



# Implicación de la glicosilación en el ensamblaje del flagelo y las fimbrias de *Aeromonas hydrophila* AH-1

Raquel Molero Andrade

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universidad de Barcelona

Facultad de Biología

Departamento de Microbiología

Implicación de la glicosilación en el ensamblaje del flagelo y las  
fimbrias de *Aeromonas hydrophila* AH-1

Memoria presentada por Raquel Molero Andrade  
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado  
Microbiología Ambiental y Biotecnología

VºBº de la directora

La doctoranda

Dra. Susana Merino Montero

Raquel Molero Andrade

Barcelona, Abril 2014



There is a driving force more powerful than steam,  
electricity and atomic energy: the will

Albert Einstein



Agradecimientos:

Me gustaría dedicar unas líneas a todas las personas que han colaborado, de una manera u otra, a la realización de esta Tesis. No quiero extenderme demasiado; lo bueno, si es breve, dos veces bueno.

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Joan Tomàs y a la Dra. Susana Merino por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. A Juan por mostrarme el lado más crítico de las cosas y a Susana por la dirección de esta Tesis y estar siempre dispuesta a resolver una duda. También, agradecer a la Dra. Kelly Fulton y la Dra. Susan Twine del National Research Council (Canadá), por su colaboración en la parte más química de este trabajo.

También me gustaría agradecer a todo el personal del Departamento de Microbiología, desde los profesores que han contribuido a mi formación y a despertar mi interés y afición por la microbiología, hasta todos los compañeros de otros laboratorios con los que he compartido charlas en el pasillo, cenas de Navidad, desayunos, etc. Sin olvidar al personal de Secretaría por asesorarme con el papeleo que conlleva la Tesis, que no es poco.

Y muy especialmente a mis compañeros del día a día en el labo 7... sois tantos los que habéis pasado desde que entré a colaborar en 2007 que sinceramente ¡espero no dejarme a nadie por mencionar! Al grupo "inicial": Silvia, Maite S., Mercè, Anna, Natalia, Carol, Markus y Maite... Gracias a todos por la acogida y haber sido tan buenos profes conmigo. Y por todos los momentos que hemos pasado juntos tanto dentro como fuera del lab. En especial a Maite Polo, que es la única que ha estado desde el principio hasta el final conmigo...somos unas supervivientes! Jeje. Gracias por ser la mejor técnica del mundo, siempre trabajando y tan previsora con el material, y sobretodo, por nuestras confianzas y darme la confianza para contarte todas mis inquietudes de mi día a día...te voy a echar mucho de menos!!

A Judit V., que entró conmigo pero me demostró que a veces el corazón triunfa sobre la razón, y hacerme ver que hay cosas que no solo suceden en las películas!

A Fidelín, que junto con Markus erais Zipi y Zape, que risas y buenos momentos...creo que fue una de las mejores épocas que pasé en el labo...

A Ivania, Belén y Flor, por traer un pedacito de Sudamérica a Barcelona y enriquecernos un poquito más. En especial a Flor, por ser mi primera alumna que

más tarde se convirtió en confidente... echo de menos nuestros cafecitos en el Mango! Te deseo lo mejor en Uruguay.

A Núria por su frescura y espontaneidad. A Alba, mi segunda alumna, con las ideas tan claras. A Mónica, Judit C., y Víctor porque con vosotros se volvió a formar piña en el lab; os deseo mucha suerte en vuestros nuevos caminos. Os lo merecéis.

Y por último a Patri, Lidia, Eleonora, María, Eli, Sara y Jesús que sois los que habéis compartido estos últimos meses conmigo, ya no los mejores sino los más estresantes para mí. Muchas gracias por todo el apoyo y aguantar mis nervios en la recta final de la Tesis. A Eleonora por nuestras tardes de soledad...¡Coño!...jeje...te deseo mucha suerte en tu futuro próximo.

Pasando a un plano más personal me gustaría agradecer a mi familia, en especial a mis padres, el haberme apoyado desde el principio, no solo de esta Tesis, sino de toda mi trayectoria académica, por haber confiado en mí y haberme animado siempre. Especialmente a ti, mama, por creer tanto en mí y animarme cada día.

Tata, seguro que tú también llegas lejos, solo un consejo: haz lo que quieras que sea con ganas y motivación. Así tienes el éxito asegurado.

A mis amigos de la "Beautiful People" por los buenos momentos que hemos vivido, en especial a Sheila y Cris, os deseo mucha suerte en vuestro futuro: vais a ser unas mamás estupendas!

Tamara, gracias por acompañarme en esto desde el principio, desde aquel día de 2004 cuando pisé la Universidad por primera vez y me senté a tu lado. Desde entonces hemos vivido muchas experiencias juntas y seguimos compartiendo lo bueno y lo malo que implica hacerse doctora. ¡Ya te queda muy poco también!

Y por último, y no menos importante, a ti, Markus, por haber sido mi profe "guiri", por haberme enseñado tantas cosas tanto de biología molecular como de la vida en general, por tus incontables bromas y hacerme pasar tan buenos momentos en el lab y fuera de él. Sin duda, lo mejor que me llevo de estos años has sido tú.

ÍNDICE





|  |    |
|--|----|
| <b>ABREVIATURAS</b> .....  | 1  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 7  |
| <b>1.1 La familia <i>Aeromonadaceae</i></b> .....                          | 7  |
| 1.1.1 Taxonomía .....  | 7  |
| 1.1.2 Hábitat .....  | 8  |
| 1.1.3 Patogenicidad y epidemiología .....                                  | 9  |
| <b>1.2 Factores de virulencia en <i>Aeromonas</i> mesófilas</b> .....      | 10 |
| 1.2.1 Cápsula .....  | 11 |
| 1.2.2 Lámina S .....   | 12 |
| 1.2.3 Lipopolisacárido (LPS) .....   | 14 |
| 1.2.4 Sistemas de captación de hierro .....                                | 17 |
| 1.2.5 Sistemas de secreción .....  | 19 |
| 1.2.6 Flagelo .....  | 20 |
| 1.2.6.1 Glicosilación de las flagelinas .....                              | 23 |
| 1.2.6.2 Papel biológico de los glicanos flagelares .....                   | 28 |
| 1.2.7 Fimbrias o <i>pili</i> .....   | 29 |
| 1.2.7.1 Sistema de biogénesis de las fimbrias de tipo IV .....             | 31 |
| 1.2.7.2 Regulación de las fimbrias de tipo IV .....                        | 33 |
| 1.2.7.3 Fimbrias Msh (Bfp) .....   | 34 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 39 |
| <b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....   | 43 |
| <b>2.1 Cepas bacterianas</b> .....   | 43 |
| <b>2.2 Vectores</b> .....  | 44 |
| <b>2.3 Cebadores</b> .....   | 45 |
| <b>2.4 Medios de cultivo y suplementos</b> .....                           | 48 |
| 2.4.1 Medios de cultivo .....  | 48 |
| 2.4.2 Suplementos .....  | 49 |
| <b>2.5 Ensayos de motilidad</b> .....                                      | 49 |
| <b>2.6 Técnicas de genética molecular</b> .....                            | 49 |
| 2.6.1 Aislamiento de ADN genómico .....                                    | 49 |
| 2.6.2 Aislamiento de ADN plasmídico .....                                  | 49 |
| 2.6.3 Aislamiento de ARN .....   | 50 |
| 2.6.4 Precipitación de ADN .....   | 50 |
| 2.6.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....                      | 50 |
| 2.6.6 Cuantificación del ADN .....   | 51 |
| 2.6.6.1 Cuantificación en geles de agarosa .....                           | 51 |
| 2.6.6.2 Cuantificación espectrofotométrica .....                           | 51 |
| 2.6.7 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa ..... | 51 |
| 2.6.8 Reacciones enzimáticas con el ADN .....                              | 52 |
| 2.6.8.1 Restricciones .....  | 52 |

|  |    |
|--|----|
| 2.6.8.2 Obtención de extremos romos .....  | 52 |
| 2.6.8.3 Desfosforilación de vectores .....   | 52 |
| 2.6.8.4 Ligación .....   | 52 |
| 2.6.9 Construcción de una librería genómica .....  | 53 |
| 2.6.10 Métodos de transferencia genética .....   | 53 |
| 2.6.10.1 Transformación mediante electroporación .....                                       | 53 |
| 2.6.10.2 Conjugación en medio sólido .....   | 54 |
| 2.6.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....                                       | 54 |
| 2.6.11.1 Amplificación de fragmentos de ADN .....  | 54 |
| 2.6.11.2 Transcripción reversa (RT-PCR) .....  | 55 |
| 2.6.11.3 PCR semicuantitativa .....  | 56 |
| 2.6.12 Secuenciación de fragmentos de ADN .....  | 56 |
| 2.6.13 Software utilizado para el análisis de secuencias .....                               | 57 |
| 2.6.14 Detección de fragmentos de ADN .....  | 57 |
| 2.6.14.1 Preparación de sondas .....   | 57 |
| 2.6.14.2 <i>Colony blot</i> .....  | 58 |
| 2.6.14.3 <i>Dot blot</i> .....   | 58 |
| 2.6.14.4 <i>Southern blot</i> .....  | 59 |
| 2.6.15 Técnicas de mutagénesis .....   | 59 |
| 2.6.15.1 Mutagénesis dirigida por recombinación en un punto .....                            | 59 |
| 2.6.15.2 Mutagénesis dirigida por doble recombinación .....                                  | 60 |
| 2.6.16 Estudios de complementación de mutantes .....   | 62 |
| 2.6.17 Estudio de la expresión génica mediante el gen indicador <i>lacZ</i> .....            | 63 |
| 2.6.17.1 Construcción de fusiones transcripcionales promotor- <i>lacZ</i> .....              | 63 |
| 2.6.17.2 Ensayo de la actividad $\beta$ -galactosidasa .....                                 | 63 |
| <b>2.7 Técnicas experimentales con proteínas</b> .....                                       | 64 |
| 2.7.1 Cuantificación de proteínas por el método Bradford .....                               | 64 |
| 2.7.2 SDS-PAGE .....   | 65 |
| 2.7.3 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana ( <i>Western blotting</i> ) ..... | 66 |
| 2.7.3.1 Transferencia de proteínas a membrana por sistema semi-seco .....                    | 66 |
| 2.7.3.2 Inmunodetección y revelado colorimétrico .....                                       | 67 |
| 2.7.4 Obtención de proteínas bacterianas .....   | 68 |
| 2.7.4.1 Extractos de proteína celular total .....  | 68 |
| 2.7.4.2 Pilis purificados .....  | 68 |
| 2.7.4.3 Purificación y concentración de sobrenadantes .....                                  | 69 |
| 2.7.4.4 Obtención de flagelo .....   | 69 |
| <b>2.8 Métodos de análisis químico</b> .....   | 70 |
| 2.8.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) .....                 | 70 |
| <b>2.9 Estudio del lipopolisacárido</b> .....  | 72 |
| 2.9.1 Obtención del LPS a pequeña escala .....   | 72 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.9.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción del LPS .....  | 72  |
| <b>2.10 Microscopía</b> .....  | 73  |
| 2.10.1. Microscopía óptica .....   | 73  |
| 2.10.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....  | 73  |
| 2.10.2.1 Tinción negativa .....  | 73  |
| 2.10.2.2 Inmunomicroscopía mediante proteína A ligada a oro coloidal .....   | 73  |
| <b>2.11 Anticuerpos</b> .....  | 74  |
| <b>2.12 Ensayo de biofilms</b> .....   | 74  |
| <b>3. RESULTADOS</b> .....   | 77  |
| <b>3.1 Glicosilación del flagelo de la cepa AH-1 de <i>Aeromonas hydrophila</i></b> .....  | 77  |
| 3.1.1 Precedentes .....  | 77  |
| 3.1.1.1 WbpL .....   | 80  |
| 3.1.1.2 WbgZ .....   | 80  |
| 3.1.2 Estudio de la glicosilación de las flagelinas polares y laterales de la cepa AH-1 de <i>A. hydrophila</i> .....  | 81  |
| 3.1.2.1 Construcción y caracterización fenotípica de un mutante incapaz de formar el flagelo polar en la cepa de <i>A. hydrophila</i> AH-1 y en el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL..... | 82  |
| 3.1.2.2 Purificación del flagelo polar y lateral .....   | 84  |
| 3.1.2.3 Análisis de la glicosilación de las flagelinas polares en la cepa AH-1 .....   | 84  |
| 3.1.2.4 Análisis de la glicosilación de las flagelinas polares en el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL.....   | 88  |
| 3.1.2.5 Análisis de la glicosilación de las flagelinas laterales en los mutantes AH-1 $\Delta$ flaB-J y en el doble mutante AH-1 $\Delta$ wbpL $\Delta$ flaB-J .....               | 89  |
| 3.1.3 Genes implicados en la glicosilación de las flagelinas polares .....   | 90  |
| 3.1.3.1 Análisis de la glicosilación de las flagelinas polares en el mutante incapaz de producir el antígeno O:11 del LPS .....  | 90  |
| 3.1.3.2 Detección y análisis de los genes implicados en la biosíntesis del derivado del ácido pseudamínico.....  | 92  |
| 3.1.3.3 Obtención y caracterización de mutantes en genes implicados en la biosíntesis de ácido pseudamínico de la cepa AH-1 de <i>A. hydrophila</i> .....                          | 95  |
| 3.1.3.4 Construcción de un mutante en el gen <i>maf-1</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-1 .....   | 99  |
| <b>3.2 Fimbrias Msh de <i>Aeromonas hydrophila</i></b> .....   | 103 |
| 3.2.1 Análisis de las fimbrias expresadas en el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL .....   | 103 |
| 3.2.1.1 Obtención de una sonda específica para detectar una agrupación homóloga a AHA_0383-0399 en la cepa de <i>A. hydrophila</i> AH-1.....                                       | 104 |
| 3.2.1.2 Construcción de un mutante en el gen <i>mshM</i> en la cepa AH-1 $\Delta$ wbpL mediante recombinación homóloga en un punto.....  | 105 |
| 3.2.1.3 Caracterización fenotípica de los mutantes AH-1 $\Delta$ wbpL:: <i>mshM</i> y AH-1:: <i>mshM</i> .....   | 106 |
| 3.2.2 Clonaje de la agrupación <i>msh</i> de la cepa AH-1 de <i>A. hydrophila</i> .....  | 106 |
| 3.2.2.1 Hibridación de la librería genómica de la cepa de <i>A. hydrophila</i> AH-1.....   | 106 |
| 3.2.2.2 Secuenciación de la agrupación <i>msh</i> .....  | 107 |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 3.2.2.3    | Análisis de la agrupación génica <i>msh</i> de la cepa AH-1 de <i>A. hydrophila</i> .....  | 107        |
| 3.2.2.4    | Unidades transcripcionales independientes de la agrupación <i>msh</i> de la cepa AH-1 de <i>A. hydrophila</i> .....                        | 111        |
| 3.2.3      | Construcción de un mutante carente de los genes <i>mshL,M,N,E</i> en AH-1 y AH-1 $\Delta$ <i>wbpL</i> .....                                | 111        |
| 3.2.3.1    | Caracterización fenotípica de los mutantes AH-1 $\Delta$ <i>mshL-E</i> y AH-1 $\Delta$ <i>wbpL</i> $\Delta$ <i>mshL-E</i> .....            | 114        |
| 3.2.4      | Estudio de la pilina mayoritaria MshA .....  | 115        |
| 3.2.4.1    | Construcción de un mutante en el gen <i>mshA</i> en las cepas AH-1 y AH-1 $\Delta$ <i>wbpL</i> mediante doble recombinación.....           | 115        |
| 3.2.4.2    | Caracterización fenotípica de los mutantes AH-1 $\Delta$ <i>mshA</i> y AH-1 $\Delta$ <i>wbpL</i> $\Delta$ <i>mshA</i> .....                | 116        |
| 3.2.5      | Distribución de la agrupación <i>msh</i> en diferentes cepas de <i>Aeromonas</i> mesófilas .....   | 117        |
| 3.2.5.1    | Elaboración de sondas.....   | 117        |
| 3.2.5.2    | Hibridación con colonias.....  | 118        |
| 3.2.6      | Estudio de la cepa A62 de <i>A. hydrophila</i> como modelo de expresión constitutiva de fimbrias <i>msh</i> .....                          | 118        |
| 3.2.6.1    | Construcción de un mutante en el gen <i>mshM</i> en la cepa A62 de <i>A. hydrophila</i> .....  | 118        |
| 3.2.6.2    | Caracterización fenotípica del mutante A62:: <i>mshM</i> .....   | 119        |
| 3.2.7      | Estudio de la regulación de las fimbrias Msh en la cepa AH-1 de <i>A. hydrophila</i> .....   | 120        |
| 3.2.7.1    | Análisis de la transcripción de la agrupación <i>msh</i> mediante fusiones transcripcionales promotor- <i>lacZ</i> .....                   | 120        |
| 3.2.7.2    | Análisis transcripcional de la agrupación <i>msh</i> mediante RT-PCR semicuantitativa ...  | 122        |
| 3.2.7.3    | Análisis de la expresión de las fimbrias Msh en la cepa AH-1 .....   | 124        |
| 3.2.7.4    | Construcción de la fusión transduccional de la pilina MshA de la cepa AH-1 con una cola de histidinas .....                                | 126        |
| 3.2.7.5    | Análisis de la secreción y ensamblaje de las fimbrias Msh en la cepa AH-1 .....  | 127        |
| 3.2.8      | Ensayo de biofilms .....   | 129        |
| <b>4.</b>  | <b>DISCUSIÓN</b> .....   | <b>133</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Glicosilación del flagelo de la cepa AH-1 de <i>A. hydrophila</i></b> .....   | <b>133</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Estudio de las fimbrias Msh de <i>Aeromonas hydrophila</i></b> .....  | <b>137</b> |
| <b>4.3</b> | <b>La glicosilación como nexo de unión entre flagelo, LPS y fimbrias Msh en la cepa AH-1</b> .....   | <b>144</b> |
| <b>5.</b>  | <b>CONCLUSIONES</b> .....  | <b>151</b> |
| <b>6.</b>  | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | <b>155</b> |
| <b>7.</b>  | <b>ANEXOS</b> .....  | <b>279</b> |
| <b>7.1</b> | <b>Secuencia nucleotídica de la zona <i>neu-flm</i> adyacente a la región 2 de flagelo polar de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-1</b> ..... | <b>185</b> |
| <b>7.2</b> | <b>Secuencia nucleotídica de la agrupación génica de las fimbrias <i>msh</i> de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-1</b> .....                 | <b>201</b> |

**1-9**

2,3-DHB: ácido 2,3-dihidroxidobenzoico

**A-B**

Aa: aminoácido

ABC: casete de unión a ATP (*ATP-binding cassette*)

ADN: ácido desoxiribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNr: ADN ribosómico

ADP: adenosina difosfato

AHL: acil homoserin lactona

AMP: adenosina monofosfato

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

Amp: ampicilina

APS: persulfato de amonio

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

AT: autotransportador

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo (*American type culture collection*)

ATP: adenosina trifosfato

ATPasa: adenosina trifosfatasa

AVA: Autoridad veterinaria y del Sector Agroalimentario de Singapur (*Agri-Food and Veterinary Authority*)

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

BSA: albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*)

**C-D-E**

C-terminal: carboxi-terminal

c-di-GMP: 3',5'-diguanilato cíclico

CMP: citidina 5'-monofosfato

Col: colistina

DEPC: dietilpirocarbonato

DGC: *diguanylate cyclase*

DMF: dimetilformamida

DNasa: desoxiribonucleasa

ddNTP: didesoxinucleótido trifosfato

dGTP: desoxiguanina trifosfato

dNTP: desoxiribonucleótido trifosfato

dTDP: desoxitimidina 5'-difosfato

Da/kDa: Daltons / KiloDaltons

DO<sub>x</sub>: densidad óptica a una longitud de onda de x nanómetros

DTT: ditioneitol

EAL: *conserved protein domain with PDEA activity*

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético

EGTA: ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

EMBL: *the European molecular biology laboratory*

EPEC: *E. coli* enteropatogénica

**F-G**

FBS: suero fetal bovino (*fetal bovine serum*)

Fimbria S/R: corta y rígida (*Short/Rigid*)

Fimbria L/W: larga y flexible (*Long/Wavy*)

G+C: guanina + citosinas

GalNAc: N-acetilgalactosamina

GlcNAc: N-acetilglucosamina

GAP: proteína activadora de GTPasa (*GTPase activating protein*)

GFP: proteína fluorescente verde (*green fluorescence protein*)

GGDEF: *conserved protein domain with DGC activity*

GI: isla de glicosilación

GRAVY: promedio de hidrofobicidad (*grand average of hydropathy*)

GSP: sistema general de secreción (*general secretion pathway*)

GTP: guanosina trifosfato

GTPasa: guanosina trifosfatasa

## H-I-J-K

Hcp: *haemolysin coregulated protein*

HEp-2: células epiteliales humanas

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-piperacín-1-etano-sulfónico

HG: grupo de hibridación (*hybridization group*)

Hrp: respuesta de hipersensibilidad y patogénesis (*hypersensitive response and pathogenesis*)

IL-8: interleucina-8

IPTG: isopropil-B-D-tiogalactopiranosido

Kb: kilobases

Kdo: ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico

Km: kanamicina

## L-M

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

LC-MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LOS: lipooligosacárido

LPS: lipopolisacárido

tipo S: liso (*smooth*)

tipo R: rugoso (*rough*)

μ: micro

M: molar

*Maf*: *motility accessory factor*

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*)

MEM: medio mínimo esencial

MS: espectrometría de masas (*mass spectrometry*)

MSHA: *mannose-sensitive hemagglutinin*

## N-O

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NBT: disodio-nitroazul tetrazolio

NF-κB: factor nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*)

NET: tampón cloruro sódico-tris-EDTA

NDP: nucleósido difosfatasa

nm: nanómetro

NMWL: peso molecular nominal límite (*nominal molecular weight limit*)

NTP: nucleósido trifosfatasa

N-terminal: amino-terminal

ORF: pauta de lectura abierta (*open reading frame*)

## P-Q

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PDHc: complejo piruvato deshidrogenasa

pI: punto isoeléctrico

*Pilus Bfp*: *Bundle-forming pilus*

*Pilus Tap*: *pilus* de tipo IV de *Aeromonas* (*type IV Aeromonas pilus*)

*PilZ*: *conserved protein domain that binds c-di-GMP*

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

PDEA: *phosphodiesterase A*

PLC: fosfolipasa C

PM: peso molecular

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro

Pse5Ac7Ac: ácido pseudamínico

## R-S

RBS: sitio de unión a ribosoma (*ribosome binding site*)

Rif: rifampicina

RFLP: polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*)

Rha: ramnosa

rpm.: revoluciones por minuto  
 RT-PCR: retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa  
 SDS: sodio dodecil sulfato  
 SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato  
 Ser: serina  
 SLS: lauril sarcosinato sódico  
 Spc: spectinomicina  
 SRP: partícula de reconocimiento de señal (*signal recognition particle*)  
 SSC: Tampón citrato de sodio salino  
 st: estándar

## **T-U-V-W-X-Y-Z**

T3SS: sistema de secreción de tipo III (*type III secretion system*)  
 T6SS: sistema de secreción de tipo VI (*type VI secretion system*)  
 TAE: tampón Tris-acetato-EDTA  
 Tat: translocación mediante motivo de dos argininas (*twin arginine translocation*)  
 TBE: tampón Tris-borato-EDTA  
 Tc: tetraciclina  
 TCA: ácido tricloroacético  
 TCP: *toxin coregulated pilus*  
 TE: tampón Tris-EDTA  
 TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina  
 Thr: treonina  
 Tm: temperatura hibridación ADN/cebador  
 TPR: repeticiones tetratricopéptido (*TetratricoPeptide Repeats*)  
 Tris: Tris (hidroximetil) aminometano  
 TSA: agar de triptona y soja (*tryptic soy agar*)  
 TSB: caldo de triptona y soja (*tryptic soy broth*)  
 U: unidad  
 UDP: uridina 5'-difosfato  
 Und-P: undecaprenil fosfato  
 Und-PP: undecaprenil pirofosfato





# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 La familia *Aeromonadaceae*

### 1.1.1 Taxonomía

Desde la primera referencia de un organismo móvil que podía considerarse de la familia *Aeromonadaceae* en 1891, la taxonomía del género *Aeromonas*, iniciada en 1943, es compleja y cambia constantemente. Aunque históricamente el género *Aeromonas* fue incluido en la familia *Vibrionaceae*, junto con el género *Vibrio*, *Photobacterium* y *Plesiomonas*, investigaciones filogenéticas indicaron que debía formar su propia familia: *Aeromonadaceae* (Colwell *et al.*, 1986).

La familia *Aeromonadaceae* está constituida de bacilos Gram-negativos, oxidasa y catalasa positivos, quimioorganotrofos anaerobios facultativos, capaces de catabolizar tanto la glucosa como numerosos carbohidratos con producción de ácidos y frecuentemente gas, reductores de nitratos a nitritos (aunque no tienen actividad desnitrificante) y con una temperatura óptima de crecimiento de 22-28°C. Los integrantes del género *Aeromonas* son generalmente móviles por flagelación polar, habiéndose descrito *A. salmonicida* y *A. media* como especies no móviles. Inicialmente, en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey esta familia únicamente incluía el género *Aeromonas* y fue dividida en dos subgrupos: las especies no mótilas y psicrófilas (*A. salmonicida*) y las especies mótilas y mesófilas (*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*) (Popoff, 1984). La actual edición consta con tres géneros en esta familia: *Aeromonas*, *Oceanimonas* y *Tolumonas* (Martin-Carnahan and Joseph, 2005).

Las primeras clasificaciones dentro del género *Aeromonas* se llevaron a cabo mediante características fenotípicas, generándose las denominadas fenoespecies en base a pruebas bioquímicas. No obstante, debido a la heterogeneidad fenotípica encontrada y al creciente número de especies reconocidas, existe una gran dificultad en la identificación de las cepas de *Aeromonas* a nivel de especie mediante características bioquímicas (Abbott *et al.*, 2003). Uno de los mayores logros en el proceso taxonómico fue la introducción y validación de métodos genotípicos, estableciéndose grupos de hibridación (HG) o genoespecies mediante pruebas de hibridación de ADN total. Las genoespecies se han ido asociando a especies fenotípicas determinadas, pero todavía quedan genoespecies sin fenoespecie asociada y viceversa. Sin embargo, la identificación de algunas especies seguía suponiendo un problema debido a que existían

discrepancias entre los grupos fenotípicos y genotípicos. Una herramienta útil para la clasificación de las cepas del género *Aeromonas* fue el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S (Martínez-Murcia *et al.*, 1992a). Posteriormente, se desarrolló un método rápido y de relativo bajo coste basado en el análisis de los patrones RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de determinadas regiones, amplificadas por PCR, de los genes ADNr 16S (Martínez-Murcia *et al.*, 1992a; Figueras *et al.*, 2000). Más recientemente, se ha propuesto el análisis de las secuencias de genes esenciales (*housekeeping*), como el gen *gyrB*, que codifica la subunidad B de la ADN girasa, y el gen *rpoD*, que codifica el factor  $\sigma^{70}$  de la ARN polimerasa (Yáñez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004), ya que estos genes presentan una mayor tasa de sustitución nucleotídica respecto al gen ADNr 16S.

