han desarrollado mecanismos para controlar los niveles de hierro intracelular. Así, el gen *fur* regula la expresión de las proteínas implicadas en la captación de hierro y la de las proteínas de almacenamiento y uso de hierro según la concentración intracelular de este elemento que tengan en cada momento. Este gen, o un análogo suyo, cuyo mecanismo exacto de regulación se detallará más adelante, se encuentra presente en prácticamente todas las especies bacterianas cuyo genoma se ha secuenciado.

Además, también se han descrito mecanismos específicos de adaptación a ambientes con una elevada concentración de hierro (Wösten & Fox, 2000). Así, *Salmonella enterica* presenta un sistema de dos componentes, PmrA-PmrB, que parece introducir una serie de cambios en la pared de la célula bacteriana que disminuyen la interacción con el hierro.

1.2.1. Control de la expresión de los genes implicados en la captación de hierro: la proteína Fur

La proteína Fur (*ferric uptake regulator*) es la principal encargada de regular la expresión de los genes implicados en la captación de hierro. Actúa como un represor que reconoce una secuencia de DNA, conocida como caja Fur, presente en la región operadora de los genes que pertenecen al regulón Fur y se une a ella bloqueando la transcripción de dichos genes. Este reconocimiento tiene lugar cuando la proteína Fur forma un complejo con Fe(II), por lo cual la transcripción de estos genes sólo se bloquea en presencia de hierro (Ochsner & Vasil, 1996).

Se han descrito proteínas *Fur-like* en muchas bacterias, tanto grampositivas como gramnegativas, hecho que sugiere que este mecanismo de regulación está muy generalizado en el mundo bacteriano. Además, la proteína Fur de *Escherichia coli* reconoce las cajas Fur de otros microorganismos, incluso de grampositivos, por lo

que la caja Fur también parece estar muy conservada a lo largo de la evolución (Escolar *et al.*, 1999).

La proteína Fur está compuesta por dos dominios: el amino-terminal contiene un motivo de unión a DNA *helix-turn-helix* y el carboxi-terminal posee dos lugares de unión de metales, uno para el Fe^{2+} y otro para Zn^{2+} y es importante para la dimerización (Hantke, 2001).

La regulación de la expresión del gen *fur* es muy compleja. Por un lado la proteína Fur es autorregulable, pero además presenta un lugar de unión para la proteína CAP (represor por catabolito), con lo que se liga su expresión al metabolismo general de la célula, y además está regulado también por la respuesta al estrés oxidativo (Hantke, 2001). Sorprendentemente, en *Campylobacter jejuni*, el gen *fur* se expresa a partir de dos promotores, cuya expresión no está regulada por hierro (van Vliet *et al.*, 2000).

1.2.1.1. La caja Fur

La caja Fur se definió originalmente como una estructura palindrómica cuya secuencia consenso era GATAATGATAATCATTATC (de Lorenzo *et al.*, 1988). Diferentes estudios, en los que se clonó esta secuencia delante de genes no pertenecientes al regulón Fur, demostraron que la presencia de esta secuencia daba lugar a que dichos genes pasaran a estar regulados por la proteína Fur (Stojiljkovic *et al.*, 1994). Sin embargo, estudios posteriores mediante la técnica *hydroxyl radical footprinting* han modificado este concepto. Así, y basándose en el patrón de interacción entre Fur y DNA, se ha descrito la caja Fur como una repetición de como mínimo tres copias del hexámero NATA/TAT en una u otra orientación (Escolar *et al.*, 1999). Recientemente se ha vuelto a revisar este concepto y, basándose en estudios comparativos de las distintas regiones de DNA a las que se une la proteína Fur de *Bacillus subtilis*, se ha propuesto que la caja Fur está formada por dos secuencias superpuestas de heptámeros repetidos e invertidos (Baichoo & Helmann, 2002). En la Fig. 1.1 se comparan las distintas interpretaciones de la caja Fur.

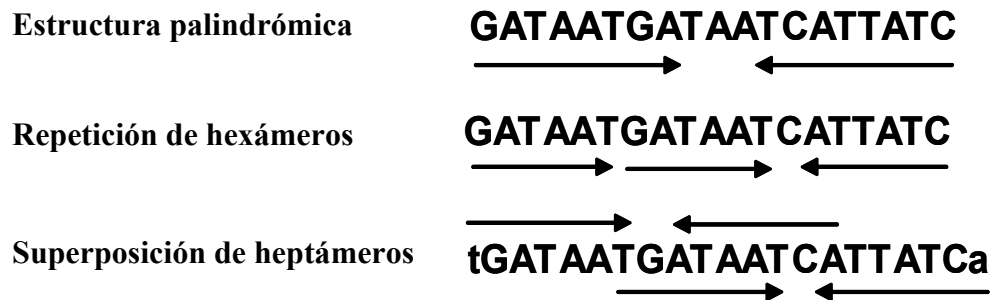


Fig. 1.1 Esquema de las distintas interpretaciones descritas acerca de la caja Fur.

La proteína Fur también puede regular la captación de hierro de forma indirecta a través de sistemas de transducción de señal de dos componentes, mediante reguladores *AraC-like*, los cuales regulan la síntesis de sideróforos y su sistema de captación, o mediante factores sigma. Además, también puede regular positivamente algunos genes, como los que codifican la superóxido dismutasa SodB, las ferritinas Bfr y Ftn, la aconitasa Acn, la fumarasa FumC y diversas proteínas que regulan la respuesta al estrés ácido (Hantke, 2001). No obstante, este último tipo de regulación parece ser a nivel post-transcripcional, ya que, aunque se ha demostrado que la proteína Fur se une al promotor del gen *sodB*, lo hace con muy baja afinidad y además ensayos FURTA con este promotor han dado negativos (Dubrac & Touati, 2002). Se ha propuesto que la proteína Fur puede estabilizar el mRNA de *sodB* o bien ejercer un control indirecto sobre la transcripción del gen (Dubrac & Touati, 2002).

1.2.1.2. El regulón Fur

Los genes regulados por la proteína Fur constituyen el llamado regulón Fur, habiéndose desarrollado diferentes metodologías para identificar dichos genes. Una de estas estrategias es el ensayo FURTA (*Fur Titration Assay*) que está basado en la utilización de una fusión génica entre el gen *fhuF*, regulado por Fur, y el gen *lacZ* (Stojiljkovic *et al.*, 1994). La introducción, en una célula que contenga dicha fusión, de un vector multicopia con un promotor que lleve una caja Fur, desplaza a la

proteína Fur del promotor del gen *fhuF*, lo cual permite su expresión y la producción de β -galactosidasa. Otra metodología empleada con este objetivo es la denominada SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) que está basada en filtrar diferentes fragmentos del genoma de un microorganismo a través de una membrana donde está inmovilizada la proteína Fur. Seguidamente se purifican y amplifican los fragmentos retenidos en la membrana (Ochsner & Vasil, 1996). Se ha empleado también el estudio comparado de los patrones de proteínas en geles bidimensionales de una cepa salvaje y de un mutante *fur*. Recientemente, la aplicación de técnicas de genómica comparada ha permitido detectar nuevos genes del regulón Fur de *E. coli*, *Salmonella Typhi*, *Yersinia pestis* y *Vibrio cholerae* (Panina *et al.*, 2001).

La mayoría de los genes que pertenecen al regulón Fur están implicados en la captación de hierro, como los de biosíntesis y transporte de sideróforos, proteínas de membrana externa receptoras de moléculas transportadoras de hierro del huésped, etc., y en el metabolismo del hierro, como las bacterioferritinas. Quizás para ajustar el metabolismo celular a las condiciones óptimas de crecimiento, también pertenecen a este regulón otras proteínas implicadas en el metabolismo celular, como las acotinasas PurR o MetJ, o proteínas que participan en la respuesta al estrés oxidativo, la superóxido dismutasa SodB y algunos factores de virulencia, como colicinas, hemolisinas y ciertas toxinas. Además, la proteína Fur parece controlar también genes cuyos productos están implicados en la síntesis de flagelos, como el gen *flhD*, principal activador del sistema de biosíntesis de flagelos en *E. coli*. Así pues, la proteína Fur es un regulador pleiotrópico que regula la expresión de muchos genes implicados en la captación de hierro y de otros genes importantes para la vida de la célula. Los mutantes Fur presentan una expresión constitutiva de los genes implicados en la captación de hierro, no pueden crecer usando glicerol, succinato o fumarato como fuentes de carbono, y son más sensibles al estrés ácido que las cepas salvajes (Escolar *et al.*, 1999).

1.2.2. Sideróforos

Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de sideróforos es uno de los mecanismos de que disponen los patógenos para capturar hierro de su entorno.

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular con una elevada afinidad por hierro, Fe (III), que son secretadas al medio y son capaces de extraer las moléculas de este elemento presentes en las proteínas transportadoras del huésped o en el medio ambiente. Una vez han captado el hierro, son reconocidos por unos receptores específicos de la membrana bacteriana, y en la mayoría de los casos, penetran hacia el interior de la célula donde liberan a la molécula de hierro. El sideróforo, tras este proceso, puede ser secretado otra vez al medio para capturar una nueva molécula de hierro. Así, los sideróforos actúan como agentes quelantes de hierro (Ratledge & Dover, 2000). En la Fig. 1.2 se esquematiza este proceso de captación de hierro por parte de los sideróforos.

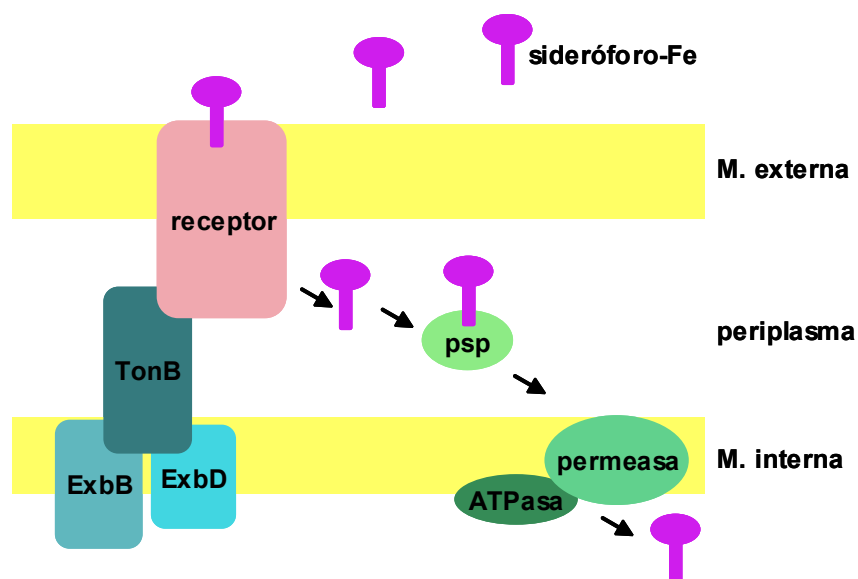
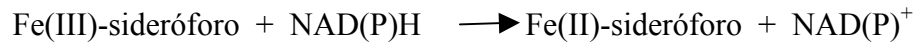


Fig. 1.2 Esquema del proceso de captación de hierro por parte de los sideróforos. Figura modificada de Jacques & Mikael (2002). psp = proteína soluble periplasmática

Una vez en el citoplasma, se produce la liberación del hierro de los sideróforos por una reducción de Fe(III) a Fe(II) catalizada por una ferri-sideróforo ferri-reductasa (Ratledge & Dover, 2000). La reacción global de este proceso sería:



La molécula de Fe(II) es soluble, se libera del sideróforo, pasa al citoplasma y se incorpora a las porfirinas o a las apoproteínas. Este proceso parece ser general, excepto en el caso de la enteroquelina de *E. coli*, que presenta un potencial redox demasiado bajo para utilizar el poder reductor del par NAD(P)H/NAD(P)⁺. En este caso la liberación del ión de hierro implica la hidrólisis del sideróforo por la acción de una esterasa produciéndose después la reducción de Fe(III) a Fe(II) (Ratledge & Dover, 2000).

Los sideróforos no presentan especificidad de fuente de hierro, sino que un mismo sideróforo puede secuestrar el hierro de diferentes proteínas del huésped como transferrina, hemoglobina, hemopexina, etc.

Se han descrito más de 500 sideróforos diferentes producidos tanto por bacterias como por levaduras y hongos, poniendo de manifiesto que esta estrategia para captar hierro del medio está ampliamente distribuida a lo largo de la evolución (Ratledge & Dover, 2000).

Los genes implicados tanto en la biosíntesis de sideróforos como en la de sus receptores están regulados negativamente por el complejo formado por la proteína Fur y el Fe(II), de forma que en condiciones de presencia de hierro, las regiones promotoras de dichos genes se encuentran bloqueadas y sólo se expresan en condiciones de privación de hierro. Así, debido a que la disponibilidad de hierro *in vivo* es escasa, la producción de sideróforos se inicia cuando el patógeno infecta un huésped, permitiéndose la captura de hierro y el reciclaje de éstos, con lo que la

necesidad de sintetizar nuevas moléculas desaparece y se inhibe la transcripción de los genes de biosíntesis.

Además de este control negativo, en algunos casos también parece tener lugar una regulación positiva que induce la síntesis de sideróforos. Así, *Vibrio anguillarum* presenta, además de la proteína Fur, dos activadores que controlan la síntesis del sideróforo anguibactina: AngR (*anguibactin system regulator*) y TAF (*transacting factor*). En cualquier caso, esta bacteria también posee un regulador negativo (un RNA antisentido) que interviene en esta regulación (Tolmasky *et al.*, 1994).

Algunas especies, como las del género *Pseudomonas*, pueden sintetizar más de un tipo de sideróforos (Ratledge & Dover, 2000). En *V. anguillarum*, los genes implicados en la síntesis y transporte de sideróforos están codificados en el plásmido pJM1 (Stork *et al.*, 2002). En los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia* las células sintetizan también sideróforos intracelulares, además de los extracelulares (de Voss *et al.*, 1999). Este fenómeno se debe probablemente a la gruesa capa lipofílica de sus membranas celulares. Estas bacterias necesitan un almacenamiento de hierro intracelular que asegure la disponibilidad de hierro a corto plazo, ya que el paso de los sideróforos extracelulares y la consiguiente incorporación de hierro a través de la membrana celular es un proceso lento. Algunas especies de la familia *Enterobacteriaceae* pueden reconocer no sólo sus propios sideróforos, sino también los que sintetizan otros microorganismos, incluidos los de los hongos (Nelson *et al.*, 1992).

La estructura de los sideróforos, así como las rutas de biosíntesis, varía entre las distintas especies, aun cuando se pueden establecer dos tipos de sideróforos según su estructura: los fenolatos, como la enterobactina de algunas especies de la familia *Enterobacteriaceae*, y los hidroxamatos, como la aerobactina de *E. coli* (Otto *et al.*, 1992). En la Fig. 1.3 se muestran las estructuras de algunos sideróforos.

Este mecanismo de captación de hierro parece ser imprescindible para la patogenia de las bacterias puesto que mutantes de diferentes especies, como *Y. pestis*, deficientes en la síntesis de sideróforos presentan una reducción en su virulencia (Haag *et al.*, 1993).

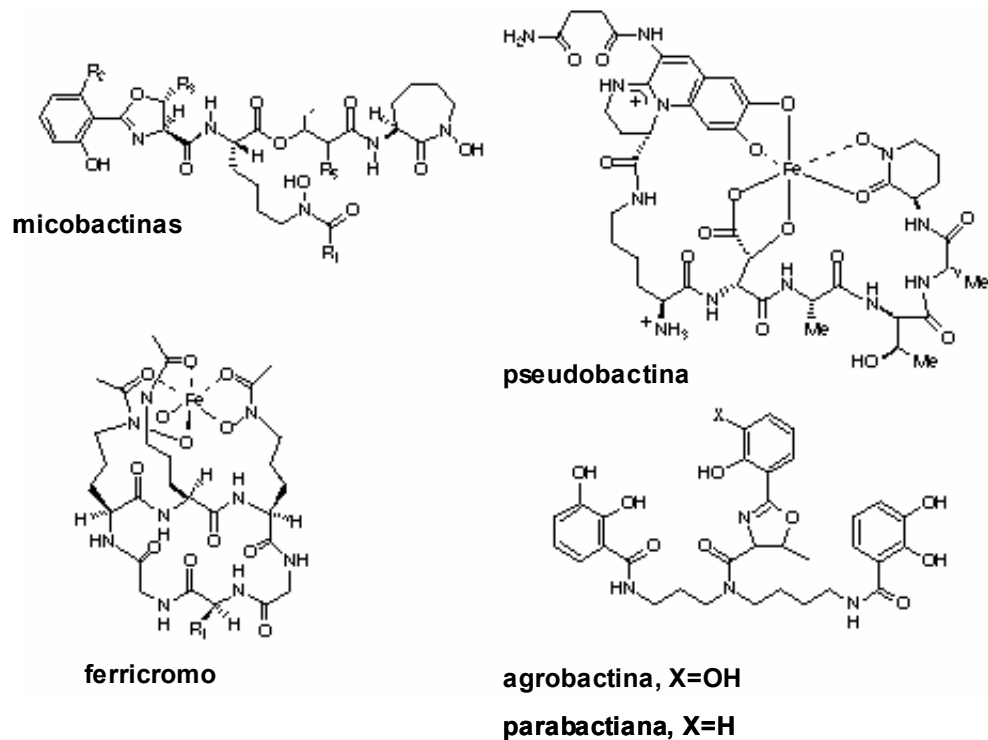


Fig. 1.3 Estructura de algunos de los sideróforos más representativos.

1.2.3. Receptores de membrana externa

La permeabilidad de la membrana externa de las bacterias gramnegativas viene determinada por la presencia de proteínas denominadas porinas de clase I que forman unos poros en la membrana que permiten el paso de compuestos hidrofílicos de hasta 600 daltons de tamaño. Estas porinas no muestran especificidad de sustrato (Braun, 1995). Existen un segundo tipo de porinas, las denominadas de clase II, que permiten la difusión inespecífica de compuestos de bajo peso molecular, aunque también reconocen algunos sustratos de forma específica (Braun, 1995). Esta especificidad permite una difusión más eficiente de dichos sustratos y también la de compuestos de mayor tamaño que incluso no podrían pasar a través de las porinas de clase I. Por

último, existe un tercer tipo de canales, se trata de unos receptores específicos de alta afinidad que permiten el paso de moléculas de mayor tamaño y que se encuentran en concentraciones muy bajas (Braun, 1995).

El tamaño de las moléculas de hierro en solución impide que éstas puedan atravesar la membrana externa a través de las porinas inespecíficas, por lo que es necesaria la presencia de receptores de membrana concretos. Estos receptores reconocen a las moléculas de hemo o a las proteínas transportadoras de hierro del huésped. Después de la unión de dichas moléculas, se libera el hierro que es transportado hacia el citoplasma y en ningún caso las moléculas del huésped son introducidas (Genco & Dixon, 2001). Este proceso de entrada del hierro requiere energía que es proporcionada por el sistema *tonB* (Moeck & Coulton, 1998). Por ello, los receptores específicos de membrana contienen una región, conocida como caja TonB, que es la que interacciona con la proteína TonB. Así, se puede considerar que aquellas proteínas de membrana que contengan una caja TonB estarán probablemente implicadas en la captación de alguna clase de nutriente esencial para la célula, como el hierro.

Todos estos receptores están regulados negativamente por el complejo Fur-Fe(II) y, por tanto, se expresan en condiciones de privación de hierro. A continuación se describen los diferentes tipos de receptores.

1.2.3.1. Receptores de transferrinas y lactoferrinas

En muchas bacterias patógenas pertenecientes a las familias *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae* se han descrito dos proteínas muy conservadas y específicas que reconocen únicamente a las transferrinas o lactoferrinas de su huésped habitual. Dichas proteínas se han denominado TbpA y TbpB si reconocen a la transferrina y LpbA y LpbB para los receptores de lactoferrina (Morton & Williams, 1989; Fuller *et al.*, 1998). Así, por ejemplo, se han descrito receptores de transferrinas en *Neisseria gonorrhoeae* (Cornelissen *et al.*, 2000), *Neisseria meningitidis* (Schryvers & Morris, 1988; Ferrón *et al.*, 1993) y en *P. multocida* (Veken *et al.*, 1994; Ogunnariwo & Schryvers, 2001) y receptores de lactoferrina en *N. meningitidis*

(Schryvers & Morris, 1988b). También se han identificado receptores de este tipo en microorganismos que no pertenecen a estas familias, como en *Moraxella catarrhalis* (Du *et al.*, 1998).

La proteína TbpA es un receptor de membrana externa dependiente de TonB. Presenta la misma afinidad por las transferrinas cargadas con moléculas de hierro como por las apotransferrinas. La proteína TbpB es una lipoproteína que produce un aumento de la eficiencia de captación de hierro, si bien no es imprescindible para que ésta se lleve a cabo. Se ha propuesto un mecanismo de acción que consiste en que inicialmente la proteína TbpB reconocería a las transferrinas cargadas de moléculas de hierro, se uniría a ellas y las presentaría a un dímero formado por dos proteínas TbpA ancladas en la membrana externa. La unión de la transferrina a estas dos proteínas podría inducir un cambio conformacional de TbpB y en las propias transferrinas, liberándose así las moléculas de hierro que pasarían hacia el periplasma a través de los poros formados por las proteínas de membrana (Schryvers & Stojiljkovic, 1999). En la Fig. 1.4 se esquematiza este mecanismo de acción.

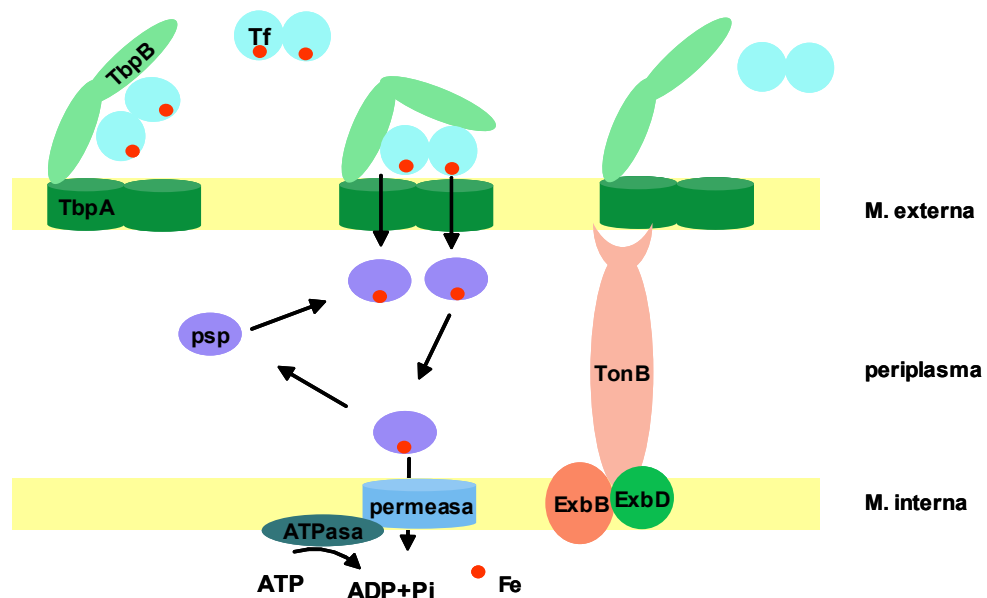


Fig. 1.4 Mecanismo de captación de hierro a partir de la transferrina. Modelo modificado de Ratledge & Dover (2000). psp = proteína soluble periplamática, Tf = transferrina, Fe = molécula hierro.

Estos receptores son importantes para el proceso de infección de los patógenos, como los gonococos, puesto que mutantes en estos genes presentan una virulencia reducida (Cornelissen *et al.*, 1998).

1.2.3.2. Receptores de hemina y hemoglobina

Se ha descrito una gran variedad de proteínas de membrana implicadas en la captación de hierro a partir de hemina y hemoglobina. Por ejemplo, se han caracterizado receptores de hemina en *Porphyromonas gingivalis* (Daspher *et al.*, 2000) o receptores de hemoglobina en *Haemophilus ducreyi* (Elkins, 1995; Elkins *et al.*, 1995b), *P. gingivalis* (Fujimura *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 2000) y en distintas especies de *Neisseria* (Stojiljkovic *et al.*, 1995; Stojiljkovic *et al.*, 1996).

Todas ellas presentan una baja similitud (entre un 17 y un 23%) con los receptores de membrana para sideróforos y los de transferrinas y lactoferrinas, siendo el extremo N-terminal el más conservado entre los distintos tipos de proteínas (Wandersman & Stojiljkovic, 2000). En particular, los receptores de hemina contienen un dominio muy conservado que presenta la secuencia FRAP/NPNL (Wandersman & Stojiljkovic, 2000).

Algunas de estas proteínas son muy específicas, como las HutA, HmbR y HgbA de *Haemophilus influenzae* (Maciver *et al.*, 1996; Morton *et al.*, 1999) y sólo reconocen uno o dos tipos de moléculas transportadoras de hierro y de su huésped habitual, mientras que otras son capaces de reconocer una gran variedad de fuentes de hierro distintas, como la HemR de *Yersinia enterocolitica* (Bracken *et al.*, 1999).

Algunos de estos receptores, como el HpuAB de *N. meningitidis*, al igual que los de transferrinas y lactoferrinas, están formados por dos proteínas diferentes, un receptor y una lipoproteína (Lewis *et al.*, 1997), aunque el mecanismo de acción en este caso debe ser diferente al descrito anteriormente para los receptores de transferrina, puesto que tanto HpuA como HpuB son necesarias para la unión y utilización de la hemoglobina o hemoglobina-haptoglobina (Rohde *et al.*, 2002).

1.2.3.3. Receptores de hemopexina

El único caso conocido hasta el presente es el de *H. influenzae*, que contiene un operón formado por los genes *hxuABC*, cuyos productos están implicados en la utilización de hemina libre y de hemo-hemopexina. Parece ser que la proteína HxuA actúa tanto como receptor de membrana como de sideróforo y la proteína HxuB podría estar implicada en la secreción de HxuA (Cope *et al.*, 1998).

1.2.4. El sistema *exbB-exbD-tonB*

El sistema compuesto por las proteínas ExbB-ExbD-TonB aporta energía desde la membrana citoplasmática hasta la membrana externa permitiendo la introducción de hierro, vitamina B₁₂, colicinas y determinados fagos a través de sus receptores de membrana externa específicos (Braun, 1995).