De acuerdo con la última edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (Martin-Carnahan and Joseph, 2005), el género *Aeromonas* comprende las siguientes 17 especies (entre paréntesis se indica el grupo de hibridación del ADN): *A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2), *A. salmonicida* (HG3), *A. caviae* (HG4), *A. media* (HG5), *A. eucrenophila* (HG6), *A. sobria* (HG7), *A. veronii* [(bv. *sobria* (HG8) and bv. *veronii* (HG10)], *A. jandaei* (HG9), *A. schubertii* (HG12), *A. trota* (HG14), *A. allosaccharophila* (HG15) (Martínez-Murcia *et al.*, 1992b), *A. encheleia* (HG16) (Esteve *et al.*, 1995) y *A. popoffii* (HG17) (Huys *et al.*, 1997); y recientemente han sido descritas tres nuevas especies: *A. culicicola* (Pidiyar *et al.*, 2002), *A. simiae* (Harf-Monteil *et al.*, 2004) y *A. molluscorum* (Miñana-Galbis *et al.*, 2004). Dos grupos de hibridación de ADN, *Aeromonas* sp. HG11 y *Aeromonas* sp. HG13 (previamente Grupo Entérico 501) aún no tienen asociada una especie concreta.

### 1.1.2 Hábitat

Las bacterias del género *Aeromonas* ocupan una enorme diversidad de hábitats, aunque el medio acuático, principalmente aguas dulces e interfase agua dulce-agua marina, se ha descrito como su hábitat natural. De este modo, se han aislado cepas del género de gran cantidad de ambientes acuáticos: pozos, piscifactorías, piscinas, ríos, lagos, pantanos, aguas residuales, playas, estuarios y aguas potables, tanto cloradas como no cloradas, alrededor de todo el mundo, pero con mayor frecuencia durante los meses más cálidos del año (Janda and Abbott, 1998).

También es frecuente aislar cepas de *Aeromonas* de alimentos frescos, tales como carnes, pescados, mariscos o vegetales, o preparados, como salsas, helados o productos de pastelería, cuya presencia ha sido atribuida al contacto del alimento con agua contaminada (Merino *et al.*, 1995). En consecuencia, este género potencialmente podría representar un problema serio en alimentos, dado que muchas cepas pueden crecer a temperaturas de refrigeración (4-7°C), en condiciones de pH de 4-10, bajo la mayoría de atmósferas utilizadas para la preservación de alimentos y en presencia de una elevada concentración de sal (Kirov, 1997). Además se ha visto que este género también es capaz de producir exotoxinas a bajas temperaturas (Majeed *et al.*, 1990).

### **1.1.3 Patogenicidad y epidemiología**

Las especies del género *Aeromonas* se reconocen desde hace más de 100 años como patógenos de animales poiquiloterms, incluyendo anfibios, peces y reptiles; y también se han asociado con infecciones en aves y mamíferos.

Las especies de este género son consideradas agentes etiológicos de numerosas patologías en peces de interés en acuicultura, causando infecciones que suponen significativas pérdidas económicas (Austin *et al.*, 1998). La especie psicrófila *A. salmonicida* se considera el principal agente causal de la furunculosis en piscifactorías de zonas frías, donde el cultivo de trucha y salmón está muy extendido. La furunculosis se caracteriza por producir letargo, y múltiples hemorragias en aletas, ano y músculo; a nivel interno, produce hemorragias en hígado y bazo, y necrosis en riñón (McCarthy, 1975). Por otro lado, *A. hydrophila* y *A. jandaei* son causantes de aeromoniasis en especies de peces cultivadas en zonas templadas, tales como la anguila, la carpa o el pez gato (Janda, 1991). La aeromoniasis es una septicemia hemorrágica que se caracteriza por la presencia de pequeñas lesiones superficiales, a menudo precedidas por la pérdida de escamas, hemorragias en agallas y ano, úlceras, abscesos, exoftalmia y distensión abdominal. A nivel interno, se puede observar anemia, e hinchamiento de hígado y riñón (Miyazaki and Kaige, 1985).

Las *Aeromonas* mesófilas están emergiendo como un importante patógeno en humanos, causando una variedad de infecciones extraintestinales y sistémicas, así como gastrointestinales. Aproximadamente un 85% de los aislados clínicos de este género corresponden a dos especies y a un único biotipo de una tercera especie: *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bv. Sobria (Janda, 1991). Entre las infecciones extraintestinales se

incluyen: septicemia, provocada por la diseminación en el organismo desde el tracto intestinal al sistema circulatorio, normalmente observada en pacientes inmunocomprometidos; infección de heridas, la mayoría infecciones cutáneas superficiales, pero también infecciones en tendones, músculos y huesos; infecciones en el tracto respiratorio, desde epiglotitis hasta neumonía; y, con menor frecuencia, meningitis, peritonitis, infecciones oculares y síndrome hemolítico urémico (Janda and Abbott, 1998). La enfermedad más común causada por *Aeromonas* es la gastroenteritis que puede dar lugar a procesos diarreicos que van desde una forma de diarrea líquida autolimitante hasta una diarrea más severa e invasiva. Estos procesos entéricos se dan en todos los grupos de edad, aunque la población más afectada es la infantil, en particular niños menores de 2 años. En los últimos años se han documentado casos de diarrea del viajero causada por *Aeromonas* (Vila *et al.*, 2003). A pesar de todo, el poder enteropatógeno de estos microorganismos todavía permanece en controversia debido a que no se han documentado grandes brotes epidémicos y, a nivel experimental, no se dispone de un modelo animal adecuado para reproducir la sintomatología diarreica observada en el ser humano (Janda and Abbott, 1998).

## **1.2 Factores de virulencia en *Aeromonas* mesófilas**

Las infecciones microbiológicas implican la interacción entre huésped y patógeno. Los microorganismos usan sus propias estrategias de supervivencia y multiplicación, luchando contra los mecanismos de defensa del sistema inmune del huésped. Las manifestaciones clínicas observadas en infecciones por *Aeromonas* sugieren que éstas son procesos multifactoriales, debidos a la existencia de una compleja red de mecanismos de patogenicidad que deberían ser estudiados de un modo integral. Además, recientemente se ha observado que la virulencia, en este género, es dependiente de la cepa bacteriana, la ruta de infección y el animal utilizado como modelo (Yu *et al.*, 2005).

A lo largo de los últimos años ha habido un gran incremento en el número de genomas secuenciados de diferentes bacterias en las bases de datos. Esta información permite un mejor entendimiento aunque con ciertos límites. Hasta la fecha se han secuenciado dos genomas completos del género *Aeromonas*: la cepa A449 de *A. salmonicida*, subespecie *salmonicida* (Reith *et al.*, 2008), y la cepa ATCC 7966<sup>T</sup> de *Aeromonas hydrophila* (Seshadri *et al.*, 2006). Esta información es de gran valor, aunque hay una gran

diversidad dentro del género, y algunos factores de virulencia no están presentes en estas cepas o éstas muestran diferentes mecanismos para infectar el huésped en comparación con otras.

Los principales factores de virulencia descritos en *Aeromonas* spp. son la cápsula, la lámina S, las fimbrias y otras adhesinas no filamentosas, el lipopolisacárido, la flagelación polar y lateral, los sistemas de captura de hierro, el sistema de secreción de tipo III y de tipo VI y la secreción de otras exotoxinas y enzimas extracelulares.

### **1.2.1 Cápsula**

La cápsula es una estructura polisacáridica que recubre la membrana externa de la célula bacteriana. Está altamente hidratada (aproximadamente un 95% es agua) y se compone de repeticiones de monosacáridos unidos entre sí mediante enlaces glicosídicos, pudiendo dar lugar a homo o heteropolímeros. La variedad de monosacáridos que pueden formarla y la unión entre éstos, o sus posibles modificaciones, contribuyen a una elevada diversidad y una complejidad estructural adicional (Roberts, 1996).

Frecuentemente, esta estructura constituye la capa más externa de la célula y, como tal, participa en la interacción de la bacteria con el ambiente. En consecuencia, se ha descrito como un factor de virulencia importante en diversos patógenos, ya que contribuye a la resistencia a la acción del complemento y a la fagocitosis, favorece la adherencia a otras bacterias o tejidos del huésped, y actúa como barrera frente a moléculas hidrofóbicas tóxicas. Además, se ha utilizado para la clasificación dentro de un mismo género debido a sus propiedades antigénicas (antígenos K).

En *Aeromonas salmonicida* se había documentado la capacidad de formar cápsula tanto *in vitro* (en un medio rico en glucosa) como *in vivo*, y el papel de esta estructura como factor de virulencia, ya que su presencia reducía la opsonización, impidiendo la fagocitosis (Garrote *et al.*, 1992; Garduño *et al.*, 1993; Merino *et al.*, 1994), y favorecía la invasión en líneas celulares de peces (Merino *et al.*, 1996a). Recientemente, se ha descrito su estructura química, que consiste en unidades repetitivas de un trisacárido lineal, y es idéntica a la del antígeno O del lipopolisacárido producido en las mismas condiciones (Wang *et al.*, 2004). Dicho polisacárido capsular es detectado *in vitro* en



crecimientos en medio sólido TSA (*Tryptic Soy Agar*), pero no en medio líquido TSB (*Tryptic Soy Broth*).

Entre las *Aeromonas* spp. mesófilas, *A. hydrophila* AH-3 (serogrupo O:34) y *A. veronii* bv. *sobria* (serogrupo O:11) también son capaces de producir cápsula cuando crecen en medio rico en glucosa (Martínez *et al.*, 1995). Las cepas PPD134/91 y JMC3980 de *A. hydrophila* (serogrupo O:18) también producen polisacáridos capsulares, siendo la cepa PPD134/91 donde se ha descrito por primera vez, dentro del género, una agrupación génica que incluye los genes de biosíntesis y exportación de la cápsula. Su organización genética, en tres regiones, es similar al grupo II de polisacáridos capsulares de otras bacterias como *Escherichia coli* (Zhang *et al.*, 2002).

### 1.2.2. Lámina S

La lámina S es una matriz proteica de naturaleza paracristalina, producida por una gran variedad de bacterias, que forma una envuelta externa a la pared celular. Su análisis químico ha demostrado que están constituidas por monómeros de una única proteína o glicoproteína (40-200 kDa), que se autoensamblan constituyendo una estructura supramolecular con una morfología ultraestructural precisa. La lámina S tiene un grosor de 5 a 10 nm y presenta poros de idéntico tamaño (diámetro 2-8 nm) y morfología. Se ha asociado con diversas funciones relacionadas con patogenicidad. Debido a su posición en la superficie celular se ha descrito que cumple diversas funciones biológicas: adhesión, protección frente al complemento y fagocitosis, propiedades antigénicas, lugar de anclaje de exoenzimas hidrolíticos y receptor de bacteriófagos, entre otras (Beveridge *et al.*, 1997).

En 1981, Kay y colaboradores, mediante microscopía electrónica de transmisión, identificaron una lámina externa a la pared celular, inicialmente llamada lámina A, que se asoció con la virulencia de *A. salmonicida* (Kay *et al.*, 1981). Estudios posteriores, permitieron la identificación de la proteína constituyente y la secuenciación del gen codificante de la misma, *vapA* (Kay *et al.*, 1984). Además se observó la pérdida de dicha lámina cuando esta especie crecía a temperaturas superiores a 25°C, debido a una delección del material genético (Belland and Trust, 1987). Paralelamente, también se identificaron las láminas S de algunas cepas de *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria*, todas pertenecientes al serogrupo O:11, y el gen codificante fue denominado *ahsA* (Dooley and Trust, 1988; Janda *et al.*, 1987). Aunque estas láminas son parecidas a

nivel morfológico a la de *A. salmonicida*, son diferentes a nivel genético y funcional y, consecuentemente, podrían desempeñar papeles distintos en la patogenicidad (Noonan and Trust, 1997). Recientemente, se ha descrito la presencia de lámina S en aislados patógenos de *A. hydrophila* pertenecientes a los serogrupos O:14 y O:81 (Esteve *et al.*, 2004).

La lámina S de *Aeromonas* se compone de diversas subunidades de una única proteína que se autoensamblan para formar un complejo tetragonal que envuelve a la célula por completo (figura 1.1), y constituye el antígeno superficial predominante de las células que la poseen (Chu *et al.*, 1991). Anticuerpos policlonales contra la lámina S han permitido desarrollar un método para la detección de las aeromonadas O:11 en alimentos, mediante la realización de un ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) (Merino *et al.*, 1993a).



**Figura 1.1** Tinción negativa de lámina S de *A. hydrophila*. Barra = 10 nm. Noonan, 1997.

Estudios de secreción, realizados en diferentes especies de *Aeromonas*, de la proteína implicada en la formación de las láminas, muestran que el paso a través de la membrana plasmática implica el corte de un péptido señal durante dicho proceso. La salida desde el periplasma hacia el exterior requiere la acción de diferentes proteínas de secreción que muestran homología con componentes del sistema de secreción de tipo II, aunque son específicas de las subunidades de la lámina S, habiéndose demostrado que la mutagénesis de éstas no altera la secreción de sustratos de tipo II (Thomas and Trust, 1995; Noonan and Trust, 1995).

En *A. salmonicida* la lámina S facilita la unión a macrófagos, una porfirinas (Kay *et al.*, 1985) e inmunoglobulinas (Phipps and Kay, 1988), protege de la acción de las proteasas, y es capaz de unirse a una gran variedad de proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno IV y la laminina (Trust *et al.*, 1993). La presencia de lámina S en las *Aeromonas* spp. mesófilas pertenecientes al serogrupo O:11 incrementa la capacidad de adhesión de estas células, contribuyendo a la colonización de mucosa intestinal, pudiendo ser ésta la explicación del frecuente aislamiento de este serotipo en pacientes con gastroenteritis. Además, parece que la lámina S proporciona una mayor

resistencia a la opsonofagocitosis, hecho que podría facilitar la diseminación sistémica después de la invasión a través de la mucosa gastrointestinal (Merino *et al.*, 1995). Tanto en *A. salmonicida* como en *Aeromonas* mesófilas del serotipo O:11, la pérdida de la lámina se ha asociado con la disminución de la virulencia.

Hasta el momento, todas las cepas de *Aeromonas* que poseen lámina S tienen en común la presencia de un lipopolisacárido (LPS) que contiene polisacáridos O de longitud de cadena homogénea en su superficie celular, y este hecho ha llevado a especular sobre la posible implicación del LPS en la unión de la lámina a la superficie celular bacteriana (Kokka *et al.*, 1990; Esteve *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Lipopolisacárido (LPS)

El lipopolisacárido, también conocido como endotoxina, es un complejo glucolipídico que constituye el componente mayoritario de la capa externa de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Se diferencia en tres regiones: el lípido A, el núcleo del LPS, a su vez subdividido en núcleo interno y núcleo externo, y el antígeno O o polisacárido O (Raetz and Whitfield, 2002) (figura 1.2). La morfología de las colonias de las cepas que presentan las tres regiones del LPS muestran un fenotipo de tipo S (*Smooth*), mientras que la pérdida del polisacárido O dan lugar a un fenotipo R (*Rough*) (Whitfield *et al.*, 1997). Sin embargo, algunas bacterias patógenas de las mucosas, como *Haemophilus* y *Neisseria*, no presentan antígeno O, sino que producen lipooligosacáridos (LOS), formados por un lípido A y un núcleo interno desde donde se extienden una o varias ramificaciones mono u oligosacáridicas (Raetz and Whitfield, 2002).

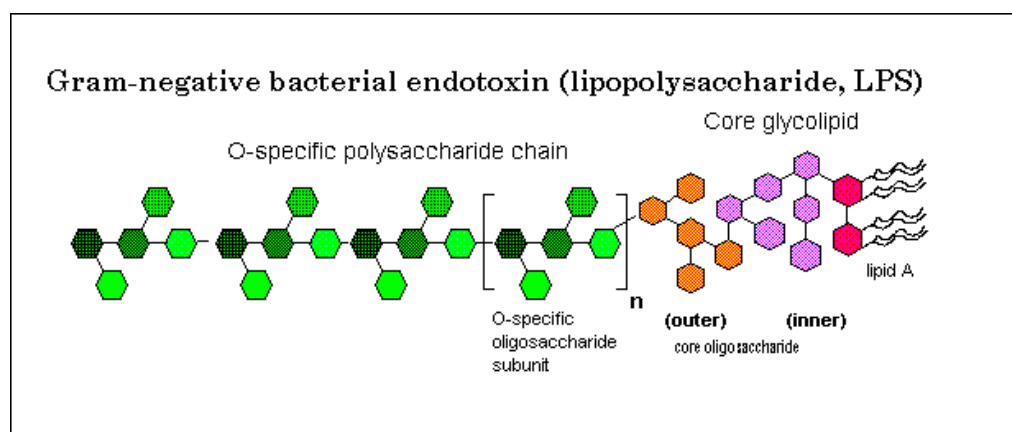


Figura 1.2 Estructura general del LPS

- I) El lípido A es una estructura altamente conservada y ligada covalentemente al complejo polisacárido. Es el componente lipídico del LPS y permite el anclaje del LPS en la capa externa de la membrana externa. Consiste de un dímero fosforilado de N-acetilglucosamina con 6 o 7 ácidos grasos saturados anclados. Algunos están anclados directamente al dímero y otros están esterificados a los 3-hidroxi ácidos grasos que hay presentes. Su actividad biológica parece depender de una peculiar conformación que está determinada por el disacárido de glucosamina, los grupos fosfato, las cadenas aciladas y el ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico (Kdo) del núcleo interno. Las propiedades endotóxicas del LPS son debidas a este lípido A que, liberándose a causa de la lisis celular (de ahí el nombre endotoxina), es capaz de provocar una importante inflamación sistémica conocida como *shock* séptico o endotóxico.
  
- II) El núcleo se puede dividir en dos regiones, según su composición de azúcares: el núcleo interno y el núcleo externo. El núcleo interno está anclado al lípido A en la posición 6' de una N-acetilglucosamina y todos los núcleos internos conocidos contienen Kdo o un residuo derivado (ácido 3-glicero-D-talo-octulosónico). Además, la estructura basal del núcleo interno contiene típicamente L-glicero-D-manoheptosa (L, D-Hep), aunque algunas bacterias tienen D-glicero-D-manoheptosa (D, D-Hep) sola o en combinación con L, D-Hep mientras que otras bacterias no poseen heptosas, como es el caso de *Rhizobium* (Kadrmaz *et al.*, 1996). Dentro de un género o una familia, la estructura del núcleo interno tiende a ser altamente conservada. Por el contrario, el núcleo externo proporciona anclaje al antígeno O y muestra una mayor diversidad estructural, aunque la variación entre especies (o incluso géneros) también es bastante limitada.
  
- III) El polisacárido O (antígeno O) está anclado normalmente a un residuo terminal del núcleo externo y consiste en unidades oligosacáridicas repetidas, generalmente formadas por 3-6 azúcares (unidades O). Las cadenas individuales varían en longitud alcanzando hasta 40 repeticiones, constituyendo el dominio hidrofílico de la molécula de LPS, así como el mayor determinante antigénico de la pared celular de las bacterias Gram-negativas. Esta estructura es altamente polimórfica, incluso a nivel

intraespecífico, debido a la diversidad de monosacáridos que la pueden formar, la variación de uniones que pueden darse entre éstos o la longitud total de la cadena (Reeves *et al.*, 1996).

El primer esquema útil para el serotipado de cepas de *Aeromonas* incluía 44 serogrupos basados en antígenos O de un total de 307 cepas de *A. hydrophila* y *A. caviae* (Sakazaki and Shimada, 1984). Posteriormente, se ampliaron a 97 serogrupos O (Thomas *et al.*, 1990). Más del 60% de los casos de septicemia están relacionados con cuatro de estos serogrupos (O:11, O:16, O:18 y O:34) (Janda and Abbot, 1998). El serogrupo O:11 se ha relacionado con infecciones severas en humanos como septicemia, meningitis y peritonitis, mientras que el serogrupo O:34, el más común entre las *Aeromonas* mesófilas, se ha asociado con infecciones de heridas en humanos y brotes septicémicos en peces (Janda *et al.*, 1996).

En los serogrupos O:13, O:33, O:34 y O:44 se ha observado cambios fenotípicos en el LPS como consecuencia de una adaptación térmica. Así, temperaturas elevadas (37°C) provocan un aumento de los niveles de algunos ácidos grasos saturados del lípido A (Merino *et al.*, 1992), y en relación con el antígeno O, predominan las formas S del LPS en crecimientos a 20°C o 37°C con elevada osmolaridad, mientras que en crecimientos a 37°C y baja osmolaridad predominan las formas del tipo R (Aguilar *et al.*, 1997).

Se ha caracterizado la estructura química del lípido A, del núcleo del LPS y del antígeno O de *A. hydrophila* O:34 (Knirel *et al.*, 2004; Knirel *et al.*, 2002) y de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Wang *et al.*, 2006a; Wang *et al.*, 2006b; Wang *et al.*, 2005), presentando ésta última una estructura similar a la de *A. hydrophila* y diferenciándose sólo en un fragmento trisacáridico del extremo del núcleo externo. Además, se han descrito las estructuras químicas del antígeno O:11 de *A. hydrophila* LL1 (Dooley *et al.*, 1985).

Además, se ha descrito los genes de biosíntesis del antígeno O en la cepa PPD134/91 de *A. hydrophila* (serogrupo O:18) y AH-3 (serogrupo O:34) (Zhang *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2008). Como sucede en otras agrupaciones de biosíntesis de polisacáridos, se han encontrado tres clases de genes: genes que codifican enzimas implicadas en las rutas de biosíntesis de los precursores azúcar nucleótido,

genes que codifican glicosiltransferasas y genes cuyos productos son necesarios para la translocación y la polimerización del antígeno O.

El LPS de *Aeromonas* spp. presenta propiedades endotóxicas similares a las observadas en otras bacterias Gram-negativas. El lípido A actúa como mitógeno T independiente produciendo activación policlonal de células B y una respuesta predominante de inmunoglobulinas M. Además, se ha observado una gran variedad de efectos tras su inyección en animales: pirogenicidad, leucopenia seguida de leucocitosis, *shock* séptico, necrosis hemorrágica de tumores, diarrea e incluso muerte (Morrison, 1983; Merino *et al.*, 1995). Por otro lado, el LPS de tipo S protege a la bacteria del efecto bactericida del suero no inmune, debido a que largas cadenas de antígeno O provocan la unión de C3b (componente del complemento) lejos de la membrana y previenen la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-9), evitando la lisis celular (Albertí *et al.*, 1996). Además, las cadenas largas de antígeno O proporcionan una mayor actividad hemolítica, un aumento de la virulencia en peces y ratones (Merino *et al.*, 1992), y un incremento de la adhesión a células epiteliales humanas (Aguilar *et al.*, 1997) a cepas del serotipo O:34, considerándose un importante factor de colonización *in vivo* (Merino *et al.*, 1996b).

#### **1.2.4. Sistemas de captación de hierro**

Numerosos ambientes contienen una concentración de hierro libre inferior a 1  $\mu\text{M}$ , que es la considerada indispensable para el crecimiento óptimo de los microorganismos (Neilands, 1995). La baja disponibilidad de hierro libre dificulta, pero no impide, el crecimiento y la patogenicidad bacteriana. Los microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten extraer el hierro del huésped y de los polímeros insolubles del ambiente: las modificaciones reductivas del hierro, los sistemas de transporte de iones ferrosos o los sideróforos. La competición por el hierro entre un huésped vertebrado y un microorganismo invasor es uno de los puntos donde se puede decidir el avance de una infección. Debido a la presencia de las proteínas de unión a hierro del huésped, como por ejemplo la hemoglobina (con sus grupos hemo), la transferrina, la lactoferrina o la ferritina, el hierro está poco accesible *in vivo*. En suero, las concentraciones de hierro libre están muy lejos de los mínimos requeridos para el crecimiento durante la infección de muchas bacterias. Esta capacidad de privar a un

microorganismo de un nutriente esencial para el crecimiento, como por ejemplo el hierro, se conoce como inmunidad nutricional (Stintzi and Raymond, 2000). Por tanto, los mecanismos para la captación del hierro del huésped que presentan las bacterias durante una infección se consideran esenciales para la virulencia.

Se conocen dos sistemas de captación de hierro en cepas de *Aeromonas*, uno dependiente y otro independiente de sideróforo (Byers *et al.*, 1991). Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que presentan grupos funcionales con elevada afinidad y especificidad por los iones ferrosos, y necesitan de receptores en la membrana celular de las bacterias para poder llevar a cabo su función, así como un aparato asociado a la célula para incorporar el metal en el metabolismo bacteriano.

La mayoría de *Aeromonas* mesófilas producen uno de los dos tipos de sideróforos: enterobactina o amonobactina, pero nunca los dos a la vez. El sideróforo enterobactina es sintetizado por diferentes bacterias Gram-negativas, mientras que el sideróforo amonobactina es producido exclusivamente por aeromonadas (Zywno *et al.*, 1992). Ambos sideróforos son de tipo catecolato, ya que están formados por ácido 2,3-dihydroxidobenzoico (2,3-DHB) conjugado con aminoácidos (Telford and Raymond, 1998). Su biosíntesis en *Aeromonas* spp. está codificada por dos agrupaciones génicas diferentes: la agrupación *amo*, presente en las cepas productoras de amonobactina, y la agrupación *aeb* (*Aeromonad Enterobactin Biosíntesis*), propia de las productoras de enterobactina (Massad *et al.*, 1994). El receptor de la amonobactina de *A. hydrophila* presenta baja especificidad, cosa que le permite transportar un amplio rango de sideróforos, con grupos quelantes tan variados como catecolato, hidroxamato o hidroxipiridonato (Stintzi and Raymond, 2000).

Recientemente se ha descrito la agrupación génica implicada en la biosíntesis de sideróforos de tipo catecolato en *A. salmonicida* (Najimi *et al.*, 2009).

Los mecanismos independientes de sideróforos consisten en proteínas de membrana externa capaces de unir grupos hemo del huésped (Stintzi and Raymond, 2000).

### 1.2.5 Sistemas de secreción

Las bacterias Gram-negativas tienen una membrana citoplasmática, una fina capa de peptidoglicano y una membrana externa que contiene el lipopolisacárido. El espacio entre la membrana citoplasmática y la membrana externa se conoce como espacio periplasmático. Con el fin de transportar proteínas desde el citoplasma hacia el espacio extracelular, las bacterias Gram-negativas han desarrollado diferentes sistemas de secreción (Henderson *et al.*, 2004): los sistemas de secreción de tipo I, II, III, IV, V y VI. Esta clasificación está basada en el transporte de las proteínas a través de la membrana externa, por lo que sólo es válida en microorganismos Gram-negativos, y se refiere a la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y a las reacciones que catalizan.

Todas estas vías de secreción se pueden subdividir en dos grandes grupos en función del mecanismo utilizado para el transporte a través de la membrana interna: las vías Sec-dependientes y las vías Sec-independientes (Kostakioti *et al.*, 2005). Las vías Sec-dependientes utilizan el sistema de exportación Sec, en el que las proteínas a exportar presentan un péptido señal en el extremo N-terminal. Las vías Sec-dependientes incluyen los sistemas de secreción tipo II y V. Por el contrario, en las vías Sec-independientes, los sustratos pueden salir del citoplasma al espacio extracelular en un único paso, sin necesidad de un intermediario citoplasmático. Estas vías incluyen los sistemas de secreción de tipo I, III, IV y VI. No obstante, el sistema de secreción de tipo IV también puede utilizar una vía Sec-dependiente.

Se conoce una vía Sec-independiente alternativa que consiste en el reconocimiento de una secuencia señal en la que existen dos argininas “gemelas” y que permite transportar proteínas en su configuración nativa a través de la membrana interna (Palmer and Berks, 2003). Este sistema se conoce con el nombre de Tat (*Twin Arginine Translocation*).

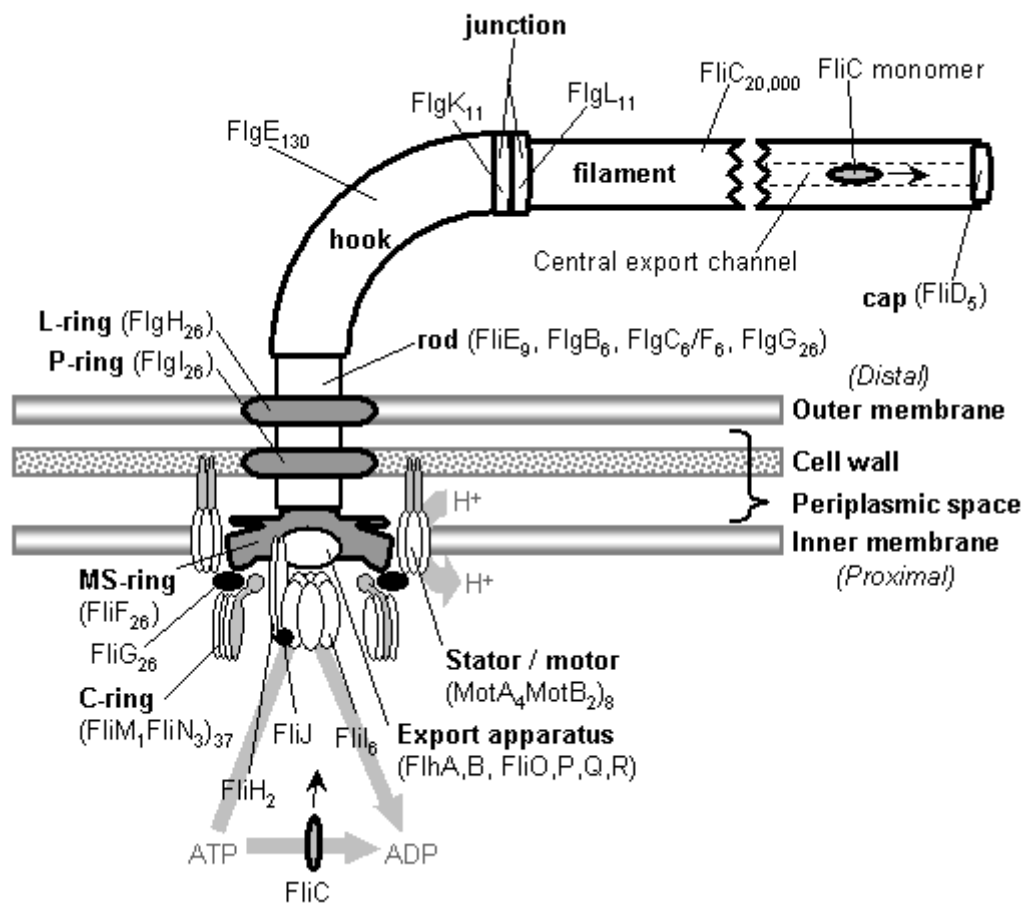
Los sistemas de secreción de tipo III y de tipo VI (T3SS y T6SS, respectivamente) juegan un papel importante en la virulencia de muchas bacterias Gram-negativas. Normalmente se activan por contacto con las células diana inyectando toxinas de naturaleza proteica, llamadas efectores, directamente en el citosol de la célula huésped.



Se ha descrito la presencia de un sistema de secreción de tipo III funcional en *A. salmonicida* (Burr *et al.*, 2002) y en las cepas AH-1, AH-3 y SSU de *A. hydrophila* (Yu *et al.*, 2004; Vilches *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2005). También se han descrito cuatro proteínas efectoras en *A. salmonicida*: AexT, AopP, AopO y AopH (Braun *et al.*, 2002; Dacanay *et al.*, 2006; Fehr *et al.*, 2006), y una, AexT y AexU en las cepas AH-3 y SSU de *A. hydrophila*, respectivamente (Vilches *et al.*, 2007; Sha *et al.*, 2007; Sierra *et al.*, 2007). AexT es una toxina bifuncional con actividad ADP-ribosiltransferasa y GAP (proteína activadora de GTPasa), siendo la finalidad de estas funciones la desorganización del citoesqueleto de actina de la célula huésped (Fehr *et al.*, 2007). AopP modula la respuesta inflamatoria y la señalización celular, mediante el control de citoquinas, MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) y el factor transcripcional NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) (Fehr *et al.*, 2006).

### 1.2.6 Flagelo

El flagelo bacteriano es un apéndice largo (15-20  $\mu$ m de longitud) y delgado (aproximadamente 20 nm de diámetro), de naturaleza proteica, con capacidad de rotación y que permite la propulsión de la célula. En esta estructura, se distinguen tres regiones: el cuerpo basal, el gancho y el filamento (figura 1.3). El cuerpo basal se encuentra embebido en las envueltas bacterianas y, en bacterias Gram-negativas, está constituido por un cilindro axial y cuatro anillos. Los dos anillos externos, L y P, reciben su nombre por la asociación al lipopolisacárido y al peptidoglicano respectivamente, mientras que el anillo interno MS (formado por dos anillos juntos), está en contacto con la membrana plasmática. Existe un anillo adicional, el anillo C, situado en la cara citoplasmática del cuerpo basal. El gancho, cuya función es el anclaje del filamento al cuerpo basal, está formado por múltiples copias de una proteína que polimeriza de forma helicoidal dando lugar a una estructura corta, hueca y curvada. El filamento, que se extiende desde el gancho hacia el exterior, es un cilindro rígido y hueco constituido por la polimerización de una proteína denominada flagelina. Algunas bacterias tienen el filamento recubierto por una vaina, de diferente estructura química según el grupo al que pertenezcan, como por ejemplo algunos *Vibrio* sp. o *Helicobacter* sp., que poseen una vaina membranosa contigua a la membrana externa y similar en composición.



**Figura 1.3** Esquema de un flagelo típico de *E. coli* o *S. enterica*, mostrado en sección longitudinal. En negrita los nombres de subestructuras y en letra normal los de las proteínas constituyentes así como su estequiometría aproximada. Figura adaptada de Matzke, 2003.

La disposición y el número de flagelos varían según la especie bacteriana, utilizándose estos parámetros para la definición de diferentes tipos de flagelación: monotrica o polar, que comprende un único flagelo anclado en la región polar o subsolar; lofotrica, con dos o más flagelos en uno de los polos; anfitrica, con un flagelo, como mínimo, en cada uno de los polos y peritrica o lateral, donde los flagelos se distribuyen por la superficie bacteriana.

Existen dos tipos de movilidad asociada al flagelo bacteriano: el *swimming* o natación y el *swarming* o “enjambado”. La natación permite el movimiento individual en medios líquidos o ligeramente viscosos. El *swarming* permite a las bacterias moverse de forma coordinada y expandir la población a nuevas localizaciones. Este último tipo de

movilidad es un proceso multicelular que tiene lugar en superficies sólidas o en medios con elevada viscosidad y requiere una diferenciación celular. Esta diferenciación suele caracterizarse por una elongación de las células y su hiperflagelación, provocada simplemente por el aumento del número de flagelos, como es el caso de *Proteus mirabilis*, *E. coli* o *S. enterica* sv. Typhimurium, o por la inducción de un sistema de flagelación lateral (peritrico inducido), con o sin elongación de las células, como en algunas especies de *Aeromonas* y *Vibrio*, entre otras.

Las *Aeromonas* mesófilas expresan un único flagelo polar de manera constitutiva y, en un 50-60% de las cepas asociadas a procesos diarreicos, el crecimiento en superficies induce la expresión de flagelos laterales (Kirov *et al.*, 2002). Así, las cepas AH-3 de *A. hydrophila* y Sch3N de *A. caviae* producen un único flagelo polar sin vaina cuando crecen en medio líquido, y múltiples flagelos laterales, además del flagelo polar, también sin vaina, cuando crecen en medio sólido. Tal y como ocurren en otros Gram-negativos, el flagelo polar es responsable de la movilidad por natación (*swimming*) en ambientes líquidos, mientras que los flagelos laterales son responsables de la movilidad colonial observada en crecimientos en medios sólidos o semisólidos, conocida como *swarming*. La natación y la quimiotaxis son importantes en el contacto inicial con las superficies (O'Toole and Kolter, 1998), mientras que el *swarming* permite a las bacterias avanzar sobre las superficies y facilitar el proceso de colonización. En consecuencia, la presencia de flagelo y también su movilidad participan en las fases iniciales del proceso de infección, entre las que cabe destacar la adhesión a células eucariotas, la colonización del huésped (Josenhans and Suerbaum, 2002) y la formación de "biofilms" (Merino *et al.*, 2006). En *A. hydrophila* O:34, se ha demostrado que la movilidad es importante en el proceso de adhesión a líneas celulares de peces, que los flagelos contribuyen al proceso de invasión (Merino *et al.*, 1997) y que tanto la natación como el *swarming* son esenciales para la formación de "biofilms" en la cepa AH-3 de *A. hydrophila* (Gavín *et al.*, 2002).

Se han secuenciado agrupaciones génicas implicadas en el establecimiento de la flagelación polar y lateral en las cepas AH-3 de *A. hydrophila* y Sch3N de *A. caviae*. En la cepa AH-3, los genes del sistema de flagelación polar se agrupan en siete regiones cromosómicas distintas (Canals *et al.*, 2006; Wilhelms *et al.*, 2009; Molero *et al.*, 2011). Aunque la organización génica se conserva en otras bacterias, como *Vibrio* y *Pseudomonas*, la distribución es diferente. En cambio, los genes del sistema de

flagelación lateral están agrupados en una única región cromosómica (Canals *et al.*, 2006). Por otro lado, la cepa AH-3 de *A. hydrophila* presenta dos flagelinas para la flagelación polar y una sola para la flagelación lateral, mientras que *A. caviae* Sch3N presenta dos flagelinas en ambos tipos de flagelo (Altarriba, 2003).

*A. salmonicida* ha sido definida como una especie no flagelada e inmóvil, aunque en crecimientos en medios líquidos con elevada viscosidad y a temperaturas supraóptimas (30 a 37°C), se ha observado que un 1% de la población presenta movilidad asociada a la expresión de flagelación polar (McIntosh and Austin, 1991). Se han identificado algunos genes implicados en la biosíntesis de la flagelación polar, como los que codifican las flagelinas, *flaA* y *flaB* (Umelo and Trust, 1997). También se ha descrito una agrupación génica asociada a la flagelación lateral, *lafA-U*, donde todos los genes son funcionales, excepto *lafA* (que codifica la flagelina lateral), inactivo debido a la presencia de una putativa transposasa (Merino *et al.*, 2003).

#### **1.2.6.1 Glicosilación de las flagelinas**

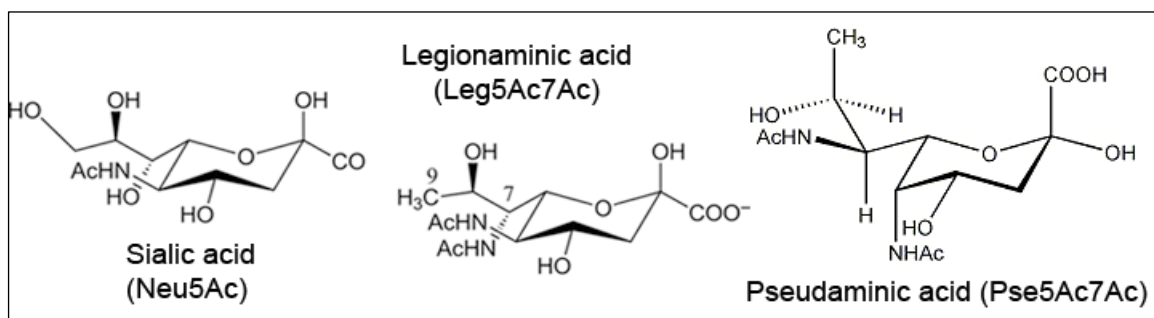
La glicosilación es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes en las células eucariotas. Los glicanos pueden estar unidos covalentemente al nitrógeno del grupo amino de residuos de asparagina (*N*-glicosilación), al oxígeno del grupo hidroxilo de, típicamente, residuos de serina o treonina (*O*-glicosilación), y, raramente, al segundo carbono del grupo indol del triptófano. Originariamente, se consideró un fenómeno único en eucariotas, sin embargo, recientemente se ha visto que hay un elevado número de bacterias que modifican estructuras proteicas de su superficie con azúcares mediante enlaces *N*- u *O*-glucosídico. Una de las estructuras en las que se ha descrito este tipo de modificación post-transduccional es el flagelo y concretamente, las flagelinas. Así, se ha descrito *O*-glicosilación en flagelinas de diferentes Eubacterias y *N*-glicosilación en las de algunas Arqueobacterias.

Si nos centramos en el flagelo de las Eubacterias, se ha descrito *O*-glicosilación en flagelinas de numerosas bacterias Gram-negativas que presentan flagelación polar y únicamente, en los dos géneros de Gram positivas: *Clostridium* y *Listeria*. Además, hasta la fecha no hay datos en la bibliografía que indiquen que flagelinas peritricas de la familia *Enterobacteriaceae* se hallen glicosiladas. La glicosilación de las flagelinas laterales únicamente se ha descrito en un limitado número de casos, como por ejemplo en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*.

Han sido identificados los residuos monosacáridicos que glicosilan las flagelinas polares de *Campylobacter jejuni* (Thibault *et al.*, 2001), *Campylobacter coli* (Logan *et al.*, 2002), *Helicobacter pylori* (Schirm *et al.*, 2003) y *Pseudomonas aeruginosa* (Schirm *et al.*, 2004). Estas especies solo poseen un sistema de flagelación polar y los filamentos están constituidos por dos flagelinas: FlaA y FlaB. La caracterización estructural de estas flagelinas permitieron identificar la presencia de ácido pseudamínico (Pse5Ac7Ac) unido a través de un enlace O-glucosídico a residuos de serina (Ser) o Treonina (Thr) en la región central de la secuencia primaria, que se cree queda expuesta en el filamento ensamblado (Samatey *et al.*, 2001).

El ácido pseudamínico (ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradexo-L-glicero- $\alpha$ -L-mano-nonulosónico) es un azúcar de 9 átomos de carbono similar al ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico (Neu5Ac). En *C. jejuni* se han encontrado otros residuos que modifican las flagelinas, todos ellos derivados del ácido pseudamínico (McNally *et al.*, 2006). Estudios recientes han demostrado que además, algunas cepas de *C. jejuni* y *C. coli* pueden glicosilar sus flagelinas con un segundo derivado del ácido siálico; el ácido legionamínico (ácido 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradexo-D-glicero- $\beta$ -D-galacto-nonulosónico) (Logan *et al.*, 2009) (figura 1.4).

Se han encontrado más de 19 sitios de glicosilación en las flagelinas de *Campylobacter* y estas modificaciones representan un 10% del total de la masa de la proteína (Thibault *et al.*, 2001). En *H. pylori* se han descrito 7 sitios de glicosilación en FlaA y 10 en FlaB (Schirm *et al.*, 2003). Estos sitios de glicosilación no parecen estar relacionados con una determinada secuencia peptídica conservada, aunque se observa, al menos parcialmente, una dependencia de una hidrofobicidad local en la región anterior, adyacente a los residuos de Ser/Thr (Thibault *et al.*, 2001; Schirm *et al.*, 2003).



**Figura 1.4** Estructuras de los derivados del ácido siálico encontrados en *Campylobacter*. Comparación entre el ácido legionamínico (Leg5Ac7Ac) y el ácido pseudamínico (Pse5Ac7Ac) con respecto al ácido siálico para demostrar su similitud. (Figura adaptada de Logan, 2009).

A nivel genético se han identificado islas de glicosilación (GI) en *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae* (Arora *et al.*, 2005; Taguchi *et al.*, 2006) y *Campylobacter*. La GI de *Campylobacter* parece ser uno de los loci más variables del genoma, conteniendo entre 25 y 50 genes, dependiendo de la cepa, y estos genes están situados cerca de los genes que codifican para las flagelinas (Szymansky *et al.*, 2003). Varios genes de este locus codifican proteínas con homología a enzimas de biosíntesis de carbohidratos, incluyendo algunos (*neu*-locus) con homología a enzimas de biosíntesis de ácido siálico (Schoenhofen *et al.*, 2006a). Se han realizado extensivos análisis mutacionales, así como estudios funcionales en enzimas recombinantes y se ha definido la función precisa de genes de GI implicados en la biosíntesis de Pse5Ac7Ac. También se han relacionado los genes *ptm* de este locus con la vía de biosíntesis de ácido legionamínico (Goon *et al.*, 2003; Soo *et al.*, 2004; McNally *et al.*, 2006; Schoenhofen *et al.*, 2006b; Schoenhofen *et al.*, 2006c; McNally *et al.*, 2007).

Además de los genes de biosíntesis de carbohidratos, las islas de glicosilación (GI) de *Campylobacter* contienen múltiples copias de hipotéticos genes que codifican proteínas que pertenecen a la familia de factores accesorios a la motilidad (*maf*, Cj1318) (Karlyshev *et al.*, 2002). Mutaciones por inserción de copias individuales de estos genes han puesto en evidencia su papel en motilidad o glicosilación aunque la función precisa de cada gen *maf* aún está por determinar (Schirm *et al.*, 2003; Karlyshev *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2006).

En algunas especies, como *C. jejuni* y *H. pylori*, la glicosilación del flagelo es necesaria para el ensamblaje del filamento (Goon *et al.*, 2003; Guerra *et al.*, 2006), mientras que en *P. aeruginosa* la ausencia de glicosilación no afecta ni al ensamblaje ni a la motilidad (Arora *et al.*, 2005).

La glicosilación del flagelo juega un papel importante en la colonización del intestino de *C. jejuni* (Szymanski *et al.*, 2002) y en la respuesta proinflamatoria de *P. aeruginosa* (Arora *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2005). En *Pseudomonas syringae* los residuos glicosilados del flagelo determinan la especificidad para la planta huésped (Takeuchi *et*

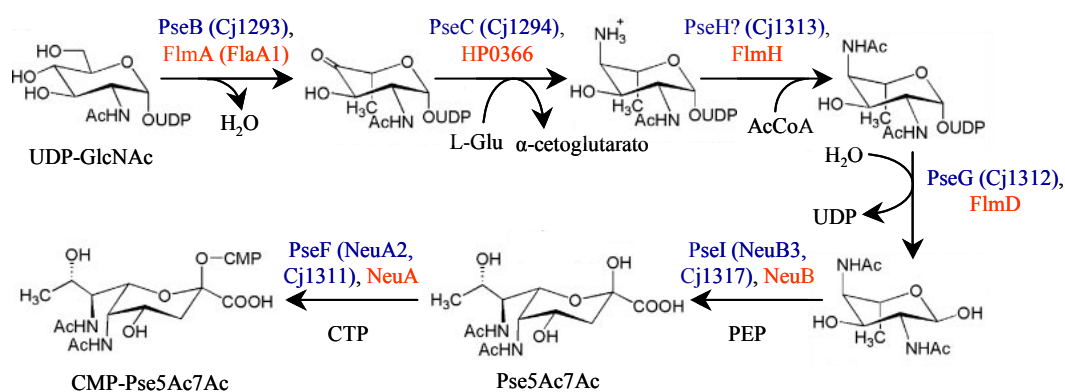
*al.*, 2003; Taguchi *et al.*, 2006) y también juegan un papel en la estabilización del filamento (Taguchi *et al.*, 2008).

En *Aeromonas caviae* UU51 las flagelinas polares, FlaA y FlaB están glicosiladas en seis y siete sitios, respectivamente, con un derivado del ácido pseudamínico de 373Da de masa (Pse5Ac7Ac8Ac). En *A. caviae* Sch3N el flagelo polar está glicosilado en 6-8 sitios por ácido pseudamínico (Pse5Ac7Ac). La isla de glicosilación (locus *flm*) contiene homólogos de un número de genes encontrados en las islas de glicosilación de *H. pylori* y *C. jejuni*, y la glicosilación es necesaria para el ensamblaje del flagelo (Gryllos *et al.*, 2001; Schirm *et al.*, 2005). *A. caviae* Sch3N posee una pequeña isla genómica relacionada con la glicosilación de la flagelina y con la biosíntesis del antígeno O del LPS. Esta isla parece haberse adquirido lateralmente, está flanqueada por elementos de inserción y además, su contenido en G-C es menor que el que presenta de media *Aeromonas*. La mayoría de los productos codificados por los genes de esta isla son ortólogos a proteínas relacionadas con la biosíntesis del ácido pseudamínico y con la glicosilación del flagelo. Dos de estos genes, *lst* y *lsg*, son específicos del LPS, ya que mutaciones en ellos resultan en la pérdida de una única banda del antígeno O. Las proteínas codificadas por *flmA*, *flmB*, *neuA*, *flmD* y *neuB* se cree que están implicadas en la biosíntesis del ácido pseudamínico, y mutaciones en cualquiera de estos genes dan lugar a la pérdida de motilidad, de expresión del flagelo y la pérdida de una banda del antígeno O (Tabei *et al.*, 2009). Los flagelos laterales de *A. caviae* también están glicosilados aunque todavía no se ha determinado la estructura de estos glicanos.

Recientemente, se ha descrito la glicosilación en el flagelo tanto polar como lateral de *Aeromonas hydrophila* AH-3 (serotipo O:34) (Wilhelms *et al.*, 2012). La flagelina lateral está modificada en tres sitios con un único monosacárido de 376 Da de masa, que corresponde a un derivado del ácido pseudamínico unido mediante enlace O-glucosídico. Las flagelinas polares están modificadas con un heptasacárido compuesto de tres N-acetilhexosaminas, dos hexosas y dos monosacáridos desconocidos de 376 y 120 Da de masa, en la secuencia: 376Da-Hex-Hex-HexNAc-HexNAc-HexNAc-102Da, siendo el azúcar de 376 Da el que establece el enlace O-glucosídico con la flagelina. Se pudieron observar hasta un máximo de seis cadenas del heptasacárido mediante espectrometría de masas, una de ellas unida a la treonina 161 de FlaB. Este heptasacárido no está relacionado con el antígeno O:34 del LPS caracterizado en esta cepa, consistente en la repetición de un tetrasacárido compuesto por D-manosa, D-

GalNAc y 6-deoxitalosa (Knirel *et al.*, 2002), a diferencia de lo que sucede en *A. caviae*, donde los genes implicados en la síntesis del glicano flagelar también están implicados en la biosíntesis del LPS, siendo el ácido pseudamínico un componente de ambas superficies (Tabei *et al.*, 2009).

El monosacárido de 376 Da (presente en ambos tipos de flagelo de *A. hydrophila* AH-3) es absolutamente necesario para la producción de flagelo, ya que mutantes en genes de biosíntesis de ácido pseudamínico homólogos a *pseB* y *pseF* de *Campylobacter*, dan lugar a la pérdida del flagelo tanto polar como lateral. Esta función es restablecida al introducirles *pseB* o *pseF*, respectivamente, de la cepa parental o de *Campylobacter*.



**Figura 1.5** Ruta propuesta para la biosíntesis del CMP-ácido pseudamínico a partir de la UDP-GlcNAc en *C. jejuni* y *H. pylori*. En azul se muestra el nombre de las enzimas en *C. jejuni* y en rojo el de las enzimas en *H. pylori*; los paréntesis indican otros nombres que han recibido las mismas enzimas. La biosíntesis incluye la acción de seis enzimas: PseB, deshidratasa; PseC, aminotransferasa; PseH, podría ser la acetiltransferasa; PseG, hidrolasa; PseI, sintasa del ácido pseudamínico; y PseF, sintetasa del ácido pseudamínico activado. Figura adaptada de Liu y Tanner, 2006.

Se ha sugerido que *Aeromonas hydrophila* AH-3 dispone de dos putativos genes para unir los glicanos a las flagelinas. La mutación en el gen *maf-1* da lugar a la ausencia del flagelo polar aunque se conservan los flagelos laterales (Canals *et al.*, 2006a), en cambio, la mutación en el gen *maf-5* da lugar a la ausencia de la flagelación lateral pero no polar (Canals *et al.*, 2006b).



### 1.2.6.2 Papel biológico de los glicanos flagelares

Se han propuesto diferentes hipótesis en relación al rol de los glicanos flagelares: evasión del sistema inmune, estabilidad y ensamblaje del filamento del flagelo, adhesión y reconocimiento del huésped (Logan, 2006). En general, la glicosilación de las flagelinas es esencial para el ensamblaje del flagelo, para la motilidad, virulencia y especificidad del huésped, aunque en *Pseudomonas* sp. y *Burkholderia* sp. la glicosilación no se requiere para el ensamblaje del flagelo (Takeuchi *et al.*, 2003). Las flagelinas de *C. jejuni* y *H. pylori* no se pueden ensamblar en el filamento a menos que éstas se hallen glicosiladas (Schirm *et al.*, 2003; Thibault *et al.*, 2001). La heterogeneidad de glicanos presente en las flagelinas de *C. jejuni* se requiere para la óptima interacción con varios huéspedes y puede jugar un papel en la evasión de la respuesta inmune (Thibault *et al.*, 2001). Trabajos recientes han mostrado que la hiperglicosilación en *H. pylori* promueve la interacción entre la bacteria y las células epiteliales gástricas, mejorando así la colonización por parte de la bacteria (Asakura *et al.*, 2010).