Se ha descrito que mutantes TonB⁻ de *E. coli* presentan efectos pleiotrópicos que incluyen una reducción en el crecimiento, disminución en la captación de sideróforos, resistencia a los fagos T1 y ϕ 80 y a un determinado grupo de colicinas del grupo B, así como al antibiótico albomicina (Pradel *et al.*, 2000).

También se sabe que los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* pueden crecer usando hemina como fuente de hierro, pero son incapaces de utilizar hemoglobina, lactoferrina y/o transferrina (Stojiljkovic & Srinivisan, 1997; Desai *et al.*, 2000). Además, en *Bordetella pertusis*, un mutante *tonB-exbB* presenta una disminución del crecimiento en condiciones de privación de hierro y una reducción en la captación de sideróforos, hemina y albomicina (Pradel *et al.*, 2000).

En cuanto al efecto sobre la virulencia de una mutación en el gen *tonB*, depende de cada microorganismo y de la ruta de infección. Así, el producto del gen *tonB* de *H. influenzae* es imprescindible para la virulencia cuando éste es inoculado por vía intraperitoneal o intranasal (Jarosik *et al.*, 1994). Mutantes *tonB-exbB* de *B. pertusis* son incapaces de proliferar en el tracto respiratorio de ratón, dado que los

mecanismos de captación de hierro dependientes de TonB son esenciales para la multiplicación de esta bacteria *in vivo* (Pradel *et al.*, 2000). Igualmente, los mutantes *tonB* de *V. cholerae* (Mey & Payne, 2001), *Pseudomonas aeruginosa* (Takase *et al.*, 2000) y *Shyggella dysenteriae* (Reeves *et al.*, 2000) también presentan una reducción en la virulencia, y mutantes TonB⁻ de *N. meningitidis* no pueden crecer en cultivos de células epiteliales (Larson *et al.*, 2002). Por otra parte, la inactivación del gen *tonB* de *S. enterica* serovar Thyphimurium no afecta a su virulencia cuando es inoculada intraperitonealmente, si bien ésta sí disminuye significativamente en una infección intragástrica (Tsolis *et al.*, 1996).

Se han encontrado proteínas homólogas a la proteína TonB de *E. coli* en una gran variedad de bacterias gramnegativas (Higgs *et al.*, 1998), hecho que sugiere que este sistema está ampliamente distribuido y conservado a lo largo de su proceso evolutivo.

Las bacterias grampositivas carecen de membrana externa, por lo que no necesitan este sistema de transducción de energía y tienen los receptores anclados directamente en la membrana citoplasmática mediante uniones covalentes (Braun & Killmann, 1999).

1.2.4.1. Estructura de las proteínas ExbB-ExbD-TonB

Las tres proteínas que componen este sistema están localizadas en la membrana citoplasmática. La proteína ExbB presenta tres dominios transmembranales y contiene su extremo N-terminal y un pequeño giro en el periplasma (Braun & Killmann, 1999). ExbD está anclada a la membrana citoplasmática por su extremo N-terminal y el resto de la proteína se encuentra en el periplasma (Braun & Killmann, 1999).

La proteína TonB presenta una secuencia hidrofóbica en su extremo N-terminal, por donde se ancla en la membrana citoplasmática. Contiene dos regiones ricas en prolina, EPEPEPEPIPEP y KPKPKPKPKPKP, que sugieren una estructura *rod-like*

que se extiende por el periplasma (Braun & Killmann, 1999). Se puede identificar también un motivo anfipático beta-alfa-beta, cerca del extremo C-terminal, por donde podría interaccionar con los receptores de membrana externa (Moeck & Coulton, 1998). Así, la proteína TonB interacciona con el complejo ExbB-ExbD por su extremo N-terminal y con los receptores de membrana externa por el extremo C-terminal.

1.2.4.2. Mecanismo de acción

La unión del ligando a la proteína de membrana que actúa como receptora, proceso independiente de TonB, le induce un cambio conformacional, de tal manera que expone unos bucles en el periplasma. Estos cambios provocan que la proteína TonB contacte físicamente con el receptor, a través de la región denominada caja TonB, transduciéndose la energía desde la membrana citoplasmática hacia el receptor de la membrana externa. Ello provoca un cambio conformacional en el receptor y como consecuencia se forma un poro en la membrana y se reduce la afinidad de éste por el ligando, de tal manera que dicho sustrato pasa, a través del poro formado, hacia el periplasma. Después, la proteína TonB se disocia del receptor y es reciclada por el complejo ExbB-ExbD. Por otro lado, la proteína de membrana adopta la misma estructura que tenía antes de su unión con el ligando (Moeck & Coulton, 1998). En la Fig. 1.5 se escenifica este mecanismo de acción.

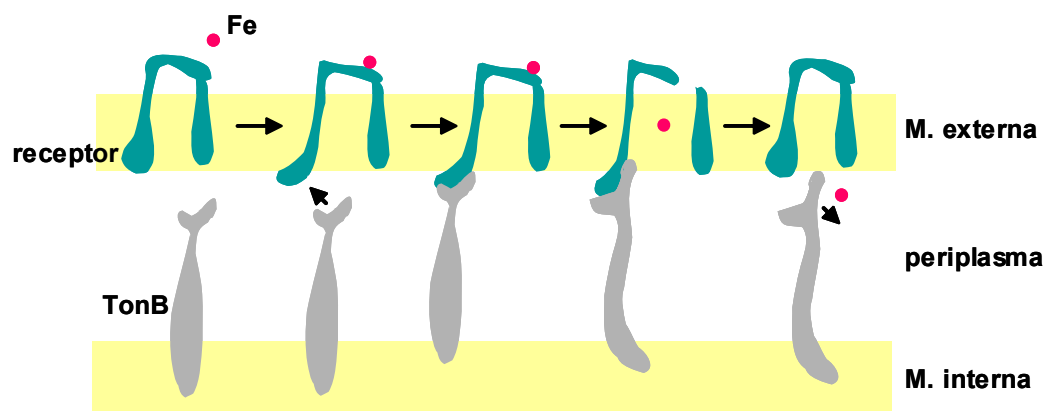


Fig. 1.5 Esquema de los distintos pasos del proceso de entrada de hierro a través de la membrana externa. Modelo modificado de Moeck & Coulton (1998).

Según este modelo, la proteína TonB actúa como un regulador alostérico que, cuando está activado, produce un cambio conformacional en el receptor permitiendo la internalización de los ligandos. Además, la proteína TonB interacciona preferentemente con aquellos receptores que han reconocido un ligando (Braun & Braun, 2002).

De todo lo anterior se deduce que la proteína TonB presenta un ciclo de cambios conformacionales. Una de estas conformaciones proporciona la energía necesaria para el transporte del ligando a través del receptor de membrana, y las proteínas ExbB y ExbD se encargan del reciclaje de la proteína TonB. Además, el complejo ExbB-ExbD estabiliza a la proteína TonB, puesto que en ausencia de la proteína ExbB, las proteínas ExbD y TonB son hidrolizadas y la vida media de la proteína TonB es mayor en presencia de ExbB-ExbD que en un mutante ExbB (Braun, 1995).

Según todo esto, los receptores serían como unos canales cerrados que se abrirían cuando interactúan con la proteína TonB (Moeck & Coulton, 1998).

1.2.4.3. Organización genética del sistema *exbB-exbD-tonB*

Como se ha comentado anteriormente, el sistema *tonB* está ampliamente distribuido en las bacterias gramnegativas, si bien su organización genética no es tan conservada.

B. pertusis (Pradel *et al.*, 2000), *N. meningitidis* (Stojiljkovic & Srinivisan, 1997), *N. gonorrhoeae* (Biswas *et al.*, 1997), *Xantomonas campestris* (Wiggerich *et al.*, 1997) y uno de los dos sistemas de *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998) muestran una disposición del tipo *tonB-exbB-exbD*. Mientras que en *Pseudomonas putida* (Bitter *et al.*, 1993), *H. influenzae* (Jarosik *et al.*, 1994), *H. duceyi* (Elkins *et al.*, 1998), *Pasteurella haemolytica* (Graham *et al.*, 1997), *Helicobacter pylori* (Worst & Maaskant, 1999) y en el segundo sistema de *V. cholerae*, el orden de los genes es *exbB-exbD-tonB*. En las enterobacterias, el gen *tonB* no forma una unidad transcripcional con los genes *exbB* y *exbD*.

En algunos casos, como *V. cholerae*, se han descrito dos sistemas *tonB*, denominados *tonB1* y *tonB2*. Ambos son funcionales y participan en la captación de hierro. Mutaciones en uno de los dos no elimina la captación de hierro en *V. cholerae*, siendo necesarias mutaciones en ambos para obtener un fenotipo TonB⁻. Es posible que estos dos sistemas tengan funciones redundantes y que su duplicación se deba a un mecanismo de seguridad. Sin embargo, se han descrito dos tipos de cajas TonB en diferentes receptores de hemina de *V. cholerae* que podrían ser reconocidas preferentemente por *tonB1* o por *tonB2*, por lo que tal vez cada uno de ellos esté especializado en la captación de hierro a partir de una fuente determinada o en un momento concreto del ciclo infectivo (Mey & Payne, 2001).

En algunos microorganismos los genes del sistema *tonB* están organizados alrededor de genes que participan en la captación de hierro. El sistema *tonB1* de *V. cholerae* forma parte de un operón que incluye además tres genes implicados en la captación de hemina (*hutBCD*) (Occhino *et al.*, 1998). En *Actinobacillus pleuropneumoniae* los genes *tonB-exbB-exbD* están junto a los genes *tbpB* y *tbpA* que codifican receptores de transferrina (Tonpitak *et al.*, 2000).

1.2.4.4. Otras funciones del sistema *tonB*

Se ha descrito que el sistema *tonB* puede también participar en otras funciones celulares. Así, se sabe que puede actuar como transductor de señales extracelulares. Por ejemplo, el sistema de transporte del citrato férrico en *E. coli* se induce por la presencia de este compuesto en el medio, sin embargo no es necesario que el citrato férrico entre en la célula para inducir el sistema (Crosa, 1997; Braun & Killmann, 1999).

En *Aeromonas hydrophila* se ha descrito una proteína similar a TonB, denominada ExeB, que está implicada en la secreción de una exotoxina. Esto sugiere que el sistema *tonB* podría también estar relacionado con la secreción de algunos factores de virulencia (Howard *et al.*, 1996).

Mutantes *tonB* de *S. dysenteriae* no pueden proliferar en el interior de las células renales del asa de Henle (Reeves *et al.*, 2000). Sin embargo, en el interior de dichas células los niveles de hierro libre son suficientemente elevados como para mantener reprimidos los sistemas de alta afinidad implicados en la captación de hierro. Según esto, la atenuación en la virulencia que presentan los mutantes *tonB* de este microorganismo no puede ser debida a un defecto en la captación de hierro, sino que la proteína TonB debe estar implicada en la captación de algún otro nutriente esencial para la célula o bien puede participar en la secreción de algún factor de virulencia importante (Reeves *et al.*, 2000).

1.2.5. Transporte de hierro a través de la membrana citoplasmática

Se conocen diferentes sistemas implicados en la translocación del hierro a través de la membrana citoplasmática. Se trata de sistemas transportadores del tipo ABC. Todos ellos están compuestos por tres tipos de componentes: una proteína soluble periplasmática, una permeasa de transmembrana y una ATP-hidrolasa, que se encarga de proporcionar la energía necesaria para que tenga lugar la introducción del hierro al interior de la célula. A pesar de que todas las proteínas de los sistemas de transporte ABC presentan unas secuencias consenso que las identifican como miembros de la familia, no se pueden reemplazar las proteínas de un sistema por la proteína equivalente de otro de estos sistemas (Köster, 2001).

Las proteínas periplasmáticas de diferentes sistemas presentan una baja similitud de secuencia entre ellas, sin embargo son muy parecidas en cuanto a estructura. La mayoría de ellas están formadas por dos dominios globulares conectados por una pequeña cadena polipeptídica de tal manera que se facilita el movimiento de los dominios globulares por un “mecanismo de bisagra” (Clarke *et al.*, 2001).

Las permeasas de los distintos sistemas ABC también son muy diferentes en cuanto a secuencia, sin embargo los mecanismos de transporte en todos los casos son muy parecidos. Las permeasas son muy hidrofóbicas y contienen muchos segmentos transmembranales y se sabe que los dominios N- y C-terminal son esenciales para su función. Además, presentan también varios bucles externos que pueden ser

importantes para la interacción con las proteínas periplasmáticas (Clarke *et al.*, 2001).

Estos sistemas de transportadores ABC están implicados en la captación de sideróforos, grupo hemo y vitamina B₁₂ (Clarke *et al.*, 2001). Están muy conservados a lo largo de la evolución ya que se encuentran en todas las bacterias y arqueobacterias, excepto en aquellos patógenos intracelulares cuyo metabolismo está muy ligado al metabolismo de sus huéspedes, como los micoplasmas, y en aquellas bacterias que no necesitan hierro, como las bacterias del ácido láctico (Köster, 2001).

El transporte de sideróforos y hierro a través de la membrana citoplasmática es mucho menos específico que su translocación a través de la membrana externa, ya que un mismo sistema es capaz de transportar a diferentes sustratos relacionados estructuralmente (Köster, 2001).

Aunque no existen evidencias, es posible que en las bacterias gramnegativas, las proteínas de unión al sustrato interaccionen directamente con los receptores de membrana externa, facilitando así la liberación del ligando (Köster, 2001).

La unión del sustrato a la proteína periplasmática induce en ésta un cambio conformacional que facilita su reconocimiento por la permeasa. Esta última extrae el ligando y lo transporta a través de la membrana citoplasmática, usando la energía proporcionada por la hidrolasa de ATP. La hidrólisis no se inicia hasta que dicha enzima interacciona con una proteína periplasmática cargada con el ligando, es decir que debe enviarse una señal desde la proteína periplasmática a la ATPasa para inducir la hidrólisis del ATP, evitándose así un consumo innecesario de ATP (Köster, 2001).

1.2.6. Almacenamiento de hierro en el interior de las células bacterianas

Una vez dentro del citoplasma, el hierro tiene distintas destinaciones. Un 5% forma parte de los citocromos, un 10% se encuentra en las proteínas de hierro y azufre, un 10% está secuestrado por las bacterioferritinas y hasta un 40% está unido a carbohidrato ácido en forma de Fe(II) (Clarke *et al.*, 2001).

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

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

1.3. Antigenicidad de las estructuras receptoras de hierro

Los antígenos que se expresan *in vivo* desempeñan un papel esencial en la protección heteróloga. Algunos autores consideran que la expresión de estos antígenos está inducida por la baja concentración de hierro en los tejidos del huésped; así, los elementos que conferirían esta protección serían las proteínas de membrana externa inducidas por hierro (IROMPs) (Choi-Kim *et al.*, 1991).

Además, las proteínas receptoras de transferrina, lactoferrina, hemoglobina y hemina presentan una serie de características que las proponen como buenas candidatas para el diseño de vacunas. Entre ellas se pueden citar su exposición en la membrana celular, el aumento de su síntesis durante un proceso infeccioso y que su neutralización por parte de anticuerpos puede bloquear la captación de hierro, inhibiendo así el crecimiento de la célula bacteriana dentro del huésped.

Se ha descrito que proteínas captadoras de hierro de un microorganismo presentan un efecto protector frente a infecciones con ese mismo agente (Rossi-Campos *et al.*, 1992; Danve *et al.*, 1993; Lissolo *et al.*, 1995). Estos estudios han seguido dos estrategias, el uso de bacterinas crecidas en condiciones de privación de hierro o la purificación de receptores de transferrina.

1.3.1. Células inactivadas

Los diferentes estudios realizados en este sentido están basados en la inoculación de células crecidas en condiciones de privación de hierro o bien en la administración de extractos de proteínas de membrana de células crecidas en ausencia de hierro.

Así, se ha descrito que extractos, obtenidos por sonicación o por tratamiento con agentes químicos como el formol, de *P. haemolytica* A2 crecida en presencia del quelante de iones 2,2'-dipiridil (DP) inducen una buena protección frente a una infección con este microorganismo (Gilmour *et al.*, 1991).

Sin embargo, bacterinas de *P. multocida* crecidas en condiciones de privación de hierro no inducen inmunidad en pollos y pavos aún después de dos dosis de inoculación (Glisson *et al.*, 1993). Contrariamente, extractos de membrana externa de *P. multocida* crecidas en presencia de DP inducen protección heteróloga frente a esta especie bacteriana (Ruffolo *et al.*, 1998). Además, células de este microorganismo crecidas *in vivo* y después inactivadas también inducen protección cruzada en pollos (Ibrahim *et al.*, 2000).

A pesar de los buenos resultados obtenidos, estas aproximaciones presentan algunas limitaciones, como el elevado coste económico, las complicaciones que supone optimizar cultivos masivos en presencia de agentes quelantes (adaptación, menor rendimiento del tanque de fermentación, etc.) y las alteraciones que se pueden producir en la estructura de los antígenos durante el proceso de obtención de los extractos.

1.3.2. Proteínas purificadas

Se han realizado numerosos estudios basados en la purificación de receptores de hierro, ya sea directamente a partir de cultivos del patógeno, o bien mediante la clonación del gen correspondiente y su posterior purificación tras su expresión en *E. coli*.

Así, se ha publicado que la inoculación en cerdos con dos dosis de 25 µg cada una de un receptor de transferrina de *A. pleuropneumoniae*, induce una buena respuesta humoral y confiere protección frente a un enfrentamiento homólogo (Rossi-Campos *et al.*, 1992).

Además, trabajos realizados con los receptores de transferrina (Tbps) de *N. meningitidis* demuestran que el antisuero específico obtenido contra las Tbps de este microorganismo confiere protección pasiva en ratones. Este antisuero presenta actividad protectora no sólo frente a su cepa parental sino también frente a otras cepas. De la misma forma, la inoculación de Tbps purificadas en ratones incrementa su supervivencia frente a una infección con dicha bacteria (Danve *et al.*, 1993).

En la misma línea, anticuerpos contra la proteína Tbp2 de *N. meningitidis* inhiben la captación de transferrina, disminuyendo el crecimiento de la cepa cuando crece con transferrina como única fuente de hierro, además de presentar capacidad protectora frente a su cepa parental (Lissolo *et al.*, 1995).

Se ha determinado también que el extremo N-terminal de la proteína TbpB de *N. meningitidis* es suficiente para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes, mientras que la parte C-terminal desencadena la síntesis de anticuerpos con propiedades bactericidas. Ambos tipos de anticuerpos reconocen el receptor TbpB de distintos serotipos (Rokbi *et al.*, 1997).

Aunque las dos proteínas que forman los receptores de transferrinas son capaces, por separado, de inducir cierto grado de protección, parece que la TbpB es más eficiente. A pesar de que la proteína TbpA de *N. meningitidis* induce una mejor protección heteróloga que la TbpB, los anticuerpos diseñados contra TbpB presentan una mayor actividad protectora que los obtenidos contra TbpA (West *et al.*, 2001). De la misma manera, antisuero anti-TbpA de *M. catarrhalis* no muestra actividad bactericida, mientras que sí que la presenta el antisuero anti-TbpB (Myers *et al.*, 1998).

Se han publicado también trabajos con otros tipos de receptores de hierro. Así, en *M. catarrhalis*, las proteínas TbpB y LbpB son inmunogénicas, mientras que no lo son las TbpA y LbpA (Yu *et al.*, 1999). Además, la proteína Fbp de *N. meningitidis* induce la producción de anticuerpos que reaccionan con distintas cepas de esta especie, aunque éstos no bloquean la incorporación de hierro ni activan el sistema del complemento frente a meningococos (Gómez *et al.*, 1996).

Los datos sobre la posible utilización de receptores de hemoglobina como inmunógenos son escasos. Sólo está reportado que la inhibición de la captación de hemoglobina por anticuerpos creados contra la proteinasa Kgp de *P. gingivalis* induce protección en ratones (Kuboniwa *et al.*, 2001).

Estas estrategias no presentan las limitaciones descritas en el apartado anterior y, por otro lado, el uso de sistemas de expresión permite que se puedan obtener cantidades suficientes de proteínas con fines vacunales. Sin embargo, también existen algunos inconvenientes, como los posibles cambios estructurales que pueden producirse en las proteínas seleccionadas, debido a la expresión de estos antígenos en un microorganismo distinto, y que podrían alterar sus propiedades inmunogénicas.

2. OBJETIVOS

Pasteurella multocida constituye un grupo heterogéneo de cepas asociadas con infecciones en muchos animales salvajes y domésticos (Bisgaard, 1995). Este microorganismo presenta un amplio espectro de huésped, originando diferentes procesos patológicos como septicemias hemorrágicas en ganado bovino, neumonías en la cabaña bovina y ovina, en cerdos y en conejos, rinitis atróficas en cerdo, cólera en pollos y pavos, etc. (Alwis, 1995). Se han descrito también infecciones en el hombre debido a mordeduras de animales infectados. *P. multocida* tiene una amplia distribución geográfica y ocasiona importantes pérdidas económicas, pero, a pesar de los numerosos estudios que se han realizado en este sentido (Adler *et al.*, 1996; Adler *et al.*, 1999), hasta el momento no se dispone de una vacuna eficaz contra este patógeno que confiera una buena protección heteróloga.

La estrategia más utilizada para prevenir las infecciones debidas a *P. multocida* ha sido la aplicación de bacterinas, con las cuales se consigue una buena protección frente a la misma cepa pero no frente a distintos serotipos.

Por otro lado, y tal y como se ha comentado anteriormente, se han desarrollado vacunas eficaces frente a bacterias de géneros como *Actinobacillus* y *Neisseria* basadas en la expresión de receptores de transferrinas y proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs). A este respecto, se ha descrito que extractos de proteínas de membrana externa de *P. multocida* crecidas en condiciones de privación de hierro confieren protección heteróloga (Ruffolo *et al.*, 1998).

Por todo ello, en la presente tesis doctoral nos planteamos el estudio y caracterización de los mecanismos de captación de hierro de *P. multocida* con el propósito de que sirviera de base para el diseño de una vacuna eficaz contra este microorganismo, basada en la sobreexpresión de proteínas receptoras de hierro.

En este contexto, se definieron los siguientes objetivos parciales:

1. Aislamiento, clonación y caracterización del gen *fur* de *P. multocida* y construcción de un mutante de *P. multocida* deficiente en este gen.

2. Determinación de la DL_{50} de dicho mutante *fur* y análisis del perfil electroforético de sus proteínas de membrana externa (OMPs).
3. Caracterización del sistema *tonB* de *P. multocida*: construcción de mutantes deficientes en los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* y determinación de la DL_{50} de cada uno de ellos.
4. Identificación, clonación y caracterización de proteínas de membrana receptoras de hemoglobina y/o hemina mediante búsqueda en los bancos de datos.
5. Estudio de la capacidad inmunogénica y protectora de los distintos receptores seleccionados con análisis western-blot.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento y caracterización del gen *fur* de *P. multocida* (Artículo I y resultados no publicados)

3.1.1. Aislamiento del gen *fur* de *P. multocida*

Con el objetivo de clonar el gen *fur* de *P. multocida* se realizó, con una genoteca de *P. multocida* construida en el vector pUA520 (Cárdenas *et al.*, 2001), un estudio de complementación de la cepa de *Escherichia coli* H1780 (Achenbach & Yang, 1997), que es un mutante *fur* y contiene en su cromosoma una fusión entre el promotor del gen *fiu* y el *lacZ*. El gen *fiu* se encuentra bajo el control de la proteína Fur, de tal manera que en presencia de hierro y de un gen *fur* funcional, se forma el complejo Fur-Fe(II) que reconoce la región operadora del gen *fiu*, se une a ella e impide su transcripción, con lo que no se sintetiza β -galactosidasa. Por ello, los clones que cumplan estas características dan lugar a colonias de color blanco en un medio que contenga X-gal y una fuente de hierro, mientras que aquellos que hayan recibido un fragmento del genoma de *P. multocida* que no pueda complementar la mutación *fur* de la cepa receptora H1780, no pueden reprimir la expresión a partir del promotor del gen *fiu* y originan colonias azules.

Se llevó a cabo una conjugación triparental entre la mencionada genoteca de *P. multocida* y la cepa receptora *E. coli* H1780, usando el plásmido pRK2013 (Ditta *et al.*, 1985) como vector movilizador, y se obtuvieron cinco colonias blancas. Se extrajo el DNA plasmídico de dichos clones y se observó que el patrón electroforético y el perfil de restricción era el mismo en todos los casos, así que se seleccionó al azar uno de esos clones, y se denominó pUA823 al plásmido que contenía, el cual fue objeto de estudios posteriores. Antes de proseguir con el estudio de este plásmido se realizaron dos comprobaciones adicionales. Así, se transformó dicho plásmido en la cepa de *E. coli* H1780 y se demostró que el inserto del plásmido complementaba la mutación Fur^- de la célula receptora y originaba colonias blancas. Además, mediante el estudio de la actividad β -galactosidasa, se determinó que el clon seleccionado presentaba una menor producción de β -galactosidasa y, por lo tanto, una expresión reducida del gen *fiu* con respecto a la cepa receptora H1780. Los

resultados obtenidos se representan en la Fig. 3.1 en la que puede observarse que la actividad β -galactosidasa de la cepa receptora H1780 es más de diez veces superior a la de la cepa H1780 portadora del plásmido pUA823. Estos datos demuestran que el inserto del plásmido pUA823 complementa la mutación Fur^- de la cepa H1780; es decir que contiene el gen *fur* de *P. multocida*. Además, puede afirmarse que la proteína Fur de *P. multocida* reconoce la caja Fur de *E. coli* puesto que inhibe la transcripción desde el promotor del gen *f_lu* de *E. coli*.

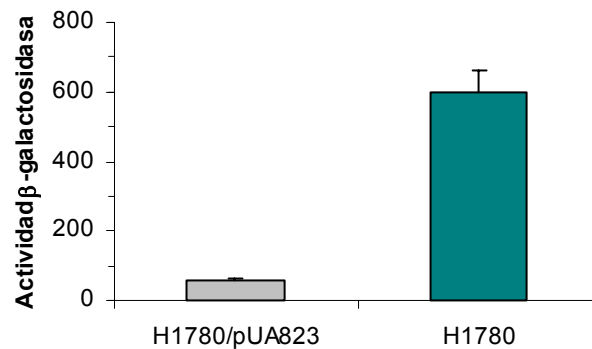


Fig. 3.1 Ensayo de la actividad β -galactosidasa (expresada en unidades de Miller). Los valores representados son la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar en todos los casos fue menor del 10%.