A diferencia de lo que sucede en especies de *Campylobacter* y *Helicobacter pylori*, la glicosilación de las flagelinas no es indispensable para el ensamblaje del flagelo en *Pseudomonas aeruginosa* ni para su motilidad; no obstante se ha demostrado que existe una considerable reducción de la virulencia cuando la flagelina no se halla glicosilada (Arora *et al.*, 2005). Además, se ha observado una mayor respuesta de IL-8 por parte de la flagelina glicosilada en comparación con la no glicosilada (Verma *et al.*, 2005). En *Burkholderia* sp., al igual que en *Pseudomonas* sp, la glicosilación no es un requisito para el ensamblaje del flagelo y se ha sugerido que podría tratarse de un mecanismo utilizado por la bacteria con el fin de evadir la detección por parte del sistema inmune del huésped o para modular la virulencia, dada la diferencia existente entre la composición de los glicanos y la virulencia entre las especies *B. pseudomallei* y *B. thailandensis* (Scott *et al.*, 2011).

En *Aeromonas* mesófilas ni las flagelinas polares ni laterales se pueden ensamblar a menos que se hallen glicosiladas. Debido a que los sistemas de flagelación polar y lateral de las *Aeromonas* mesófilas están relacionados con adherencia a superficies y formación de biofilms, el proceso de glicosilación parece ser crucial para la patogenicidad de estas bacterias móviles (Rabaan *et al.*, 2001; Canals *et al.*, 2006).

El hecho de que muchos de los enzimas implicados en la *O*-glicosilación bacteriana no estén presentes en las células eucariotas, sumado al papel que juegan estos glicanos en patogenicidad, convierten estos enzimas en nuevas dianas para el desarrollo de antibióticos y vacunas, así como para la detección de infecciones bacterianas.

### 1.2.7 Fimbrias o *pili* (adhesinas filamentosas)

Las fimbrias son proyecciones filamentosas, formadas a partir de subunidades proteicas denominadas pilinas, que se encuentran en la superficie bacteriana. Aunque las fimbrias se describen como adhesinas, también están implicadas en otras funciones como: unión a fagos, transferencia de ADN, formación de biofilms, agregación celular, invasión al huésped y movilidad por *twitching*. En función del mecanismo de ensamblaje, las fimbrias de bacterias Gram-negativas se han distribuido en cuatro grupos: a) fimbrias ensambladas mediante chaperonas; b) fimbrias de tipo IV; c) fimbrias ensambladas mediante la vía de nucleación/precipitación; d) fimbrias ensambladas por la vía alternativa de las chaperonas (familia CS1) (Proft *et al.*, 2009).

En *Aeromonas* mesófilas se han descrito diferentes tipos de fimbrias atendiendo a su morfología y a los antígenos que presentan. Así, en aislados tanto clínicos como ambientales se han descrito dos tipos de fimbrias: fimbrias cortas y rígidas (S/R, *Short/Rigid*), presentándose en un alto número por célula bacteriana; y fimbrias largas y flexibles (L/W, *Long/Wavy*), que se encuentran en bajo número por célula.

Las fimbrias S/R presentan una longitud de 0.6 a 2  $\mu\text{m}$ , poseen epítomos comunes entre diferentes especies analizadas, y están altamente distribuidas, ya que más del 95% de las cepas estudiadas las poseen. Además son el tipo predominante entre las aeromonadas con elevada cantidad de *pili*, como ciertas cepas ambientales de *A. veronii* bv. *sobria* (Kirov *et al.*, 1995). Pueden causar autoagregación pero no hemoaglutinación, y no se unen a células intestinales (Honma and Nakasone, 1990). En algunas cepas clínicas, este tipo de fimbrias se puede inducir bajo determinadas condiciones ambientales (<22°C en medio líquido).

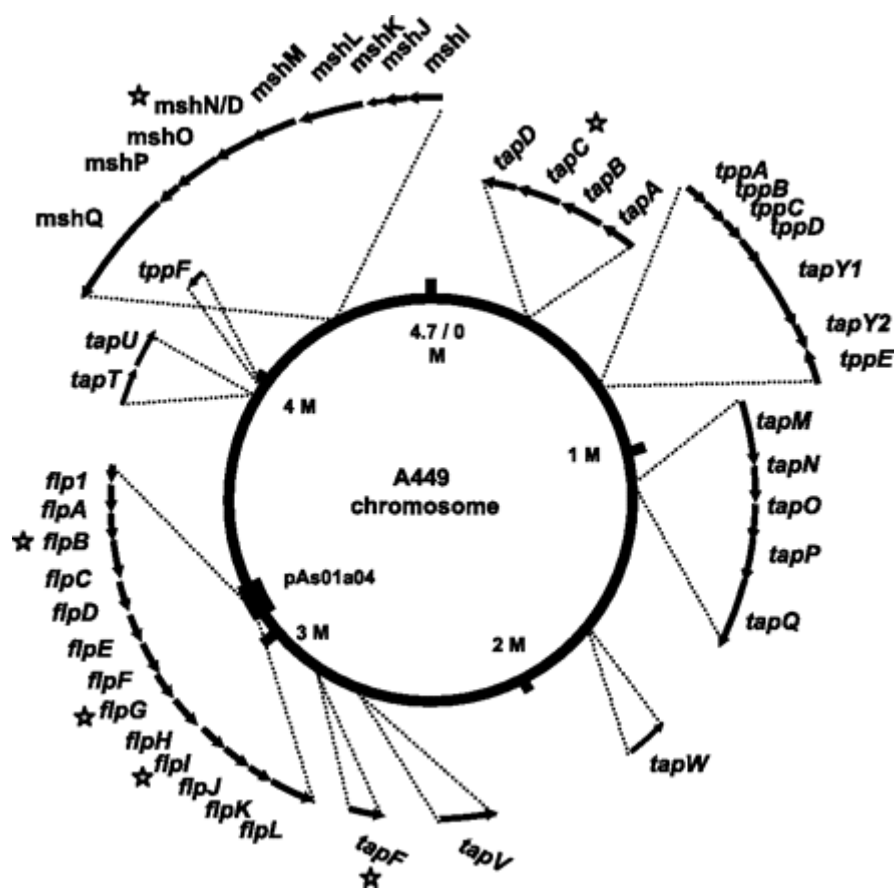
Las fimbrias L/W son largas, finas (4-7 nm),



**Figura 1.6** Micrografía electrónica de barrido de la adhesión de *A. veronii* bv. *sobria* a células Henle 407 mediante *pili* Bfp. Kirov, 1999.

flexibles y se consideran hemoaglutininas. Además, son el tipo predominante en cepas aisladas a partir de heces, como las de *A. veronii* bv. *sobria*, que presentan un bajo número de *pili* (<10 por célula) (figura 1.6). El análisis de su secuencia aminoacídica indica que se corresponden con *pili* de tipo IV (Pepe *et al.*, 1996), reconocidos como estructuras importantes en la adhesión a células epiteliales e implicadas en la formación de biofilms, y relacionadas con el movimiento celular independiente de flagelo sobre superficies sólidas, denominado *twitching motility*, siendo todas estas actividades importantes en la colonización de las mucosas (Béchet and Blondeau, 2003). Estudios previos realizados en especies de *Aeromonas* asociadas con gastroenteritis, habían mostrado la existencia de, al menos, dos familias de *pili* de tipo IV: Bfp (*Bundle-Forming Pili*) y Tap (*Type IV Aeromonas pili*) (Barnett *et al.*, 1997), que se diferencian en el peso molecular de la pilina y en la secuencia N-terminal. Se ha demostrado la implicación de las fimbrias Bfp en la adhesión a células intestinales (Kirov *et al.*, 1999), y se ha observado que una de las proteínas de la familia Tap (TapD) es esencial para la secreción de aerolisina y proteasas, contribuyendo de este modo al sistema de secreción de tipo II (Pepe *et al.*, 1996). Las fimbrias de tipo IV Tap fueron identificadas mediante el clonaje de los genes de biosíntesis (*tapABCD*) (Pepe *et al.*, 1996) y su inactivación por inserción en el gen estructural de la pilina *tapA*, no da lugar a efectos en adherencia; los mutantes eran capaces de adherirse a superficies tanto bióticas como abióticas de la misma manera que lo hacía la cepa parental (Kirov *et al.*, 2000). Las fimbrias de tipo IV Bfp son las adhesinas mayoritarias entre las *Aeromonas* mesófilas y su inactivación mediante anticuerpos anti-Bfp, provoca una reducción del 80% en la capacidad de adhesión de las bacterias a la célula huésped (Kirov *et al.*, 1996; Kirov *et al.*, 1999). La secuencia N-terminal de las fimbrias Bfp mostró elevada homología con las *mannose-sensitive hemagglutinin* (MSHA) de *Vibrio cholerae* El Tor.

La publicación de los genomas completos de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> y *A. salmonicida* A449 ha permitido describir tres sistemas de fimbrias de tipo IV: *tap*, *flp* y *msh* (Bfp). Sin embargo, en las especies psicrófilas de *A. salmonicida* el locus que codifica las fimbrias MSHA tiene una extensa delección interna y el sistema no es funcional (Boyd *et al.*, 2008). Mutaciones en el sistema Flp en *A. salmonicida* parecen no afectar apenas en la virulencia, sin embargo, el sistema Tap parece estar relacionado en virulencia cuando se prueba en el huésped natural de esta especie, el salmón atlántico.



**Figura 1.7** Genoma de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y mapa de los genes que codifican para los tres sistemas de fimbrias de tipo IV. Las flechas indican los tamaños aproximados y la orientación de los genes. Las estrellas indican genes con interrupciones. (Boyd *et al.*, 2008).

### 1.2.7.1 Sistema de biogénesis de las fimbrias de tipo IV

Para la formación de las fimbrias de tipo IV se requieren una serie de proteínas que se localizan en el citoplasma, periplasma, membrana externa y membrana interna de la bacteria, y que constituyen el complejo de ensamblaje. Estas proteínas se encuentran codificadas por genes de la agrupación.

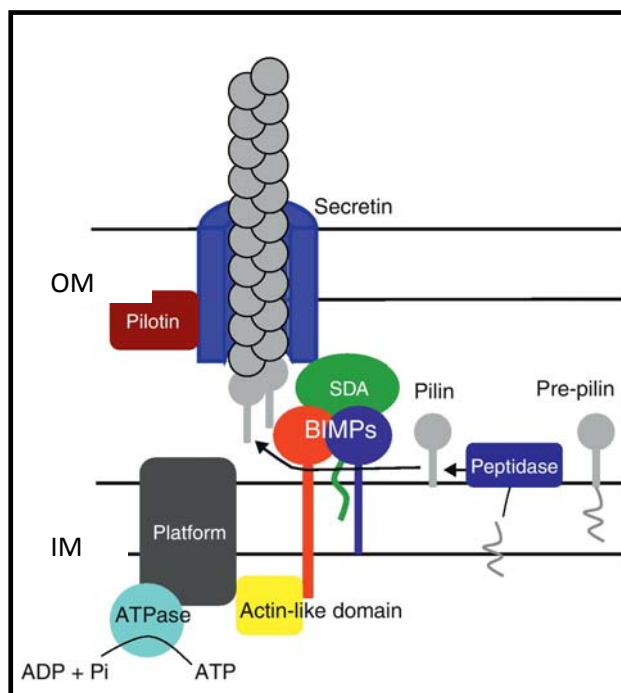
Se ha descrito que el sistema de secreción de tipo II y las fimbrias de tipo IV muestran similitudes tanto a nivel funcional como estructural, sugiriendo un origen común de ambos sistemas (Ayers *et al.*, 2010).

El complejo de membrana externa está formado por la secretina, una proteína que forma un poro en la membrana a través del cual se produce la extrusión de la fimbria, y la pilotina, una lipoproteína necesaria para la formación y estabilización de la secretina. La

proteína que se muestra en la figura como SDA (del inglés *secretin dynamic-associated*), representa un grupo de proteínas de membrana interna que interaccionan tanto con el complejo de membrana externa como con el complejo de membrana interna, jugando un papel en la interacción entre ambos compartimentos.

El complejo de membrana interna incluye una o más ATPasas, la plataforma, una o más proteínas de membrana interna (BIMPs; *bitopic inner membrane protein*) y una proteína citoplasmática con un dominio actina-like. La plataforma es una proteína integral de membrana interna que interacciona con una proteína con un dominio actina-like y con las ATPasas, que proporcionan la energía para el ensamblaje o retracción de la fimbria (Allen *et al.*, 2012).

Una vez insertadas en la membrana interna a través de la maquinaria Sec, las pre-pilinas son procesadas por una peptidasa para dar lugar a la polimerización no covalente de las pilinas maduras en una fimbria.



**Figura 1.8** Esquema de la biogénesis de los pilis de tipo IV. Las siglas IM (*inner membrane*) representan la membrana interna mientras que OM (*outer membrane*) representan la membrana externa. Figura adaptada de Allen *et al.*, 2012.

### 1.2.7.2 Regulación de las fimbrias de tipo IV

Se han descrito gran variedad de mecanismos de regulación de las fimbrias de tipo IV, tanto transcripcionales como post-transcripcionales, que difieren entre las diferentes especies bacterianas. En muchas especies, un incremento en la viscosidad puede regular la expresión de la pilina (Bertrand *et al.*, 2010). En *Haemophilus influenza* se requiere un pH alcalino para la óptima expresión de las fimbrias (Bakaletz *et al.*, 2005), mientras que algunas arqueobacterias producen las fimbrias en respuesta a una radiación con luz ultravioleta (Fröls *et al.*, 2008).

En *Pseudomonas aeruginosa* se ha descrito una regulación transcripcional de la pilina mayoritaria, PilA, a través de RpoN ( $\sigma^{54}$ ) y un sistema de dos componentes: PilR-PilS (Strom and Lory, 1993). La autofosforilación de la proteína de membrana externa PilS y la subsecuente fosforilación de PilR, regula la transcripción de *pilA* mediante RpoN. La señal exacta captada por PilS no ha sido determinada todavía pero se ha propuesto que podría ser la misma proteína PilA (Bertrand *et al.*, 2010).

La regulación a nivel de ensamblaje de las fimbrias es compleja debido al gran número de componentes que se hallan implicados. En *P. aeruginosa* se ha descrito un complejo sistema de quimiotaxis (Pil-Chp) compuesto por proteínas que presentan elevada homología con el sistema de quimiotaxis del flagelo de *E. coli* (Whitchurch *et al.*, 2004). Este sistema controla la biogénesis de las fimbrias de tipo IV a través del control del ensamblaje y/o retracción del pili así como la expresión de la pilina PilA. Sistemas similares de quimiotaxis se han identificado en otras bacterias que tienen fimbrias de tipo IV como *Myxococcus*, *Xylella*, *Xanthomonas* y *Ralstonia*, pero no se encuentran en patógenos como *Neisseria*, *Legionella* o *Vibrio*, deficientes en el sistema Pil-Chp.

Por último, también ha sido descrito un mecanismo de regulación post-traduccionale de las fimbrias de tipo IV mediante los niveles intracelulares del mensajero secundario c-di-GMP. En *P. aeruginosa* se han identificado PilZ y FimX, dos proteínas relacionadas con la molécula c-di-GMP requeridas para la biogénesis de las fimbrias de tipo IV. Mutantes en PilZ expresan cantidades normales de pilina pero no son capaces de ensamblar los pilis (Alm *et al.*, 1996). Otros estudios en *Xanthomonas* han demostrado que PilZ interacciona con PilB, la ATPasa encargada de la polimerización de las fimbrias y con el dominio EAL de la proteína FimX (Guzzo *et al.*, 2009). Este trabajo

sugiere que PilZ conjuntamente con FimX podría regular la función de PilB de forma dependiente de c-di-GMP.

### 1.2.7.3 Fimbrias Msh (Bfp)

Las fimbrias de tipo IV Bfp (*bundle-forming pilus*) se denominan también MSHA porque la secuencia N-terminal presenta elevada homología con las fimbrias *mannose-sensitive hemagglutinin* de la cepa *Vibrio cholerae* El Tor.

Las fimbrias MSHA de *Vibrio cholerae* El Tor pertenecen a la familia tipo IV, subclase IVa. La clasificación IVa o IVb responde a la similaridad en la secuencia de aminoácidos dentro del extremo amino terminal de la subunidad polipeptídica. Los monómeros de la pilina son sintetizados como proteínas precursoras con una secuencia líder de longitud variable que es procesada posteriormente por una prepilina peptidasa de tipo IV durante la secreción de la pilina. Las subunidades de prepilina del tipo IVa están caracterizadas por una corta secuencia líder de 5-6 aminoácidos, cuya escisión resulta en una subunidad de la pilina madura con un residuo de fenilalanina metilado en el extremo N-terminal. Los pilis de tipo IVa se suelen distribuir de forma peritrica o polar en la superficie celular bacteriana. Los pilis de tipo IV pueden provocar agregación celular, una propiedad que contribuye en mecanismos de colonización o en formación de *biofilms*. El ensamblaje y la secreción de los pilis de tipo IV requieren la expresión de numerosos productos génicos, incluyendo la prepilina estructural y su peptidasa. Además, se requieren proteínas de membrana interna y externa y proteínas citoplasmáticas que unen nucleótidos, generando la energía necesaria para la translocación. *Vibrio cholerae* O1 El Tor presenta fimbrias TCP (*toxin coregulated pilus*) que son del tipo IVb y fimbrias MSHA en su superficie. Diversos estudios han puesto de manifiesto que las fimbrias TCP contribuyen a la colonización de la bacteria en el intestino delgado, mientras que las fimbrias MSHA no parecen intervenir en este proceso de colonización (Attridge *et al.*, 1996; Tackett *et al.*, 1998; Thelin and Taylor, 1996), siendo más probable asociarlas con una función relacionada con la persistencia medioambiental y la formación de *biofilms* tanto en superficies bióticas como abióticas (Chiavelli *et al.*, 2001; Watnick and Kolter, 1999). Tanto en la cepa de *V. cholerae* O1 El Tor como en la cepa O139 se ha visto que las fimbrias MSHA contribuyen a la adherencia de la bacteria en la superficie del zooplancton.

En *Vibrio parahaemolyticus* se han descrito dos tipos de fimbrias de tipo IVa: ChiRP (*chitin-regulated pilus*) y MSHA. Ambas participan en la persistencia medioambiental de la cepa y en la formación de *biofilms*. Se han descrito las fimbrias MSHA como iniciadoras del proceso de adhesión en superficies abióticas, mientras que las ChiRP se activan por quitina presente en estas superficies y juegan un papel en la interacción bacteria-bacteria (Shime-Hattori *et al.*, 2006). Se ha propuesto que la GlcNAc juega un papel importante en la regulación de estas fimbrias. La GlcNAc (monómero de la quitina), se encuentra tanto en el medio acuático (en exoesqueletos de crustáceos) como modificando glicoproteínas y péptidos del epitelio intestinal. Los dos tipos de fimbrias, especialmente ChiRP, pueden funcionar uniéndose a la proteína GbpA en presencia de la GlcNAc, tanto en el medio acuático como en el intestino (Kirn *et al.*, 2005).

En *Vibrio parahaemolyticus* se ha descrito que la GlcNAc, uno de los aminoazúcares más abundantes en los océanos, induce una serie de genes, entre ellos los que codifican para las fimbrias MSHA (Thompson *et al.*, 2010). Sin embargo, la GlcNAc no es capaz de inducir esto en *Vibrio cholerae* (Meibom *et al.*, 2004), donde parece que las fimbrias MSHA se unen primero a la epicutícula que recubre la quitina del caparazón de los cangrejos. Todo apunta a que en *V. cholerae* las fimbrias MSHA potencian la unión a quitina pero independientemente de la composición química de la superficie.

Tanto en el caso de *V. cholerae* como en el de *Vibrio parahaemolyticus*, parece ser que las fimbrias MSHA serían las iniciadoras de la adhesión en este proceso de colonización de superficies.

En *Pseudoalteromonas tunicata* se ha descrito que la adhesión entre la bacteria y la alga *Ulva australis* está mediada por fimbrias MSHA. Las fimbrias MSHA en *P. tunicata* juegan un papel en la adhesión a superficies tanto abióticas como bióticas y se ha demostrado que en presencia de celulosa (uno de los mayores polímeros de la superficie de *U. australis*), se incrementa la producción de estos pilis (Dalisay *et al.*, 2006).

Recientemente se ha descrito que la cepa *Aeromonas veronii* bv. Sobria presenta fimbrias MSHA en su superficie y que éstas juegan un papel tanto en la adherencia a células epiteliales como en la adherencia a superficies abióticas y formación de *biofilms* (Hadi *et al.*, 2012).



Se ha descrito el gen *mshH* como parte de la agrupación de fimbrias MSHA en diversas especies como *Photobacterium*, *Shewanella*, *Vibrio* y *Aeromonas* spp. Sin embargo parece no estar ligado transcripcionalmente al resto de genes MSHA. El gen codifica para una proteína con dominios GGDEF/EAL, que están implicados en la actividad diguanilato ciclasa sintasa y fosfodiesterasa, responsables de la síntesis y la degradación de c-di-GMP, respectivamente. La concentración intracelular de c-di-GMP modula la forma de vida de la bacteria de móvil a sésil o viceversa y es importante en fenómenos de adhesión y de formación de *biofilms*.

Se ha encontrado un gen homólogo a *mshH* en bacterias entéricas como *Serratia*, *Enterobacter* y *Yersinia*, las cuales no poseen fimbrias MSHA. Además, el gen adyacente a *mshH* en estas bacterias es *mreB*, el cual se ha encontrado al final de la agrupación génica de las fimbrias MSHA en *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Shewanella* y *Vibrio* spp. Esto sugiere que la agrupación MSHA se perdió o deleccionó en las bacterias entéricas o que un ancestro común de las bacterias con estas fimbrias insertó la agrupación entre los genes *mshH* y *mreB* (Hadi *et al.*, 2012). En *Vibrio cholerae* se ha sugerido la hipótesis de que la agrupación MSHA se insertó, debido a la presencia de una repetición de 7 pb flanqueando el locus (Marsh and Taylor, 1999).

**OBJETIVOS**



## Objetivos

En base a la importancia de la regulación de la flagelación y las fimbrias en el proceso de colonización del tracto intestinal, así como de otras superficies y dado que estudios previos en la cepa de *Aeromonas hydrophila* de serotipo O:11 han mostrado que la mutación de los genes *wbpL* y *wbgZ*, implicados en la biosíntesis del antígeno O:11, produce además de la pérdida del antígeno O:11 del lipopolisacárido, una reducción en la motilidad de los mutantes y la expresión de fimbrias al crecer en medio líquido, el presente proyecto de Tesis se plantea como objetivo global analizar los mecanismos que interrelacionan estas tres estructuras de la superficie bacteriana.

En el primer capítulo se analiza la glicosilación del flagelo polar y lateral de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* y se establecen los siguientes objetivos:

1. Determinar los lugares de glicosilación y el tipo de glicano presente en las flagelinas polares y laterales de *Aeromonas* de serotipo O:11 (*Aeromonas hydrophila* AH-1).
2. Determinar los genes implicados en la glicosilación del flagelo polar y lateral de la cepa de *Aeromonas hydrophila* AH-1 de serotipo O:11.
3. Analizar el papel de la glicosilación en la regulación de la expresión de fimbrias/pili en *Aeromonas hydrophila* de serotipo O:11.

En el segundo capítulo se analizan las fimbrias presentes en los mutantes *wbpL* y *wbgZ* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, estableciendo los objetivos siguientes:

4. Determinar el tipo de fimbrias expresadas ante la mutación de los genes *wbpL* y *wbgZ* de la cepa *Aeromonas hydrophila* AH-1.
5. Obtención de la agrupación génica implicada en la biosíntesis de dichas fimbrias y determinar su distribución en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas.
6. Determinar el mecanismo de regulación de dichas fimbrias en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*.



## 2.MATERIAL Y MÉTODOS



## 2.1 Cepas bacterianas

**Tabla 2.1** Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

| Cepa                             | Genotipo o fenotipo relevantes <sup>1</sup>  | Procedencia                   |
|----------------------------------|--|-------------------------------|
| <i>Aeromonas</i> spp.            |  |                               |
| AH-1                             | <i>Aeromonas hydrophila</i> O:11   | Merino <i>et al.</i> , 1993   |
| AH-1R                            | Mutante espontáneo de AH-1 Rif <sup>r</sup>  | Altarriba 2003                |
| AH-1Δ <i>wbpL</i>                | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>wbpL</i>   | Nuestro laboratorio           |
| AH-1Δ <i>wbgZ</i>                | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>wbgZ</i>   | Nuestro laboratorio           |
| AH-1Δ <i>wbbB</i>                | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>wbbB</i>   | Nuestro laboratorio           |
| AH-1Δ <i>orf22</i>               | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>orf22</i>  | Nuestro laboratorio           |
| AH-1Δ <i>rfe</i>                 | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>rfe</i>  | Nuestro laboratorio           |
| AH-1Δ <i>wzy</i>                 | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>wzy</i>  | Nuestro laboratorio           |
| AH-1:: <i>lfgL<sub>L</sub></i>   | Mutante derivado de AH-1R por recombinación en un punto del vector pFS100- <i>lfgL<sub>L</sub></i> , Gm <sup>r</sup>       | Nuestro laboratorio           |
| AH-1:: <i>maf-1</i>              | Mutante derivado de AH-1R por recombinación en un punto del vector pCM100- <i>maf-1</i> , Cm <sup>r</sup>                  | Este trabajo                  |
| AH-1Δ <i>pseI</i>                | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>pseI</i>   | Este trabajo                  |
| AH-1Δ <i>pseB</i>                | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>pseB</i>   | Este trabajo                  |
| AH-1Δ <i>rmlB</i>                | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>rmlB</i>   | Este trabajo                  |
| AH-1Δ <i>flaB-flaJ</i>           | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>flaB-flaJ</i>  | Este trabajo                  |
| AH-1Δ <i>wbpLΔflaB-flaJ</i>      | Doble mutante derivado de AH-1Δ <i>wbpL</i> por doble recombinación del vector pDM4- <i>flaB-flaJ</i>                      | Este trabajo                  |
| AH-1:: <i>mshM</i>               | Mutante derivado de AH-1R por recombinación en un punto del vector pFS100- <i>mshM</i> , Gm <sup>r</sup>                   | Este trabajo                  |
| AH-1Δ <i>wbpL</i> :: <i>mshM</i> | Doble mutante derivado de AH-1Δ <i>wbpL</i> por recombinación en un punto del vector pFS100- <i>mshM</i> , Gm <sup>r</sup> | Este trabajo                  |
| AH-1Δ <i>mshL-mshE</i>           | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>mshL-mshE</i>  | Este trabajo                  |
| AH-1Δ <i>wbpLΔmshL-mshE</i>      | Doble mutante derivado de AH-1Δ <i>wbpL</i> por doble recombinación del vector pDM4- <i>mshL-mshE</i>                      | Este trabajo                  |
| AH-1Δ <i>mshA</i>                | Mutante derivado de AH-1R por doble recombinación del vector pDM4- <i>mshA</i>   | Este trabajo                  |
| AH-1Δ <i>wbpLΔmshA</i>           | Doble mutante derivado de AH-1Δ <i>wbpL</i> por doble recombinación del vector pDM4- <i>mshA</i>                           | Este trabajo                  |
| AH-3                             | <i>Aeromonas hydrophila</i> O:34   | Merino <i>et al.</i> , 1988   |
| AH-405                           | Mutante espontáneo de AH-3 Rif <sup>r</sup>  | Nogueras <i>et al.</i> , 2000 |
| ATCC7966 <sup>T</sup>            | <i>Aeromonas hydrophila</i> O:1  | ATCC <sup>2</sup>             |



|                         |   |                      |
|-------------------------|---|----------------------|
| A62                     | <i>Aeromonas hydrophila</i>   |                      |
| A62::mshM               | Mutante derivado de A62 por recombinación en un punto del vector pFS100-mshM, Km <sup>r</sup>                           | Este trabajo         |
| <b>Escherichia coli</b> |   |                      |
| DH5α                    | F <sup>-</sup> endA hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) supE44 thi-1 recA1 gyr-A96 80lacZ | Hanahan, 1983        |
| MC1061λpir              | thi thr1 leu6 proA2 his4 argE2 lacY1 galK2 ara14 xyl5 supE44 λpir   | Rubires et al., 1997 |
| HB101                   | pro leu thi lacY endoI recA <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>   | Ditta et al., 1985   |

<sup>1</sup> Abreviaturas de los antibióticos: Cm, cloranfenicol; Km, kanamicina; Rif, rifampicina; Str, estreptomicina; Tc, tetraciclina.