3.1.2. Secuenciación del gen *fur* de *P. multocida*

Previamente, se había determinado que el plásmido pUA823 contiene un fragmento de 4 kb que incluye el gen *fur* de *P. multocida*. Por ello, se realizó un mapa de restricción de dicho plásmido y se subclonó en el plásmido pBSK una banda de aproximadamente 3,2 Kb, obtenida por la digestión con *Hind*III. Se comprobó, mediante retrotransformación en la cepa H1780, que esta clonación complementaba la mutación *fur* de dicha cepa. Seguidamente, se secuenciaron los extremos de esta última subclonación, mediante el sistema ALF de Pharmacia Biotech, usando los oligonucleótidos universales del polilinker del pBSK. Las secuencias obtenidas se compararon con las introducidas en los bancos de datos y se encontró que el extremo 5' de una ORF detectada presentaba una elevada similitud con las secuencias que codifican la proteína Fur de diferentes microorganismos, siendo la de *H. influenzae* la más parecida con un 89 % de similitud.

Fue necesaria una nueva subclonación para determinar la secuencia completa del gen *fur*, la cual se realizó eliminando un fragmento *Pst*I que se hallaba en la región clonada previamente y a 110 pb del inicio de traducción del gen *fur*. Para ello, se cortó el plásmido pUA823 con *Pst*I y se circularizó el fragmento mayor, secuenciándose los extremos de esta nueva construcción. De esta forma se consiguió obtener la secuencia completa del gen *fur* de *P. multocida*. Dicha secuencia fue introducida en el EMBL/GeneBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data, bajo el código de acceso AF027154. En la Fig. 3.2A se muestra la secuencia del gen *fur* de *P. multocida*.

Esta secuencia génica codifica una proteína de 147 aminoácidos, de un peso molecular de 16,8 KDa (Fig. 3.2B) y presenta el dominio de unión de metales H₂XHX₂CX₂CG muy conservado en las proteínas Fur de diferentes microorganismos (Escolar *et al.*, 1999).

Se estudió la región operadora del gen para intentar identificar alguna secuencia que pudiera estar relacionada con el control de su expresión génica. Así, entre las posiciones -29 y -10 respecto al codón de inicio de traducción, se identificó la secuencia CTTAATAGCAAAATAATTAA (Fig. 3.2A) que se asemeja a la caja Fur de *E. coli* (Escolar *et al.*, 1999).

La presencia de esta posible caja Fur sugeriría que la proteína Fur de *P. multocida* podría autorregular su propia expresión, por lo cual se decidió construir un mutante *fur* de *P. multocida* y se le introdujo una fusión génica entre el promotor del gen *fur* y la región codificante del gen *lacZ* para comparar la expresión de este promotor en la cepa salvaje y en el propio mutante *fur* de *P. multocida*.

A

acctaaaggc gccatcattg ttggctactg gccaacggat ggctatcact ttgaagtttc gcaagcatta
 gtcgatgaaa atacttttgt aggattatgt attgatgaag atcgtcaacc tgaattaact gctgaacgtg
 ttgaaaaatg ggtgaagcaa gtgtttgacg aaatgtgttt agcagaactt **gcttaatagc aaaataatta**
aggggctatt atgtctgaag aaaatatcaa acttttgaaa aaagcggggg tgaaaatcac cgaacctcgt
 ttaacgattt tggcattaat gcaagaacat caagaagaac acttctctgc agaagatgtg tataagatgc
 tccttgagag aggcgaagaa attggtttag ccacagtta ccgtgtatta gaccaatttg atgaagcaaa
 aattttgatt cgtcataatt ttgaaggcaa taaatccgtc tttgaacttg cccaactga acaccacgat
 cacattattt gcgtggactg cggtaaagtg tttgagtta atgatgacat tattgaaaaa cgtcaacgtg
 aaattaccaa acaacatggt attgagttag ccacacacag tctgtatctg tatggcaaat gtagtaatgt
 caagagatgc gatgagaatg gcaaaaagata **a**

B

<i>P. multocida</i>	MSEE-NIKLLKAGLKI TEPRLT ILALMQEHQEEHFAEDVYKMLLERGEEIGLATVYRV	59
<i>H. influenzae</i>	MSEG-NIKL LKKVGLKITEPRLTI LALMÑNHKNEHFAEDVYKIFLEQGCE IGLATVYRV	59
<i>Y. pestis</i>	MTD--NNKALKNAGLKVT LPR LKI LEVLQNPACHHVSAEDLYKIL IDI GEE IGLATVYRV	58
<i>E. coli</i>	MTD--NNTALKKAGLKVT LPR LKI LEVLQEPDNHHVSAEDLYKRL IDMGEE IGLATVYRV	58
<i>N. meningitidis</i>	MEKFNN IAQLKDSGLKVT GPRLKI LDLFETHAE EHL SAE DVYRIL LEEGVE IGVATI YRV	60
	* . * ** . ***:* ***.* ::: .*.***:* ::: * ***:***:***	
<i>P. multocida</i>	LDQFDEAKI LIRHNFEGNKSV FELAPTE HHDH I CVDCG KVFEFNDDI IEKRQREITKQH	119
<i>H. influenzae</i>	LNQFDEAHI VIRHNFEGNKSV FELAPTE HHDH I CEDCG KVFEFTDNI IEQRQREISEKY	119
<i>Y. pestis</i>	LNQFDDAGI VTRHNFEGGKSV FELTQQ HHDH I CLDCG KVIEFSNES IESLQREIAKQH	118
<i>E. coli</i>	LNQFDDAGI VTRHNFEGGKSV FELTQQ HHDH I CLDCG KVIEFSDDS IEARQREIAAKH	118
<i>N. meningitidis</i>	LTQFEQAGI LQRHHFETGKAVYELDKG HHDH I VCVKCG EVTEFHNPE IEALQDKIAEEN	120
	* **:* * * : **:* .*:** .***:* .**:* * * : * * * :*	
<i>P. multocida</i>	GIELATHSLYLYGKCSNVKRC DENGKR---	146
<i>H. influenzae</i>	GIKLKTHNVYLYGKCSDI NHC DENNSK---	146
<i>Y. pestis</i>	GIKLTNHSLYLYGHCETGNCREDE SAH SKR	148
<i>E. coli</i>	GIRLTNHSLYLYGHCAEGDCREDE HAHEGK	148
<i>N. meningitidis</i>	GYRIVDHALYMYGVCSD---CQAKGKR---	144
	* .: * :*:** * : : :	

Fig. 3.2 A Secuencia del gen *fur* de *P. multocida*. El inicio y final de traducción del gen están resaltados en negrita. En negrita y cursiva se remarca la secuencia de la posible caja Fur. **B** Comparación de la secuencia de la proteína Fur de distintos microorganismos. Resaltado en negrita y subrayado se señala un dominio de unión a metales muy conservado.

3.1.3. Construcción de un mutante *fur* de *P. multocida*

Debido a la baja eficiencia en la obtención de mutantes por intercambio de marcadores en *P. multocida*, se decidió construir un mutante *fur* de *P. multocida* mediante la inserción de un vector suicida que llevara un fragmento interno del gen *fur* (mutagénesis insercional).

Con esta finalidad se clonó un fragmento interno de 394 pb, obtenido por PCR usando los oligonucleótidos Fur1 y Fur2 (Tabla 2 del artículo I), en el vector suicida pUA826, derivado del plásmido pGY2 (Young *et al.*, 1996), cuyo origen de replicación es dependiente del producto del gen π que contiene el fago λ pir.

Al plásmido recombinante obtenido se le denominó pUA891 y fue introducido por conjugación triparental en la cepa de *P. multocida* PM1002. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de BHI suplementadas con rifampicina y ampicilina.

Para confirmar la integración del plásmido pUA891 en el cromosoma, se obtuvo DNA cromosómico de los conjugantes seleccionados, se realizó una amplificación mediante PCR usando un oligonucleótido del plásmido, Aad, y otro externo a la región clonada en el plásmido pUA891, Fur3 (Tabla 2 del artículo I). En todos los casos se obtuvo un fragmento del tamaño esperado, mientras que con el DNA cromosómico de la cepa salvaje no se consiguió ninguna banda de amplificación.

Se seleccionó al azar uno de los conjugantes comprobados por PCR, al cual se le denominó PM1056, para confirmar la interrupción del gen *fur* mediante Southern-blot. Para ello, los DNAs cromosómicos de la cepa salvaje y del mutante PM1056 fueron digeridos con la enzima *Dra*I, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa y se transfirieron las bandas a filtros de nitrocelulosa que se hibridaron con un fragmento interno del gen *fur* marcado con digoxigenina y finalmente se reveló la hibridación por colorimetría. Las bandas de hibridación visualizadas fueron de un tamaño de 3 Kb (carril 1, Fig. 3.3) y 4,4 Kb (carril 2, Fig. 3.3) respectivamente, lo que corroboraba que el gen *fur* de la cepa PM1056 estaba interrumpido (Fig. 3.3).

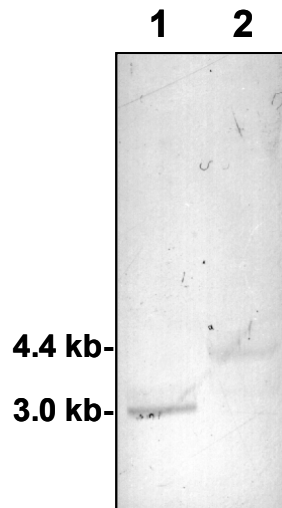


Fig. 3.3 Souther-blot realizado con el DNA cromosómico de las cepas salvaje (carril 1) y mutante *fur* (carril 2), usando como sonda un fragmento interno del gen *fur* de *P. multocida*.

Una vez comprobado el mutante, y dado que la interrupción del gen se había conseguido por la inserción de un plásmido suicida, fue necesario demostrar la estabilidad de dicha construcción. Para ello, se realizaron diez pases de siembra en medio rico sin antibióticos, seleccionándose 100 colonias, a las cuales se les extrajo su DNA cromosómico y se amplificó una región por PCR con los oligonucleótidos Aad y Fur3 (Tabla 2 del artículo I), obteniéndose en todos los casos el fragmento de amplificación esperado. Estos resultados demuestran que la mutación introducida en el gen *fur* de *P. multocida* es estable *in vitro* en ausencia de presión selectiva.

3.1.4. Análisis de la expresión del gen *fur* de *P. multocida*

Se construyó una fusión génica entre el promotor del gen *fur* de *P. multocida* y la región codificante del gen *lacZ*, clonado en el plásmido pHRP309 (Parales & Harwood, 1993). Para ello, se diseñaron los oligonucleótidos Fur4 y Fur5 (Tabla 2 del artículo I) para amplificar, a partir del DNA cromosómico, un fragmento de 376 pb que contuviera el promotor del gen *fur*. Se clonó dicho fragmento en el vector pGEM-T y se secuenció para descartar que durante el proceso de amplificación se hubiera introducido alguna mutación que pudiera afectar a la expresión de dicho gen. Se liberó la banda por digestión con *Sall-BamHI* y se clonó en las mismas dianas del vector pHRP309, obteniéndose así el plásmido pUA892. Esta construcción se

comprobó mediante restricción con las enzimas *SalI-BamHI* y por PCR con los oligonucleótidos Fur4 y Fur5 (Tabla 2 del artículo I).

Seguidamente, dicha fusión se introdujo por conjugación triparental en la cepa salvaje y en el mutante *fur* de *P. multocida* y se realizaron los ensayos de actividad β -galactosidasa para cuantificar la expresión del gen *fur* en ambas cepas en presencia o ausencia de hierro. Para ello, se realizaron cultivos en agua peptonada (BPW) en ausencia y presencia del quelante de hierro 2,2'-dipiridil (DP). Además, y debido a que la glucosa inhibe la expresión del gen de *fur* de *E. coli* (de Lorenzo *et al.*, 1988), se evaluó también el efecto de la adición de glucosa al medio de cultivo sobre la expresión del gen *fur* de *P. multocida*, tanto en la cepa salvaje como en el mutante *fur*.

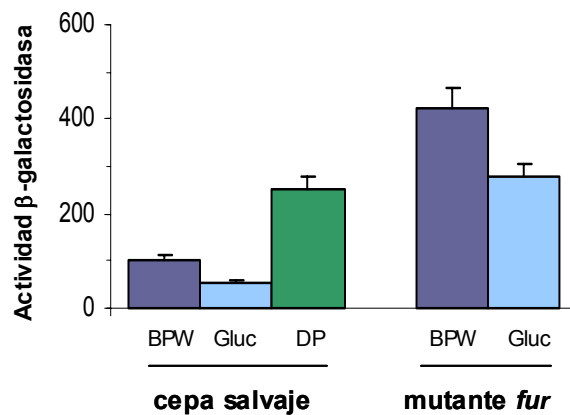


Fig. 3.4 Análisis de la expresión del gen *fur* de *P. multocida* mediante una fusión *fur::lacZ*. Los datos presentados son la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar fue en todos los casos menor al 10%.

Los resultados obtenidos (Fig. 3.4) indican que la proteína Fur autoregula su propia transcripción, puesto que la expresión del gen en el mutante *fur* es entre cuatro y cinco veces más elevada que en la cepa salvaje. Además, la presencia de hierro reprime la expresión del gen *fur*, ya que en la cepa salvaje en presencia de DP la expresión del gen es más del doble que en presencia de hierro (BPW). El mutante *fur* no crecía bien en presencia de DP, por lo que no se pudo estudiar el efecto de la privación de hierro en dicho mutante. Por otro lado, estos datos también indican que la glucosa inhibe la transcripción del gen *fur*, ya que la adición de glucosa al medio

de cultivo disminuye la expresión del gen *fur* tanto en la cepa salvaje como en el mutante *fur*. Este efecto se debe a que la presencia de glucosa produce una disminución en la concentración intracelular de AMPc y no se puede formar el complejo activador AMPc-CAP. Así, *P. multocida* muestra el mismo tipo de regulación que el gen *fur* de *E. coli*.

En la bibliografía, se ha descrito el efecto de la glucosa y la represión por catabolito sobre el control de la expresión de algunos factores de virulencia. Así, por ejemplo diversas toxinas termoestables de *E. coli* están reguladas por el complejo AMPc-CAP (Mekalanos, 1992). Se ha propuesto que la presencia de glucosa podría ser una señal que informara a los patógenos de un cambio en las condiciones ambientales al detectar la transición desde las superficies mucosas hacia el torrente sanguíneo. También se ha hipotizado que la regulación de la expresión de los genes de virulencia por la glucosa podría deberse a un control para evitar que los efectos ocasionados en el huésped no sean desmesurados y acaben ocasionando daños irreparables, es lo que se conoce como estrategia *no harm, no foul* (Mekalanos, 1992). Debido a que la proteína Fur es un regulador de la expresión de genes de virulencia, como las proteínas implicadas en la captación de hierro, el efecto de la glucosa sobre esta proteína podría también explicarse por alguna de estas hipótesis.

3.1.5. Estudio del perfil electroforético de las proteínas de membrana externa del mutante *fur* de *P. multocida*

Está ampliamente reportado que, en ausencia de hierro, las células bacterianas expresan unas proteínas de membrana de elevado peso molecular que están implicadas en la captación de hierro (Ruffolo *et al.*, 1998) y que se encuentran reguladas negativamente por el complejo Fur-Fe(II). Con el fin de determinar si se observa también esta desregulación en el mutante *fur* de *P. multocida*, se realizaron extracciones de proteínas de la membrana externa (OMPs) de dicho mutante y de la cepa salvaje. Los perfiles obtenidos se muestran en la Fig. 3.5, en la cual puede apreciarse la aparición de diversas proteínas de elevado peso molecular (> 66 KDa) en el mutante *fur*. Estos resultados indican que el mutante *fur* muestra una expresión constitutiva de dichas proteínas de alto peso molecular.

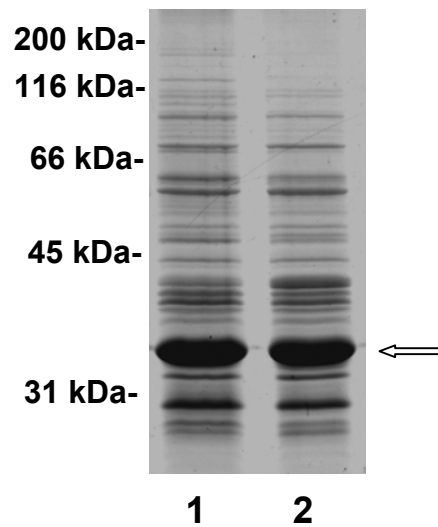


Fig. 3.5 Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa (OMPs) del mutante *fur* (carril 1) y de la cepa salvaje (carril 2) de *P. multocida* crecidas en presencia de hierro.

Al analizar los perfiles electroforéticos de la Fig. 3.5 destaca el hecho de que una proteína mayoritaria de membrana parece estar inducida en el mutante *fur*. Este posible aumento de la concentración de dicha proteína sugiere que su expresión podría estar bajo el control negativo del complejo Fur-Fe(II). Para confirmar esta posibilidad se procedió a la identificación de esta proteína por secuenciación de su extremo N-terminal y a la construcción de una fusión génica con el gen *lacZ* con el fin de poder cuantificar la expresión de dicho gen en diferentes condiciones de cultivo. Con este fin, se realizó una electroforesis de las proteínas de membrana externa en un gel de poliacrilamida, se transfirieron las proteínas a un filtro ImmobilonTM-P (Millipore), que se tiñó con comassie blue y se recuperó la banda correspondiente a la proteína que interesaba. Se pudo determinar que la secuencia de su extremo N-terminal era ATVYNQDGTKVDVNGSVRLI. Al comparar dicha secuencia con las introducidas en los bancos de datos, se observó una total identidad con la secuencia del extremo N-terminal de la forma madura de la proteína OmpH de *P. multocida* (Luo *et al.*, 1997). Ambas proteínas, la OmpH de *P. multocida* y la identificada en el gel de poliacrilamida tienen un tamaño de 36 KDa.

3.1.6. Análisis de la expresión del gen *ompH* de *P. multocida*

Una vez identificada la proteína, y dado que se conocía la secuencia del gen *ompH* de *P. multocida*, se pudieron diseñar dos oligonucleótidos, OmpH1 y OmpH2 (Tabla 2 del artículo I), para amplificar la región cromosómica que contiene la región promotora de dicho gen. Se clonó el fragmento de amplificación en el plásmido pGEM-T y se secuenció para descartar cualquier mutación que se hubiera podido introducir durante el proceso de amplificación. Se liberó dicho fragmento mediante restricción con las enzimas *SalI-BamHI* y se clonó en el vector pHRP309, obteniéndose así el plásmido pUA893 que contiene una fusión génica entre el promotor del gen *ompH* y la región codificante del gen *lacZ*.

Seguidamente, se introdujo el plásmido pUA893 en la cepa salvaje *P. multocida* y en el mutante *fur* por conjugación triparental y se cuantificó la expresión del gen *ompH* mediante ensayos de la actividad β -galactosidasa en ambos fondos genéticos y en presencia y ausencia de hierro o glucosa. Los resultados obtenidos se resumen en la Fig. 3.6, siendo una confirmación de lo que ya se intuía en los geles de poliacrilamida. El gen *ompH* está desregulado tanto en la cepa salvaje en ausencia de hierro como en el mutante *fur*, lo que indica que está controlado negativamente por el complejo Fur-Fe(II), y que por tanto pertenece al regulón Fur de *P. multocida*. En concordancia con estos resultados, un estudio de la secuencia de la región operadora de dicho gen reveló la presencia de la secuencia AATCATTTAATCGAATTAT, localizada entre las bases -48 y -29 respecto al codón de inicio de traducción, que se asemeja a la caja Fur de *E. coli* (Escobar *et al.*, 1999).

Por otro lado, se observó también que la presencia de glucosa inhibe la transcripción del gen *ompH* de *P. multocida*, tanto en la cepa salvaje como en el mutante *fur*. Se ha descrito el mismo comportamiento en otras porinas de membrana externa de otros microorganismos. Así, las proteínas OmpA y OmpB de *E. coli* también muestran represión por catabolito (Gibert & Barbé, 1990; Huang & Freundlich, 1992) y se ha localizado, en la región promotora del gen *ompH* (en la posición -89 respecto al ATG del gen) la secuencia AAATGGTGCAGACGACTTAT, que podría ser el lugar de unión del complejo AMPc-CAP (Berg & von Hippel, 1988).

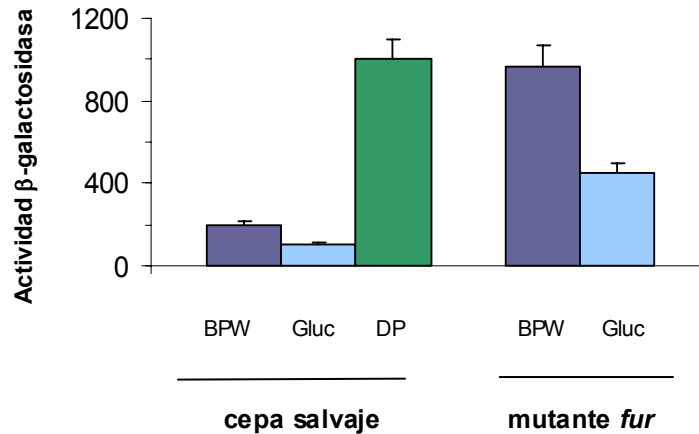


Fig. 3.6 Análisis de la expresión del gen *ompH*. Los datos presentados son la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar fue en todos los casos menor al 10%.

Estos resultados son especialmente importantes si se considera que algunas vacunas diseñadas contra infecciones producidas por *P. multocida* están basadas en la capacidad inmunogénica y protectora de la proteína OmpH (Luo *et al.*, 1999). Como conclusión inmediata de estos resultados se deduce que los cultivos que se pretendan usar con dicha finalidad deberían realizarse en ausencia de hierro y de glucosa para mejorar su rendimiento.

3.1.7. Virulencia del mutante *fur* de *P. multocida*

No está claro el papel que desempeña el gen *fur* en el proceso infeccioso de los diferentes microorganismos, dado que se han descrito resultados contradictorios al respecto. Por ejemplo, mutantes *fur* de *S. typhimurium* no dan lugar a una reducción en la virulencia cuando son inoculados intraperitonealmente, mientras que presentan una atenuación cuando son suministrados oralmente (García del Portillo *et al.*, 1993). Por otro lado, mutantes *fur* de *Staphylococcus aureus* presentan una reducción en la virulencia en ciertos modelos de infección (Horsburg *et al.*, 2001). Resultados como los comentados señalan la necesidad de estudiar el efecto de una mutación en el gen *fur* sobre la virulencia en cada especie o cepa patógena.

Por ello, y con el fin de determinar el papel que desempeña el gen *fur* en el proceso infeccioso de *P. multocida*, se determinaron las dosis letales 50 (DL₅₀) de la cepa salvaje y del mutante *fur* mediante la inoculación intraperitoneal de grupos de 3 ratones hembra Swiss con diluciones seriadas de una suspensión ajustada a 3×10^8 cfu/ml, evaluándose el número de animales que sobrevivieron a las 24, 48 y 72 horas post-inoculación.

Para ambas cepas se determinó que la DL₅₀ era de 5 cfu/animal, por lo que una mutación en el gen *fur* parece no modificar la virulencia de *P. multocida*. Para descartar que esta falta de afectación no fuera debida a variaciones genéticas del mutante *fur*, se estudió la estabilidad *in vivo* de la mutación introducida en el gen *fur* mediante su recuperación de los corazones de los animales muertos como consecuencia de la inoculación con la cepa mutante. Se seleccionaron 100 clones recuperados, de los que se obtuvo el DNA cromosómico, y se comprobó mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos Aad y Fur3 (Tabla 2 del artículo I) que todos ellos mantenían la inserción del plásmido suicida. Este hecho nos permite concluir que el mutante *fur* es también estable *in vivo* en ausencia de presión selectiva.

El efecto de una mutación *fur* sobre la virulencia de una cepa puede estar relacionado más con las funciones de la proteína Fur como activadora de algunos procesos celulares, como la respuesta al estrés oxidativo o ácido, que con el control de la expresión de los genes implicados en la captación de hierro, puesto que, *in vivo* y en condiciones de privación de hierro, es lógico pensar que no existen diferencias entre un mutante *fur* y la cepa salvaje, ya que en ambos casos los genes implicados en la captación de hierro están desregulados.

Así, las consecuencias de una mutación en el gen *fur* sobre la virulencia pueden depender de la importancia de la proteína Fur como reguladora de otras funciones celulares en cada patógeno en cuestión. Por ejemplo, se ha descrito que en *S. aureus* la proteína Fur activa la síntesis de la catalasa KatA que está implicada en la detoxificación de radicales hidroxilo (Horsburg *et al.*, 2001). Así, un mutante *fur* de este microorganismo presenta una menor producción de catalasa y por lo tanto la respuesta de la cepa frente al daño oxidativo se ve disminuida y como consecuencia

podría modificarse su virulencia. Quizás en *P. multocida* la proteína Fur no tenga un papel tan importante en el control de ciertas funciones celulares, o quizás *P. multocida* contenga algún otro sistema que compense los efectos negativos de una deficiencia en el gen *fur* sobre estas otras funciones.

3.2. Aislamiento y estudio de la organización genética del sistema *exbB-exbD-tonB* de *P. multocida* (Artículo II y resultados no publicados)

Como se ha comentado anteriormente, el proceso de introducción de hierro a través de la membrana externa requiere un aporte energético que es proporcionado por el sistema *tonB* (Braun, 1995), y cuyo estudio y caracterización es imprescindible para entender los mecanismos de captación de hierro de una especie determinada. Además, a pesar de que los productos de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* actúan conjuntamente (Higgs *et al.*, 1998), la organización genética de este sistema no está conservada a lo largo de la evolución (Jarosik *et al.*, 1994; Occhino *et al.*, 1998; Pradel *et al.*, 2000) y tampoco está claro el papel del gen *tonB* en la virulencia.

Por todo ello se aisló el sistema *exbB-exbD-tonB* de *P. multocida*, se estudió su organización genética y se determinó su importancia en la virulencia de esta especie.

3.2.1. Aislamiento de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida*

El último paso de la vía de biosíntesis de metionina implica la metilación de la homocisteína. Esta metilación puede ser llevada a cabo por las transmetilasas MetE o MetH (Mann *et al.*, 1986). MetH necesita la vitamina B₁₂ como cofactor y donador del grupo metilo, mientras que la metilación llevada a cabo por MetE es independiente de vitamina B₁₂. Ello comporta que un mutante *metE* requiera metionina o vitamina B₁₂ para poder crecer. La entrada de vitamina B₁₂ es dependiente de TonB, por lo que un doble mutante *tonB metE* no puede crecer en ausencia de metionina y presencia de vitamina B₁₂, a menos que sea complementado con un gen *tonB* funcional.

Con el fin de aislar el gen *tonB* de *P. multocida* se realizó una conjugación entre la cepa de *E. coli* RK5048 (*metE tonB*) (Mann *et al.*, 1986) y una cepa portadora de una genoteca de *P. multocida*, construida en el vector pUA520 (Cárdenas *et al.*, 2001). Se seleccionaron los conjugantes que hubieran recibido un fragmento de DNA de *P. multocida* que complementara la mutación *tonB* sembrando en placas de medio mínimo AB suplementadas con glucosa y vitamina B₁₂.

Se obtuvo el DNA plasmídico de algunos de estos conjugantes y se observó que todos ellos presentaban un inserto de unas 5 Kb en el plásmido pUA520. Tras

comprobar que todos los plásmidos presentaban el mismo patrón, se seleccionó uno de ellos para proseguir con el trabajo propuesto. Como comprobación adicional se transformó dicho plásmido sobre la cepa RK5048 y se comprobó que era capaz de complementar una mutación *tonB* ya que los clones recombinantes podían crecer sin metionina y en presencia de vitamina B₁₂.

Después de varias subclonaciones y secuenciaciones de diferentes fragmentos del inserto, se identificaron tres ORFs que presentaban similitud con los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de diferentes microorganismos, siendo los más parecidos los de *H. influenzae* y *H. ducreyi*, con un 80% de similitud. Las secuencias de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida* fueron introducidas en el EMBL/GeneBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data, bajo el código de acceso AF468825 y se muestran en la Fig. 3.7.

La organización genética de esta región en *P. multocida* es la misma que la descrita para otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*, como *H. influenzae*, *H. ducreyi* o *Mannheimia haemolytica* (Jarosik *et al.*, 1994; Elkins *et al.*, 1998; Graham & Lo, 1997). Es destacable la existencia de una corta región intergénica entre los genes *exbB* y *exbD* y un solapamiento del inicio de traducción del gen *tonB* y el codón de final de lectura del gen *exbD*, lo cual sugiere que estos tres genes deben formar una única unidad transcripcional y que deben transcribirse en una relación 1:1:1. Aún así, la pertenencia de estos tres genes a un único operón no podía deducirse tan sólo de la secuencia sino que eran necesarios experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

ATCTTAGAAG AGATTGTCGG TGAATTTACC ACTTCAACAG CCCCATCAAT TAACGATGAA GTTATCCCAC
AATCAGACGG TTCTCTTATC ATTGAGGGCT CCGCCAATTT ACGTGATTTG AATAAATTAT TTGACTGGAA
TCTCGATACC GAAGATGCAC GTACCTTCAA CGGCTTAATT TTAGAGCATT TAGAAGAAAT TCCAGAAGAA
GGAACGGTAT GTGAAATTAA TGGGCTACAA ATCACGATTC TAGAAGTGAA TTACAACATG ATTTAAACAAG
CCAAAGTCAT TAAACTTTAA TTCAACATCT GGCTAAGCGA TGTATCAAG ACATCGCTTT TTTATTCCGT
ACATGAATGT TTGATCCAAC ACAACATTTA TTCAACATTTG GATAAATAAT CATCCTAAAT CGCACGAATT
TCTTATTTAC CCCGTTTTTG GCTTTTGCTA GAATCTTGCA ATTGAAATTA ATTCTCAATA CCGTATAATG
TTCAACCTTA TTTTGCATA CAAATTAAG GGTATTAAA **ATGCCACACT** TATTCCACTT CTTACAACAA
TATATTGATT ACAATTATC TAGGCTTACT TGCCTTCAAG AGCTTTATTA TGGGTTGGCT TGTGATTGCA
CGCTTCTCT CTTAAGTCG GTCAACGTGG CATCTTATGA AAGCATACAT GAATTAGACA TTGACTTACA
ACGCCACCTC ACAGCTATCT CTACAATCGG TTCTAATGCA CCTTATGTAG GTTTGCTTGG TACCGTCATT
GGTATTCTCT TAACTTTCTA TGAATTAGGT CACTCTGGTG GCGATATTGA TCGCGCGGCT ATTATGGTGC
ACTTATCATT AGCCTTAAAA GCCACAGCAG TAGGTATTTT AGTCGCCATT CCTGCAATGG TGTGTACAA
CGGTTTAGGA CGTAAAGTCG AAGTTAATCG TTTGAAATGG TTTGCCTTAA ATGAGAAAAA AGCCAAACAA
CAAGC**ATAGG** GAGCCT**CATG** AAAAAGTTT ATGAAATCAA CATTATCCCT TTTATTGACA TCATGTTGGT
ACTATTGGCT ATCGTTCTGA TTACAGCCTC TTTTATTTCA CAAGGTAAAA TCCAAGTGAA TGTACAAAA
GCAAGTTCAA CAGTTGCGTT TCGTTCAGAT GATTTAGCCA AATTGCTGAC TATTACGGAA AGTGGTGAAA
TTTTTTATCA CGATAAACCG ATTACTATAG TAGCATTGGA ACAAGAAATC AGTAATGGG AAAAAGATCA
AAAAGTCACC TTGAAGGTAG ATGCAAAATC CAGTTTCAA GATTTCTGTT CTATCACTGA TATTATGGCT
AAAAATGAAA TTAAAAATGT CGCTATCGTG ACGGTTAAAG AAAAGGCACC TCA**ATGA**TAG ATAAAAGTCG
TTCTTGATC GGGTTTGCAA TTTTATTGCT TTTTCACGCA AGTTTTGTCT CTTTCTGTG TTGGATTGTA
CAAAAAGACG ATGACAGCGC GAATGGATT GCTGCCGATA TCATCTCAAC TCATATTTCC ATGGAATGC
TGGCGGCTAC CGTTTTAGAA GAACCAGAGC CGGAACCAGA GCCGGCGCCT CCGGTAGTAG AACCTGAAC
GCCAAAAGAA GAAGTCGCAG ATCCGACGGT AAAACCTGAG CCACCAAAG AACCCGAAAA ACCAAAAGAG
CCTGAAAAGC CAAAAGAGAA ACCGAAGGAA AAACCAAAG AAAAGCCGAA AAAACCGAAG AAAGAACAAC
GTGATTTACC AAAGTCAGAT GCACAAATTG ATTTCTAATTC ATCGATCAAT CAACAAGCGA CCACAACAGG
TAACATCACA ACCAATAATC CGAATCTGGT CGGTAAAGGT AATAGCACAG ATGAAGTCAA TGCTTATCGC
TCGGCTTTAC GCAGAGAAAT TGAAAACAT AAACGCTATC CAAACCGTGC ACGCATGATG CGCAAACAAG
GTGTGGTAAC AATCACGTT CATCTTAATA ATGCCGGCGT AATTAGTAAT GCGCGAATCA GCAAACTTTC
TGGCTCAGAA GAATTAGATA ACGCTGCACT GGTAGCTGTC AATAATGCC GTCCAATTGG TCCATTGCCT
GCTGGTATGC CAAATGAAGT GAGCGTTCTT GTCAGTTTCA GAATCACAAA **TAAAAAAGT** **GCGGTAATT**
TTACCGCACT **TTTT**TCTCTC TATTAGAATT CCTCTCATTT GTGCACTTAT CTAGGACATC TTTCAAAAA
ACTTGTGCAT TTTTTATCTT CCTATTAGGA TATCTAACGA TTATCTTCTG CTCATCAATA AGGTAAATAA
AAATGACTAA AAAACCTTAT TTTCGCCA

Fig. 3.7 Secuencia de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida*. Los codones de inicio y final de traducción del gen *exbB* se remarcan en negrita, los del gen *exbD* en negrita y cursiva y los del gen *tonB* subrayados. La secuencia de un posible terminador de transcripción está resaltada en negrita y subrayado.

3.2.2. Organización transcripcional del cluster *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida*

Con el fin de determinar si los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida* constituyen un operón, se realizó una extracción de RNA total de la cepa salvaje y se realizaron reacciones de RT-PCR para detectar la existencia de los posibles transcritos.

Se diseñaron parejas de oligonucleótidos para amplificar los transcritos de cada uno de los genes, así como para detectar los posibles transcritos policistrónicos *exbB-exbD*, *exbD-tonB* y *exbB-exbD-tonB*. Así mismo, se descartó una posible contaminación de la extracción de RNA con restos de DNA cromosómico mediante reacciones de PCR con los juegos de oligonucleótidos diseñados, y en ningún caso se detectó producto de amplificación.

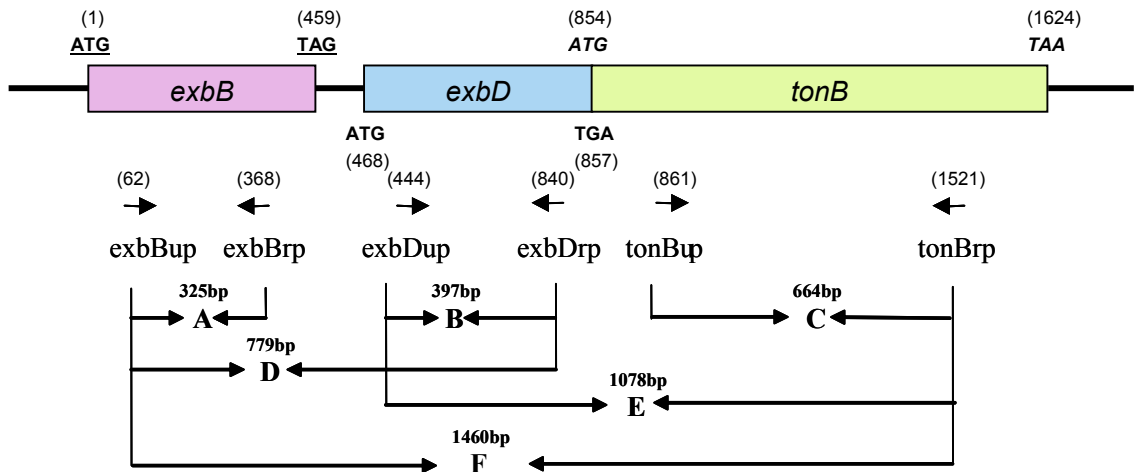
Para cada uno de los juegos de oligonucleótidos se realizaron tres reacciones. En la primera se utilizó RNA total como molde, en la segunda el molde fue DNA cromosómico (control positivo) y en la tercera reacción no se introdujo ningún molde (control negativo).

En la Fig. 3.8 se muestra un esquema de la organización transcripcional de esta región cromosómica señalando la posición de los oligonucleótidos utilizados en este estudio, así como los resultados de las reacciones de amplificación. Como puede verse en dicha figura sólo se detectaron los transcritos simples *exbB*, *exbD* y *tonB* (carriles 2, 5 y 8, respectivamente), no obteniéndose amplificación de ningún transcrito policistrónico (carriles 11, 14 y 17), a pesar de que sí que se obtuvo una banda de amplificación desde DNA cromosómico como molde (carriles 12, 15 y 18).

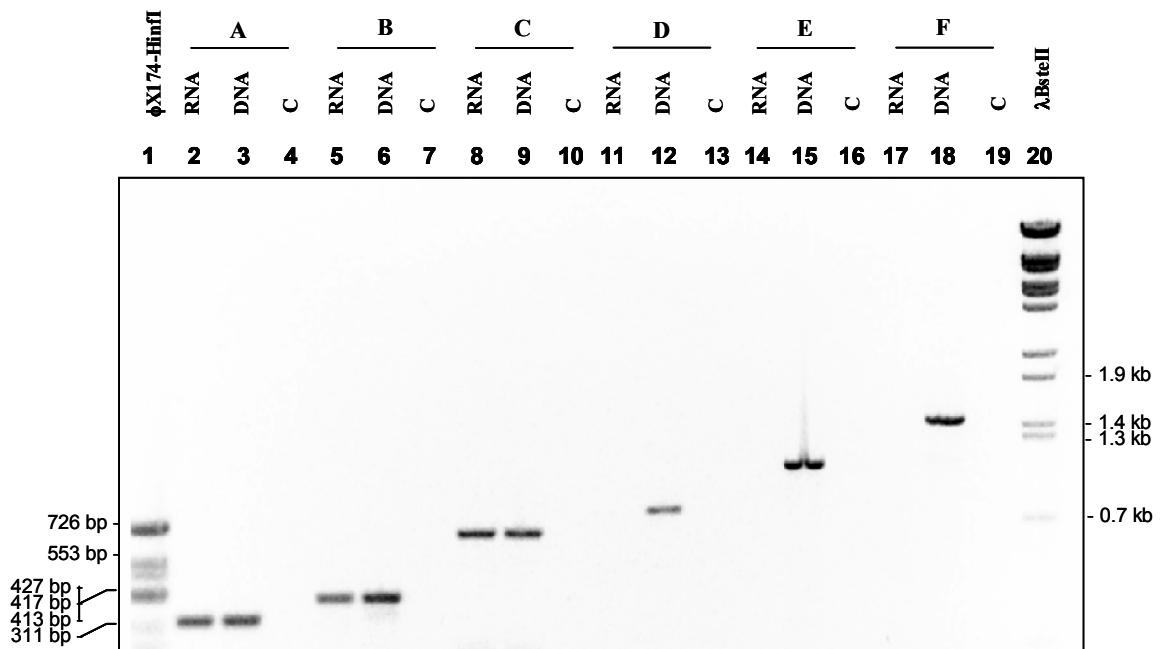
Para comprobar que esta falta de amplificación no era debida a un proceso de degradación del RNA durante su extracción, se realizó como control una reacción de RT-PCR usando oligonucleótidos del gen *recA* y se obtuvo una banda de amplificación de 1kb, demostrándose así la integridad del RNA.

Fig. 3.8 **A** Esquema de la región cromosómica que contiene los genes del sistema *tonB*. Las flechas simbolizan los oligonucleótidos utilizados en este estudio y entre paréntesis se indican la posición, en pares de bases, del inicio y final de traducción de cada gen respecto al ATG del gen *exbB*. **B** Análisis de la organización transcripcional de la región *exbB-exbD-tonB* de *P. multocida* mediante reacciones de RT-PCR. Los carriles 2, 3 y 4 se realizaron con el juego de oligonucleótidos A (para detectar el transcrito *exbB*), los carriles 5, 6 y 7 con el juego B (para detectar el transcrito *exbD*), los carriles 8, 9 y 10 con el C (para detectar el transcrito *tonB*), los carriles 11, 12 y 13 con el D (para detectar el transcrito *exbB-exbD*), los carriles 14, 15 y 16 con el E (para detectar el transcrito *exbD-tonB*) y los carriles 17, 18 y 19 con el juego F (para detectar el transcrito *exbB-exbD-tonB*). En los carriles 2, 5, 8, 11, 14 y 17 se utilizó RNA como molde, en los carriles 3, 6, 9, 12, 15 y 18 el molde usado fue DNA cromosómico, mientras que en los carriles 4, 7, 10, 13, 16 y 19 no se adicionó ningún molde (controles negativos). El carril 1 y 20 corresponden a los marcadores de peso molecular ϕ X174-*Hinf*I y λ *Bste*II, respectivamente.

A



B



Todos estos resultados demuestran la existencia de promotores internos dentro de la región cromosómica analizada, indicando además que los tres genes no forman una única unidad transcripcional o bien que el posible transcrito policistrónico es tan escaso y/o tan inestable que no ha sido posible su detección a pesar de la sensibilidad de la técnica. En cualquier caso, se puede afirmar que prácticamente la totalidad de las proteínas ExbB, ExbD y TonB de *P. multocida* se producen a partir de sus respectivos mRNAs monocistrónicos.

Para corroborar la existencia de promotores internos en esta región se decidió acotar la región promotora de los genes mediante reacciones de RT-PCR. Así, se pudo determinar que el promotor del gen *exbD* se encuentra entre los nucleótidos -245 y -127, respecto a su inicio de traducción, y se localizó la región promotora del gen *tonB* entre el nucleótido -73 y su inicio de traducción.

Una posible explicación a la existencia de promotores internos dentro de esta región podría ser que estos genes estuvieran regulados de forma diferente, por lo cual se procedió al estudio de su expresión en diferentes condiciones de crecimiento a través de fusiones génicas entre los promotores de estos genes y la región codificante del gen *lacZ*.

3.2.3. Regulación de la transcripción de los genes del cluster *tonB* de *P. multocida*

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar las regiones promotoras de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida* (Tabla 1 del artículo II). Se clonaron los productos de amplificación en el vector pGEM-T y se secuenciaron para descartar la introducción de mutaciones durante el proceso de amplificación. Se liberaron los insertos por restricción con las enzimas *SalI-BamHI* y se clonaron en el vector pHRP309, obteniéndose los plásmidos pUA917, pUA918 y pUA919 que contienen fusiones génicas entre la región codificante del gen *lacZ* y los promotores de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB*, respectivamente. Una vez comprobadas estas construcciones por restricción y PCR, dichos plásmidos se introdujeron en la cepa salvaje de *P. multocida* mediante conjugación triparental.

Debido a que los componentes del sistema *tonB* están implicados en la captación de hierro, se estudió el efecto de la privación de hierro sobre la transcripción de estos genes, cuantificándose su expresión en un medio con hierro y sin hierro por tratamiento previo de este medio de cultivo con DP. En la Fig. 3.9 se esquematizan las diferentes fusiones génicas construidas y se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de la actividad β -galactosidasa.

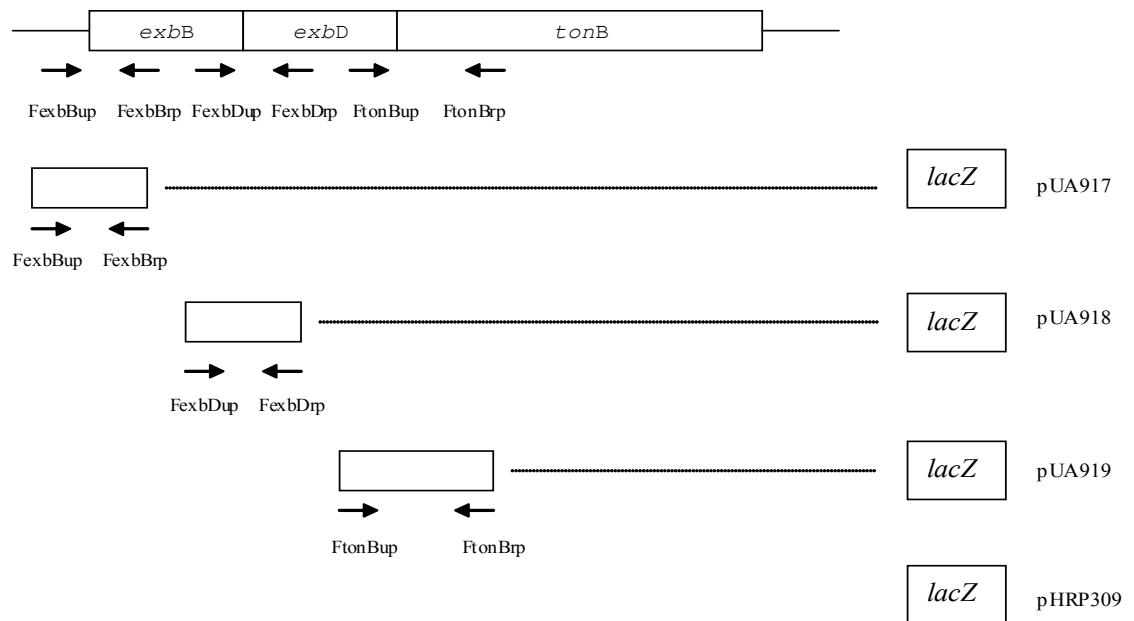
Estos datos demuestran, una vez más, la existencia de promotores internos dentro de esta región cromosómica, ya que en todos los casos se observa una mayor actividad β -galactosidasa que en el control negativo. Por otro lado, también se confirma que la expresión de los genes del sistema *tonB* está inhibida por la presencia de hierro, ya que en presencia de DP, la expresión en todos los casos es aproximadamente el doble de la obtenida cuando las células crecen en presencia de hierro. Estos resultados concuerdan también con los obtenidos coetáneamente mediante la técnica de *microarrays* por otros autores (Paustian *et al.*, 2001).

Con el fin de encontrar posibles estructuras que pudieran estar implicadas en la regulación de la expresión de dichos genes, se analizó en detalle la secuencia de las regiones promotoras de cada uno de ellos. En este análisis se localizaron unas secuencias que recordaban a la caja Fur de *E. coli* en las posiciones -42, -59 y -57 respecto al origen de traducción de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB*, respectivamente. Sin embargo, la mera presencia de estas secuencias no era suficiente para demostrar un control por parte de la proteína Fur.

Por ello, y para determinar si el efecto de la presencia de hierro sobre la expresión de estos genes era dependiente de la proteína Fur, se realizó un ensayo FURTA (Stojiljkovic *et al.*, 1994) con cada uno de los promotores clonados. Así, en primer lugar se clonaron los promotores de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* en el plásmido de alto número de copias pGEM-T, que contenía un gen de resistencia a cloranfenicol interrumpiendo el gen *lacZ* para evitar la producción de β -galactosidasa a partir del vector, obteniéndose las construcciones pUA955, pUA956 y pUA957, respectivamente. Se introdujeron, mediante electroporación, todas estas construcciones y el plásmido pGEM-T con la cassette cloranfenicol en la cepa

H1717 y se seleccionaron los electrotransformantes en placas Lac-EMBO suplementadas con FeSO₄ 1mM. Además de observar el fenotipo FURTA en las placas, se cuantificó también la expresión de la actividad β-galactosidasa. Para ello, se recogieron las células crecidas en las citadas placas Lac-EMBO suplementadas con hierro y se resuspendieron en LB.

A



B

Construcción	Actividad β-galactosidasa (unidades de Miller)		Factor de inducción
	BPW	DP	
pUA917	2332	4850	2,08
pUA918	100	200	2
pUA919	1030	2425	2,34
pHRP309	43	27	-

Fig. 3.9 A Esquema de las diferentes fusiones génicas construidas entre los genes del sistema *tonB* y el gen *lacZ*. B Efecto de la privación de hierro en la expresión de los genes del sistema *tonB* de *P. multocida* en la cepa salvaje crecida en agua peptonada (BPW) y en agua peptonada suplementada con DP. Los datos presentados son la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar en todos los casos fue inferior al 10%.

Tabla 3.1. Ensayo FURTA con los promotores de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida*.

Plásmido	Promotor	Fenotipo FURTA^a	Actividad β-galactosidasa^b
pGEM-T Ω Cm	Ninguno	-	80
pUA955	<i>exbB</i>	+	220
pUA956	<i>exbD</i>	+	240
pUA957	<i>tonB</i>	+	230

a, El símbolo + se aplica cuando el fenotipo de la colonia es Lac+ (FURTA +) y el símbolo – cuando es Lac - (FURTA -) b, La actividad β -galactosidasa está expresada en unidades de Miller y los valores indicados son la media de tres experimentos independientes siendo la desviación estándar inferior al 10% en todos los casos.

Los resultados obtenidos (Tabla 3.1) demuestran claramente que los tres promotores presentan el mismo tipo de regulación y que todos ellos están bajo el control negativo del complejo Fur-Fe(II). Por tanto, los tres genes pertenecen al regulón Fur de *P. multocida* y la existencia de promotores internos en esta estructura no es debida a una regulación diferencial de los distintos genes. Este resultado es esperable ya que parece lógico que genes que están implicados en la misma función, tengan también un mismo control. Es posible que la existencia de promotores internos se deba más bien a un sistema de seguridad que garantice la expresión de todos los genes y prevenga de posibles inconvenientes originados por el solapamiento de sus regiones codificantes.

Por otro lado, la presencia de promotores internos puede evitar también los efectos polares de mutaciones en los primeros genes del operón, que impiden la transcripción o traducción de los genes que están por detrás en la organización genética.

La existencia de promotores secundarios ya se había descrito anteriormente en los operones de biosíntesis de histidina de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Winkler, 1996). Sin embargo las dos situaciones no son del todo comparables puesto que en el caso del operón *his* de *E. coli* y *S. typhimurium* existe un transcrito policistrónico que contiene todos los genes del operón y de hecho, la expresión desde los promotores

internos es prácticamente insignificante en comparación con la transcripción a partir del promotor principal (Winkler, 1996).

Otra hipótesis sería que quizás alguna de las proteínas del cluster *tonB* realizara otra función en la célula, además de facilitar la entrada de hierro hacia el periplasma, y que, por lo tanto, se requirieran niveles intracelulares distintos de cada una de estas proteínas. Por ello, y con el objetivo de estudiar si esta hipótesis era válida, se construyeron mutantes de cada uno de los genes y se evaluó el efecto de dichas mutaciones sobre el crecimiento en diferentes condiciones de cultivo *in vitro*, así como sobre la virulencia de *P. multocida*.

3.2.4. Construcción de mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida*

Se diseñaron los juegos de oligonucleótidos ExbBintup y ExbBintrp, ExbDintup y ExbDintrp, y TonBintup y TonBintrp (Tabla 1 del artículo II) para amplificar regiones internas de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB*, respectivamente. Se clonaron los productos de amplificación en el plásmido pGEM-T y se secuenciaron para descartar la introducción de mutaciones durante la reacción de amplificación. Se liberaron los insertos mediante restricción con las enzimas *ApaI-SacI*, se rellenaron los extremos y se clonaron en la diana *EcoRV* del plásmido pUA826 que es suicida en *P. multocida*. Estas construcciones se comprobaron mediante reacciones de PCR usando los oligonucleótidos diseñados para amplificar los fragmentos internos.

Se introdujeron dichas construcciones en una cepa salvaje de *P. multocida*, mediante conjugación triparental usando el pRK2013 (Ditta *et al.*, 1985) como plásmido movilizador, y se seleccionaron los conjugantes en placas de BHI suplementadas con rifampicina y ampicilina.

Se comprobaron los mutantes mediante reacciones de PCR a partir del DNA cromosómico de cada uno de los conjugantes, usando un oligonucleótido del plásmido pUA826 y un oligonucleótido externo a cada una de las construcciones, de tal manera que sólo se pudiera obtener un producto de amplificación si la copia cromosómica del gen estaba interrumpida por la inserción del plásmido suicida. Los resultados de estos estudios se muestran en la Fig. 3.10.