<sup>2</sup> ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*).

## 2.2 Vectores

**Tabla 2.2** Vectores utilizados en este trabajo.

| Vector         | Características principales  | Procedencia          |
|----------------|--|----------------------|
| pLA2917        | Cósmido, Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>                                     | Allen et al., 1985   |
| pLA-mshM11.6   | pLA2917 con la agrupación génica msh de AH-1, Tc <sup>r</sup>                | Este trabajo         |
| pGEM-T easy    | Vector de clonaje, lacZ Amp <sup>r</sup>                                     | Promega              |
| pRK2073        | Plásmido derivado de pRK2013 facilitador de la conjugación, Spc <sup>r</sup> | Ditta et al., 1985   |
| pFS100-Gm      | Plásmido suicida derivado de pGP704, λpir Gm <sup>r</sup>                    | Rubires et al., 1997 |
| pFSGm-mshM     | pFS100-Gm con un fragmento interno del gen mshM de AH-1, Gm <sup>r</sup>     | Este trabajo         |
| pFS100-Km      | Plásmido suicida derivado de pGP704, λpir Km <sup>r</sup>                    | Rubires et al., 1997 |
| pFS-mshM       | pFS100-Km con un fragmento interno del gen mshM de A62, Km <sup>r</sup>      | Este trabajo         |
| pCM100         | Plásmido suicida derivado de pGP704, λpir Cm <sup>r</sup>                    | Yu et al., 2004      |
| pCM-maf-1      | pCM100 con un fragmento interno del gen maf-1 de AH-1, Cm <sup>r</sup>       | Este trabajo         |
| pDM4           | Plásmido suicida, λpir, genes sacAB, Cm <sup>r</sup>                         | Milton et al., 1996  |
| pDM4-wbpL      | pDM4 con el gen wbpL de AH-1 deleciónado en pauta, Cm <sup>r</sup>           | Nuestro laboratorio  |
| pDM4-wbgZ      | pDM4 con el gen wbgZ de AH-1 deleciónado en pauta, Cm <sup>r</sup>           | Nuestro laboratorio  |
| pDM4-rmlB      | pDM4 con el gen rmlB de AH-1 deleciónado en pauta, Cm <sup>r</sup>           | Este trabajo         |
| pDM4-pseI      | pDM4 con el gen pseI de AH-1 deleciónado en pauta, Cm <sup>r</sup>           | Este trabajo         |
| pDM4-pseB      | pDM4 con el gen pseB de AH-1 deleciónado en pauta, Cm <sup>r</sup>           | Este trabajo         |
| pDM4-flaB-flaJ | pDM4 con los genes flaB-flaJ de AH-1 deleciónados en pauta, Cm <sup>r</sup>  | Este trabajo         |
| pDM4-mshL-mshE | pDM4 con los genes mshL-mshE de AH-1 deleciónados en pauta, Cm <sup>r</sup>  | Este trabajo         |
| pDM4-mshA      | pDM4 con el gen mshA de AH-1 deleciónado en pauta, Cm <sup>r</sup>           | Este trabajo         |

|                                 |   |                                 |
|---------------------------------|---|---------------------------------|
| pBAD33Cm                        | Vector de expresión inducible con arabinosa, contiene el promotor P <sub>BAD</sub> y el gen <i>araC</i> , Cm <sup>r</sup> | Guzmán <i>et al.</i> , 1995     |
| pBAD33Cm- <i>rmlB</i>           | pBAD33Cm con el gen <i>rmlB</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-1, Cm <sup>r</sup>   | Este trabajo                    |
| pBAD33Cm- <i>pseI</i>           | pBAD33Cm con el gen <i>pseI</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-1, Cm <sup>r</sup>   | Este trabajo                    |
| pBAD33Cm- <i>pseB</i>           | pBAD33Cm con el gen <i>pseB</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-1, Cm <sup>r</sup>   | Este trabajo                    |
| pBAD33Gm                        | Vector de expresión inducible con arabinosa, contiene el promotor P <sub>BAD</sub> y el gen <i>araC</i> , Gm <sup>r</sup> | Nuestro laboratorio             |
| pBAD33Gm-MshA-His               | pBAD33Cm con el gen <i>mshA</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-1 fusionado con cola de Histidinas, Gm <sup>r</sup>            | Este trabajo                    |
| pDN19lacΩ                       | Vector de expresión, <i>lacZ oriV oriT Tetr Strr</i>  | Totten, P. A. and S. Lory, 1990 |
| pDN19lacΩ –promotor <i>mshI</i> | pDN19lacΩ con la región promotora del operón <i>mshI-mshF</i> de AH-1, Tc <sup>r</sup>                                    | Este trabajo                    |
| pDN19lacΩ –promotor <i>mshB</i> | pDN19lacΩ con la región promotora del operón <i>mshB-mshQ</i> de AH-1, Tc <sup>r</sup>                                    | Este trabajo                    |

<sup>1</sup> Abreviaturas de los antibióticos: Amp, ampicilina; Cm, cloranfenicol; Km, kanamicina; Spc, espectinomicina; Tc, tetraciclina.

## 2.3 Cebadores

Los cebadores empleados para la amplificación de fragmentos de ADN por PCR se diseñaron utilizando el programa *Primer3* (*Version 0.3.0*, Rozen and Skaletsky, 2000), y fueron sintetizados por Sigma Aldrich.

**Tabla 2.3** Cebadores de vectores.

| Nombre                 | 5' Composición 3'          | Localización                |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>pFS100 / pCM100</b> |                            |                             |
| pGP-for                | 5'-ACGGATCCCAAGCTTCTT-3'   | diana <i>EcoRI</i>          |
| pGP-rev                | 5'-AGGGATGTAACGCACTGAG-3'  | diana <i>EcoRI</i>          |
| <b>pDM4</b>            |                            |                             |
| pDM-for                | 5'-AGTGATCTTCCGTACAGG-3'   | Lugar de clonaje del vector |
| pDM-rev                | 5'-AAGGTTTAACGGTTGTGGA-3'  | Lugar de clonaje del vector |
| <b>pLA2917</b>         |                            |                             |
| CSpLA                  | 5'-GACTGGGCGGTTTTATGG-3'   | diana <i>BglII</i>          |
| RpLA                   | 5'-CCATCTTGTTCAATCATGCA-3' | diana <i>BglII</i>          |
| <b>pGEM-T easy</b>     |                            |                             |
| SP6                    | 5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'  | Lugar de clonaje del vector |
| M13 for                | 5'-TGAAAACGACGGCCAGT-3'    | Lugar de clonaje del vector |
| <b>pBAD33</b>          |                            |                             |
| pBAD-F                 | 5'-ATACTCCCGCCATTCAGAG-3'  | Lugar de clonaje del vector |
| pBAD-R                 | 5'-GGAGACCCCACTACCAT-3'    | Lugar de clonaje del vector |

**Tabla 2.4** Cebadores para la construcción de las fusiones promotor-*lacZ*.

| PROMOTOR             | 5' COMPOSICIÓN 3'                               | LOCALIZACIÓN<br>(relativo al inicio<br>transcripción) |
|----------------------|---|---|
| promotor <i>mshI</i> | 5'- <u>CGGAATTC</u> GACAAAAACGAGATCCA -3'       | -503 <i>mshI</i>                                      |
|                      | 5'- CGC <b>GGATCC</b> TCGAACGTCTGAAAAGTTGTT -3' | +22 <i>mshI</i>                                       |
| promotor <i>mshB</i> | 5' - <u>CGGAATTCT</u> GGCAGTTTGATGAACG -3'      | -300 <i>mshB</i>                                      |
|                      | 5'-CG <b>GGATCC</b> AGCTCGATCAACGAGAAAC-3'      | +59 <i>mshB</i>                                       |

Las letras subrayadas muestran la diana de restricción *EcoRI*, mientras que las subrayadas y en negrita muestran la diana para *BamHI*.

**Tabla 2.5** Cebadores para clonar la pilina MshA de *Aeromonas hydrophila* AH-1 fusionada a una cola de histidinas (His-Tag) en el vector pBAD33Gm.

| Nombre          | 5' Composición 3'   | Fragmento amplificado |
|-----------------|---|-----------------------|
| A1MshA-SmaI     | 5'- <u>TCCCCCGGG</u> TCAGGTGACCACCAATA -3'                              | <i>mshA</i>           |
| A1MshA-His-XbaI | 5'- <u>GCTCTAGA</u> <b>TTAGTGATGATGATGGTGGT</b> GATTGCAGTCAGTGGTCAC -3' |                       |

Las letras subrayadas muestran la diana correspondiente al cebador y las letras en negrita corresponden a la cola de seis Histidinas. En cursiva se muestra el codón de parada.

**Tabla 2.6** Cebadores para la construcción de sondas.

| Nombre   | 5' Composición 3'                              | Fragmento amplificado |
|----------|--|-----------------------|
| 0385for  | 5'- TGAAACAAC <sup>5'</sup> TTTTCAGACGTTTC -3' | <i>mshI</i>           |
| 0385rev  | 5'- CGAAGGTCTGCTCCATGT -3'                     |                       |
| MshMfor2 | 5'- AGGGCTTCATCAAGGTGAC -3'                    | <i>mshM</i>           |
| MshMrev2 | 5'- CTTCTGCGCCAGTATGTTG -3'                    |                       |
| MshQfor  | 5'- GCGTCAAGTTCTGGAGCA -3'                     | <i>mshQ</i>           |
| MshQrev  | 5'- CTTGCGCCGATAAATAAT -3'                     |                       |

**Tabla 2.7** Cebadores para la construcción de mutantes por recombinación en un punto y en pauta de lectura.

| Nombre  | 5' Composición 3' (ª)                                    | Fragmento amplificado          |
|---|--|--------------------------------|
| <b>Cebadores usados para la construcción de mutantes en pauta</b> |  |                                |
| A-PseB  | 5'-GA <u>AGATCT</u> GAGGACAAACAACGGATG-3'                |                                |
| B-PseB  | 5'- <u>CCCATCCACTAAACTTAAACAT</u> TGTCTTGACCAGCATCTT -3' | fragmento AB de $\Delta$ pseB  |
| C-PseB  | 5'- <u>IGTTTAAGTTTAGTGGATGGG</u> ATGAACCAGCAGGTGTTGT-3'  |                                |
| D-PseB  | 5'- GA <u>AGATCT</u> AAGCTGAAGACCGTCATGT -3'             | fragmento CD de $\Delta$ pseB  |
| A-PseI  | 5'- CGGGATCCAATGCTGGATGATGAGCAA-3'                       |                                |
| B-PseI  | 5'- <u>CCCATCCACTAAACTTAAACAG</u> TCAGCGGTATAGGTTTGCA-3' | fragmento AB de $\Delta$ pseI  |
| C-PseI  | 5'- <u>IGTTTAAGTTTAGTGGATGGG</u> AGACGAGGCAAAGCAGTC-3'   |                                |
| D-PseI  | 5'-CGGGATCCTTTAACTGGCCTGGCTCTA-3'                        | fragmento CD de $\Delta$ pseI  |
| A-RmlB  | 5'-GA <u>AGATCT</u> TCCATCAGCAGGTCAAT-3'                 |                                |
| B-RmlB  | 5'- <u>CCCATCCACTAAACTTAAACAG</u> TTGAGAACTGAGTCGTTGG-3' | fragmento AB de $\Delta$ rmlB  |
| C-RmlB  | 5'- <u>IGTTTAAGTTTAGTGGATGGG</u> AGCGGATCCTATCAGTCCT-3'  |                                |
| D-RmlB  | 5'-GA <u>AGATCT</u> CTGGCTTTGACAAACA-3'                  | fragmento CD de $\Delta$ rmlB  |
| A-FlaB  | 5'-CGGGATCCAACAGTCTGCCAATGGTTC-3'                        |                                |
| B-FlaB  | 5'- <u>CCCATCCACTAAACTTAAACAG</u> TTAGCCTGAGCCAAAATG-3'  | fragmento AB de $\Delta$ flaBJ |
| C-FlaJ  | 5'- <u>IGTTTAAGTTTAGTGGATGGG</u> AGACAACAGCTAGGGGAGTT-3' |                                |
| D-FlaJ  | 5'-CGGGATCCAACGTTTCACAAGCAAGA-3'                         | fragmento CD de $\Delta$ flaBJ |
| A-A1MshA  | 5'- GA <u>AGATCT</u> CGTTTTCTCGATGTCACG-3'               |                                |
| B-A1MshA  | 5'- <u>CCCATCCACTAAACTTAAACA</u> ACCCAGAATGATGATCACG-3'  | fragmento AB de $\Delta$ mshA  |
| C-A1MshA  | 5'- <u>IGTTTAAGTTTAGTGGATGGG</u> ACTTACACCGAGGCAACG-3'   | fragmento CD de                |

|  |   |                                  |
|--|---|----------------------------------|
| D-<br>A1MshA   | 5'- GA <u>AGATCT</u> CCTGAGGAGCCTGATTGA -3' | <i>ΔmshA</i>                     |
| MshLfor  | 5'- CATGACCGAGCAGAACAAG -3'                 | fragmento AD de<br><i>ΔmshLE</i> |
| MshErev  | 5'-GGTCGAAATACTCCAGCAG -3'                  |                                  |
| <b>Cebadores usados para la construcción de mutantes por inserción</b> |   |                                  |
| MshMfor2   | 5'- AGGGCTTCATCAAGGTGAC -3'                 | Fragmento interno<br><i>mshM</i> |
| MshMrev<br>2   | 5'- CTTCTGCGCCAGTATGTTG -3'                 |                                  |
| A1Maf-1<br>for   | 5'- TTCATCAGGAAAACCTTGG -3'                 | Fragmento interno <i>maf-1</i>   |
| A1Maf-1<br>rev   | 5'- ACATCAGGTCACCAAGAGC-3'                  |                                  |

(<sup>a</sup>) Las letras con doble subrayado corresponden a las 21 pb complementarias; letras subrayadas muestran diana *Bam*HI y las letras subrayadas y en negrita muestran la diana *Bg*III.

**Tabla 2.8** Cebadores para los ensayos de complementación en pBAD33Cm.

| Nombre                | 5' Composición 3'                            | Fragmento amplificado |
|-----------------------|--|-----------------------|
| PseB-for (XbaI)       | 5'- GCTCTAGATGGAATAAACTGGCATCA-3'            | <i>pseB</i>           |
| PseB-rev<br>(HindIII) | 5'-CCAAGCTTGACCTTGGGTCAGATAATCA-3'           |                       |
| PseI-for (SmaI)       | 5'-TCC <u>CCCGGG</u> TTCACCTTTTCACGCCTAT-3'  | <i>pseI</i>           |
| PseI-rev (XbaI)       | 5'-GCTCTAGACTAATGCTAAAGCGACAACG-3'           |                       |
| RmlB-for (SmaI)       | 5'-TCC <u>CCCGGG</u> CAGTTTGAGCGAGCATTTTC-3' | <i>rmlB</i>           |
| RmlB-rev (XbaI)       | 5'-GCTCTAGAAAGTCACCGCAGTAGTCG-3'             |                       |

Las letras subrayadas muestran la diana correspondiente al cebador que se indica entre paréntesis.

## 2.4 Medios de cultivo y suplementos

### 2.4.1 Medios de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* se hicieron crecer en medio Luria-Bertani (LB) Miller o LB Miller agar (LB + 1.5% agar), a las temperaturas de 37°C o 30°C, según requerimiento. Los crecimientos de las cepas de *Aeromonas*, si no se indica lo contrario, se realizaron en caldo de triptona y soja (TSB) o agar de triptona y soja (TSA) a 30°C.

## 2.4.2 Suplementos

Cuando fue necesario, se añadieron diferentes suplementos a los medios de cultivo mencionados. Como antibióticos se utilizó: ampicilina (sal sódica, USB), 100 µg/ml; cloranfenicol (USB), 10-25 µg/ml; espectinomicina (diclóridrato pentahidrato, AppliChem), 50 µg/ml; gentamicina (sulfato, AppliChem), 100 µg/m; kanamicina (sulfato, AppliChem), 25-50 µg/ml; rifampicina (AppliChem), 100 µg/ml; tetraciclina (AppliChem), 20 µg/ml. Otros suplementos: 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosido (X-Gal, AppliChem), 40 µg/ml; isopropil-B-D-tiogalactopiranosido (IPTG, USB), 0,2 mM; arabinosa (USB), 0,2%; sacarosa (BDH Anala®), 0.2%.

## 2.5 Ensayos de motilidad

Para los ensayos de *swimming* en agar se partió de cultivos líquidos de la cepa de interés y se inoculó una gota de 3-5 µl en el centro de una placa de agar semisólido (1% tripton, 0.5% NaCl, 0.25% agar). Las placas se incubaron durante 24-48h a una temperatura de 25°C y la motilidad se determinó mediante la migración de la bacteria a través del agar desde la gota central hacia la periferia de la placa. La motilidad también fue evaluada en cultivos líquidos mediante observación en microscopio óptico de una gota pendiente en portaobjetos excavados.

## 2.6 Técnicas de genética molecular

### 2.6.1 Aislamiento de ADN genómico

Para la purificación de ADN genómico se empleó el *kit* de Invitrogen *Easy-DNA kit, Genomic DNA isolation*, según las recomendaciones del proveedor.

### 2.6.2 Aislamiento de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico de medio a alto número de copias se realizó con el *kit GFX Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare). La obtención de grandes cantidades de plásmidos, así como de plásmidos de bajo número de copias, se realizó con el *kit Qiagen Plasmid Midi-Prep Preparations* (Qiagen). En ambos casos se siguieron las recomendaciones de la casa comercial.

### **2.6.3 Aislamiento de ARN**

El ARN total se aisló mediante *RNA Protect Bacteria Reagent* (Quiagen) y *RNeasy® Protect mini kit* (Quiagen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ARN obtenido se trató con *RNase-free TurboDNase I* (Ambion) para eliminar los posibles restos de ADN de la muestra, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Posteriormente, la ausencia de ADN en la muestra se determinó mediante una PCR control con cebadores específicos.

### **2.6.4 Precipitación de ADN**

La precipitación de ADN se llevó a cabo mediante el método descrito por Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982). Brevemente, se añadió acetato sódico (Merck) 3M pH 4,8 en una proporción 1:10 respecto al volumen total en el que se encontraba disuelto el ADN. Seguidamente se adicionó etanol absoluto (Panreac) frío 2:1 respecto al volumen final obtenido en el paso anterior, mezclándose suavemente y manteniéndose un mínimo de 2 horas a una temperatura de -20°C. A continuación se centrifugó a 13000 x g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, para seguidamente descartar el sobrenadante y realizar dos lavados de diez minutos con etanol 70% frío. Finalmente, se realizó el secado de la muestra en una centrífuga de vacío (*Speed-Vac modelo 100*, Savant Instruments Inc.).

### **2.6.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Se utilizaron geles de agarosa (Pronadisa) con un porcentaje de 0,5% a 2%, en función del tamaño de los fragmentos a separar (Maniatis *et al.*, 1982). El tampón utilizado tanto en los geles como en las cubetas de electroforesis fue TAE 1x. Para visualizar el ADN, se añadió bromuro de etidio (Ecogen) al gel, a una concentración de 0,5 µg/ml. Las muestras de ADN se mezclaron en una proporción 1:6 con tampón de muestras 6x. Además, tanto para determinar el tamaño como para cuantificar la cantidad de ADN de las muestras, se cargaron en los geles marcadores de ADN de peso molecular y concentración conocidos (Fago λ *Hind*III de Bioron y/o Ecoladder de Ecogen). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales *Mini* de Ecogen aplicando un voltaje de 5-10 V/cm (Lewis, 1986). Los geles se visualizaron y fotografiaron en un

transiluminador de luz ultravioleta ( $\lambda=302\text{nm}$ ; *Image Master<sup>®</sup> VDS* de Pharmacia Biotech).

**Tabla 2.9** Soluciones para la electroforesis de ADN.

| Tampón TAE 50x                        | Tampón de muestras 6x                  |
|---------------------------------------|--|
| 40 mM Tris (AppliChem)                | 40% sacarosa (BDH Anala <sup>®</sup> ) |
| 1 mM EDTA pH 8 (Merck)                | 0,25% azul de bromofenol (USB)         |
| 40 mM Ácido acético glacial (Panreac) |  |

## 2.6.6 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante dos métodos, dependiendo de la precisión deseada en la medida.

### 2.6.6.1 Cuantificación en geles de agarosa

En general, el ADN se cuantificó mediante la observación de la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio intercalado entre las bases de la doble hélice cuando es irradiado con luz ultravioleta; esta emisión es directamente proporcional a la masa total de ADN. En un mismo gel de agarosa se cargaron diferentes diluciones de las muestras del ADN a cuantificar y concentraciones conocidas del marcador de ADN. Se cuantificó la concentración de ADN por comparación entre la intensidad de las bandas de las muestras respecto a las del marcador.

### 2.6.6.2 Cuantificación espectrofotométrica

Cuando fue requerida una cuantificación más precisa, se utilizó un espectrofotómetro, modelo *GeneQuant pro* de Amersham Biosciences, para determinar la cantidad de ADN.

### 2.6.7 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa se realizó empleando *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare), según recomendaciones del fabricante.



## **2.6.8 Reacciones enzimáticas con el ADN**

### **2.6.8.1 Restricciones**

Para la digestión enzimática del ADN se utilizaron diferentes endonucleasas de restricción suministradas por GE Healthcare y Bioron. La cantidad a digerir del ADN se mezcló con la endonucleasa y el tampón, según las condiciones indicadas por la casa comercial y, salvo excepciones, se incubó 2 horas a 37°C.

### **2.6.8.2 Obtención de extremos romos**

Para obtener extremos romos a partir de extremos 5' protuberantes se utilizó el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa (USB), según las recomendaciones hechas por la casa comercial. En caso de partir de extremos 3' protuberantes, se procedió a la utilización de la nucleasa S1 (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones de los proveedores.

### **2.6.8.3 Defosforilación de vectores**

Con el fin de eliminar el fosfato presente en el extremo 5' de los vectores digeridos y prevenir su recircularización en los ensayos de ligación, se trataron con la enzima de modificación fosfatasa alcalina (USB). El tratamiento se realizó según las condiciones descritas por Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989).

### **2.6.8.4 Ligación**

Las reacciones de ligación se realizaron en general a una relación inserto:vector 3:1 si se trataba de fragmentos de ADN de extremos cohesivos y 5:1 en el caso de extremos romos. La mezcla inserto-vector se incubó durante 5 minutos a 65°C para relajar el ADN. Tras sumergirla en hielo se añadió T4 ADN ligasa y el tampón de ligación (Invitrogen), incubándose toda la noche a 16-20°C. Para ligaciones más rápidas y eficientes, se utilizó *Fast-Link*<sup>TM</sup> ADN ligasa (Epicentre® Biotechnologies), según las recomendaciones de la casa comercial. Las reacciones de ligación a pGEM-T *easy* se realizaron según las instrucciones suministradas por la casa comercial (Promega).

### 2.6.9 Construcción de una librería genómica

Se realizó una digestión parcial del ADN cromosómico de *A. hydrophila* AH-1 con la enzima de restricción *Sau3A*. Se escogió esta enzima debido a que tiene una diana de restricción de 4 pares de bases y genera extremos cohesivos compatibles con los generados por las enzimas *BamHI* y *BgIII*. La digestión parcial se realizó diluyendo de manera seriada la cantidad de enzima de restricción añadida en cada reacción, manteniendo la cantidad de ADN genómico, e incubando las mezclas durante 30 minutos a 37°C. Las restricciones se analizaron en geles de agarosa y se recortaron los fragmentos de ADN con un tamaño de 15-20 kb, ligándolos al cósmido pLA2917 digerido con *BgIII* y desfosforilado. Posteriormente, se llevó a cabo el empaquetamiento *in vitro* en el fago  $\lambda$  y la infección de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  según el protocolo del *kit* de empaquetamiento (*Gigapack III Gold Packaging Extract* de Stratagene).

### 2.6.10 Métodos de transferencia genética

La transferencia de ADN plasmídico a las cepas de *Aeromonas* spp. se realizó mediante procesos de conjugación triparental y la transferencia de ADN plasmídico a cepas de *E. coli* se realizó generalmente mediante transformación por electroporación.

#### 2.6.10.1 Transformación mediante electroporación

Las cepas bacterianas, todas ellas de *E. coli*, fueron preparadas para ser electrotransformadas siguiendo el procedimiento descrito por Dower (Dower, 1988). Se utilizó un electroporador modelo *Electro Cell Manipulator 600 (BTX Electroporation System)*, cubetas *BTX* de 2 mm (Biotechnologies & Experimental Research Inc.) y las condiciones que se especifican en la siguiente tabla:

**Tabla 2.10** Condiciones de electroporación de *E. coli*.

| Condiciones de electroporación de <i>E. coli</i> |                                      |
|--|--------------------------------------|
| Modo   | 2,5 kV / Resistencia de alto voltaje |
| Capacitancia                                     | No utilizar en modo de alto voltaje  |
| Resistencia                                      | R5 (129 $\Omega$ )                   |
| Voltaje de descarga                              | 2 kV                                 |
| Fuerza del campo eléctrico aplicado              | 10 kV / cm (máximo)                  |
| Duración del pulso                               | 5 ms                                 |

Las cepas transformadas se recogieron en 1 ml de LB y se incubaron 1 hora, a la temperatura adecuada según la cepa y/o plásmido introducido, para facilitar la expresión de los marcadores fenotípicos transmitidos. Seguidamente, se plaquearon diferentes diluciones en LB agar con los antibióticos y/o suplementos necesarios para la selección de las células transformantes.