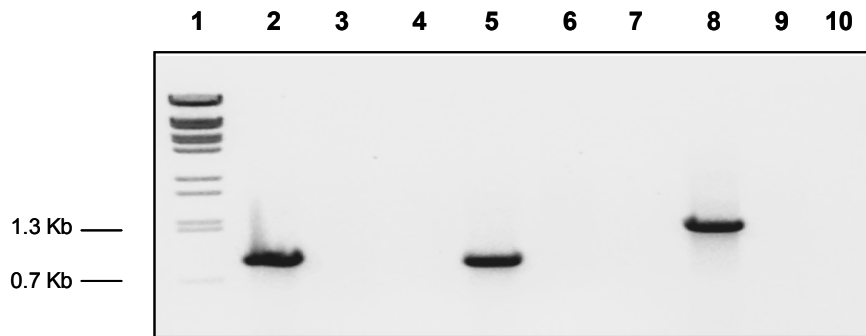


Fig. 3.10 Comprobación de la interrupción de los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida* mediante la integración de un plásmido suicida. Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a la amplificación por PCR con los oligonucleótidos Aad y ExbBrp (Tabla 1 artículo II), los carriles 5, 6 y 7 con los oligonucleótidos Aad y ExbBup (Tabla 1 del artículo II) y los carriles 8, 9 y 10 con los oligonucleótidos Aad y ExbDup (Tabla 1 del artículo II). Los carriles 2, 5 y 8 corresponden a los DNAs cromosómicos de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB*, respectivamente. Los carriles 3, 6 y 9 corresponden a DNA cromosómico de la cepa salvaje y los carriles 4, 7 y 10 son controles negativos donde no se empleó ningún DNA como molde. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular λ BsteII.

En todos los casos se obtuvo una banda de amplificación (carriles 2, 5 y 8 de la Fig. 3.10), mientras que con el DNA cromosómico de la cepa salvaje no se obtuvo ningún producto de PCR (carriles 3, 6 y 9 de la Fig. 3.10). Una vez confirmada la interrupción de los genes, y para descartar posibles efectos polares sobre la expresión de los otros genes del cluster, se analizó la expresión de los genes del cluster *tonB*. Para ello, se extrajo RNA total de la cepa salvaje y de los distintos mutantes y se comprobó que no contenía contaminación de DNA cromosómico. Seguidamente se realizaron las pruebas de RT-PCR, obteniéndose los resultados que se muestran en la Fig. 3.11.

Además, y para descartar que la expresión de los genes situados detrás de la inserción del plásmido suicida no se debía a posibles estructuras promotoras del vector que facilitasen la transcripción de los genes situados en posición 3', se realizaron reacciones de RT-PCR con RNA de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* usando como oligonucleótidos las parejas Aad y ExbBrp, Aad y ExbBup y Aad y

ExbDup, respectivamente (Tabla 1 del artículo II). En ningún caso se observó banda de amplificación, demostrándose que no había transcripción a partir de ningún promotor del plásmido.

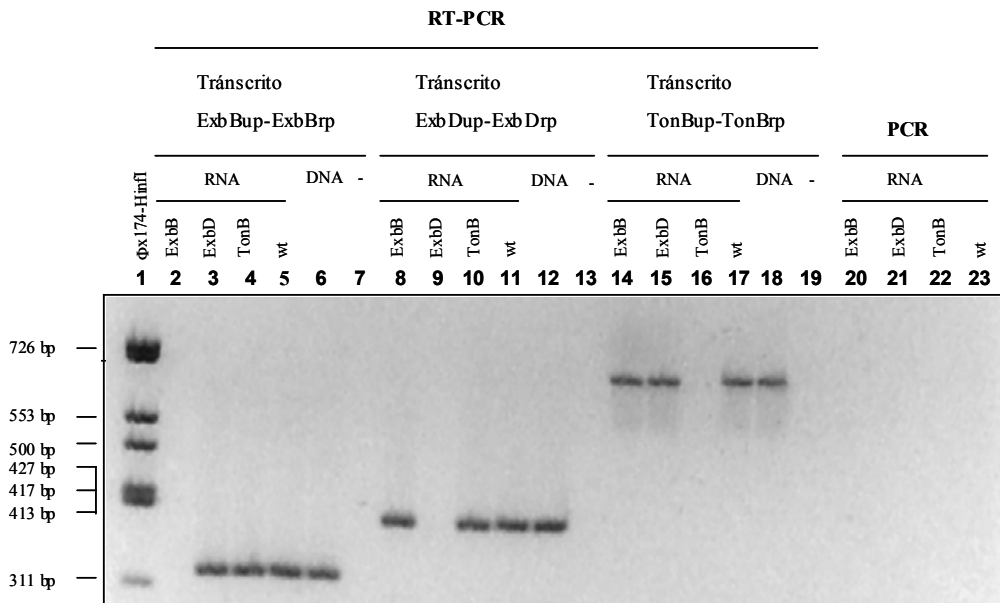


Fig. 3.11 Análisis de la expresión de los genes del sistema *tonB* mediante reacciones de RT-PCR. Los carriles del 2 a 7 corresponden a la detección del transcrito del gen *exbB*, del 8 al 13 a la del transcrito del gen *exbD* y del 14 al 19 al transcrito del gen *tonB*. Se empleó como molde el RNA del mutante *exbB* (carriles 2, 8 y 14), del *exbD* (carriles 3, 9 y 15), *tonB* (carriles 4, 10 y 16) y de la cepa salvaje (carriles 5, 11 y 17). Los carriles 6, 12 y 18 tienen como molde DNA cromosómico de la cepa salvaje (como control positivo de las reacciones) y los carriles 7, 13 y 19 son controles negativos en los que no se adiciona ningún DNA o RNA como molde. Los carriles del 20 al 23 corresponden a las PCR de control de contaminación de DNA: PCR con el RNA del mutante *exbB* y los oligonucleótidos ExbDup-ExbDrp (carril 20), RNA del mutante *exbD* y los oligonucleótidos TonBup-TonBrp (carril 21), RNA del mutante *tonB* y oligonucleótidos ExbBup-ExbBrp (carril 22) y RNA de la cepa salvaje y oligonucleótidos ExbBup-TonBrp (carril 23). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular φx174-*HinI*. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este estudio se muestra en la Tabla 1 del artículo II.

En la Fig. 3.11 se puede observar que en el mutante *exbB* hay expresión de los genes *exbD* y *tonB* (carriles 8 y 14) y que en el mutante *exbD* sigue habiendo expresión del gen *tonB* (carril 15), es decir que las inserciones introducidas en estos mutantes no presentan efectos polares, lo cual está de acuerdo con la existencia de promotores internos en esta región cromosómica.

Una vez confirmada la obtención de los mutantes y tras haber descartado posibles efectos polares de las mutaciones introducidas, se comprobó, *in vitro*, la estabilidad de las mutaciones en ausencia de presión selectiva. Con este fin, y para cada mutante, se hicieron diez resiembras sucesivas en placas sin antibióticos. Después de seleccionar 100 colonias, se extrajo su DNA cromosómico y se comprobó por PCR que todas ellas amplificaban la banda de integración del plásmido.

3.2.5. Crecimiento de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* en diferentes condiciones de cultivo

Para evaluar el efecto de mutaciones en los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* sobre la capacidad de captar hierro de diferentes fuentes, se realizaron pruebas de crecimiento en diferentes medios de cultivo: medio mínimo (MM) (Jablonski *et al.*, 1996), MM suplementado con DP, MM suplementado con DP y FeSO₄ y MM suplementado con DP y hemoglobina.

Se recogieron células crecidas en placas de agar sangre y se resuspendieron en cada uno de los medios, ajustando la DO₄₅₀ a 0,1. Se incubaron durante 48 horas y se midió la DO₄₅₀ para cuantificar el crecimiento. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 3.2.

Se puede resaltar que los tres mutantes presentan un menor crecimiento respecto a la cepa salvaje cuando crecen en condiciones de privación de hierro (MM+DP). Este fenómeno es esperable puesto que los productos de los tres genes actúan conjuntamente para facilitar la entrada de hierro a partir de los sistemas específicos que se expresan en condiciones de carencia de hierro.

Tabla 3.2. Crecimiento *in vitro* de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida* en diferentes condiciones de cultivo después de 48 horas de incubación.

Cepa	DO ₄₅₀			
	MM	MM+DP	MM+DP+FeSO ₄	MM+DP+hemoglobina
Salvaje	0,841	0,436	0,768	0,88
Mutante <i>exbB</i>	0,755	0,075	0,708	0,93
Mutante <i>exbD</i>	0,823	0,257	0,714	0,852
Mutante <i>tonB</i>	0,768	0,233	0,734	0,94

Los datos mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar en todos los casos fue inferior al 10%. Las concentraciones de FeSO₄ y de hemoglobina utilizadas fueron de 200 μM y 40 μM, respectivamente.

Sin embargo, a diferencia de lo descrito en *N. meningitidis* (Stojiljkovic *et al.*, 1997), *N. gonorrhoeae* (Desai *et al.*, 2000) y *B. pertusis* (Pradel *et al.*, 2000), los tres mutantes recuperan el crecimiento cuando se adiciona al medio FeSO₄ o hemoglobina. Estos resultados sugieren que *P. multocida* podría tener algún mecanismo de captación de hierro y hemoglobina independiente de TonB o bien que, al igual que lo descrito en otros microorganismos como *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998), hubieran dos sistemas *tonB* funcionales (*tonB1* y *tonB2*).

En este sentido, se han localizado los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA* en la secuencia de *P. multocida* Pm70 (May *et al.*, 2001) que podrían complementar las mutaciones *exbB* o *exbD*, ya que se ha descrito que las proteínas ExbB y ExbD son intercambiables con las proteínas TolQ y TolR del sistema *tol*, respectivamente (Braun, 1995). Sin embargo la proteína TonB no puede sustituirse por la proteína TolA, su homóloga en el sistema *tol*. Así, las proteínas TolQ y TolR podrían compensar las consecuencias de las mutaciones en los genes *exbB* y *exbD*, no obstante, esta hipótesis no explicaría la complementación de la mutación en el gen *tonB*.

3.2.6. Efecto de mutaciones *exbB*, *exbD* y *tonB* sobre la virulencia de *P. multocida*

Con el fin de determinar el papel que desempeñan los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* en el proceso infeccioso llevado a cabo por *P. multocida* se determinaron las DL₅₀ de la cepa salvaje y de los tres mutantes. Para ello se inocularon intraperitonealmente grupos de 3 ratones hembra Swiss con diluciones seriadas de una suspensión ajustada a 3×10^8 cfu/ml y se evaluó el número de animales que sobrevivían a las 24, 48 y 72 horas post-inoculación (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Determinación de la DL₅₀ de los mutantes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida*.

Cepa	DL ₅₀ (cfu/animal)
Salvaje	2
Mutante <i>exbB</i>	$>4,6 \times 10^3$
Mutante <i>exbD</i>	$>2,9 \times 10^3$
Mutante <i>tonB</i>	$>3 \times 10^3$

Los valores calculados se presentan en la Tabla 3.3, en la que puede observarse que mutaciones en cualquiera de los genes del sistema *tonB* conllevan un aumento de la DL₅₀ de como mínimo tres órdenes de magnitud. La importante reducción en la virulencia de los mutantes del sistema *tonB* de *P. multocida* es similar a la descrita en mutantes de este sistema en *H. influenzae* (Jarosik *et al.*, 1994), *B. pertusis* (Pradel *et al.*, 2000) y *V. cholerae* (Occhino *et al.*, 1998). Así pues, parece que el sistema *tonB* desempeña un papel relevante en el proceso infeccioso de muchos patógenos en los que su virulencia depende en gran medida de la capacidad de captación de hierro.

3.3. Caracterización de proteínas de membrana receptoras de hemina y/o hemoglobina de *P. multocida* (Artículo III y resultados no publicados)

Para completar el estudio sobre los mecanismos de captación de hierro de *P. multocida*, era necesario identificar y caracterizar alguno de los sistemas que están implicados en la captación de hierro. Como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria, entre estos sistemas están los sideróforos y los receptores de membrana de transferrina, lactoferrina, hemina y hemoglobina.

Se ha descrito que algunas cepas de *P. multocida* producen sideróforos (Hu *et al.*, 1986), sin embargo estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían demostrado que la cepa Pm25 no los sintetiza. Referente a los receptores de membrana de *P. multocida*, tan sólo se había identificado un receptor de transferrina (Veken *et al.*, 1994; Ogunnariwo & Schryvers 2001) y no se disponía de ningún otro dato sobre receptores de otras proteínas transportadoras de hierro, a pesar de que se ha demostrado que *P. multocida* puede unir hemoglobina (Veken *et al.*, 1996).

En la introducción de la presente memoria ya se ha comentado que la identificación de estos receptores tiene un gran interés aplicado, ya que se sabe que determinados receptores de transferrinas de *P. haemolytica* (Potter *et al.*, 1999), *N. meningitidis* (Danve *et al.*, 1993) y *M. catarrhalis* (Myers *et al.*, 1998) son inmunogénicos y confieren protección en modelos animales de laboratorio, por lo que son unos buenos candidatos para la elaboración de vacunas. Sin embargo, existen pocos datos acerca de la inmunogenicidad de receptores de hemina o de hemoglobina.

Por todos estos motivos, uno de los objetivos de este trabajo fue la caracterización de receptores de hemoglobina de *P. multocida*, con el fin de estudiar su capacidad inmunogénica y ensayar vacunas basadas en la sobreexpresión de dichas proteínas.

3.3.1. Identificación y clonación de posibles receptores de hemina y/o hemoglobina de *P. multocida*

De acuerdo con lo indicado anteriormente, las proteínas implicadas en la captación de hierro tienen una región común, la caja TonB, característica y muy conservada, la cual interacciona con la proteína TonB (Braun, 1995).

Dado que el genoma de *P. multocida* Pm70 está totalmente secuenciado y es accesible en el banco de datos en la dirección http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Microb_blast/credits/747.html (May *et al.*, 2001), se realizó una búsqueda en dicho genoma para detectar las proteínas que contienen una caja TonB y que por tanto pueden estar implicadas en la captación de hierro. Se rescataron las secuencias de estos genes y se compararon con las proteínas introducidas en el banco de datos, seleccionándose aquellas que presentaban similitud con posibles receptores de hemina y/o hemoglobina dependientes de TonB.

Como resultado de este análisis se seleccionaron las siguientes 13 proteínas: PM0040, PM0236, PM0300, PM0336, PM0337, PM0576, PM0741, PM0745, PM1078, PM1081, PM1282, PM1428 y PM1622 .

A pesar de que todas estas proteínas contienen una caja TonB, era necesario confirmar empíricamente que están implicadas en la captación de hierro y determinar qué ligando reconocen en cada caso. Con este fin, se decidió clonar los diferentes genes en el vector de expresión pET22-b, inducir su expresión con IPTG y evaluar su capacidad de unión a hemina y/o hemoglobina.

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar cada uno de estos ORFs. Los oligonucleótidos directos contenían una diana *NdeI* de tal manera que el ATG de la diana coincidía con el ATG del ORF, en cambio los oligonucleótidos reversos portaban una diana *NotI*. Las secuencias de estos oligonucleótidos se recogen en la Tabla 3.4. Se realizaron las reacciones de PCR a partir del DNA cromosómico de *P. multocida* Pm25 y en todos los casos se obtuvo una banda de amplificación del tamaño esperado, excepto para los genes que codificaban las proteínas PM0337, PM0745 y PM1622. Estos resultados pueden atribuirse a que la cepa Pm25 no contenga estos ORFs o bien a que las secuencias de los extremos de la proteína no

sean tan conservados y los oligonucleótidos diseñados no complementen bien con el DNA de la cepa Pm25. Por otro lado, dado que el profesor Adler, del departamento de Microbiología de la Universidad de Monash (Australia), estaba analizando el producto del ORF PM0336 (comunicación personal), se decidió excluir de este estudio a las proteínas PM0336, PM0337, PM0745 y PM1622. Se recuperaron los fragmentos de amplificación de los genes seleccionados y se clonaron en el vector pGEM-T, comprobándose las construcciones mediante reacciones de secuenciación. Se liberaron los insertos mediante restricción con las enzimas *NdeI-NotI* y se clonaron en el vector de expresión pET22-b. Se comprobaron las construcciones por restricción con *NdeI-NotI* y se introdujeron por transformación en la cepa *E. coli* BL21 (λ DE3), seleccionándose un clon para cada proteína elegida con el objetivo de determinar el ligando al que se une.

3.3.2. Determinación de la unión de hemina

Se analizó la capacidad de unir hemina de cada una de las proteínas seleccionadas según el protocolo descrito en el Anexo I de esta memoria. Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la Fig. 3.12 e indican que las proteínas PM0040, PM0236, PM0300, PM0741, PM1081, PM1282 y PM1428 son receptores de hemina, si bien la unión de ésta a las proteínas PM0040 y PM0236 parece ser más eficiente. Por otra parte, las proteínas PM0576 y PM1078 no reconocen hemina, debiendo unirse a otro ligando.

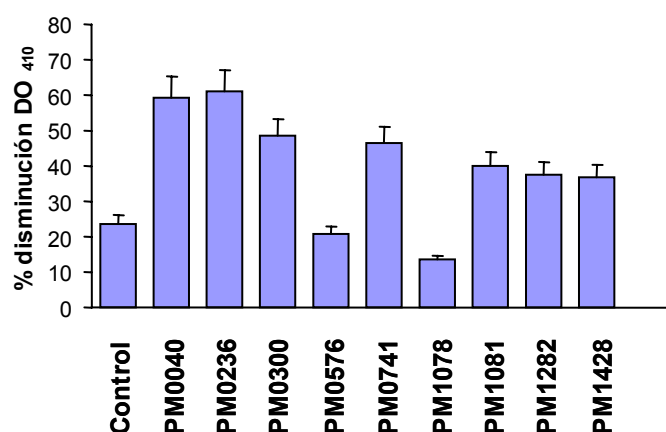


Fig. 3.12 Determinación de la unión de hemina. Los valores presentados corresponden al porcentaje de disminución de la DO₄₁₀ del sobrenadante de los cultivos centrifugados después de 16 horas de incubación. Los datos son la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar en todos los casos fue inferior al 10%.

Tabla 3.4. Oligonucleótidos usados para amplificar los receptores de hemina y/o hemoglobina.

Nombre	Secuencia^a	Posición^b	Aplicación
NdePM0040	<i>CATATGTCATTCAAACATA</i> AAAC	+1	Oligonucleótido directo para amplificar el gen PM0040
NotPM0040	<i>GCGGCCGCAAGATTTTAG</i> ATGAGGG	+2204	Oligonucleótido reverso para amplificar el gen PM0040
NdePM0236	<i>CATATGAAAAAATTAACAA</i> AAC	+1	Oligonucleótido directo para amplificar el gen PM0236
NotPM0236	<i>GCGGCCGCGACCGCACTT</i> AAGGCG	+1626	Oligonucleótido reverso para amplificar el gen PM0236
NdePM0300	<i>CATATGCGTACACAACAAC</i> AATAAAAATTTCTGC	+1	Oligonucleótido directo para amplificar el gen PM0300
NotPM0300	<i>GCGGCCGCCGCTAGCCGA</i> TCTCTTAATCC	+3025	Oligonucleótido reverso para amplificar el gen PM0300
NdePM0576	<i>CATATGGATAAAAAATTTAA</i> TG	+1	Oligonucleótido directo para amplificar el gen PM0576
NotPM0576	<i>GCGGCCGCAATATAGCCC</i> GATTTGG	+2263	Oligonucleótido reverso para amplificar el gen PM0576
NdePM0741	<i>CATATGAAATATCCCTTAA</i> GC	+1	Oligonucleótido directo para amplificar el gen PM0741
NotPM0741	<i>GCGGCCGCTTTTATCATGA</i> ACGG	+2369	Oligonucleótido reverso para amplificar el gen PM0741
NdePM1078	<i>CATATGCACAAAAAATTGT</i> TAC	+1	Oligonucleótido directo para amplificar el gen PM1078
NotPM1078	<i>GCGGCCGCCAGTTTTTCA</i> TTCGG	+760	Oligonucleótido reverso para amplificar el gen PM1078
NdePM1081	<i>CATATGCCTTTATTAAC TTT</i> AAA	+1	Oligonucleótido directo para amplificar el gen PM1081
NotPM1081	<i>GCGGCCGCCATCTCTACA</i> GTAAGACG	+2467	Oligonucleótido reverso para amplificar el gen PM1081
NdePM1282	<i>CATATGATGTTATGTAAGC</i> C	+1	Oligonucleótido directo para amplificar el gen PM1282
NotPM1282	<i>GCGGCCGCAACAGAATGC</i> GACCACC	+2379	Oligonucleótido reverso para amplificar el gen PM1282
NdePM1428	<i>CATATGTTTCAAGAGGTTG</i>	+1	Oligonucleótido directo para amplificar el gen PM1428
NotPM1428	<i>GCGGCCGCGGACTGGCAT</i> ACTGTG	+2459	Oligonucleótido reverso para amplificar el gen PM1428

a, Las dianas de restricción añadidas a los oligonucleótidos se marcan en cursiva.

b, Posición de los oligonucleótidos respecto al ATG de cada gen.

Por otro lado, estos resultados también muestran que las proteínas de *P. multocida* clonadas en el vector pET22-b y sobreexpresadas son exportadas hasta la membrana externa de *E. coli* y mantienen su capacidad de reconocer hemina.

Según los resultados obtenidos, *P. multocida* Pm25 tiene al menos 7 proteínas con la misma función. Probablemente se trate de un sistema de seguridad que garantiza la unión a hemina en el caso de que se produzca una mutación en cualquiera de estos genes, aun cuando también podría tratarse de un sistema de evasión de las defensas del huésped, puesto que un patógeno con una alta variabilidad en receptores de membrana que unen hemina es más fácil que pueda escapar de la neutralización provocada por los anticuerpos específicos contra estos antígenos. Así, podría pensarse que es probable que estos receptores presenten una expresión diferencial, es decir que cada uno de ellos actúe principalmente durante una etapa del proceso infeccioso, dejando obsoletos los anticuerpos creados contra los “antiguos” receptores de membrana. Para poder confirmar o desmentir esta hipótesis sería necesario cuantificar la expresión temporal *in vivo* de cada uno de los receptores en diferentes momentos de la infección, lo cual podría realizarse en un futuro utilizando las metodologías descritas en el apartado 3.3.8. de esta memoria.

3.3.3. Determinación de la unión de hemoglobina

Se determinó la capacidad de unión a hemoglobina de las distintas proteínas seleccionadas.

A diferencia de lo comentado anteriormente sobre que las proteínas de *P. multocida* sobreexpresadas en *E. coli* eran transportadas a su membrana externa y mantenían su capacidad de unir hemina, la conformación que adoptan en *E. coli* los receptores de hemoglobina de *P. multocida* parecía no permitir el reconocimiento entre receptor y ligando, por lo que fue necesario sonicar los cultivos y liberar el contenido celular para determinar su capacidad de unión de hemoglobina (Fig. 3.13).

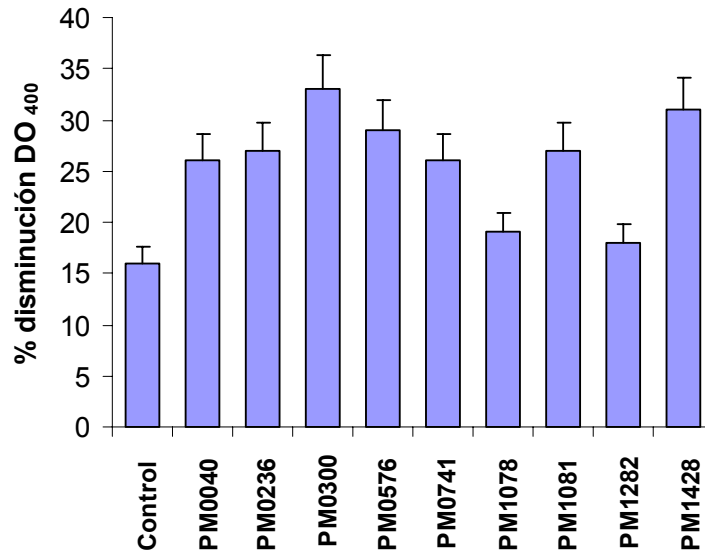


Fig. 3.13 Determinación de la unión de hemoglobina. Los valores presentados corresponden al porcentaje de disminución de la DO₄₀₀ del sobrenadante de los cultivos centrifugados después de 16 horas de incubación. Los datos son la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar en todos los casos fue inferior al 10%.

Los resultados obtenidos se representan en la Fig. 3.13 e indican que las proteínas PM0040, PM0236, PM0300, PM0576, PM0741, PM1081 y PM1428 de *P. multocida* Pm25 son receptores de hemoglobina mientras que las proteínas PM1078 y PM1282 no la reconocen.

Las posibles hipótesis que explican la existencia de más de un receptor de hemoglobina en *P. multocida* son las mismas que las indicadas en el apartado anterior para los receptores de hemina, y se basan en complementar los efectos negativos de mutaciones en estos genes y/o evadir las defensas del sistema inmune del huésped.

Mecanismos parecidos también se han sugerido para *H. influenzae*, en el cual se han identificado los receptores *hgpA*, *hgpB* y *hgpC*, implicados en la captación de hierro a partir de hemoglobina (Ren *et al.*, 1998; Morton *et al.*, 1999).

El conjunto de los datos obtenidos en la determinación de la unión de los receptores estudiados a hemina y hemoglobina se muestra en la Tabla 3.5 en la cual se aprecia que las proteínas PM0040, PM0236, PM0300, PM0741, PM1081 y

PM1428 son receptoras de hemina y hemoglobina, mientras que la PM1282 parece ser específica para hemina y la PM0576 muestra especificidad por hemoglobina. En cambio, y a pesar de presentar similitud con un receptor de hemina de *Y. enterocolitica*, la proteína PM1078 no se une a hemina ni hemoglobina, lo cual sugiere que podría unirse a otro ligando, como la transferrina o lactoferrina, o bien que esta proteína de la cepa Pm25 haya sufrido algún tipo de mutación y haya perdido su capacidad de unión.

Tabla 3.5. Capacidad de unión de hemina y/o hemoglobina de las proteínas analizadas en este estudio.

Proteína	Proteína con la que presenta mayor similitud^a	Unión Hm^b	Unión Hb^b
PM0040	Posible receptor de hemina de <i>P. aeruginosa</i> (41%)	+	+
PM0236	Lipoproteína de unión de hemina de <i>H. influenzae</i> (73%)	+	+
PM0300	Posible receptor TonB dependiente de <i>H. influenzae</i> (87%)	+	+
PM0576	Receptor de hemina de <i>H. influenzae</i> (89%)	-	+
PM0741	Receptor de hemoglobina de <i>N. meningitidis</i> (64%)	+	+
PM1078	Proteína de unión de hemina de <i>Y. enterocolitica</i> (53%)	-	-
PM1081	Proteína de membrana externa regulada por hierro de <i>M. haemolytica</i> (56%)	+	+
PM1282	Receptor de hemina de <i>Xylella fastidiosa</i> (42%)	+	-
PM1428	Proteína de membrana regulada por hierro de <i>M. haemolytica</i> (56%)	+	+

a, Entre paréntesis se señala el tanto por ciento de similitud entre ambas proteínas.

b, El símbolo + se aplica cuando la proteína tiene capacidad de unión y el símbolo – cuando no la presenta: Hm = hemina, Hb = hemoglobina.

3.3.4. Caracterización de la organización genética de la región PM0298-PM0299-*hgbA* de *P. multocida*.

El siguiente paso en este estudio consistió en seleccionar una de estas proteínas receptoras para averiguar su regulación y patrón de expresión *in vivo*, así como determinar el efecto de una mutación sobre su capacidad de unir hemoglobina y sobre la virulencia.

Se escogió la proteína PM0300 porque tiene capacidad de unir tanto hemina como hemoglobina y porque presenta como peculiaridad que se encuentra detrás de dos ORFs (PM0298 y PM0299) con los que podría formar una única unidad transcripcional. Es posible que si estos genes forman un operón, las proteínas PM0298 y PM0299 estén también implicadas en la captación de hierro. Además, a partir de este momento, se denominó *hgbA* al gen que codifica la proteína PM0300, puesto que se trata de la primera proteína de membrana caracterizada en *P. multocida* con capacidad de unir hemoglobina (*hemoglobin binding protein*).

En la Fig. 3.14A se presenta la organización genética de esta región, según se deduce del análisis del genoma de la cepa Pm70 de *P. multocida* y que comparte la cepa Pm25, puesto que se diseñaron oligonucleótidos externos a la región codificante de los genes PM0298 y *hgbA* (Tabla 2 del artículo III) y se obtuvo una banda de amplificación del tamaño esperado.

La corta distancia intergénica entre ellos y la ausencia de posibles estructuras de finalización de la transcripción sugiere que los genes PM0298-PM0299-*hgbA* podrían formar una única unidad transcripcional. Para confirmar esta hipótesis fue necesario analizar el patrón de transcripción de esta región cromosómica. Para ello, se obtuvo RNA total de la cepa salvaje *P. multocida* Pm25 y se diseñaron oligonucleótidos para detectar por RT-PCR un posible transcrito policistrónico que contuviera los tres genes. Se comprobó, mediante reacciones de PCR con los oligonucleótidos diseñados para este estudio, que el RNA extraído no contenía contaminación de restos de DNA cromosómico. Los resultados obtenidos en las reacciones de RT-PCR indican claramente que los tres genes forman una única unidad transcripcional, puesto que se obtuvo un producto de amplificación cuando se

usó RNA como molde y oligonucleótidos internos al gen PM0298 y al *hgbA* (carril 3, Fig. 3.14B).

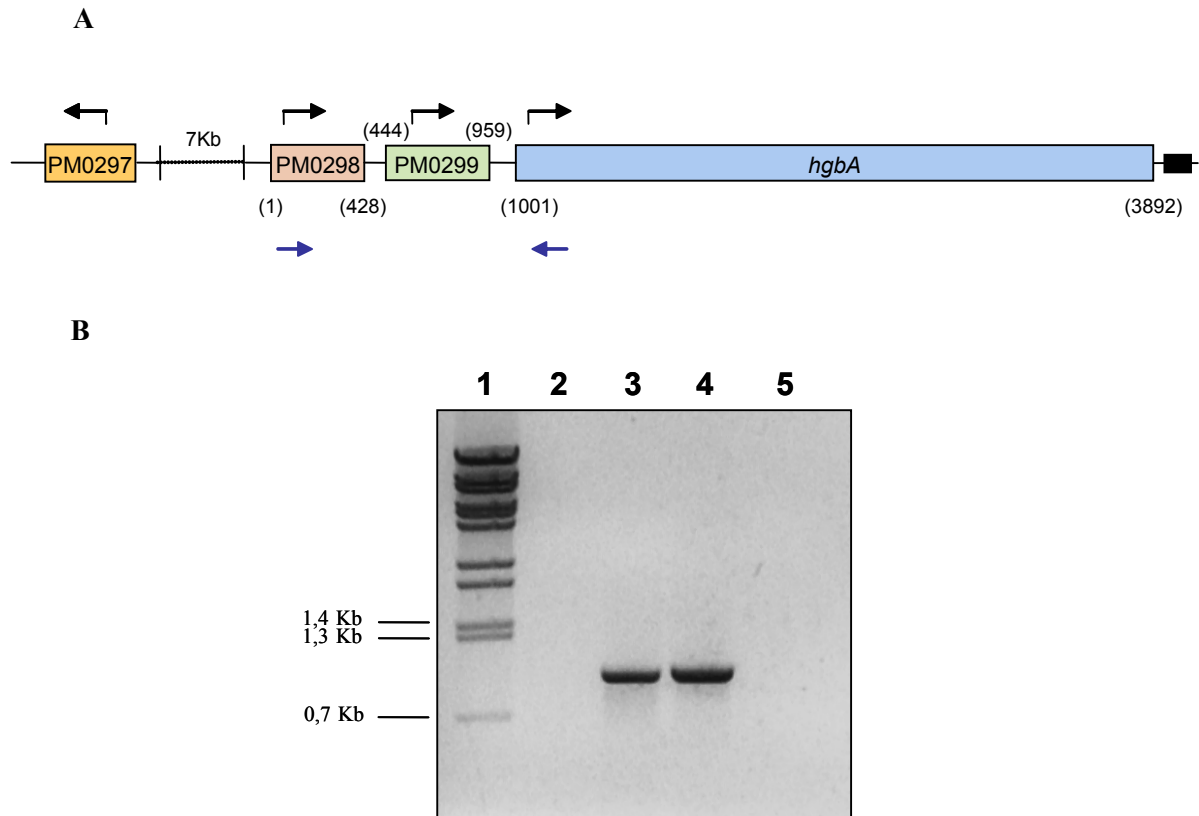


Fig. 3.14 **A** Estructura de la región cromosómica que contiene los ORFs PM0298, PM0299 y *hgbA* de *P. multocida*. Entre paréntesis se indican las coordenadas, en pares de bases, del inicio y final de traducción de cada uno de los genes respecto al ATG del gen PM0298. El recuadro negro representa una posible estructura terminadora de transcripción. Las flechas azules representan los oligonucleótidos usados en la reacción de RT-PCR. Las flechas negras indican el sentido de transcripción de los distintos genes. **B** Análisis del patrón de transcripción de la región PM0298-PM0299-*hgbA* de *P. multocida* mediante reacciones de RT-PCR. Los oligonucleótidos usados en esta reacción son PM0298intup y PHgbArp (Tabla 2 del artículo III) que corresponden a una región interna del gen PM0298 y *hgbA*, respectivamente. El carril 2 corresponde al control de contaminación de DNA cromosómico (una reacción de PCR con el RNA como molde), el carril 3 y 4 son reacciones de RT-PCR usando como molde RNA y DNA cromosómico, respectivamente, mientras que el carril 5 es un control negativo en el que no se adiciona ningún molde. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular λ -*BsteII*.

3.3.5. Construcción de mutantes de *P. multocida* deficientes para PM0298, PM0299 y *hgbA*.

Debido a que los genes PM0298 y PM0299 forman un operón con el gen *hgbA* y por tanto deben estar sujetos a la misma regulación, es posible que también estén implicados en el metabolismo del hierro. De hecho, ambos genes muestran similitud con los genes *hugX* y *hugZ* de *P. shigelloides*, respectivamente, que parece que están implicados en la prevención de la toxicidad producida por hierro (Henderson *et al.*, 2001).

Para estudiar si los genes PM0298 y PM0299 tienen una función similar, se abordó el análisis del efecto de una mutación por inserción en el gen PM0298, lo que comportaba también la inactivación de los genes PM0299 y *hgbA*. Además, se caracterizó el fenotipo de un mutante en *hgbA* para descartar el hipotético efecto polar de una mutación en el gen PM0298 sobre la transcripción de este receptor de hemina y hemoglobina.

Como se ha comentado anteriormente, la eficiencia de obtención de mutantes en *P. multocida* por doble intercambio de marcadores es muy baja, por lo que se procedió a la construcción de los mutantes en cada uno de los genes de este operón, mediante la integración simple de un plásmido suicida.

Se diseñaron los oligonucleótidos PM0298intup y PM0298intrp, PM0299intup y PM0299intrp, y HgbAintup y HgbAintrp (Tabla 2 del artículo III) para amplificar las regiones internas de los genes PM0298, PM0299 y *hgbA*, respectivamente. Se clonaron las bandas de amplificación en el vector pGEM-T y se comprobó por secuenciación que las secuencias amplificadas no presentaban ninguna mutación. Se liberaron los insertos mediante restricción con *ApaI-SacI*, se rellenaron los extremos y se clonaron en la diana *EcoRV* del plásmido suicida pUA826, obteniéndose los plásmidos pUA965, pUA966 y pUA967, respectivamente. Se comprobaron las construcciones mediante reacciones de PCR con los oligonucleótidos diseñados para amplificar los distintos fragmentos internos.

Una vez confirmadas las construcciones se introdujeron en la cepa salvaje de *P. multocida* mediante conjugación triparental y se seleccionaron los conjugantes en placas de BHI suplementadas con rifampicina y ampicilina.

A pesar de que en nuestro laboratorio se han conseguido construir varios mutantes por esta metodología, no se obtuvo ningún conjugante que llevara integrado el plásmido suicida en los genes PM0298 y PM0299, incluso después de realizar cuatro experimentos independientes en cada caso. Sin embargo, se obtuvieron mutantes en el gen *hgbA* en el primer intento. Estos resultados podrían sugerir que quizás los mutantes en los genes PM0298 y PM0299 no fueran viables.

Para confirmar esta hipótesis, se clonó la región cromosómica que comprendía los genes PM0298 y PM0299 en el plásmido pHRP309 (Parales & Harwood, 1993), que es estable en *P. multocida*, y se introdujo esta construcción en una cepa salvaje de *P. multocida* mediante conjugación, seleccionándose un conjugante que fue utilizado como receptor en un experimento de conjugación con la cepa que llevaba el vector suicida con el inserto del gen PM0298. En esta situación se obtuvieron conjugantes que portaban el plásmido suicida integrado. Se comprobó la inserción del plásmido mediante reacciones de PCR con el oligonucleótido del plásmido, el Aad, y un oligonucleótido externo a la región clonada en el vector pHRP309 (Tabla 2 del artículo III), de tal manera que sólo pudiera obtenerse banda de amplificación si el gen cromosómico estaba interrumpido por la integración del plásmido (carril 6, Fig. 3.15).

Estos resultados muestran que la inactivación del gen PM0298 sólo es posible cuando en la célula quedan copias salvajes de los genes PM0298 y PM0299, y por lo tanto indican que los genes PM0298 y PM0299 son esenciales para la viabilidad de la cepa en las condiciones de laboratorio ensayadas.

Así pues, los genes PM0298 y PM0299 de *P. multocida* podrían estar relacionados con la prevención de toxicidad de los compuestos de hierro, al igual que lo indicado con los genes de *P. shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001). Sin embargo, no hay datos sobre su papel en la viabilidad celular de este último microorganismo ya que no se ha descrito ningún mutante en dichos genes.

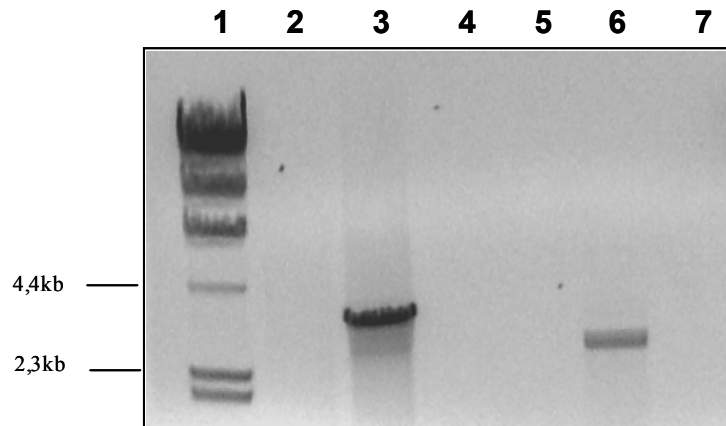


Fig. 3.15 Comprobación de la inserción de los plásmidos suicidas pUA965 y pUA967 en los genes PM0298 y *hgbA* de *P. multocida*, respectivamente. Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a amplificaciones llevadas a cabo con los oligonucleótidos Aad y HgbArp (para confirmar la inserción del plásmido en el gen *hgbA*). Los moldes utilizados en las reacciones fueron DNA cromosómico de la cepa salvaje (carril 2) y del mutante *hgbA* (carril 3), mientras que el carril 4 es un control negativo donde no se adicionó ningún DNA como molde. Las reacciones de los carriles 5, 6 y 7 se realizaron con los oligonucleótidos Aad y HgbAinrp (para confirmar la inserción del vector suicida en el gen PM0298). En el carril 5 el molde fue DNA cromosómico de la cepa salvaje, en el carril 6 fue el del merodiploide portador de la mutación en el gen PM0298 cromosómico y el carril 7 es un control negativo sin DNA molde. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular λ -HindIII. Las secuencias de los oligonucleótidos usados para este estudio se recogen en la Tabla 2 del artículo III.

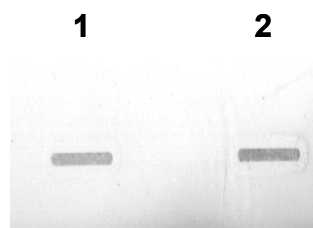
3.3.6. Unión de hemoglobina por el mutante *hgbA* de *P. multocida*

En el apartado anterior se ha comentado que se obtuvo un mutante *hgbA* de *P. multocida*, y previamente ya hemos establecido que esta cepa contiene otras proteínas con capacidad de unir hemina y hemoglobina, y que, por tanto podrían complementar los efectos de una mutación en el gen *hgbA*. Para confirmar esta posibilidad, se analizó la capacidad de unión de hemoglobina del citado mutante *hgbA*, y se determinó su DL_{50} para averiguar si una mutación en uno de los genes implicados en la captación de hemoglobina podría tener consecuencias en el proceso infeccioso.

Para alcanzar este objetivo, se pusieron a punto dos metodologías distintas para determinar la capacidad de unión de hemoglobina de un cultivo. Por un lado, se

adaptó a *P. multocida* una técnica cualitativa basada en la fijación de los cultivos a un filtro de nitrocelulosa y posterior incubación con hemoglobina marcada con digoxigenina (Jin *et al.*, 1996) y por otro se ajustaron las condiciones para aplicar en nuestro estudio una técnica cuantitativa, basada en la disminución de la absorbancia del sobrenadante del cultivo por interacción entre la hemoglobina y los receptores de las células centrifugadas (Okamoto *et al.*, 1993). Los resultados se muestran en la Fig. 3.16.

A



B

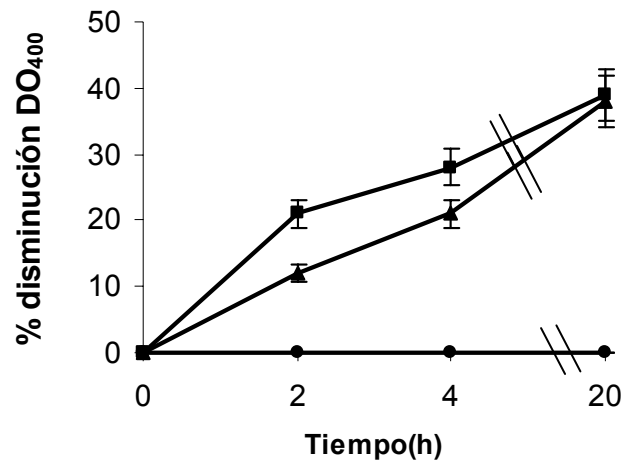


Fig. 3.16 A Análisis cualitativo de la unión de hemoglobina de la cepa salvaje (carril 1) y mutante *hgbA* (carril 2) de *P. multocida*. B Análisis cuantitativo de la absorción de hemoglobina de la cepa salvaje (■) y del mutante *hgbA* (▲) de *P. multocida*. Como control negativo se muestra la cinética de absorción de *E. coli* (●). Los valores presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar en todos los casos fue menor del 10%.

Con ambas metodologías se pudo determinar que el mutante *hgbA* de *P. multocida* Pm25 conserva la misma capacidad de unión de hemoglobina que la célula salvaje (Fig. 3.16A), aunque cuando se estudia el patrón de absorción de hemoglobina a lo largo del tiempo parece que la cinética del mutante *hgbA* es algo más lenta que la que presenta la cepa salvaje (Fig. 3.16B). Este mismo comportamiento se ha descrito en *H. influenzae*, que posee tres genes implicados en la captación de hemoglobina y mutaciones en uno de dichos genes no elimina la capacidad de los mutantes para captar hemoglobina, siendo necesario mutagenizar los tres genes para observar una pérdida de dicha capacidad (Morton *et al.*, 1999).

Para comprobar que también *in vivo* los mutantes en el gen *hgbA* de *P. multocida* pueden captar el suficiente hierro y realizar un proceso infeccioso similar al de una cepa salvaje, se determinó la DL₅₀ de la cepa salvaje y del mutante *hgbA*. Para ello, se inocularon intraperitonealmente grupos de 3 ratones hembra Swiss con diluciones seriadas de una suspensión ajustada a 3×10^8 cfu/ml de cada cepa y se evaluó el número de animales que sobrevivían a las 24, 48 y 72 horas post-inoculación. En ambos casos la DL₅₀ determinada fue de 5 cfu/animal, confirmándose así que una mutación en el gen *hgbA* no implica una disminución de la virulencia.

3.3.7. Estudio de la presencia del gen *hgbA* en diferentes serotipos de *P. multocida*.

Se ha descrito en la bibliografía que las proteínas de membrana reguladas por hierro son inmunogénicas y además confieren protección heteróloga (Ruffolo *et al.*, 1998). Esto sólo es posible si la proteína está presente tanto en el serotipo usado para el diseño de la vacuna como en el serotipo del posterior enfrentamiento, de tal manera que los anticuerpos creados contra la proteína después de la vacunación neutralicen las bacterias vivas en un enfrentamiento heterólogo posterior.

Por tanto, cuanto más distribuida esté una proteína entre los diferentes serotipos de una especie, mejor candidata será para ser ensayada como vacuna, puesto que podría conferir protección frente a un amplio rango de serotipos distintos. En esta línea se estudió la presencia de la proteína HgbA en distintos serotipos de *P. multocida*, mediante dot-blot. Se seleccionaron cepas de *P. multocida* de distintos serotipos, aisladas de diferentes animales (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Serotipo y procedencia de las cepas utilizadas para el análisis de la presencia del gen *hgbA* de *P. multocida*.

Cepa	Serotipo	Procedencia	Posición^a	
P-207	A:3	ovino	A	1
P-208	D:3	ovino	A	2
P-209	D:3	ovino	A	3
P-210	-:3	ovino	A	4
P-215	A:-	ovino	A	5
P-217	D:-	ovino	A	6
P-218	A:3	ovino	A	7
P-399	A:4,7,12	conejo	A	8
P-400	A:4,7,12	conejo	A	9
P-402	F:3	conejo	A	10
P-403	A:3	conejo	A	11
P-430	A:4,7,12	conejo	A	12
P-431	A:4,7,12	conejo	B	1
P-432	A:3	conejo	B	2
P-438	D:4,7,12	cerdo	B	3
P-440	D:4,7,12	cerdo	B	4
P-441	D:4,7,12	cerdo	B	5
P-442	A:3,4,7,12	cerdo	B	6
P-453	F:3,4,7,12	conejo	B	7
P-580	A:3,12	cerdo	B	8
P-582	A:3,12	cerdo	B	9
P-609	B:7,5	ovino	B	10
P-617	A:7,12	conejo	B	11
P-619	D:4	conejo	B	12
P-620	D:3,12	conejo	C	1
P-621	D:3,12	cerdo	C	2
P-623	A:12	cerdo	C	3
P-624	D:3,7,12	cabra	C	4
P-625	D:3,7,12	bovino	C	5
P-626	D:3,7,12	aves	C	6
P-628	D:-	ovino	C	7
P-633	A:12	aves	C	8
P-635	D:12	aves	C	9
P-636	D:7,12	aves	C	10

a, Se indica la posición de cada una de ellas en el dot-blot presentado en la Fig. 3.17.

Se procedió a extraer el DNA cromosómico de las cepas seleccionadas. Se fijó 1µg de DNA de cada cepa en un filtro de nitrocelulosa y se hibridó con un fragmento interno del gen *hgbA* marcado con digoxigenina. El resultado de esta hibridación se muestra en la Fig. 3.17 en la que se puede observar que el gen *hgbA* está presente en todos los serotipos de *P. multocida*, independientemente de su procedencia, excepto en una cepa no tipificable, la P-608. Esta distribución prácticamente universal dentro de la especie *P. multocida* convierte al gen *hgbA* en un firme candidato para ser utilizado como un método de identificación rápido y específico de este microorganismo.

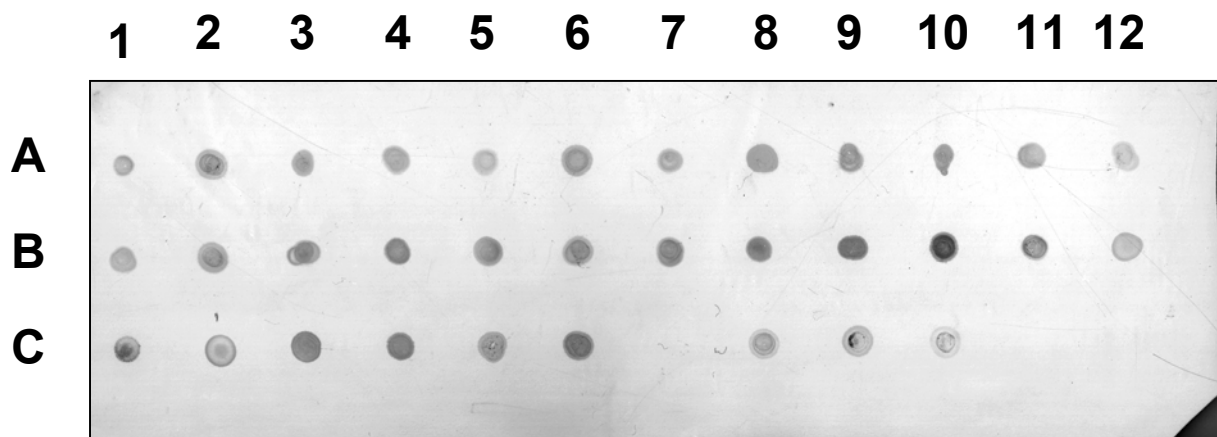


Fig. 3.17 Determinación de la presencia del gen *hgbA* en distintas cepas de *P. multocida*, descritas en la Tabla 3.6, mediante dot-blot en condiciones de alta estringencia. Las posiciones C11 y C12 son controles negativos en los que se fijó una gota de agua y 1 µg de DNA cromosómico de una cepa de *E. coli*, respectivamente.

3.3.8. Estudio de la regulación de la expresión del operón PM0298-PM0299-*hgbA* de *P. multocida*.

Como se ha comentado a lo largo de esta memoria, los genes implicados en la captación de hierro suelen estar regulados negativamente por el complejo Fur-Fe(II) (Escolar *et al.*, 1999), por lo cual el siguiente paso de este estudio fue determinar si los genes del operón PM0298-PM0299-*hgbA* estaban sometidos a esta regulación cuantificándose además la expresión de este operón a lo largo del proceso infeccioso.

Con este objetivo, y dado que se había comprobado que un mutante HgbA⁻ de *P. multocida* no presenta alterada su capacidad infectiva, se adaptó la tecnología *Recombination In Vivo Expression Technology* (RIVET) (Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999) a *P. multocida*. Para ello se modificó el plásmido pUA826, suicida en *P. multocida*, introduciéndole la construcción *res-Cm-res*, que consiste en un gen de resistencia a cloranfenicol flanqueado por dos secuencias *res*, que son las dianas de la resolvasa del transposón $\gamma\delta$. Además, también se introdujo el gen *tnpR*, sin promotor, que codifica la resolvasa que reconoce dichas regiones *res* (Camilli *et al.*, 1994). Al plásmido así obtenido se le denominó pUA960.

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la región 5' respecto al ATG del gen *hgbA* y se clonó el producto de amplificación en el plásmido pGEM-T, descartándose por secuenciación la introducción de mutaciones durante el proceso de amplificación. Se liberó la banda mediante restricción con la enzima *XbaI* y se clonó en la misma diana del plásmido pUA960. Se comprobó la construcción mediante restricción con la enzima *XbaI* y por reacción de PCR con el oligonucleótido directo usado para clonar la región 5' del gen *hgbA* y un oligonucleótido de la resolvasa.

Se introdujo esta construcción en una cepa salvaje de *P. multocida* mediante conjugación y se seleccionó un transconjugante (PM1077) que llevaba insertado el plásmido suicida. Dicho clon era portador por lo tanto de una fusión génica entre el operón PM0298-PM0299-*hgbA* y el gen *tnpR* (Fig. 3.18), de tal manera que la expresión del gen *tnpR* estaba bajo el control del promotor de dicho operón. Así pues, cuando había expresión desde este promotor, se sintetizaba resolvasa que reconocía las regiones *res* y las escindía, perdiéndose la resistencia a cloranfenicol. En cambio, cuando el promotor del operón no estaba activo, no había síntesis de resolvasa con lo que no se perdía la resistencia a cloranfenicol. Por tanto, esta estrategia permite cuantificar indirectamente la expresión del promotor del operón determinando la pérdida de resistencia a cloranfenicol.