### 2.6.10.2 Conjugación en medio sólido

La conjugación triparental se realizó mezclando cultivos estacionarios de las cepas dadora, facilitadora (*E. coli* HB101 + pRK2073) y receptora en una proporción 1:1:5 sobre una placa de LB. La placa se incubó un mínimo de 6 horas a 30°C o durante toda la noche si se requería aumentar la eficiencia de la conjugación. Tras la incubación, las bacterias se recogieron en 1 ml de TSB y se sembraron diversas diluciones en placas de TSA suplementadas con los antibióticos necesarios para la selección de los transconjugantes, incubándose a la temperatura óptima de la cepa receptora.

### 2.6.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en termocicladores *GeneAmp PCR System 2400* de Perkin Elmer o *Primus 96 Advanced Gradient* de PeqLab Biotechnologie GmbH.

#### 2.6.11.1 Amplificación de fragmentos de ADN

Para la amplificación de fragmentos de ADN de hasta 4 kb se utilizó *EcoTaq* ADN polimerasa de Ecogen y los tampones suministrados por la misma casa comercial, una mezcla de dNTP suministrada por Bioron, y agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) de Gibco. Como molde, se utilizó tanto ADN purificado (apartados 2.6.1 y 2.6.2) como colonias lisadas mediante el *kit* de lisis *Colony Fast-Screen<sup>TM</sup> kit (PCR-Screen)* de Epicentre® Biotechnologies. La composición de la mezcla de reacción y el programa de amplificación se detallan en la tabla 2.11.

**Tabla 2.11** Condiciones de amplificación con *EcoTaq* ADN polimerasa.

| Composición de la mezcla de reacción | Programa de amplificación |
|--------------------------------------|---------------------------|
| 1x tampón de PCR                     | 1 ciclo                   |
| 0,2 mM dNTP <i>mix</i>               | - 3 minutos a 94°C        |
| 2mM <sup>1</sup> MgCl <sub>2</sub>   | 25-30 ciclos:             |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| 0,5 µM cebador (cada uno)         | - 45 segundos a 94°C                       |
| 50-100 ng de ADN molde purificado | - 30 segundos a Tm <sup>2</sup>            |
| 2,5 U <i>Taq</i> ADN polimerasa   | - 1 minuto / kb de ADN a amplificar a 72°C |
| Agua desionizada DEPC hasta 50 µl | 1 ciclo                                    |
|                                   | - 10 minutos a 72°C                        |

<sup>1</sup> La concentración de MgCl<sub>2</sub> se optimizó en algunas ocasiones.

<sup>2</sup> Temperatura de hibridación ADN/cebador, dependiente de los cebadores utilizados.

Para la amplificación de fragmentos de longitud superior a 4 kb, o cuando fue necesaria mayor especificidad y fidelidad de secuencia, se utilizó *AccuPrime<sup>TM</sup> Taq* ADN polimerasa *High Fidelity* de Invitrogen y las siguientes condiciones:

**Tabla 2.12** Condiciones de amplificación con *AccuPrime<sup>TM</sup> Taq* ADN polimerasa.

| Composición de la mezcla de reacción                   | Programa de amplificación                  |
|--|--|
| 50-100 ng de ADN molde purificado                      | 1 ciclo                                    |
| 1x tampón I <i>AccuPrime<sup>TM</sup></i> <sup>1</sup> | - 2 minutos a 94°C                         |
| 0,5 µM cebador (cada uno)                              | 35 ciclos                                  |
| 1 U <i>AccuPrime<sup>TM</sup> Taq High Fidelity</i>    | - 30 segundos a 94°C                       |
| Agua desionizada DEPC hasta 50 µl                      | - 30 segundos a Tm <sup>2</sup>            |
|  | - 1 minuto / kb de ADN a amplificar a 68°C |

<sup>1</sup> El tampón I *AccuPrime<sup>TM</sup>* 10x lleva incorporado MgSO<sub>4</sub> 20 mM, quedando la concentración final a 2 mM. En caso de tener que optimizar la cantidad de MgSO<sub>4</sub>, el *kit* presenta una solución a 50mM.

<sup>2</sup> Temperatura de hibridación ADN/cebador, en función de los cebadores utilizados.

### 2.6.11.2 Transcripción reversa (RT-PCR)

Para sintetizar la primera cadena de cADN se utilizó ARN tratado con *DNasa I RNasa free* (Invitrogen) y se siguió el protocolo indicado en el *kit Thermoscript RT-PCR system* de Invitrogen. Se realizó un control negativo con todos los componentes de la reacción excepto la transcriptasa reversa con el fin de confirmar que las muestras no estaban contaminadas con ADN genómico. Las subsecuentes amplificaciones fueron llevadas a cabo con *AccuPrime<sup>TM</sup> Taq* ADN polimerasa.

**Tabla 2.13** Síntesis del ADNc.

| Composición de la mezcla de reacción | Programación del termociclador |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| 3-5 µg de ARN                        | Desnaturalización del ARN      |
| 50 ng/µl del cebador <i>random</i>   | 5 minutos a 65°C               |
| Agua desionizada DEPC hasta 10 µl    |                                |

|   |  |
|---|--|
| 1x tampón síntesis ADNc                   |  |
| 1 mM dNTP <i>mix</i>                      | 10 minutos a 25°C  |
| 5 mM DTT <sup>1</sup>                     | 45 minutos a 50°C (temperatura de hibridación ARN/cebador) |
| 40 U RNasaOUT                             | 5 minutos a 85°C (inactivación transcriptasa reversa)      |
| 15 U transcriptasa <i>ThermoScript RT</i> |  |
| Agua desionizada DEPC hasta 20 µl         |  |
| 2 U de <i>RNasa H</i>                     | 20 minutos a 37°C (degradación del ARN)                    |

<sup>1</sup>DTT, ditioneitol.

### 2.6.11.3 PCR semicuantitativa

Para la realización de RT-PCR semicuantitativa, se llevó a cabo la síntesis de la primera cadena de cADN partiendo de diferentes cantidades de ARN: 5, 3 y 1 µg y posteriormente siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior.

Como control de los niveles de transcripción, se utilizaron cebadores del gen *rrsA* que codifica el ARNr 16S de *A. hydrophila*.

Las alícuotas de los productos de PCR obtenidos a partir de las diferentes cantidades de ARN fueron analizadas mediante electroforesis en un gel de agarosa y se estimó la intensidad de las bandas de forma comparativa.

### 2.6.12 Secuenciación de fragmentos de ADN

**Tabla 2.14** Condiciones de secuenciación.

| Composición de la mezcla de reacción   | Programa de amplificación         |
|--|-----------------------------------|
| 2 µl <i>Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Ready reaction premix</i> <sup>1</sup> | 1 ciclo<br>- 4 minutos a 96°C     |
| 25-500 ng de ADN molde   | 25 ciclos<br>- 30 segundos a 96°C |
| 3,2 pmol de cebador  | - 15 segundos a Tm <sup>2</sup>   |
| Agua desionizada hasta 10 µl   | - 4 minutos a 60°C                |

<sup>1</sup> Contiene ADN polimerasa termoestable, tampón, mezcla de dNTP y ddNTP.

<sup>2</sup> La temperatura de hibridación ADN/cebador se determinó generalmente según la siguiente fórmula:  $[2 \times (A+T)] + [4 \times (G+C)]$

Para la secuenciación de fragmentos de ADN se utilizó el protocolo descrito en *ABI PRISM Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de Applied Biosystems y el sistema analítico CEQ<sup>TM</sup> 8000 (Beckman-Coulter) disponible en los Servicios Científico-Técnicos (SCT) de la Universidad de Barcelona. Este sistema se basa en el método Sanger (Sanger *et al.*, 1977), que consiste en la síntesis de moléculas

de ADN en presencia de didesoxinucleótidos (ddNTP), que terminan la síntesis de ADN y que están marcados con diferentes fluorocromos. La composición de la mezcla de reacción y el programa utilizado para la secuenciación se especifican en la tabla 2.14.

### **2.6.13 Software utilizado para el análisis de secuencias**

Para el estudio y análisis de las diferentes secuencias obtenidas se utilizaron diferentes programas informáticos.

Para la detección de pautas de lectura abierta, localización de dianas para enzimas de restricción, traducción de secuencias de ADN a proteína, detección de secuencias terminadoras y diseño de cebadores, se utilizaron los programas: *GCG (Wisconsin Package v. 9.0, Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin)*, *SeqAid II v. 3.81* (D. D. Rhoads y D. J. Roufa, *Molecular Genetics Laboratory, Center for Basic Cancer Research, Kansas State University, 1991*), *FramePlot v. 2.3.2* (Ishikawa and Hotta, 1999), *BioEdit v. 7.0.1* (Hall, 1999) y *Primer3 v. 0.3.0* (Rozen and Skaletsky, 2000). La búsqueda de putativos promotores se llevó a cabo principalmente con el software para la predicción de promotores de la página web [www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org), y los alineamientos de secuencias se realizaron mediante el programa *Clustal W* (Thompson, 1994).

Las proteínas homólogas se identificaron mediante el programa *BLAST* (Altschul, 1990; Altschul, 1997) en las bases de datos GenBank, EMBL y *Protein Identification Resource*. Con el programa *ProtParam* de EXPASy se analizaron las principales características de las proteínas, el análisis de los dominios se llevó a cabo utilizando la base de datos de familias de proteínas Pfam del centro de Sanger (Bateman *et al.*, 2002).

### **2.6.14 Detección de fragmentos de ADN**

#### **2.6.14.1 Preparación de sondas**

Las sondas se obtuvieron mediante amplificación por PCR utilizando dNTP marcados con digoxigenina (Roche). Tras la reacción de PCR, se realizaba electroforesis en geles de agarosa y, seguidamente, purificación del ADN amplificado a partir del gel de agarosa.

### 2.6.14.2 Colony blot

Se sembraron las colonias a analizar, de manera ordenada, en placas de LB suplementadas con el antibiótico necesario, incubándolas a 37°C durante 5-6 horas. Después de mantener las placas 30 minutos a 4°C para facilitar la posterior transferencia, se transfirieron por contacto (1 minuto) a membranas de nylon de 82 mm de diámetro y 1,2 µm de poro (Boehringer Mannheim). Tras secar las membranas a temperatura ambiente durante 15 minutos, se realizaron, de forma secuencial, incubaciones de 3 minutos en SDS 10% (Merck), 15 minutos en solución desnaturalizante, 15 minutos en solución neutralizante y 10 minutos en SSC 2x. Seguidamente, se fijó el ADN por iluminación ultravioleta en un *UV Crosslinker* de Hoefer. Una vez fijado el ADN, se realizó un tratamiento con proteinasa K para eliminar los restos celulares, incubándose 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se colocaron las membranas entre papeles de filtro humedecidos con agua y efectuando una cierta presión los restos celulares se transfirieron al papel de filtro. Seguidamente, se procedió a la hibridación y revelado de las membranas según el método indicado en el *kit* de marcaje y detección de sondas de ADN no radioactivas de Boehringer Mannheim. Brevemente, las moléculas marcadas se detectan mediante inmunoensayo, utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) que da lugar a una reacción cromática tras la adición de los sustratos NBT (disodio-nitroazul tetrazolio, USB) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, AppliChem).

**Tabla 2.15** Soluciones para *Colony blot*.

| Solución desnaturalizante | Solución neutralizante          | SSC 20x                         | Proteinasa K 2 mg/ml      |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 0,5 M NaOH (Panreac)      | 1 M Tris-HCl pH 7,5 (AppliChem) | 0,3 M Na-citrato pH 7,0 (Merck) | 2 mg Proteinasa K (Merck) |
| 1,5 M NaCl (Merck)        | 1,5 M NaCl (Merck)              | 3 M NaCl (Merck)                | 1 ml SSC 2x               |
| Ajustar a pH 7,4          |                                 |                                 |                           |

### 2.6.14.3 Dot blot

El ADN se desnaturalizó incubándolo durante 5 minutos a 100°C y se mantuvo en hielo otros 5 minutos antes de depositar la muestra sobre membranas de nylon de 0,45 µm de poro, Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Biosciences). Las membranas se dejaron secar al aire y el ADN se fijó por iluminación de las membranas con luz ultravioleta en un *UV*

*Crosslinker* de Hoefer antes de proceder a la hibridación y revelado según el método descrito en el sistema de marcaje y detección de sondas de ADN no radioactivas de Boehringer Mannheim.

#### 2.6.14.4 Southern blot

El ADN que se pretendía hibridar se sometió, en primer lugar, a una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% en tampón TBE 1x. El grosor de estos geles era menor al habitual para minimizar el tiempo de transferencia y facilitar la misma. La transferencia a membranas de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Biosciences), se llevó a cabo mediante el *Vacuum Blotting System* de Pharmacia Biotech y según las instrucciones suministradas por los fabricantes. Para proceder a la hibridación y revelado se siguió el método descrito en el *kit* de marcaje y detección de sondas de ADN no radioactivas de Boehringer Mannheim.

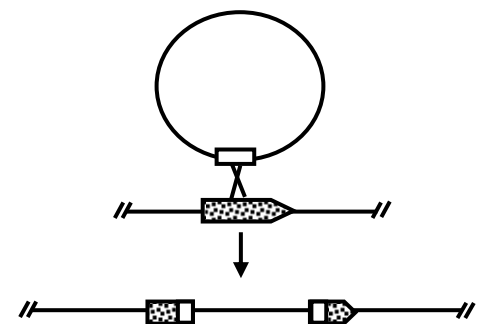
**Tabla 2.16** Composición del tampón TBE.

| Tampón TBE 5x              |
|----------------------------|
| 45 mM Tris (AppliChem)     |
| 45 mM Ácido bórico (Merck) |
| 1 mM EDTA pH 8,3 (Merck)   |

#### 2.6.15 Técnicas de mutagénesis

##### 2.5.15.1 Mutagénesis dirigida por recombinación en un punto

La obtención de mutantes por recombinación en un punto se realizó utilizando los vectores suicida pFS100 (Km<sup>r</sup>), PFS100Gm (Gm<sup>r</sup>) o pCM100 (Cm<sup>r</sup>), según el protocolo descrito por Rubires (Rubires *et al.*, 1997) (figura 2.1). Este método se basa en clonar un fragmento interno de la región codificante del gen a mutar en el



**Figura 2.1** Esquema del funcionamiento del sistema de recombinación en un punto.

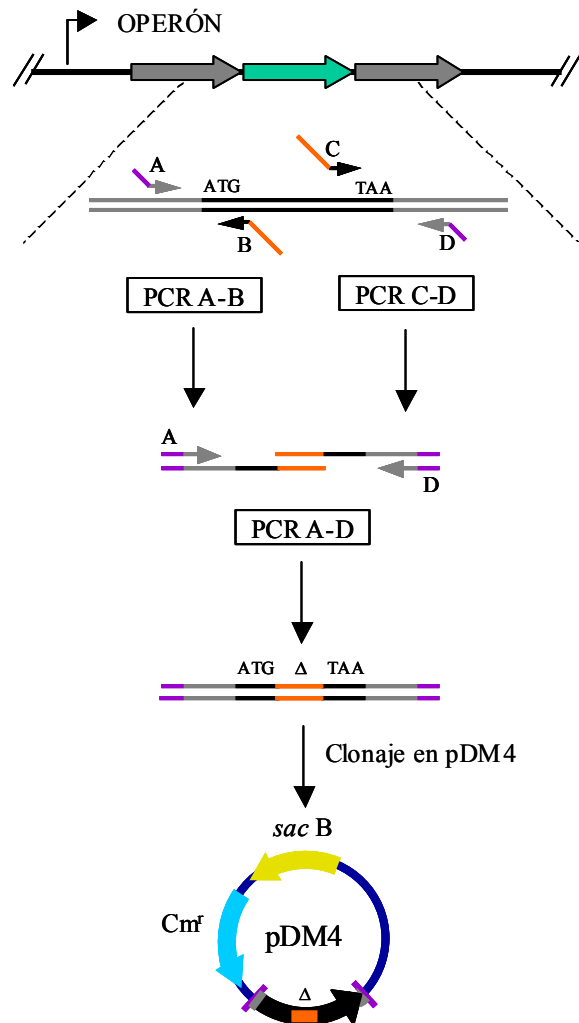
vector suicida, cuya replicación depende de la proteína  $\lambda\text{pir}$ . Posteriormente, se transforma la construcción en la cepa de *E. coli* MC1061 ( $\lambda\text{pir}$ ), la cual se utilizará para transferir el plásmido mediante conjugación a la cepa a mutar (apartado 2.6.10.2). La selección de mutantes se realiza empleando una resistencia característica de la cepa a mutar y la resistencia para el marcador del vector empleado. Dado que el plásmido no



puede replicarse en cepas que carecen de la proteína  $\lambda$ pir, las colonias resistentes al marcador del plásmido presentan, en su mayoría, dicho plásmido integrado por recombinación homóloga en el gen a mutar. La recombinación en un punto genera dos copias truncadas del gen a mutar en el genoma del microorganismo.

### 2.6.15.2 Mutagénesis dirigida por doble recombinación

Para generar mutaciones dirigidas pero minimizando los posibles efectos polares que la mutación pudiera provocar en la expresión del resto de los genes de una agrupación, se recurrió a la mutagénesis cromosómica dirigida por doble recombinación produciéndose la deleción de un fragmento interno del gen a mutar de manera que se mantuviera la pauta de lectura. Para ello, se utilizó el sistema basado en el vector suicida pDM4 con replicación dependiente de la proteína  $\lambda$ pir (Milton *et al.*, 1996). Se utilizaron dos parejas de cebadores para sintetizar *in vitro* una copia delecionada del gen a mutar manteniendo la pauta de lectura del gen. Una pareja de cebadores, denominados A y B, amplificaba la región inmediatamente anterior al gen y los primeros tripletes completos de éste. Los cebadores C y D amplificaban la región inmediatamente posterior al gen y los últimos tripletes de éste.

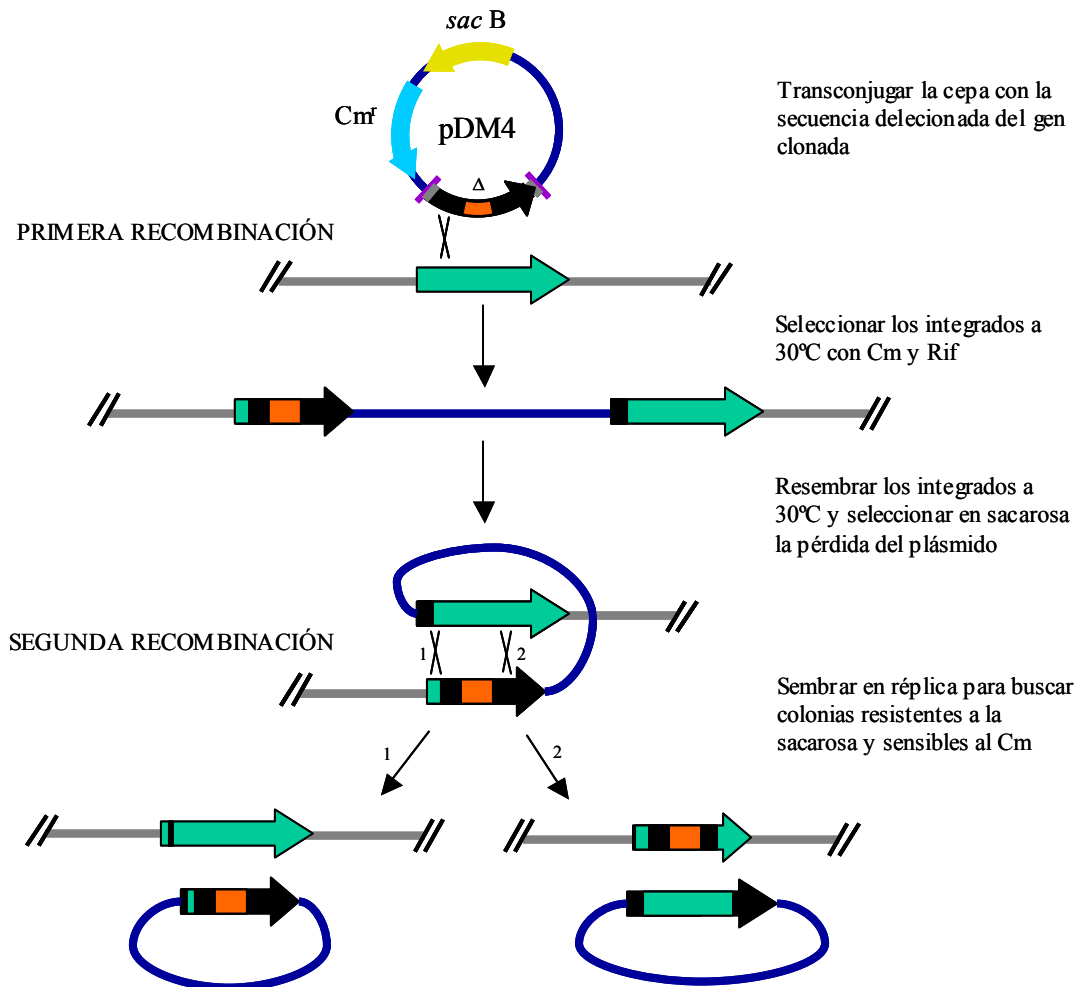


**Figura 2.2** Diseño de construcciones delecionadas en pauta. Figura adaptada de Link *et al.*, 1997.

Los cebadores B y C fueron diseñados de manera que en su extremo 5' presentaran una “cola” de 21 pb complementarias carentes de señales de terminación, y los cebadores A y D, con una diana de restricción.

Se realizaron dos PCR asimétricas independientes con las parejas de cebadores A-B y C-D, respectivamente. Los productos de amplificación se utilizaron como molde para una última PCR con los cebadores A y D y el fragmento obtenido, una vez purificado y

digerido con la enzima correspondiente a la diana de los cebadores A y D, fue clonado en el plásmido pDM4 (Figura 2.2).



**Figura 2.3** Protocolo utilizado para sustituir secuencias salvajes del cromosoma por secuencias delecionadas *in vitro*.

Esta construcción en pDM4 se transformó mediante electroporación a la cepa *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir) y se seleccionaron los transformantes en LB agar con cloranfenicol. Los plásmidos recombinantes se transfirieron a la cepa a mutar, resistente a la rifampicina, en una posterior conjugación triparental (ver apartado 2.6.10.2). La selección a 30°C en TSA con rifampicina y cloranfenicol y la falta del sistema  $\lambda$ pir permite el crecimiento de aquellas bacterias que hayan integrado el plásmido en su cromosoma mediante una primera recombinación homóloga, presentando una copia delecionada del gen a mutar y una copia correcta (Fig. 2.3).

Posteriormente, estos transconjugantes se hicieron crecer en placas de TSA suplementadas con sacarosa al 10% a 30°C (Blomfield *et al.*, 1991) y, dado que el pDM4 contiene el gen *sacB*, letal para la bacteria cuando crece en sacarosa, las cepas resistentes a la sacarosa (y sensibles al cloranfenicol) habían eliminado el plásmido integrado mediante una segunda recombinación homóloga. Tras esta segunda recombinación, en el cromosoma bacteriano quedaba una copia del gen, que podía ser la salvaje o la delecionada, lo cual se determinó por PCR con los cebadores A y D, además de secuenciar la región delecionada de los mutantes, producto de la amplificación, para comprobar que se mantuviera la pauta de lectura (Fig. 2.3).

### 2.6.16 Estudios de complementación de mutantes

Los estudios de complementación de mutantes se llevaron a cabo mediante el plásmido pBAD33 (Guzmán *et al.*, 1995) que contiene el promotor P<sub>BAD</sub> del operón arabinosa y su gen regulador, *araC*. En presencia de arabinosa se induce la transcripción a partir de dicho promotor y, en ausencia, se reduce a muy bajo nivel, pudiendo reducirse todavía más mediante el crecimiento en presencia de glucosa. Para realizar las construcciones, genes de *A. hydrophila* AH-1 se amplificaron a partir de ADN cromosómico por PCR utilizando cebadores específicos con dianas para enzimas de restricción, de manera que no quedase incluida ninguna posible región promotora, en el caso de que la hubiese, pero sí se amplificara el putativo sitio de unión al ribosoma (RBS, *Ribosome Binding Site*). Los productos amplificados se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes a las dianas diseñadas en los cebadores utilizados y se ligaron al vector pBAD33 digerido con las mismas enzimas o con enzimas que creasen dianas compatibles, de modo que se asegurase la correcta orientación de cada uno de los genes salvajes bajo el control del promotor P<sub>BAD</sub>. Cada una de las construcciones fue transformada a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación y se seleccionaron los transformantes a 37°C en placas de LB con cloranfenicol, los cuales fueron confirmados mediante PCR con cebadores específicos del vector (PBAD-F y PBAD-R), que también se utilizaron para secuenciar el plásmido y verificar la orientación del inserto.

Una vez obtenidas las construcciones necesarias, éstas fueron transferidas al mutante de la cepa AH-1 correspondiente mediante conjugación triparental (ver apartado 2.6.10.2). Los transconjugantes fueron seleccionados a 30°C en placas de TSA con cloranfenicol y rifampicina y se confirmó la presencia del plásmido mediante PCR. En el ensayo de

complementación, los cultivos se incubaron durante toda la noche a 30°C en medio TSB con cloranfenicol y 0,2% de glucosa. Posteriormente, se hizo una dilución 1:100 en medio fresco sin glucosa y se incubaron hasta que alcanzaron una DO<sub>600</sub> de, aproximadamente, 0,2. Seguidamente, se añadió un 0,2% de L-arabinosa y se cultivaron durante dos horas más antes de proceder al estudio de la recuperación del fenotipo salvaje. Paralelamente, se realizaron cultivos control que se mantuvieron reprimidos con glucosa.

### **2.6.17 Estudio de la expresión génica mediante el gen indicador *lacZ***

Con el fin de analizar la expresión de genes transcritos bajo el control de determinadas secuencias promotoras, se escogió el gen indicador *lacZ* para realizar fusiones transcripcionales con los promotores a analizar. La actividad de los promotores a estudiar se analizó mediante análisis de la expresión de la enzima β-galactosidasa.

#### **2.6.17.1 Construcción de fusiones transcripcionales promotor-*lacZ***

Se construyeron fusiones transcripcionales entre los diferentes promotores de la agrupación génica *msh* y el gen de la β-galactosidasa del vector pDN19lacΩ. Los putativos promotores fueron amplificados por PCR usando los cebadores descritos en la Tabla 2.4. Los productos de la PCR fueron ligados en el vector pGEM-Teasy y transformados en la cepa de *E. coli* DH5α. Los plásmidos recombinantes fueron secuenciados con los cebadores del vector SP6 y M13 y digeridos con los enzimas *Bam*HI y *Eco*RI, cuyas dianas estaban presentes en el *polylinker* del pDN19lacΩ. Los promotores digeridos fueron ligados a dicho vector cortado con los mismos enzimas y electroporados a la cepa de *E. coli* DH5α. Los plásmidos recombinantes fueron transferidos a las diferentes cepas receptoras de *A. hydrophila* mediante conjugación triparental.