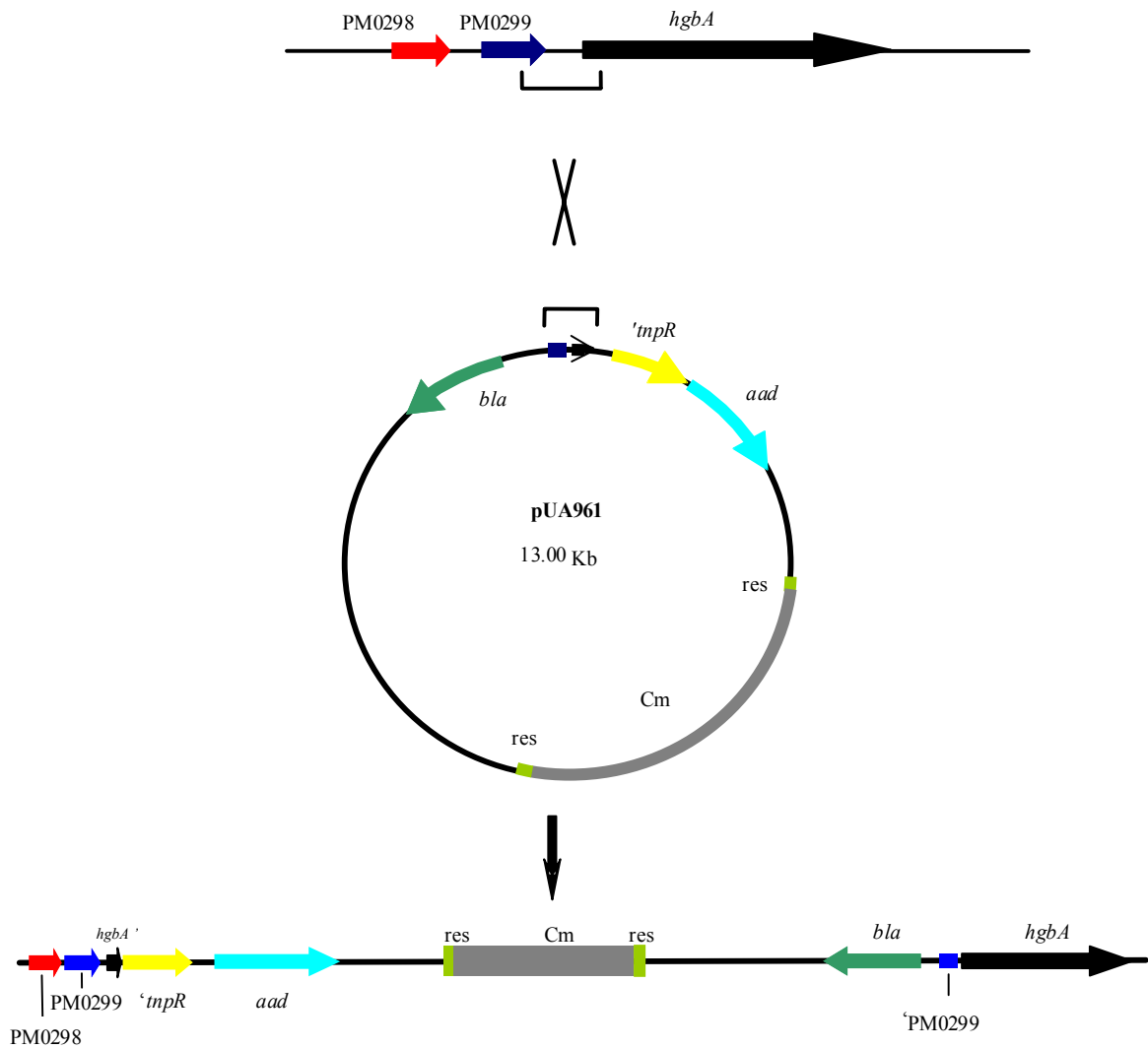


Fig. 3.18 Estrategia utilizada para analizar la expresión *in vivo* de la unidad transcripcional PM0298-PM0299-*hgbA* de *P. multocida*.

Se analizó la expresión del operón *in vivo* durante un proceso de infección e *in vitro* en ausencia de hierro y en presencia de diferentes fuentes de hierro (Fig. 3.19).

Para los ensayos *in vivo* se inocularon ratones Swiss hembra de 21 días con una suspensión de la cepa PM1077, se sacrificaron los animales a diferentes tiempos y se recuperaron las células de la cavidad peritoneal. Seguidamente, se sembraron diluciones en placas de BHI suplementadas con estreptomicina y después se determinó el porcentaje de células sensibles a cloranfenicol como resultado de la expresión del promotor del operón PM0298-PM0299-*hgbA* y la consecuente producción de resolvasa. Los resultados obtenidos se representan en la Fig. 3.19A, que muestra la cinética de expresión *in vivo* de los genes que forman este operón. Es destacable que el 45% de los clones ya habían perdido la resistencia a cloranfenicol en las primeras 2 horas post-inoculación.

En la Fig. 3.19B se presenta la cinética de expresión de estos genes *in vitro* en las siguientes condiciones de cultivo: presencia de hierro (BPW), ausencia de hierro (DP), FeSO₄ como única fuente de hierro (DPFeSO₄) y hemoglobina como aporte de hierro (DPHb). Los resultados obtenidos demuestran que la presencia de hierro inhibe la transcripción de estos genes, ya que la adición de FeSO₄ o hemoglobina disminuye el porcentaje de células sensibles a cloranfenicol en presencia de DP. Para confirmar que este efecto inhibitor del hierro sobre la expresión de los genes PM0298-PM0299-*hgbA* es dependiente de la proteína Fur, se analizó la región anterior al gen PM0298 y se identificó una posible caja Fur (TATTATCAATATT GATAAT), localizada en la posición -114 respecto al ATG de dicho gen.

3.3.9. Estudio de la capacidad inmunogénica y protectora de los receptores de hemina y/o hemoglobina de *P. multocida*.

Para determinar si las proteínas seleccionadas en nuestro estudio pueden usarse en el diseño de vacunas frente a *P. multocida* es necesario demostrar que presentan la capacidad de inducir la respuesta inmune del huésped. Con este fin, se realizaron estudios de western-blot, según los protocolos descritos en el Anexo I de esta memoria, con extractos de proteína total de las cepas de *E. coli* BL21, portadoras del plásmido pET22-b con las diferentes proteínas clonadas y sobreexpresadas, y usando como anticuerpo el suero obtenido a partir de ratones inoculados con proteínas de la membrana externa de una cepa de *P. multocida* Pm25, crecida en condiciones de privación de hierro. En la Fig. 3.20 se resumen los pasos realizados para determinar la capacidad inmunogénica de las proteínas analizadas en este trabajo.

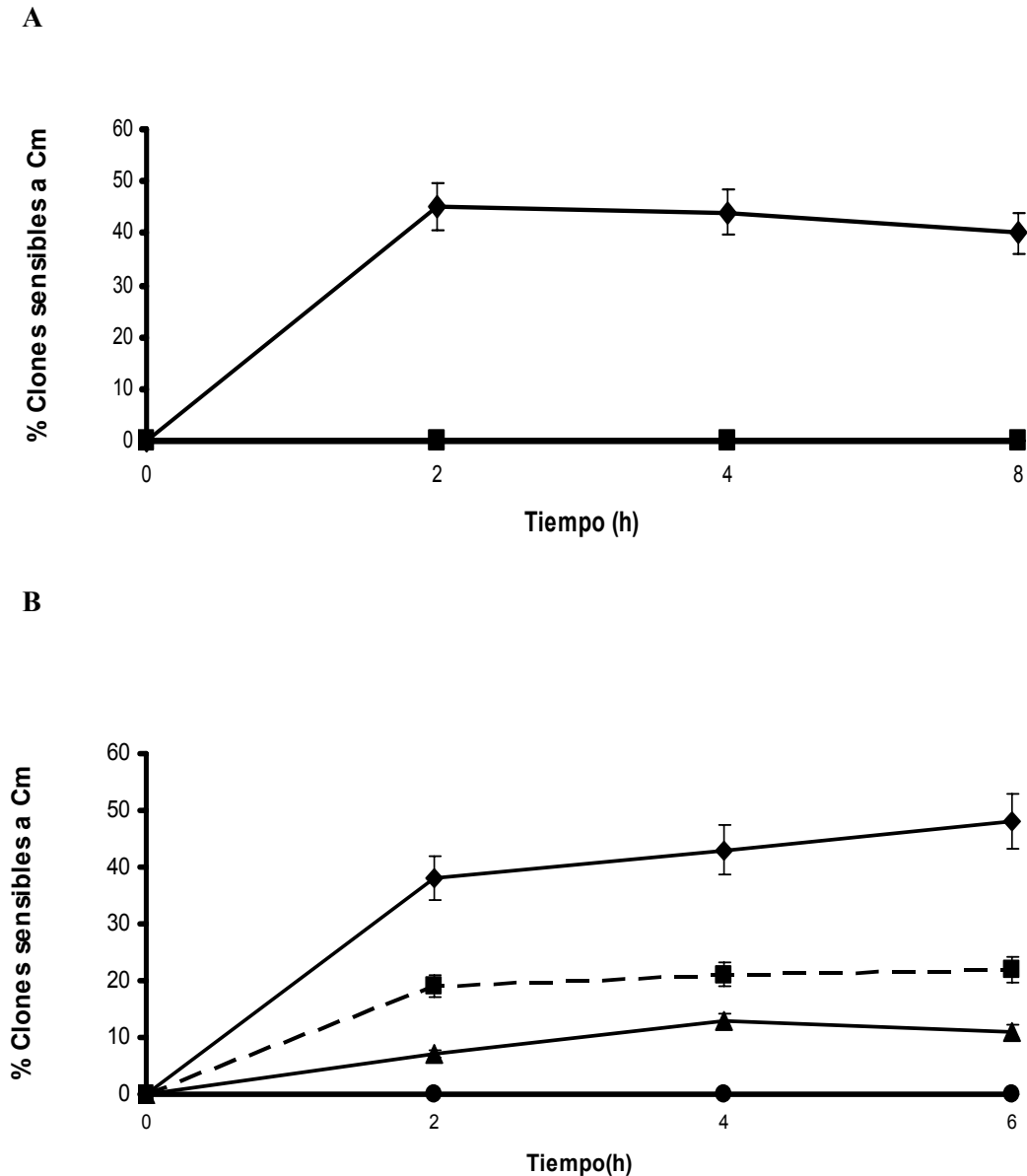


Fig. 3.19 **A** Cinética de expresión *in vivo* de la fusión PM0298-PM0299-*hgbA::tnpR* de *P. multocida* (♦). Se muestra también, como control de la estabilidad de la construcción *res-Cm-res*, la cinética de expresión de un cultivo *in vitro* de la misma cepa en agua peptonada (■). Los valores presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar en todos los casos fue menor del 10%. **B** Cinética de expresión de la fusión PM0298-PM0299-*hgbA::tnpR* *in vitro* en agua peptonada (●), agua peptonada tratada con DP (♦), agua peptonada tratada con DP y suplementada con FeSO_4 (▲) y agua peptonada en presencia de DP y hemoglobina (■). Los valores presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar en todos los casos fue menor del 10%.

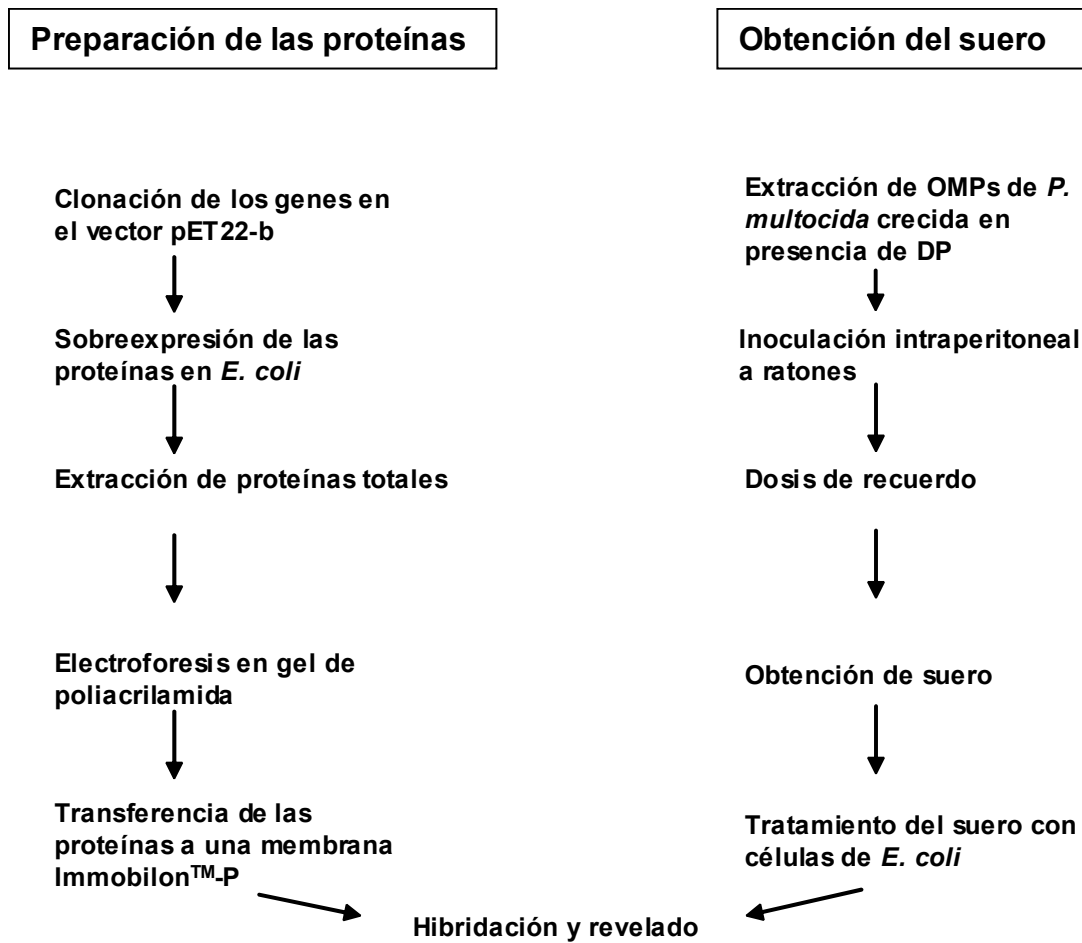
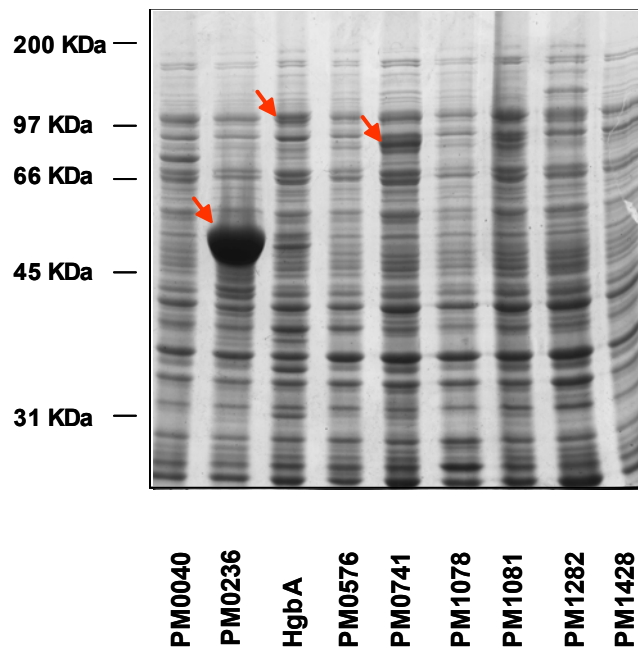


Fig. 3.20 Esquema del protocolo llevado a cabo para determinar la capacidad inmunogénica de los receptores de hemina y/o hemoglobina analizados en este trabajo.

Así, se ha podido demostrar que las proteínas PM0236, PM0741 y HgbA de *P. multocida* son inmunogénicas en el huésped ya que cuando se inoculan extractos de membrana externa de células crecidas en presencia de DP en ratones, éstos inducen la producción de anticuerpos contra ellas (Fig. 3.21). Sin embargo, el hecho de que el resto de proteínas no desencadenen la producción de anticuerpos específicos no implica necesariamente que no sean inmunogénicas, dado que podrían sufrir cambios conformacionales en el extracto de proteínas usado para la obtención del suero y perder su capacidad inmunogénica.

A



B

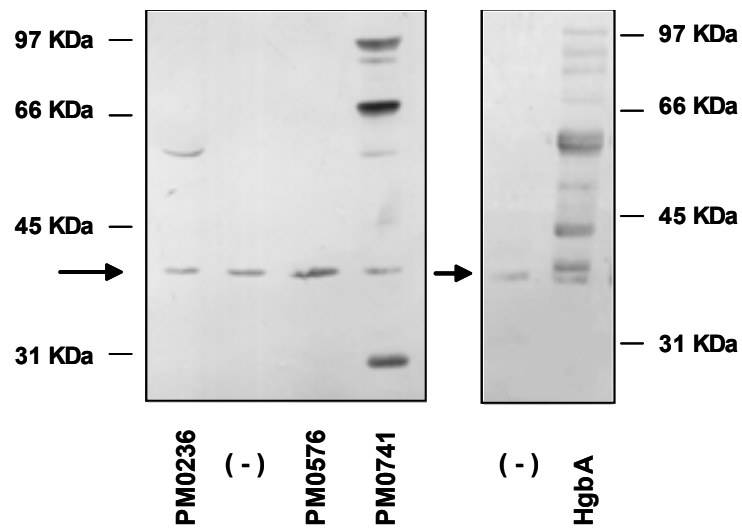


Fig. 3.21 **A** Electroforesis en gel de poliacrilamida de los extractos de proteína total de las cepas de *E. coli* BL21 (λ DE3) portadoras de las proteínas analizadas en este trabajo sobreexpresadas. Con flechas rojas se señalan las bandas que corresponden a las proteínas de *P. multocida* que se muestran en el western-blot. **B** Determinación, mediante western-blot, de la capacidad inmunogénica de los receptores de hemina y/o hemoglobina caracterizados en este trabajo. El control negativo (-) corresponde al extracto de BL21 con el vector pET22-b. La presencia de una banda inespecífica se señala con una flecha negra.

Con el fin de determinar si esta inducción era suficiente para conferir protección, se inocularon intraperitonealmente 3 μg de las proteínas PM0741 y/o HgbA purificadas, en ratones Swiss hembra de 21 días. A los 15 días se realizó una segunda inoculación con 3 μg de cada proteína y tres semanas después se realizó el enfrentamiento con una cepa salvaje de *P. multocida* Pm25, analizándose la evolución de los ratones a las 48 horas post-enfrentamiento. Ninguno de los ratones inoculados sobrevivió a la infección. Estos resultados indican que la inoculación de un único receptor de hemoglobina o de dos a la vez, a pesar de que son capaces de inducir la producción de anticuerpos, no confiere inmunidad frente a un enfrentamiento homólogo. Este resultado negativo podría deberse a que la cantidad de proteína inoculada no fuera suficiente para desencadenar una respuesta protectora. Sin embargo, estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio habían demostrado que la inoculación de menos de 1 μg /animal de un extracto de proteínas de membrana externa de una cepa salvaje de *P. multocida*, era suficiente para conferir un 100% de protección frente a un enfrentamiento homólogo.

Otra posible explicación sería que la neutralización de tan sólo uno o dos de los receptores de hemoglobina y/o hemina no sea suficiente para inhibir el proceso infeccioso llevado a cabo por *P. multocida*. Esto último está en concordancia con los datos obtenidos anteriormente respecto a la no afectación de la DL_{50} de un mutante de *P. multocida* en el gen *hgbA*. En todo caso, estos últimos resultados sugieren la necesidad de buscar estrategias alternativas a la utilización de una única proteína de hierro con capacidad antigénica cuando se persigue obtener vacunas basadas en éstas para especies microbianas que poseen múltiples receptores de este elemento.

4. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer a partir de los datos obtenidos en el presente trabajo son las siguientes:

1. El gen *fur* de *P. multocida* además de regular la transcripción de los genes implicados en la captación de hierro en esta especie bacteriana, también controla la expresión de genes no directamente relacionados con dicho proceso, como el que codifica la porina mayoritaria de membrana OmpH.
2. El gen *fur* de *P. multocida* no es esencial para el desarrollo de un proceso infectivo por las células de esta especie bacteriana.
3. Los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida* no constituyen una única unidad transcripcional, teniendo cada uno de ellos un promotor propio que está controlado, en todos los casos, por el complejo Fur-Fe(II).
4. Los genes *exbB*, *exbD* y *tonB* de *P. multocida* son imprescindibles para la virulencia de esta especie bacteriana.
5. Las proteínas PM0040, PM0236, PM0300, PM0741, PM1081 y PM1428 son receptoras de hemina y hemoglobina, mientras que la PM1282 es específica para hemina y la PM0576 para hemoglobina.
6. Los genes PM0298-PM0299-*hgbA* de *P. multocida* forman una única unidad transcripcional, siendo los dos primeros esenciales para la viabilidad de *P. multocida*.
7. Los mutantes en el gen *hgbA* de *P. multocida* no presentan ningún defecto en la capacidad de unión de hemoglobina ni en el desarrollo de un proceso infectivo.
8. El gen *hgbA* de *P. multocida* se expresa *in vivo* a las dos horas después de una inoculación intraperitoneal e *in vitro* está regulado por hierro.
9. El gen *hgbA* está ampliamente distribuido en la especie *P. multocida*, independientemente del serotipo u origen animal por lo que puede ser un excelente

candidato para el diseño de sistemas de identificación específicos para esta especie bacteriana.

10. Las proteínas PM0741 y HgbA, a pesar de ser inmunogénicas, no confieren protección frente a un enfrentamiento homólogo. Este hecho implica la necesidad de buscar nuevas estrategias vacunales para aquellas especies bacterianas que presenten diferentes proteínas captadoras de hierro en su superficie.

5. BIBLIOGRAFÍA

Achenbach, L. A. and Yang, W. (1997) The *fur* gene of *Klebsiella pneumoniae*: characterization, genomic organization and phylogenetic analysis. *Gene* 185:201-207.

Adler, B., Chancellor R., Homchampa, P., Hunt, M., Ruffolo, C., Strugnell, R. and Wapling, D. (1996) Immunity and vaccine development in *Pasteurella multocida* infections. *J. Biotechnol.* 44:139-144.

Adler, B., Bulach, D., Chung, J., Doughty, S., Hunt, M., Rajakumar, K., Serrano, M., van Zanden, A., Zhang, Y. and Ruffolo, C. (1999) Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *J. Biotechnol.* 73:83-90.

Alwis, M. C. L. (1995) Haemorrhagic septicaemia (*Pasteurella multocida* serotype B:2 and E:2 infection) in cattle and buffaloes. In: *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*. W. Donachie, F. A. Lainson and J. C. Hodgson (Eds.) Plenum Press, New York, USA.

Baichoo, N. and Helmann, J. D. (2002) Recognition of DNA by Fur: a Reinterpretation of the Fur Box Consensus Sequence. *J. Bacteriol.* 184:5826-5832.

Bereswill, S., Greiner, S., van Vliet, A. H. M., Waidner, B., Fassbinder, F., Schiltz, E., Kusters, J. G. and Kist, M. (2000) Regulation of Ferritin-Mediated Cytoplasmic Iron Storage by the Ferric Uptake Regulator Homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 182:5948-5953.

Berg, O. G. and von Hippel, P. H. (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. II. The binding specificity of the cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J. Mol. Biol.* 200:709-723.

Bisgaard, M. (1995) Taxonomy of the family *Pasteurellaceae* Pohl 1981. In: *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*. W. Donachie, F. A. Lainson and J. C. Hodgson (Eds.) Plenum Press, New York, USA.

Biswas, G. D., Anderson, J. E. and Sparling, P. F. (1997) Cloning and characterization of *Neisseria gonorrhoeae tonB*, *exbB* and *exbD* genes. Mol. Microbiol. 24:169-179.

Bitter, W., Tommassen, J. and Weisbeek P. J. (1993) Identification and characterization of the *exbB*, *exbD* and *tonB* genes of *Pseudomonas putida* WCS358: their involvement in ferric-pseudobactin transport. Mol. Microbiol. 7:117-130.

Bracken, C. S., Baer, M. T., Abdur-Rashid, A., Helms, W. and Stojiljkovic, I. (1999) Use of heme-protein complexes by *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. J. Bacteriol. 181:6063-6072.

Braun, V. (1995) Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. FEMS Microbiol. Rev. 16:295-307.

Braun, V. and Killmann H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. TIBS 24:104-109.

Braun, V. and Braun, M. (2002) Active transport of iron and siderophore antibiotics. Curr. Opin. Microbiol. 5:194-201.

Camilli, A., Beattie, D. T. and Mekalanos, J. J. (1994) Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2634-2638.

Cárdenas, M., Fernández de Henestrosa, A. R., Campoy, S., Pérez de Rozas, A. M., Barbé, J., Badiola, I. and Llagostera, M. (2001) Virulence of *Pasteurella multocida recA* mutants. Vet. Microbiol. 80:53-61.

Choi-Kim, K., Maheswaran, S. K., Felice, L. J. and Molitor, T. W. (1991) Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of *in vivo* grown *Pasteurella multocida*. Vet. Microbiol. 28:75-92.

Clarke, T. E., Tari, L. W. and Vogel, H. J. (2001) Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr. Top. Med. Chem.* 1:7-30.

Cope, L. D., Thomas, S. E., Hrkal, Z. and Hansen, E. J. (1998) Binding of heme-hemopexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 66:4511-4516.

Cornelissen, C. N., Kelley, M., Hobbs, M. M., Anderson, J. E., Cannon J. G., Cohen, M. S. and Sparling, P. F. (1998) The transferrin receptor expressed by gonococcal strain FA1090 is required for the experimental infection of human male volunteers. *Mol. Microbiol.* 27:611-616.

Cornelissen, C. N., Anderson, J. E., Boulton, I. C. and Sparling, P. F. (2000) Antigenic and Sequence Diversity in Gonococcal Transferrin-Binding Protein A. *Infect. Immun.* 68:4725-4735.

Crosa, J. H. (1997) Signal Transduction and Transcriptional and Posttranscriptional Control of Iron-Regulated Genes in Bacteria. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 61:319-336.

Danve, B., Lissolo, L., Mignon, M., Dumas, P., Colombani, S., Schryvers, A. B. and Quentin-Millet, M. J. (1993) Transferrin-binding proteins isolated from *Neisseria meningitidis* elicit protective and bactericidal antibodies in laboratory animals. *Vaccine* 11:1214-1220.