#### **2.6.17.2 Ensayo de la actividad β-galactosidasa**

La medida de la actividad β-galactosidasa del gen *lacZ* se llevó a cabo en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (Miller, 1972). Este ensayo se basa en la reacción colorimétrica en la que el *o*-nitrofenol-β-D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la enzima β-galactosidasa, es hidrolizado a galactosa y *o*-nitrofenol (ONP), cromóforo de color amarillo cuya concentración puede determinarse mediante

espectrofotometría. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Haase (Haase *et al.*, 2003). Se incubaron los cultivos celulares en LB a la temperatura de estudio durante toda la noche, se realizó una dilución 1:200 en medio fresco y se incubaron de nuevo en agitación hasta una DO<sub>600</sub> de, aproximadamente, 0,4.

A continuación, se añadieron 1500 µl de cultivo a una mezcla de 1435,5 µl de tampón Z 2X, 13,5 µl de β-mercaptoetanol, 1 µl de SDS 10% y 50 µl de cloroformo, estos tres últimos incorporados al momento. Cada una de las muestras se analizó por triplicado. Los tubos se agitaron unos 5 segundos y se incubaron durante toda la noche a 4°C con el fin de obtener una permeabilización celular máxima. Posteriormente, se agitaron durante unos 10 segundos y se dejaron reposar para asentar el cloroformo.

Para el análisis, se recogió 1 ml de cada muestra y se precalentó a 28°C. La reacción se inició añadiendo 0,2 ml de ONPG (Ecogen) (4mg/ml en tampón Z 1X, pH 7) precalentado, también, a 28°C. Las muestras se incubaron a 28°C durante 20 minutos, tiempo que podía variar según la aparición del color amarillo, y se paró la reacción con 0,5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M, al producirse un aumento del pH. A continuación, se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a 12000 x g y se valoró la DO<sub>420</sub> de 1 ml del sobrenadante. Cuando fue necesario, previa adición del ONPG, se cogió menos volumen de muestra y se diluyó en tampón Z 1X en un volumen final de 1 ml, con el fin de obtener valores de DO<sub>420</sub> entre 0,1 y 0,8, dentro de los cuales el ensayo es lineal.

La actividad β-galactosidasa, expresada en unidades de Miller (UM), se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$UM = \frac{1000 \times DO_{420}}{t \times V \times DO_{600}}$$

t = tiempo de la reacción (minutos)  
V = volumen de cultivo ensayado en la reacción (ml)

## 2.7 Técnicas experimentales con proteínas

### 2.7.1 Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Para la determinación de la cantidad de proteína presente en una muestra se utilizó el reactivo *Protein Assay Dye Reagent Concentrates* de Bio-Rad, y se siguieron las indicaciones de la casa comercial, basadas en el método descrito por Bradford, según el cual las proteínas presentan afinidad por el azul de Coomassie (Bradford, 1976).

Se preparó una solución de BSA (albúmina sérica bovina, Sigma-Aldrich) a una concentración de 25 mg/ml y, a partir de ésta, las diluciones 25, 12,5, 6,25, 3,125 y 1,56 µg/ml. La recta patrón se construyó por duplicado a partir de 0,8 ml de cada una de estas diluciones más 0,2 ml de reactivo de Bradford, siendo entonces las cantidades de proteína de las diferentes diluciones que formarían la recta patrón 20, 10, 5, 2,5 y 1,25 µg. En el caso de las muestras, se utilizó entre 5 y 25 µl de volumen, a los que se les añadió 0,2 ml de reactivo Bradford y la cantidad correspondiente de agua hasta llegar de 1 ml de volumen total. Seguidamente, se midió la absorbancia a DO<sub>595</sub> de todas las muestras. La concentración de proteína de las muestras se calculó extrapolando a partir de la recta patrón los valores de absorbancia de las muestras problema y haciendo la corrección según el volumen de muestra utilizado.

### 2.7.2 SDS-PAGE

El estudio del perfil electroforético de las proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) según el método de Laemmli (Laemmli, 1970) modificado por Ames (Ames *et al.*, 1974). Para la preparación de los geles, se utilizaron placas de vidrio y teflón de 8 x 10 cm de Amersham Biosciences. En la parte superior (gel de compactación) se utilizó un porcentaje de poliacrilamida del 5%, y en la parte inferior (gel de resolución) un porcentaje del 7,5% o del 12%, según el peso molecular de las proteínas analizadas.

Una vez determinada la cantidad de muestra a analizar (apartado 2.7.1), ésta se mezcló con tampón de carga para SDS-PAGE y, seguidamente, se desnaturalizó mediante su incubación a 100°C durante 8-10 minutos. La electroforesis se realizó en cubetas verticales modelo SE250 de Hoefer, aplicando 10 mA (60 V) en el gel de compactación y 20 mA (150V) en el gel de resolución. Se utilizaron dos tipos de marcadores de peso molecular, *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare) o *Benchmark<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder* (Invitrogen), en función de si se realizaba tinción con azul de Coomassie, según las condiciones descritas por Fairbanks (Fairbanks *et al.*, 1971), o se procedía a la realización de *Western blotting* (apartado 2.7.3). Todas las soluciones utilizadas se especifican a continuación.

**Tabla 2.17** Composición de las soluciones para la electroforesis de geles de poliacrilamida.

| Tampón de compactación 4x  | Tampón de resolución 4x    | Tampón de electroforesis 10x | Tampón de carga para SDS-PAGE 2x        |
|----------------------------|----------------------------|------------------------------|---|
| 0,5 M Tris-HCl (AppliChem) | 1,5 M Tris-HCl (AppliChem) | 0,25 M Tris (AppliChem)      | 10% glicerol (Panreac)                  |
| 0,4% SDS (Merck)           | 0,4% SDS (Merck)           | 1% SDS (Merck)               | 5% β-mercaptoetanol (Bio-Rad)           |
|                            |                            | 1,92 M Glicina (Fluka)       | 2,3% SDS (Merck)                        |
|                            |                            |                              | 62,5 mM Tris (AppliChem)                |
|                            |                            |                              | 0,1% Azul de Bromofenol (GE Healthcare) |
| Ajustar a pH 6,8           | Ajustar a pH 8,8           | pH 8,3 (no ajustado)         | Ajustar a pH 6,8                        |

**Tabla 2.18** Soluciones de tinción y destinción con azul de Coomassie.

| Solución de tinción Azul de Coomassie | Solución de destinción              |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 0,1 % Azul brillante R-250 (Sigma)    | 15% Isopropanol (Panreac)           |
| 40% Metanol (Panreac)                 | 10% Ácido acético glacial (Panreac) |
| 10% Ácido acético glacial (Panreac)   |                                     |

## 2.7.3 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana (*Western blotting*)

### 2.7.3.1 Transferencia de proteínas a membrana por sistema semi-seco

Tras realizar la electroforesis de las proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), éstas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μM de poro (AppliChem) mediante el sistema *Semi-Dry Blotter modelo EBU-4000* (C.B.S. Scientific) en presencia de tampón de transferencia durante 30 minutos a 30 V en frío (4°C).

**Tabla 2.19** Composición del tampón de transferencia.

| Tampón de transferencia |
|-------------------------|
| 25mM Tris (AppliChem)   |
| 190 mM Glicina (Fluka)  |
| 20% Metanol (Panreac)   |

### 2.7.3.2 Inmunodetección y revelado colorimétrico

Una vez finalizada la transferencia, se realizaron a temperatura ambiente dos lavados de cinco minutos con tampón NET 1x y se bloquearon los lugares de unión inespecífica agitando la membrana durante 1 hora con tampón de bloqueo. Seguidamente, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo al que se le añadió Tween-20 0,5% (USB). Tras la eliminación del anticuerpo no unido mediante tres lavados de 10 minutos con tampón de lavado, se sumergió la membrana en una solución que contenía el anticuerpo secundario, inmunoglobulina G de cabra anti-conejo o anti-mouse, según el caso (ver apartado 2.11 de Material y Métodos), conjugada con fosfatasa alcalina, diluido 1:1000 en tampón de bloqueo con Tween-20. De nuevo, el anticuerpo no unido se eliminó mediante 3 lavados de 10 minutos con el mismo tampón utilizado para eliminar el anticuerpo primario. Por último, se realizaron tres lavados de cinco minutos con tampón 3 para alcalinizar el medio y se revelaron las membranas con una solución formada por 10 ml de tampón 3, 33  $\mu$ l de solución 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y 44  $\mu$ l de solución disodio-nitroazul tetrazolio (NBT), para provocar la reacción cromática de la fosfatasa alcalina. La reacción de revelado se paró mediante la adición de tampón de parada.

**Tabla 2.20** Composición de las soluciones para inmunodetección de proteínas.

| Tampón NET 10x                | Tampón de bloqueo      | Tampón dilución anticuerpos | Tampón de lavado    |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 0,15 M NaCl (Panreac)         | tampón NET 1x          | tampón NET 1x               | tampón NET 1x       |
| 50 mM Tris pH 7,4 (AppliChem) | 1% BSA (Sigma-Aldrich) | 1% BSA (Sigma-Aldrich)      | 0,5% Tween-20 (USB) |
| 5 mM EDTA (Merck)             |                        | 0,5% Tween-20 (USB)         |                     |

**Tabla 2.21** Composición de las soluciones de revelado con fosfatasa alcalina.

| Tampón 3                          | Solución BCIP             | Solución NBT       | Tampón de parada                  |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| 0,1 M NaCl (Panreac)              | 50 mg/ml BCIP (AppliChem) | 75 mg/ml NBT (USB) | 5 mM EDTA (Merck)                 |
| 0,1 M Tris-HCl pH 9,5 (AppliChem) | 100% DMF (Merck)          | 70% DMF (Merck)    | 20 mM Tris-HCl pH 7,5 (AppliChem) |
| 0,1 M MgCl <sub>2</sub> (Merck)   |                           |                    |                                   |



## 2.7.4 Obtención de proteínas bacterianas

### 2.7.4.1 Extractos de proteína celular total

Las proteínas celulares totales se obtuvieron a partir de crecimientos en fase exponencial. Se centrifugaron 500 µl del cultivo y el precipitado se resuspendió en 50 µl de tampón PBS 1x y 50 µl de tampón de carga para SDS-PAGE (apartado 2.7.2). Con el fin de lisar el cultivo, se procedió a sonicar la muestra durante 30 segundos (Homogeneizador ultrasónico, Labsonic 1510. B. Braun) y finalmente se incubó a 85°C durante 5 minutos.

**Tabla 2.22** Composición del tampón PBS.

| Tampón PBS 1x   |
|---|
| 137 mM NaCl (Panreac)   |
| 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)                      |
| 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O (Merck) |
| 2,7 mM KCl <sub>2</sub> (Merck)                                     |
| Ajustar a pH 7,2  |

### 2.7.4.2 Pilis purificados

Para la extracción de los pilis Msh de *A. hydrophila* se emplearon cultivos de 2 litros en TSB durante toda la noche a 30°C estáticos. Se centrifugaron las células a 5000 x g durante 20 minutos y el pellet se resuspendió en 30 ml de Tris-HCl pH 7.8. Los flagelos y fimbrias fueron separados de la superficie celular mediante agitación con vórtex en presencia de una varilla de vidrio durante 3-4 minutos y posteriormente, se pasaron a través de una jeringuilla 21G seis veces. Las células carentes de estructuras superficiales filamentosas fueron separadas mediante centrifugación a 8000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante fue centrifugado a 18000 x g durante 20 minutos, eliminándose los restos celulares presentes en el precipitado. Seguidamente, se sometió a una ultracentrifugación a 350.000 x g durante 2 hora y el pellet, correspondiente a los pilis, fue resuspendido en 150 µl de Tris-HCl 0.1M, pH 7.8 con 0.2 mM de EDTA. Las muestras obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (apartado 2.7.2).

### 2.7.4.3 Purificación y concentración de sobrenadantes

Para la purificación y concentración de sobrenadantes de crecimientos bacterianos, en primer lugar se procedió a la eliminación de las células bacterianas mediante varias centrifugaciones consecutivas a 3000 x g y filtración del sobrenadante con filtros estériles de membrana de acetato de celulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Iwaki). A partir de aquí, se procedió a precipitar mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA, Merck) y posteriores lavados con acetona (Fluka). Para ello, se añadió a la muestra TCA a una concentración final del 10% y se mantuvo como mínimo 30 minutos en hielo. Seguidamente, se centrifugó a 13000 x g a 4°C durante un mínimo de 15 minutos y se lavó dos veces mediante la adición de acetona fría y la posterior centrifugación a 14000 x g. Finalmente, tras secar la muestra a temperatura ambiente se resuspendieron en tampón PBS 1x.

### 2.7.4.4 Obtención de flagelo

La extracción del flagelo polar de *A. hydrophila* se realizó a partir de cultivos de 500 ml en TSB durante toda la noche a 30°C con agitación de 200 rpm. Se centrifugaron las células a 5000 x g durante 20 minutos y el pellet se resuspendió en 10 ml de Tris-HCl pH 7.8. Los flagelos fueron separados de la superficie celular mediante agitación con vórtex en presencia de una varilla de vidrio durante 3-4 minutos y posteriormente se pasaron a través de una jeringuilla 21G seis veces. Las células fueron separadas de los flagelos mediante centrifugación a 8000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante fue centrifugado a 18000 x g durante 20 minutos, eliminándose los restos celulares presentes en el precipitado. A continuación, el sobrenadante se sometió a una ultracentrifugación a 100000 x g durante 1 hora y el pellet, correspondiente a los flagelos, fue resuspendido en 150  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 0.1M, pH 7.8 con 0.2 mM de EDTA. Las muestras de flagelo fueron analizadas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (apartado 2.7.2). Finalmente, los flagelos se purificaron en gradiente de cloruro de cesio. Las muestras de flagelo se diluyeron con 27 ml de Tris-HCl pH 7.8 y 12.1 g de cloruro de cesio (Sigma) y se transfirieron a tubos Beckman Ultra Clear™ (14 x 89 mm) para ser centrifugados a 60000 x g en un rotor Beckman SW41. La banda que contenía los flagelos fue recogida y se eliminó el cloruro de cesio mediante diálisis contra Tris-HCl 0.1M, pH 7.8 con 0.2 mM de EDTA. Los flagelos purificados se analizaron por SDS-PAGE (apartado 2.7.2).

## 2.8 Métodos de análisis químico

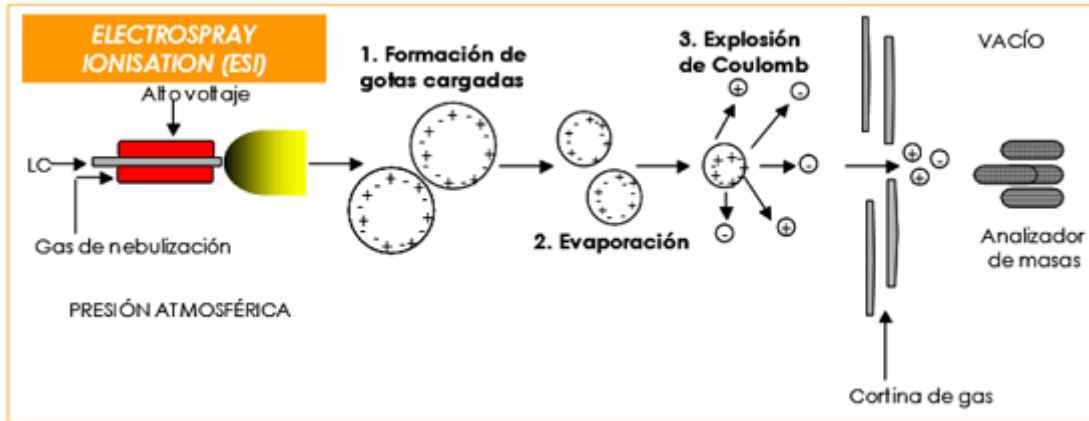
### 2.8.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

La técnica híbrida LC-MS permite combinar las características de separación de cromatografía líquida (LC) con las excelentes características de detección de la espectrometría de masas (MS), obteniendo métodos analíticos de gran sensibilidad y poder de identificación. Es una técnica adecuada para el análisis de sustancias polares y de peso molecular elevado.

La cromatografía líquida es una técnica de separación física en la cual los componentes de una muestra se separan en función a su distinta afinidad entre dos fases, una fase estacionaria contenida en una columna y una fase móvil líquida, normalmente constituida por una mezcla de disolventes que fluye a través de la columna.

En este caso se usó el disolvente A: 0.1% ácido fórmico en agua HPLC (Fisher) y disolvente B: 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo.

Para el acoplamiento entre LC y MS se requiere de una interfase que permita la introducción directa del flujo de LC en el detector MS. En este caso se usa la interfase electrospray (ESI). El flujo procedente de la LC pasa a través de un capilar a presión atmosférica, mantenido a alto voltaje. Este alto voltaje dispersa la corriente de líquido, formándose gotas altamente cargadas (nebulización), que son desolvatadas a medida que pasan a través de la región a presión atmosférica de la fuente del espectrómetro de masas. La desolvatación es asistida por una corriente de gas caliente, generalmente nitrógeno. A medida que disminuye el tamaño de las gotas se alcanza un punto en el cual las fuerzas repulsivas entre cargas en la superficie de las gotas son suficientes para superar las fuerzas cohesivas de tensión superficial. Entonces ocurre una “explosión de Coulomb”, produciendo gotas más pequeñas. Se producen una serie de explosiones hasta que se alcanza un punto en el cual los iones pasan a fase gas, siendo transferidos a través de una serie de lentes focalizadoras hacia el espectrómetro de masas. Si se aumenta la aceleración de los iones se puede producir su ruptura por fenómenos de colisión con moléculas de gas residual procedente de la fase móvil y del nitrógeno utilizado como gas de nebulización. Los fragmentos producidos mediante este fenómeno, denominado *disociación colisión inducida* (CID) pueden ser usados para la elucidación estructural de moléculas (Quintela *et al.*, 2005).



**Figura 2.4** Esquema del mecanismo de formación de los iones en ESI. Figura adaptada de Quintela *et al.*, 2005.

Un espectrómetro de masas es un instrumento que convierte los compuestos de una muestra en iones gaseosos y los separa en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Consta de tres componentes básicos: una fuente de iones, que ioniza la muestra, un analizador, que separa los iones en función de su relación  $m/z$  y un detector, que produce una señal eléctrica proporcional al número de iones que llegan.

En este caso se utilizó un Orbitrap Mass spectrometer.

Las masas de las proteínas se calcularon por deconvolución de cargas mediante el programa MaxEnt (Waters, Beverly, MA).

Adicionalmente, las flagelinas polares se digirieron con proteinasa K y se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a trampa iónica y asociada a espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS). Consiste en una variante de la técnica anterior donde el tamaño del diámetro de la columna es más pequeño que en la LC común, factor que incrementa la sensibilidad. Los péptidos tripticos provenientes de la digestión enzimática son separados por cromatografía líquida, e introducidos secuencialmente de forma automática en el espectrómetro de masas para su análisis. Mediante la correcta interpretación de los espectros de fragmentación se puede llegar a determinar la secuencia peptídica y la caracterización de posibles sitios de modificaciones post-traduccionales.

## **2.9 Estudio del lipopolisacárido**

### **2.9.1 Obtención del LPS a pequeña escala**

Con el fin de obtener el LPS de diversas cepas bacterianas de forma rápida y analizar las muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se utilizó la extracción de LPS descrita por Darveau y Hancock (Darveau y Hancock, 1983). El sedimento celular de 200 µl de crecimiento bacteriano en fase estacionaria se resuspendió en 25 µl de tampón de carga 2X y se hirvió durante 10 minutos. Una vez frío, se añadieron 25 µl de proteinasa K (1 mg/ml) para degradar las proteínas, se incubó a 58°C durante 2 horas y se analizaron 10-15 µl de esta solución que contenía el LPS por SDS-PAGE (ver apartado 2.7.2).

### **2.9.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS-PAGE y tinción del LPS**

El estudio del perfil electroforético del LPS se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) tal y como se explica en el apartado 2.7.2.

Para el análisis del LPS, los geles de poliacrilamida fueron teñidos con nitrato de plata, según el método de Tsai y Frasch (Tsai y Frasch, 1982). Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente en agitación continua y las soluciones se prepararon al momento con agua desionizada. El gel se sumergió en la solución de fijación durante un mínimo de 2 horas, a continuación se cambió esta solución por otra idéntica de oxidación a la que se le había añadido un 0.7% de ácido periódico y se mantuvo durante 7 minutos. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua desionizada de 10 minutos cada uno, se sumergió el gel en la solución de tinción durante 10 minutos y se realizaron otros tres lavados con agua desionizada de 5 minutos cada uno. Por último, se añadió la solución de revelado y se detuvo la reacción con la solución de parada, en la cual se mantuvo durante 10 minutos antes de sumergirlo en agua desionizada.

| Solución de fijación |     | Solución de tinción |        | Solución de revelado |        | Solución de parada |     |
|----------------------|-----|---------------------|--------|----------------------|--------|--------------------|-----|
| Etanol               | 40% | NaOH                | 0,02 M | Citrato sódico       | 0,005% | Metilamina         | 10% |
| Ácido acético        | 5%  | Hidróxido de amonio | 0,4%   | Formaldehído         | 0,02%  |                    |     |
|                      |     | Nitrato de plata    | 0,6%   |                      |        |                    |     |

## 2.10 Microscopía

### 2.10.1 Microscopía óptica

Las bacterias fueron observadas en preparaciones de gota pendiente según el método descrito por Barber (1908) utilizando un microscopio óptico de la marca Zeiss Axiostar.

### 2.10.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

#### 2.10.2.1 Tinción negativa

Las suspensiones bacterianas se prepararon en rejillas Formvar y se tiñeron negativamente con una solución al 2% de acetato de uranilo pH 4.1 según el método descrito por Burghardt y Drolesky (2006). Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 600.

#### 2.10.2.2 Inmunomicroscopía mediante proteína A ligada a oro coloidal

El cultivo bacteriano se lavó con PBS estéril y se colocaron gotas de 10  $\mu$ l sobre rejillas Formvar. Seguidamente se lavaron dos veces con PBS durante 15 segundos, se bloquearon con PBS-1% BSA durante 15 minutos y se colocó, en ellas, el anticuerpo primario (anti-fimbrias A62), diluido en una relación 1/100 en PBS-1% BSA durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se lavaron las rejillas tres veces con PBS durante 1 minuto y se colocó la proteína A unida a oro coloidal de 10 nm a una dilución 1/20 en PBS-1% BSA durante 20 minutos. Finalmente, las rejillas se lavaron tres veces con PBS y dos veces con agua desionizada y se dejaron secar para ser observadas con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 600.

## 2.11 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en esta Tesis han sido los que se describen en la siguiente tabla. Todos ellos han sido utilizados en una relación 1/1000.

**Tabla 2.23** Anticuerpos utilizados.

| Proteína a detectar                | Anticuerpo primario   | Anticuerpo secundario   |
|------------------------------------|---|---|
| Fimbrias de AH-1                   | Anti-fimbrias A62 hecho en conejo. Cedido por Minoru Sato (Sato <i>et al.</i> , 1989) | Inmunoglobulina G de cabra Anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina ( <i>Sigma</i> <sup>R</sup> )     |
| Pilina MshA con cola de Histidinas | Anti-histidina hecho en ratón ( <i>Sigma</i> <sup>R</sup> )                           | Inmunoglobulina G de cabra Anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina ( <i>Calbiochem</i> <sup>R</sup> ) |

## 2.12 Ensayo de biofilms

La formación de biofilm fue evaluada mediante el método de O'Toole (O'Toole *et al.*, 1999) con algunas modificaciones. Una placa de 96 pocillos de cultivo celular (VWR® *Tissue Culture Plates*) fue inoculada con 200 µl de una dilución 1:100 de cada cepa de estudio, a partir de un cultivo overnight en medio TSB. Las muestras se llevaron por triplicado y además se inoculó un pocillo adicional únicamente con medio como control negativo del experimento. La placa se inoculó durante 24 horas a 30°C en estático. Para detectar la cantidad de biofilm formado, los pocillos se sometieron a diversos lavados con PBS y las células adheridas se tiñeron con el colorante cristal violeta al 0.1% durante 15 minutos. Tras eliminar el colorante y realizar dos lavados con agua, se añadió etanol al 95% y se incubó durante 30 minutos. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro, empleando el control negativo como blanco del experimento.

### 3.RESULTADOS





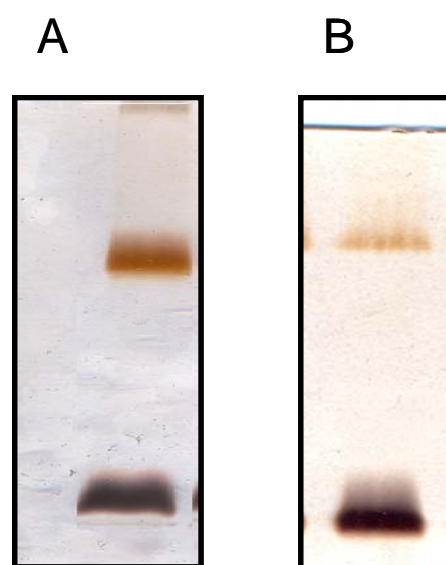
### 3.1 GLICOSILACIÓN DEL FLAGELO DE LA CEPA AH-1 DE *AEROMONAS HYDROPHILA*

#### 3.1.1 Precedentes

La cepa AH-1 de *Aeromonas hydrophila* posee un antígeno O del lipopolisacárido (LPS) de serogrupo O:11. El serotipo O:11 es uno de los cuatro serotipos dominantes (O:11, O:16, O:18 y O:34) que han sido asociados con gastroenteritis y septicemia en diferentes estudios clínicos (Kokka *et al.*, 1991) y que presenta un antígeno O con cadenas de polisacáridos de longitud homogénea (Dooley *et al.*, 1985), así como lámina-S que rodea la superficie bacteriana (Dooley and Trust, 1988).

La agrupación génica implicada en la biosíntesis del antígeno O:11 y de la lámina-S de la cepa AH-1 de *Aeromonas hydrophila* contiene 18 genes, algunos de los cuales están implicados en la biosíntesis del heteropolisacárido Wzm/Wzt-dependiente que constituye el antígeno O. Dicha agrupación había sido clonada, secuenciada y caracterizada por nuestro grupo de investigación en un estudio anterior.