Dashper, S. G., Hendtlass, A., Slakeski, N., Jackson, C., Cross, K. J., Brownfield, L., Hamilton, R., Barr, I. and Reynolds, E. C. (2000) Characterization of a Novel Outer Membrane Hemin-Binding Protein of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 182:6456-6462.

de Lorenzo, V., Herrero, M., Giovanni, F. and Neilands, J. B. (1988) Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activation protein) modulate transcription of the *fur* gene in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 173:537-546.

Desai, P. J., Garge, E. and Genco C. A. (2000) Pathogenic *Neisseriae* Can Use Hemoglobin, Transferrin and Lactoferrin Independently of the *tonB* Locus. *J. Bacteriol.* 182:5586-5591.

de Voss, J. J., Rutter, K., Schroeder, B. G. and Barry C. E. III (1999) Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *J. Bacteriol.* 181:4443-4451.

Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X. W., Finlay, D. R., Guiney, D. and Helinski, D. R. (1985) Plasmid related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13:149-153.

Du, R-P., Wang, Q., Yang, Y-P., Schryvers, A. B., Chong, P., Klein, M. H. and Loosmore, S. M. (1998) Cloning and Expression of the *Moraxella catarrhalis* Lactoferrin Receptor Genes. *Infect. Immun.* 66:3656-3665.

Dubrac, S. and Touati, D. (2002) Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 148:147-156.

Elkins, C. (1995) Identification and Purification of a Conserved Heme-Regulated Hemoglobin-Binding Outer Membrane Protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* 63:1241-1245.

Elkins, C., Chen, C. J. and Thomas, C. E. (1995b) Characterization of the *hgbA* locus encoding a hemoglobin receptor from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* 63:2194-2200.

Elkins, C., Totten, P. A., Olsen, B. and Thomas, C. E. (1998) Role of *Haemophilus ducreyi* Ton system in internalization of heme from hemoglobin. *Infect. Immun.* 66:151-160.

Escobar, L., Martin, J.P. and de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: Transcriptional Metalloregulation by Fur Protein. *J. Bacteriol.* 181:6223-6229.

Ferrón, L., Ferreirós, C. M., Criado, M. T. and Andrade, M. P. (1993) Purification of the *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein-2 (TBP2) to homogeneity using column chromatography. FEMS Microbiol. Lett. 109:159-166.

Fujimura, S., Shibata, Y., Hirai, K. and Nakamura, T. (1996) Binding of Hemoglobin to the Envelope of *Porphyromonas gingivalis* and Isolation of the Hemoglobin-Binding Protein. Infect. Immun. 64:2339-2342.

Fuller, C. A., Yu, R., Irwin, A. W. and Schryvers, A. B. (1998) Biochemical evidence for a conserved interaction between bacterial transferrin binding protein A and transferrin binding protein B. Microb. Pathog. 24:75-87.

García-del Portillo, F., Foster, J. W. and Finlay, B. B. (1993) Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. Infect. Immun. 61:4489-4492.

Genco, C. A. and Dixon, D. W. (2001) Emerging strategies in microbial haem capture. Mol. Microbiol.. 39:1-11.

Gibert, I. and Barbé, J. (1990) Cyclic AMP stimulates transcription of the structural gene of the outer-membrane protein OmpA of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 68:307-312.

Gilmour, N. J., Donachie, W., Sutherland, A. D., Gilmour, J. S., Jones, G. E. and Quirie, M. (1991) Vaccine containing iron-regulated proteins of *Pasteurella haemolytica* A2 enhances protection against experimental pasteurellosis in lambs. Vaccine 9:137-140.

Glisson, J. R., Contreras, M. D., Cheng, I.-H. N. and Wang, C. (1993) Cross-Protection Studies with *Pasteurella multocida* Bacterins Prepared from Bacteria Propagated in Iron-Depleted Medium. Avian Dis. 37:1074-1079.

Gomez, J. A., Agra, C., Ferro, L., Powel, N., Pintor, M., Criado, M. T. and Ferreiros C. M. (1996) Antigenicity, cross-reactivity and surface exposure of the *Neisseria meningitidis* 37 KDa protein (Fbp). *Vaccine* 14:1340-1346.

Graham, M. R. and Lo, R. Y. C. (1997) Cloning and characterization of the *exbB-exbD-tonB* locus of *Pasteurella haemolytica* A1. *Gene* 186:201-205.

Haag, H., Hantke, K., Drechsel, H., Stojiljkovic, I., Jung, G. and Zahner H. (1993) Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J. Gen. Microbiol.* 139:2159-2165.

Hantke, K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:172-177.

Henderson, D. P., Wyckoff, E. E., Rashidi, C. E., Verlei, H. and Oldham, A. L. (2001) Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* gene encoding the heme iron utilization system. *J. Bacteriol.* 183:2715-2723.

Higgs, P. I., Myers, P. S. and Postle, K. (1998) Interactions in the Ton-Dependent Energy Transduction Complex: ExbB and ExbD Form Homomultimers. *J. Bacteriol.* 180:6031-6038.

Horsburgh, M. J., Ingham, E. and Foster, S. J. (2001) In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J. Bacteriol.* 183:468-475.

Howard, S. P., Meiklejohn, H. G., Shivak, D. and Jahagirdar, R. (1996) A TonB-like protein and a novel membrane protein containing an ATP-binding cassette function together in exotoxin secretion. *Mol. Microbiol.* 22:595-604.

Hu, P. S., Felice, L. J., Sivanandan, V. and Maheswaran, S. K. (1986) Siderophore production by *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 54:804-810.

Huang, L. and Freundlich, M. (1992) Positive and negative control of *ompB* transcription in *Escherichia coli* by cyclic AMP and the cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* 174:664-670.

Ibrahim, R. S., Sawada, T., Shashata, M. and Ibrahim, A. (2000) Cross-protection and antigen expression by chicken embryo-grown *Pasteurella multocida* in chickens. *J. Comp. Pathol.* 123:278-284.

Jablonski, P. E., Jaworski, M. and Hovde, C. J. (1996) A minimal medium for growth of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 140:165-169.

Jacques, M. and Mikael, G. M. (2002) Virulence Factors of *Pasteurellaceae*, Formidable Animal Pathogens. *ASM News* 68:174-179.

Jarosik, G. P., Sanders, J. D., Cope, L. D., Muller-Ebenhard, U. and Hansen, E. J. (1994) A functional *tonB* gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* 62:2470-2477.

Jin H., Ren, Z., Pozsgay, J., Elkins, C., Whitby, P. W., Morton, D. J. and Stull, T. L. (1996) Cloning of a DNA Fragment Encoding a Heme-Repressible Hemoglobin-Binding Outer Membrane Protein from *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 64:3134-3141.

Köster, W. (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B₁₂. *Res. Microbiol.* 152:291-301

Kuboniwa, M., Amano, A., Shizukuishi, S., Nakagawa, I. and Hamada, S. (2001) Specific Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Lys-Gingipain by DNA Vaccination Inhibit Bacterial Binding to Hemoglobin and Protect Mice from Infection. *Infect. Immun.* 69:2972-2979.

Larson, J. A., Higashi, D. L., Stojiljkovic, I. and So M. (2002) Replication of *Neisseria meningitidis* within Epithelial Cells Requires TonB-Dependent Acquisition of Host Cell Iron. *Infect. Immun.* 70:1461-1467.

Lee, S. H., Angelichio, M. J., Mekalanos, J. J. and Camilli, A. (1998) Nucleotide sequence and spatiotemporal expression of the *Vibrio cholerae* *vieSAB* genes during infection. *J. Bacteriol.* 180:2298-2305.

Lee, S. H., Hava, L. D., Waldor, M. K. and Camilli, A. (1999) Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell* 99:625-634.

Lewis, L. A., Gray, E., Wang, Y. P., Roe, B. A. and Dyer, D. W. (1997) Molecular characterization of *hpuAB*, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 23:737-749.

Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, G., Dumas, P., Mignon, M., Danve, B. and Quentin-Millet, M-J. (1995) Evaluation of Transferrin-Binding Protein 2 within the Transferrin-Binding Protein Complex as a Potential Antigen for Future Meningococcal Vaccines. *Infect. Immun.* 63:884-890.

Luo, Y., Glisson, J. R., Jackwood, M. W., Hancock, R. E. W., Brains, M., Cheng, I. N. and Wang, C. (1997) Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73. *J. Bacteriol.* 179:7856-7864.

Luo, Y., Zeng, Q., Glisson, J. R., Jackwood, M. W., Cheng, I-H. N. and Wang, C. (1999) Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine* 17:821-831.

Maciver, I., Latimer, J. L., Liem, H. H., Muller-Eberhard, U., Hrkal, Z. and Hansen, E. J. (1996) Identification of an outer membrane protein involved in

utilization of hemoglobin-haptoglobin complexes by non typeable *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. 64:3703-3712.

Mann, B. J., Holroyd, C.D., Bradbeer, C. and Kadner, R. J. (1986) Reduced activity of TonB-dependent functions in strains of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 26:153-161.

May, B. J., Zhang, Q., Li, L. L., Paustian, M. L., Whittam, T. S. and Kapur, V. (2001) Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida* Pm70. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:238-243.

Mekalanos, J. J. (1992) Environmental Signals Controlling Expression of Virulence Determinants in Bacteria. J. Bacteriol. 174:1-7.

Mey, A. R. and Payne, S. M. (2001) Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem transport. Mol. Microbiol. 42:835-849.

Moeck, G. S. and Coulton, J. W. (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanism of siderophore-mediated active transport. Mol. Microbiol. 28:675-681.

Morton, D. J. and Williams, P. (1989) Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins. FEMS Microbiol. Lett. 53:123-127.

Morton, D. J., Whitby, P. W., Jin, H., Ren, Z. and Stull, T. L. (1999) Effect of multiple mutations in the hemoglobin- and the hemoglobin-haptoglobin-binding proteins, HgpA, HgpB and HgpC, of *Haemophilus influenzae* type b. Infect. Immun. 67:2729-2739.

Myers, L. E., Yang, Y-P., Du, R-P., Wang, Q., Harkness, R. E., Schryvers, A. B., Klein, M. H. and Loosmore S. M. (1998) The Transferrin Binding Protein B of *Moraxella catarrhalis* Elicits Bactericidal Antibodies and Is a Potential Vaccine Antigen. Infect. Immun. 66:4183-4192.

Nelson, M., Carrano, C. J. and Szaniszlo P. J. (1992) Identification of the ferrioxamine B receptor, FoxB, in *Escherichia coli* K12. *Biometals* 5:37-46.

Occhino, D. A., Wyckoff, S. L., Henderson, D. P., Wrona, T. J. and Payne, S. M. (1998) *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol. Microbiol.* 29:1493-1507.

Ochsner, U. A. and Vasil, M. L. (1996) Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: Cycle selection of iron-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:4409-4419.

Ogunnariwo, J. A. and Schryvers, A. B. (2001) Characterization of a Novel Transferrin Receptor in Bovine Strains of *Pasteurella multocida*. *J. Bacteriol.* 183:890-896.

Okamoto, K., Nayakama, K., Kadowaki, T., Abe, N., Ratnayake, D. B. and Yakamoto K. (1998) Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* 273:21225-21231.

Otto B. R., Verweij-van Vught. A. M. J. J. and MacLaren D. M. (1992) Transferrins and Heme-Compounds as Iron Sources for Pathogenic Bacteria. *Critical Rev. Microbiol.* 18:217-233.

Panina, E. M., Mironov, A. A. and Gelfand, M. S. (2001) Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res.* 29:5195-5206.

Parales, R. E. and Harwood, C. S. (1993) Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, from Gram-negative bacteria. *Gene* 133:23-30.

Paustian, M. L., May, B. J. and Kapur, V. (2001) *Pasteurella multocida* Gene Expression in Response to Iron Limitation. *Infect. Immun.* 69:4109-4115.

- Potter, A. A., Schryvers, A. B., Ogunnariwo, J. A., Hutchins, W. A., Lo, R. Y. and Watts, T.** (1999) Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle. *Microb. Pathog.* 27:197-206.
- Pradel, E., Guiso, N., Menozzi, F. D. and Locht, C.** (2000) *Bordetella pertusis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect. Immun.* 68:1919-1927.
- Ratledge, C. and Dover, L.G.** (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881-942.
- Reeves, S. A., Torres, A. G. and Payne, S.** (2000) TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect. Immun.* 68:6329-6336.
- Ren, Z., Jin, H., Morton, D. J. and Stull, T. L.** (1998) *hgpB*, a Gene Encoding a Second *Haemophilus influenzae* Hemoglobin- and Hemoglobin-Haptoglobin-Binding Protein. *Infect. Immun.* 66:4733-4741.
- Rohde, K. H., Gillaspay, A. F., Hatfield, M. H., Lewis, L.A. and Dyer, D. W.** (2002) Interactions of hemoglobin with the *Neisseria meningitidis* receptor HpuAB: the role of TonB and intact proton motive. *Mol. Microbiol.* 43:335-354.
- Rokbi, B., Mignon, M., Maitre-Wilmotte, G., Lissolo, L., Danve, B., Caugant, D. A. and Quentin-Millet, M-J.** (1997) Evaluation of Recombinant Transferrin-Binding Protein B Variants from *Neisseria meningitidis* for Their Ability To Induce Cross-Reactive and Bactericidal Antibodies against a Genetically Diverse Collection of Serogrup B Strains. *Infect. Immun.* 65:55-63.
- Rossi-Campos, A., Anderson, C., Gerlach, G. F., Klashinsky, S., Potter, A. A. and Willson, P. J.** (1992) Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumonia* with two recombinant proteins preparations. *Vaccine* 10:512-518.
- Ruffolo, C. G., Jost, B. H. and Adler, B.** (1998) Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Vet. Microbiol.* 59:123-127.

Schryvers, A. B. and Morris, L. J. (1988) Identification and characterization of the transferrin receptor from *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 2:281-288.

Schryvers, A. B. and Morris, L. J. (1988b) Identification and Characterization of the Human Lactoferrin-Binding Protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 56:1144-1149.

Schryvers, A. B. and Stojiljkovic, I. (1999) Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* 32:1117-1123.

Simpson, W., Olczak T. and Genco, C. A. (2000) Characterization and Expression of HmuR, a TonB-Dependent Hemoglobin Receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 182:5737-5748.

Stojiljkovic, I., Baumler, A. and Hantke, K. (1994) Fur regulation in Gram-negative bacteria: identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by Fur titration assay. *J. Mol. Biol.* 236:531-545.

Stojiljkovic, I., Hwa, V., de Saint Martin, L., O'Garra, P., Nassif, X., Heffron, F. and So, M. (1995) The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol. Microbiol.* 15:531-541.

Stojiljkovic, I., Larson, J., Hwa, V., Anic, S. and So M. (1996) HmbR Outer Membrane Receptores of Pathogenic *Neisseria* ssp: Iron-Regulated, Hemoglobin-Binding Proteins with a High Level of Primary Structure Conservation. *J. Bacteriol.* 178:4670-4678.

Stojiljkovic, I. and Srinivasan, N. (1997) *Neisseria meningitidis tonB, exbB, exbD* genes: Ton-dependent utilization of protein-bound iron in *Neisseriae*. *J. Bacteriol.* 179: 805-812.

Stork, M., Di Lorenze, M., Welch, T. J., Crosa, L. M., and Crosa, J. H. (2002) Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* 48:222-228.

Takase, H., Nitnai, H., Hoshino, K. and Otani, T. (2000) Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa tonB* Gene for High-Affinity Iron Acquisition and Infection. *Infect. Immun.* 68:4498-4504.

Tolmasky, M. E., Wertheimer, A. M., Actis, L. A. and Crosa, J. H. (1994) Characterization of *Vibrio anguillarum fur* gene: role in regulation of expression of FatA outer membrane protein and catechols. *J. Bacteriol.* 176:213-220.

Tonpitak, W., Thiede, S., Oswald W., Baltes, N. and Gerlach, G. F. (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* Iron Transport: a Set of *exbBD* Genes Is Transcriptionally Linked to the *tbpB* Gene and Required for Utilization of Transferrin-Bound Iron. *Infect. Immun.* 68:1164-1170.

Tsolis, R. M., Bäumer, A. J., Heffron, R. and Stojiljkovic, I. (1996) Contribution of a TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect. Immun.* 68:4498-4504.

van Vliet, A. H. M., Rock, J. D., Madeleine, L. N. and Ketley, J. M. (2000) The iron-responsive regulator Fur of *Campylobacter jejuni* is expressed from two separate promoters. *FEMS Microbiol. Lett.* 188:115-118.

Veken, J. W., Oudega, B., Luirink, J. and Graaf, F. K. (1994) Binding of bovine transferrin by *Pasteurella multocida* serotype B:2,5, a strain which causes haemorrhagic septicaemia in buffalo and cattle. *FEMS Microbiol. Lett.* 115:253-258.

Veken, J. W., Shah, N. H., Klaasen, P., Oudega, B. and de Graaf, F. K. (1996) Binding of host iron-binding proteins and expression of iron-regulated membrane proteins by different serotypes of *Pasteurella multocida* causing haemorrhagic septicaemia. *Microb. Pathog.* 21:59-64.

Wandersman C. and Stojiljkovic I. (2000) Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:215-220.

Weinberg, E. D. (1995) Acquisition of iron and other nutrients *in vivo*. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, 2nd ed. Edited by: Roth, J. A., Bolin, C. A., Brogden, K. A., Minion, F. C. and Wannemuehler, M. J. American Society for Microbiology. Washington D. C., USA.

West, D., Reddin, K., Matheson, M., Heath, R., Funnell, S., Hudson, M., Robinson, A. and Gorrings, A. (2001) Recombinant *Neisseria meningitidis* Transferrin Binding Protein A Protects against Experimental Meningococcal Infection. *Infect. Immun.* 69:1561-1567.

Wiggerich H. G., Klauke B., Köplin, R., Priefer, U. B. and Pühler, A. (1997) Unusual Structure of the *tonB-exB* DNA Region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: *tonB*, *exbB* and *exbDI* Are Essential for Ferric Iron Uptake, but *exbD2* Is Not. *J. Bacteriol.* 179:7103-7110.

Winkler, M. E. (1996) Biosynthesis of histidine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, F. C., Ed), pp. 485-505. American Society for Microbiology, Washington, DC. USA

Worst, D. J. and Maaskant, J. (1999) Multiple haem-utilization loci in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 145:681-688.

Wösten, M. M. S. M. and Fox, L. (2000) A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* 103:113-125.

Young, G. M., Amid, D. and Miller, V. L. (1996) A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. *J. Bacteriol.* 178:6487-6495.

Yu, R-H., Bonnah, R. A., Ainsworth, S. and Schryvers, A. B. (1999) Analysis of the Immunological Responses to Transferrin and Lactoferrin Receptor Proteins from *Moraxella catarrhalis*. *Infect. Immun.* 67:3793-3799.

ANEXO I

A continuación se detalla el protocolo de aquellas técnicas cuya descripción no aparece en el apartado de materiales y métodos de los distintos artículos publicados que se adjuntan en el anexo II de esta memoria.

AI.1. Determinación de unión a hemina en líquido

Se realizó una dilución 1:50 a partir de un cultivo de noche, se incubó hasta que alcanzó una DO_{550} de 0,6, se añadió IPTG a 1mM y se mantuvo a 37 °C con agitación durante 3 horas. Seguidamente se centrifugó el cultivo, se lavó el sedimento con PBS y se resuspendió en este mismo tampón, ajustando la DO_{660} a 1,5.

Se preparó una solución de hemina a 3 mg/ml y se añadieron 100 μ l de esta solución a 10 ml de cultivo. Inmediatamente después se tomó una muestra de 1 ml, que se centrifugó durante 1 min a 8000 g y se midió la absorbancia del sobrenadante a 400 nm. A continuación se incubaron los cultivos con hemina durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se tomó otra muestra de 1 ml, que se centrifugó, midiéndose la absorbancia del sobrenadante a 400 nm.

La capacidad de unión de hemina se determinó por comparación de la disminución de la absorbancia del sobrenadante de los cultivos correspondientes a cada una de las proteínas seleccionadas con la del cultivo de la cepa que contiene el vector pET22-b.

AI.2. Obtención de suero

Se inocularon intraperitonealmente 10 μ g/animal de OMPs obtenidas de *P. multocida* Pm25 crecida en condiciones de privación de hierro a ratones Swiss hembra de 4 semanas (Harlan Iberica Inc., Barcelona, España). Se realizó una segunda inoculación, o dosis de recuerdo, a las dos semanas.

La obtención del suero se llevó a cabo tres semanas después de la segunda dosis. Para ello, se durmieron los ratones con pentobarbital y se inmovilizaron boca arriba, se les abrió la cavidad torácica, se les cortó la vena cava y se recogió la sangre con

una jeringa de insulina de 1 ml sin aguja, depositándola en tubos de plástico estériles. Se incubó a 37° C durante 2 horas para facilitar la formación de coágulos, que fueron separados de la pared del tubo con un asa de Kolle y se dejó a 4 °C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se centrifugó a 2000 g durante 15 min y se recogió el suero con una pipeta Pasteur y se mantuvo a 4 °C.

Para eliminar los posibles anticuerpos creados contra las proteínas de *E. coli* que pudieran estar presentes en nuestra muestra, se siguió el siguiente protocolo: se ajustó un cultivo de noche de la cepa BL21 de *E.coli* portadora del plásmido pET22-b a una DO₅₅₀ de 0.2-0.3. Se tomó 1 ml de dicha dilución y se centrifugó a 10000 g durante 2 min. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 100 µl del suero recuperado y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Después, se centrifugó a 10000 g durante 2 min y se recuperó el sobrenadante.

AI.3. Western-blot

La determinación de la capacidad inmunogénica de las distintas proteínas analizadas en el presente trabajo se realizó mediante estudios de Western-blot con el suero obtenido según el protocolo anterior.

Se realizaron extractos de proteínas totales de los cultivos de las cepas de *E. coli* portadoras de los receptores de hemina y/o hemoglobina sobreexpresados y se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% transfiriéndose las proteínas a una membrana Immobilon™-P de Millipore (Millipore Corporation, Bedford), usando un aparato de transferencia de Hoefer miniVe (Amersham Pharmacia Biotech, California, USA) y fijando los parámetros de amperaje y voltaje a 350 mA y 25 V, respectivamente, durante una hora y media.

A continuación, se mantuvieron los filtros durante 20 minutos a temperatura ambiente para que se secasen y se trataron durante 1 hora con solución de bloqueo. Se eliminó dicha solución y se incubó durante toda la noche con el suero tratado y diluido 1/100 en solución de bloqueo. Se descartó la solución anterior y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS.

Posteriormente, se retiró el PBS y se incubó durante 1 hora con *anti-mouse IgG (Fc specific)* (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) diluido 1/30000 en solución de bloqueo. Seguidamente, se eliminó dicho anticuerpo y se lavó tres veces con PBS durante 10 minutos. Se retiró el PBS y se trató la membrana con tampón de equilibrio. Por último, se desechó esta solución y se incubó con solución de revelado hasta la aparición de bandas.

A.I.4. Composición de las soluciones

1. Tampón fosfato salino (PBS: *Phosphate Buffered Saline*)

8 g de NaCl

0,2 g de KCl

2,68 g de Na₂HPO₄ · H₂O

0,24 g de KH₂PO₄

Disolver en 800 ml de H₂O desionizada, ajustar el pH a 7,5 y enrasar a 1 litro con H₂O desionizada. Autoclavar.

2. Solución de bloqueo

1 g de *blocking reagent* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)

100 ml de PBS

Disolver con calor y añadir 100 µl de Tween 20.

3. Solución de equilibrio

1,68 g de NaCl

20 g de MgCl₂ · 6 H₂O

1,6 g de Tris-HCl

23,16 g de Tris-base

Enrasar con agua desionizada hasta 2 litros y ajustar el pH a 9,5.

4. Solución de revelado

10 ml de solución de equilibrio

35 µl de BCIP (X-phosphate/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt)

45 µl de 4-Nitro blue tetrazolium chloride

AGRADECIMIENTOS

Quizás la redacción de los agradecimientos sea el momento más esperado en todas las tesis doctorales, puesto que implica que ya se está llegando al final de todo este proceso y porque es, sin duda, la página más leída después de la portada. En fin, es el momento de expresar con palabras todo aquello que siento por las personas que me han acompañado durante esta etapa de mi vida.

Primero debo agradecer a la Dra. Montserrat Llagostera y al Dr. Jordi Barbé el haber confiado en mi desde el principio y haberme dado la oportunidad de ingresar en su grupo de investigación y de trabajar en lo que más me gusta. Espero no haberlos defraudado demasiado.

Un recuerdo especial para el Dr. Ignacio Badiola y la gente del IRTA por su orientación e inestimable ayuda en el uso y manejo de animales de experimentación, y, como no, a los ratones Swiss hembra que, muy a su pesar, han contribuido decisivamente al desarrollo de nuestro trabajo.

Muchas gracias a todas las personas con las que me he tropezado a lo largo de mi vida investigadora, a las que ya estaban aquí cuando llegué y a las que se han ido incorporando a lo largo de todos estos años. A los que ya no están en el laboratorio espero que todo les vaya estupendo allí donde estén y a los que todavía lo están, muchas fuerzas y mucha suerte para continuar y llegar hasta el final. En cualquier caso, muchísimas gracias a todos por lo mucho o lo poco que hemos compartido.

Es inevitable acordarse con más cariño de algunas de estas personas porque de una o otra manera me han marcado e incluso me han hecho un poquito mejor persona. Así que un saludo muy especial para José Antonio por enseñarme a dar los primeros pasos en el laboratorio. A Maribel y Raúl por todo vuestro trabajo con *Pasteurella* que me ha hecho la vida más fácil (esta tesis también es un poco, o un mucho, vuestra). A Lorena por los buenos tiempos. A todos los que se han peleado con la 2,5 (Ricardo, Xavi, Anna) pero sobretudo a Maria Elena, creo que sin tu ayuda no habría llegado hasta aquí, muchas gracias por todas las horas que has dedicado al “trabajo de las dos”. A Toni por todos tus buenos consejos. A Joan y Pilar por su inmejorable “technical assistance” y por ser aún mejor personas. A todos los que

Agradecimientos

forman la plantilla actual del lab 2 y lab 1 por aguantarme hasta en los peores momentos, así que un besazo para José, Lorena, Montse R., Mirle, Maria Elena, Anna, Pilar, René, Joan, Toni, Marc, Jordi C., Núria, Susana, Mónica y Gerard.

También quiero dedicar un espacio a los amigos de toda la vida, a los que sabes que están ahí y que siempre van a ayudarte aunque ya no podemos compartir el día a día. Moltes gràcies a tots per ser com sou, a veure quan quedem.

Y por último, mi agradecimiento más sincero para toda mi familia, infinitas gracias por todo.