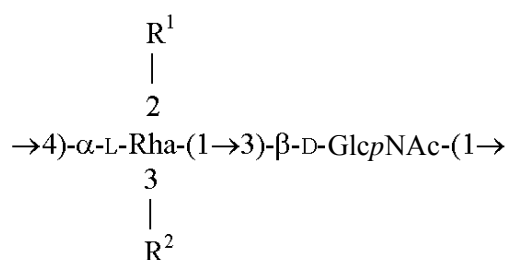
Nuestro grupo de investigación, había caracterizado el lipopolisacárido de serotipo O:11 mediante geles de SDS-PAGE, observando que las moléculas de elevado peso molecular (HMW-LPS), se caracterizaban por mostrar una doble banda que constituye el denominado antígeno O del LPS. Esta estructura, se asemeja a la presentada por las HMW-LPS de cepas de *A. salmonicida*.



**Figura 3.1.1** Gel de SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de la cepa (A) AH-1 de *A. hydrophila* y (B) *A. salmonicida* A450, ambas crecidas en TSB a 30°C.

Además, mediante análisis químico y resonancia magnética nuclear (NMR), nuestro grupo ha podido determinar la estructura y composición del antígeno O del LPS de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* de serogrupo O:11. Dicho antígeno O:11 está formado por L-Ramnosa (D-Rha) parcialmente acetilada y D-N-acetilglucosamina (D-GlcpNAc) (Shaw and Squires, 1984) (Figura 3.1.2).

The O-polysaccharide structure of *Aeromonas hydrophila* AH-1 (O11)



Variant I (~40%):  $R^1 = R^2 = H$  (non-O-acetylated form)

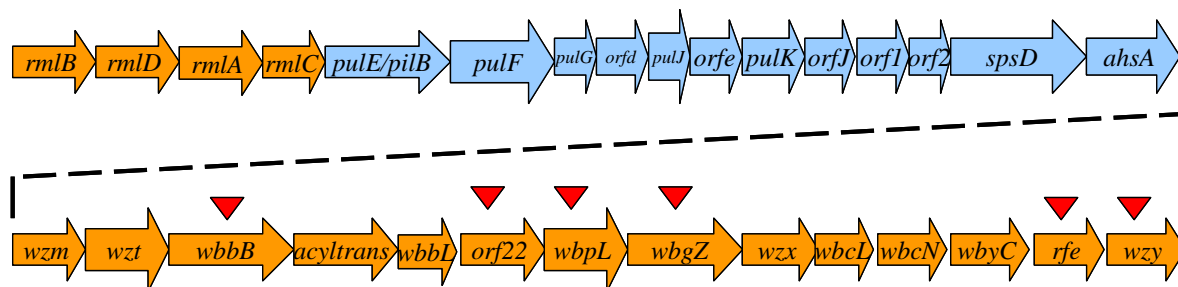
Variant II (~40%):  $R^1 = Ac, R^2 = H$  (major mono-O-acetylated form)

Variant III (~20%):  $R^1 = H, R^2 = Ac$  (minor mono-O-acetylated form)

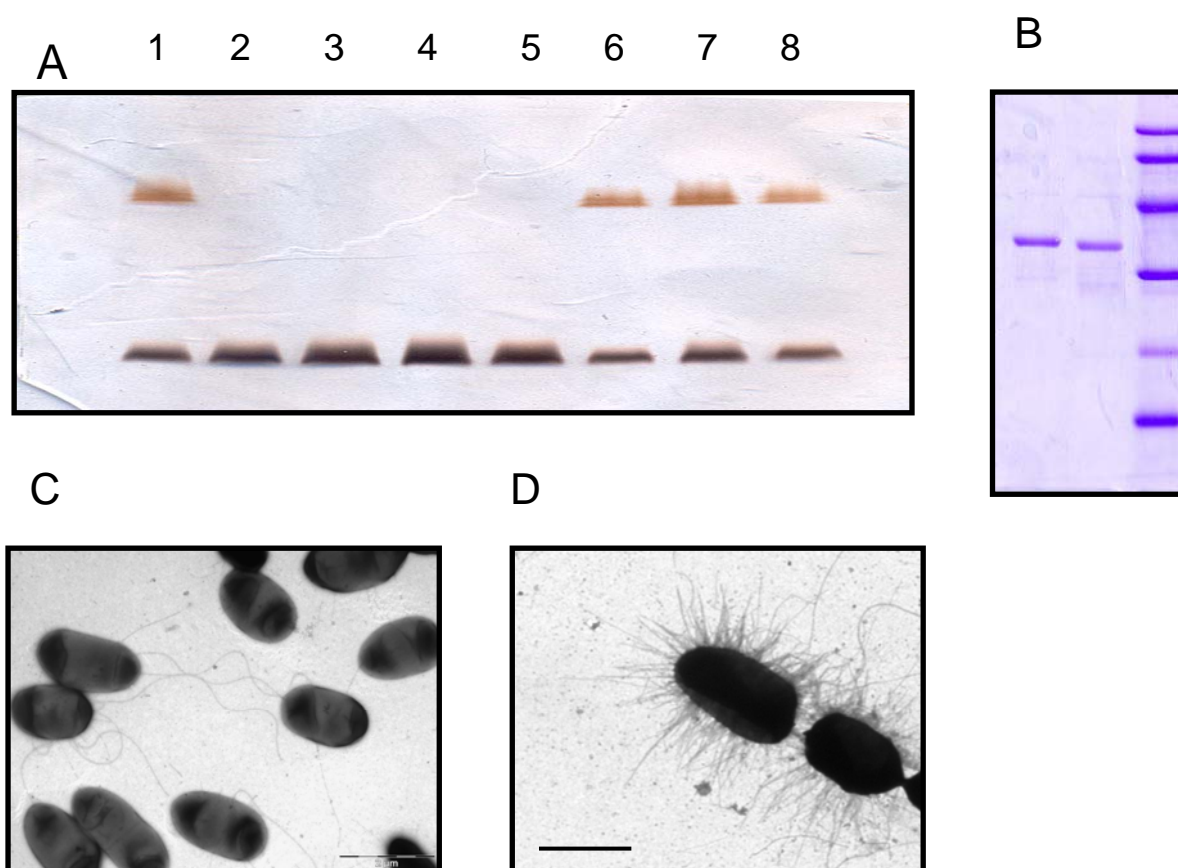
**Figura 3.1.2** Estructura propuesta del antígeno O:11 de la cepa *Aeromonas hydrophila* AH-1.

Por otro lado, la generación de mutantes definidos en diferentes genes de la agrupación implicada en la biosíntesis del antígeno O:11 ( $wb^*_{O11}$ ) (Figura 3.1.3) y el análisis tanto de su perfil del LPS en SDS-PAGE, como de su motilidad en medio líquido puso de manifiesto que la mutación de los genes *wbpL* y *wbgZ* daba lugar a la pérdida del antígeno O del LPS y a la formación de una gran cantidad de agregados celulares al crecer en medio líquido. Por el contrario, la mutación de *wbbB* únicamente producía la pérdida del antígeno O del LPS y la mutación de *orf22*, *rfe* y *wzy* no daba lugar a modificaciones en el perfil del LPS en SDS-PAGE, presentando únicamente los mutantes en *rfe* y *wzy* algunos agregados celulares al crecer en medio líquido. Estos resultados hicieron que los mutantes en los genes *wbpL* y *wbgZ* se analizaran mediante microscopía electrónica de transmisión, tras crecer en medio líquido, observándose que al igual que la cepa salvaje ambos presentaban flagelación polar, pero a diferencia de ésta, además presentaban abundantes fimbrias en su superficie. Paralelamente, se analizó su flagelo polar en geles de SDS-PAGE, observándose que las flagelinas polares

presentaban una movilidad superior a las de la cepa salvaje hecho que sugería una reducción en su peso molecular.



**Figura 3.1.3** Esquema de la agrupación de genes del antígeno O:11 y lámina S de *Aeromonas hydrophila* AH-1. En naranja los genes de biosíntesis del antígeno O:11; en azul genes de biosíntesis de la lámina S. Las flechas rojas indican los genes en los que se realizaron mutaciones en pauta de lectura.



**Figura 3.1.4** (A) Gel de SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* (carril 1) y de los mutantes AH-1Δ*wbpL* (carril 2 y 3), AH-1Δ*wbgZ* (carril 4), AH-1Δ*wbbB* (carril 5), AH-1Δ*orf22* (carril 6), AH-1Δ*rfe* (carril 7) y AH-1Δ*wzy* (carril 8). Todas crecidas en TSB a 30°C. (B) Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de muestras de flagelo de la cepa AH-1 (carril 1) y AH-1Δ*wbpL* (carril 2). St: 97, 66, 45, 30, 20 y 14.4 KDa. Microscopía electrónica de transmisión de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* (C) y del mutante AH-1Δ*wbpL* (D) crecidas a 25°C en TSB y teñidas negativamente con acetato de uranilo al 2%. Barra = 2 μm.

### 3.1.1.1 WbpL

El gen *wbpL* codifica una proteína de 341 aminoácidos que presenta un 91% de similitud y un 93% de identidad con una glicosil transferasa de grupo IV de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup> y de *A. salmonicida* A449.

WbpL es una glicosiltransferasa de tipo IV que pertenece a la familia de proteínas transmembrana encargadas de transferir una D-N-acetilhexosamina 1-fosfato a un undecaprenil-fosfato, el transportador lipídico. El subgrupo WbpL/WbcO de UDP-HexNAc bacterianas: poliprenol-P HexNAc-1-P transferasas incluye la proteína WbcO de *Yersinia enterocolitica* y la proteína WbpL de *Pseudomonas aeruginosa* (Price and Momany, 2005). En *Yersinia enterocolitica* WbcO se conoce como una N-acetilfucosamina transferasa (Skurnik, 1999). En *Pseudomonas aeruginosa* se ha descrito que WbpL es necesaria para iniciar la síntesis tanto de la molécula A como la molécula B del LPS (esta cepa posee un LPS común y otro específico de serotipo), de tal manera que la proteína sería bifuncional, transfiriendo N-acetilfucosamina en el caso de la síntesis de la molécula B y N-acetilgalactosamina/N-acetilglucosamina en el caso de la síntesis de la molécula A (Rocchetta *et al.*, 1998).

De la misma manera que sucede en otros miembros de la familia de estas transferasas, como WecA y MraY, WbpL es una proteína altamente hidrofóbica que posee 11 dominios transmembrana (Belanger *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000).

Debido a la presencia de GlcNAc en la estructura química del antígeno O:11, la proteína WbpL podría estar implicada en la reacción de iniciación de la formación de las subunidades repetitivas del antígeno O del LPS mediante la transferencia de GlcNAc-P al transportador lipídico. De esta manera, AH-1 $\Delta$ *wbpL* al tener mutada la transferasa iniciadora, no sería capaz de colocar el primer azúcar de la subunidad del antígeno O y a causa de ello, el mutante carece de antígeno O:11.

Ensayos de complementación del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* con el gen salvaje clonado en el vector pBAD33 (ver apartado 2.6.16 de Material y Métodos) restauran el fenotipo salvaje en relación a la formación de fimbrias (no se observan) y al peso molecular de la flagelina.

### 3.1.1.2 WbgZ

El gen *wbgZ* codifica una proteína de 660 aminoácidos que presenta un 95% de similitud y un 97% de identidad con una uridilil-transferasa de *Aeromonas hydrophila*.

Se trata de una presunta epimerasa azúcar nucleótido difosfato, cuya función en la cepa AH-1 podría ser convertir UDP-GlcNAc en UDP-GalNAc.

Al igual que ocurre con WbpL, la ausencia de WbgZ provoca la imposibilidad de colocar el primer azúcar de la subunidad del antígeno O y a causa de ello, el mutante carece de antígeno O:11.

Ensayos de complementación del mutante AH-1 $\Delta$ wbgZ con el gen salvaje clonado en el vector pBAD33 (ver apartado 2.6.16 de Material y Métodos) restauran el fenotipo salvaje en relación a la formación de fimbrias (no se observan) y al peso molecular de la flagelina.

### **3.1.2 Estudio de la glicosilación de las flagelinas polares y laterales de la cepa AH-1 de *A. hydrophila***

La cepa AH-1 de *Aeromonas hydrophila* posee un flagelo polar que expresa de manera constitutiva, y múltiples flagelos laterales, además del flagelo polar, que se inducen al crecer en medio semisólido.

Al observar la reducción en el peso molecular de las flagelinas polares en los mutantes AH-1 $\Delta$ wbpL y AH-1 $\Delta$ wbgZ con respecto a la cepa parental, se planteó la hipótesis de que dichas flagelinas pudieran hallarse glicosiladas, al igual que ocurre en la cepa de *Aeromonas hydrophila* AH-3 (Wilhelms *et al.*, 2012). Para determinar si las flagelinas polares se hallan glicosiladas se procedió a purificar el flagelo polar de la cepa salvaje y del mutante AH-1 $\Delta$ wbpL tras crecer ambos en medio líquido.

Paralelamente, la cepa salvaje y el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL se hicieron crecer en medios semisólidos con objeto de purificar y analizar su flagelo lateral en geles de SDS-PAGE y determinar si el peso molecular de las flagelinas laterales presentaba alteraciones en el mutante. Este análisis no mostró alteraciones evidentes en la movilidad de las flagelinas laterales del mutante, respecto a las de la cepa salvaje. A pesar de ello, se procedió a generar un mutante incapaz de formar el flagelo polar en la cepa AH-1 y en el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL, que permitiese aislar únicamente los flagelos laterales tras crecer en medio semisólido.

### 3.1.2.1 Construcción y caracterización fenotípica de un mutante incapaz de formar el flagelo polar en la cepa de *A. hydrophila* AH-1 y en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*

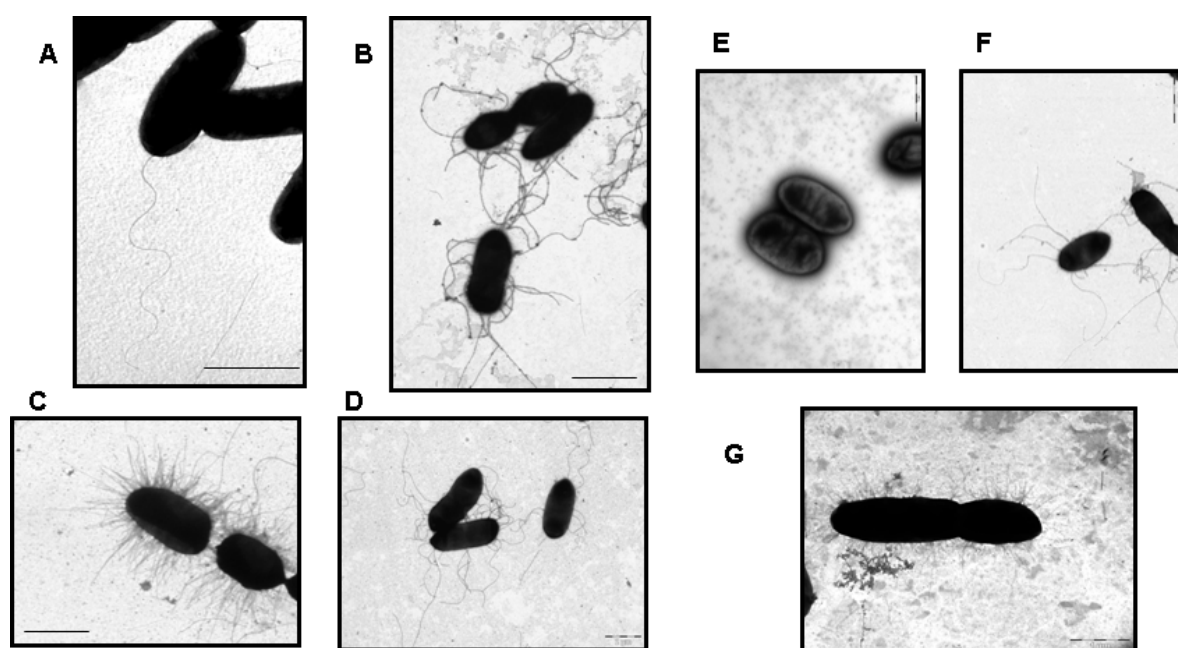
Con el fin de obtener un mutante incapaz de formar el flagelo polar se deleccionaron en pauta los siguientes genes: *flaB*, *flaG*, *flaH* y *flaJ*, todos ellos localizados en la región 2 implicada en la biosíntesis del flagelo polar y que codifican para proteínas estructurales del flagelo polar.

Para ello, se amplificaron de manera independiente las regiones de ADN flanqueantes a *flaB* y *flaJ* utilizando las parejas de cebadores A-FlaB y B-FlaB y la pareja C-FlaJ y D-FlaJ. Ambas parejas de cebadores generan amplicones de aproximadamente 600 pb. Los amplicones obtenidos se utilizaron como molde en una nueva reacción de PCR, utilizando los cebadores A-FlaB y D-FlaJ (1200 pb), los cuales contienen una diana para la endonucleasa *Bam*HI. El producto de amplificación fue digerido con la endonucleasa *Bam*HI y ligado al vector suicida pDM4, previamente digerido con la endonucleasa *Bgl*III y defosforilado. La ligación se transformó a la cepa de *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir), seleccionando a los transformantes en placas de LB suplementadas con cloranfenicol a una temperatura de incubación de 30°C. La presencia de inserto se comprobó mediante PCR utilizando los cebadores del vector pDM4for y pDM4rev, y posterior secuenciación del plásmido recombinante.

La introducción del plásmido pDM4-*flaB-J* en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* y en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* se realizó mediante conjugación triparental empleando como dadora, la cepa de *E. coli* MC1061 que contenía el vector pDM4-*flaB-J*; como receptora, la cepa de *A. hydrophila* AH-1 rifampicina resistente o el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*; y como facilitadora de la conjugación, la cepa de *E. coli* HB101 con el vector pRK2073. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con rifampicina y cloranfenicol. La correcta inserción del plásmido en el genoma bacteriano se analizó mediante PCR con los cebadores externos a la construcción amplificada: E-FlaB y F-FlaJ, dando lugar los transconjugantes correctos a ausencia de amplímero; así como con los cebadores A-FlaB y D-FlaJ, dando lugar los transconjugantes correctos a dos bandas de amplificación, una correspondiente a los genes deleccionados (1525 pb) y la otra correspondiente a los genes salvajes (3875 pb). Con el fin de provocar la escisión del plásmido pDM4 con la copia salvaje de los genes, se sometieron los transconjugantes correctos a un crecimiento en TSB con sacarosa al 10% a 30°C durante

toda la noche y posteriormente, se realizó un banco de diluciones que se sembró en placas de TSA suplementadas con sacarosa 10% e incubó a una temperatura de 30°C. Se analizó la sensibilidad de las colonias frente a cloranfenicol, seleccionando aquellas que eran sensibles y daban lugar a un amplicón 1525 pb con los cebadores externos E-A1FlaBfor y F-A1Maf1rev, correspondiente a los genes delecionados.

Los mutantes obtenidos (*AH-1ΔflaB-J* y *AH-1ΔwbpLΔflaB-J*) se analizaron mediante microscopía óptica tras crecer en TSB a 30°C, observándose que ambos eran inmóviles. Su análisis mediante microscopía electrónica mostró ausencia de flagelación polar y presencia de flagelación lateral, tras crecer en medio semisólido, en ambos mutantes. Además, el doble mutante *AH-1ΔwbpLΔflaB-J* seguía presentando fimbrias al crecer en medio líquido, tal y como ocurre en el mutante *AH-1ΔwbpL*. Los mutantes *AH-1ΔwbpL* y *AH-1ΔwbpLΔflaB-J* no expresan las fimbrias en medio semisólido.

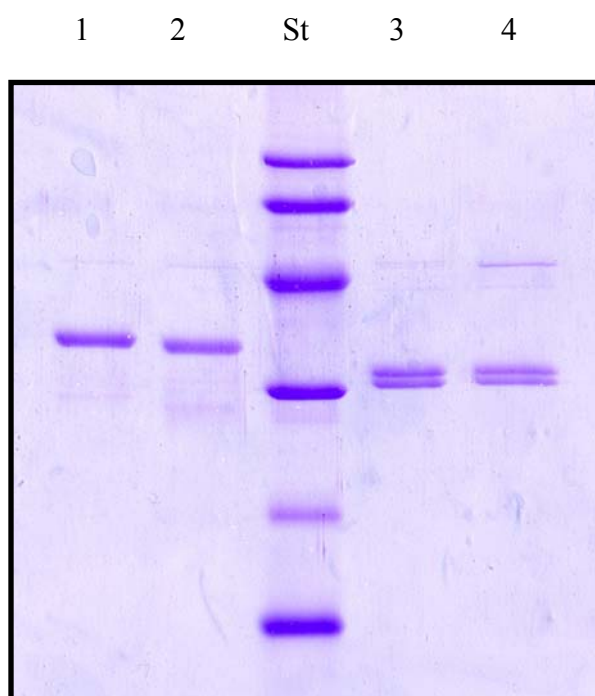


**Figura 3.1.5** Microscopía electrónica de transmisión de (A) la cepa AH-1 crecida en medio líquido, (B) AH-1 crecida en medio semisólido, (C) mutante *AH-1ΔwbpL* crecido en líquido, (D) mutante *AH-1ΔwbpL* crecido en semisólido, (E) mutante *AH-1ΔflaB-J* crecido en medio líquido, (F) mutante *AH-1ΔflaB-J* crecido en medio semisólido y (G) doble mutante *AH-1ΔwbpLΔflaB-J* crecido en medio líquido. Todas crecidas a 25°C y teñidas negativamente con acetato de uranilo al 2%. Barra = 2 μm.



### 3.1.2.2 Purificación del flagelo polar y lateral

Con objeto de determinar si las flagelinas polares de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* poseen modificaciones post-transduccionales, se purificó el flagelo polar de la cepa salvaje AH-1 y del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* en gradientes de cloruro de cesio (ver apartado 2.7.4.4 de Material y Métodos) a partir de crecimientos a 30°C en medio líquido, dado que se había observado una reducción del peso molecular de las flagelinas polares en dicho mutante. Paralelamente, y a pesar de no haberse observado modificaciones en el peso molecular de las flagelinas laterales (LafA1 y LafA2) de la cepa salvaje AH-1 y del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*, también se purificaron mediante gradiente en cloruro de cesio el flagelo lateral del mutante AH-1 $\Delta$ *flaB-J* y del doble mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *flaB-J* a partir de crecimientos en medio semisólido a 30°C. Ambos mutantes son incapaces de ensamblar el flagelo polar constitutivo pero poseen flagelos laterales inalterados.

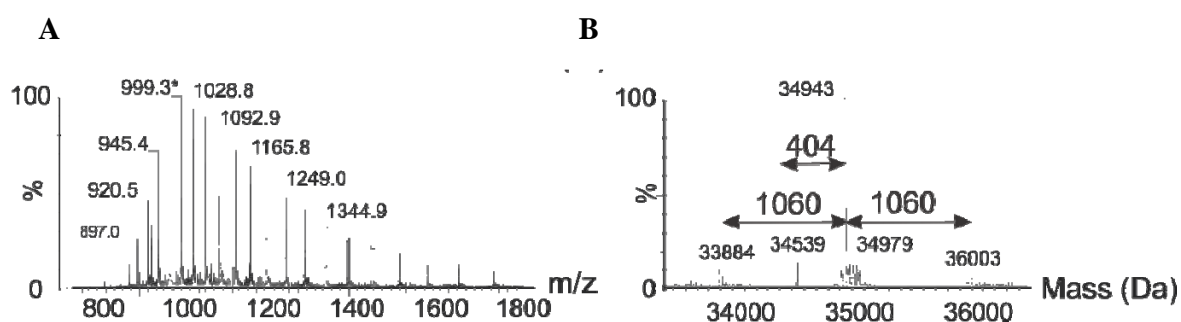


**Figura 3.1.6** SDS-PAGE y tinción con Coomassie Blue del flagelo polar (carriles 1 y 2) y lateral (carriles 3 y 4) obtenido mediante gradiente en cloruro de cesio. Carril 1: *A. hydrophila* AH-1, carril 2: AH-1 $\Delta$ *wbpL*, carril 3: AH-1 $\Delta$ *flaB-J* y carril 4: AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *flaB-J*.  
St: 97, 66, 45, 30, 20 y 14.4 kDa.

### 3.1.2.3 Análisis de la glicosilación de las flagelinas polares en la cepa AH-1

Las flagelinas polares purificadas se sometieron a análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) detectándose múltiples iones cargados (Figura 3.1.7), que al someterse a deconvolución de las cargas dieron lugar a masas de 36003, 34943, 34539 y 33884 Da. Estas masas son superiores a las

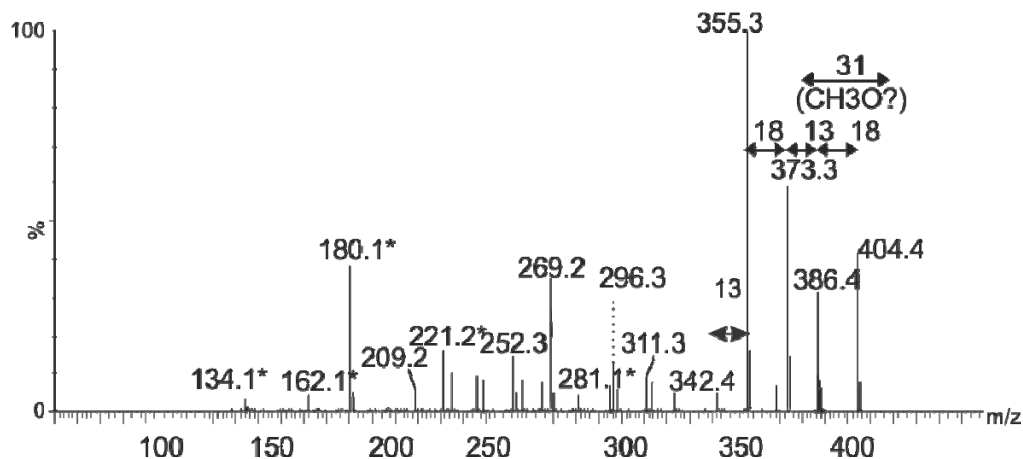
predeterminadas a partir de las secuencias peptídicas de las flagelinas polares: 31413 Da para FlaA y 31361 Da para FlaB. La masa teórica de las flagelinas polares no fue detectada en la deconvolución, sugiriendo que las flagelinas se hallan modificadas post-traduccionalmente con glicanos. Las masas observadas corresponden a flagelinas con modificaciones de 404-1060 Da. Por ejemplo, la masa observada de 33884 Da corresponde a FlaB (31361 Da) modificada con dos residuos de 1060 Da y uno de 404 Da. Las masas observadas de 34943 y 36003 Da aparentemente corresponden a repeticiones consecutivas del glicano de 1060 Da.



**Figura 3.1.7** (A) MS de las flagelinas polares intactas de AH-1 mostrando la multitud de iones cargados derivados de las proteínas. (B) Reconstrucción del perfil de masas moleculares de las flagelinas polares: 36003, 34943, 34539 y 33884 Da. Estas masas son superiores a las predeterminadas teóricamente para FlaA (31416 Da) y FlaB (31361 Da). Las flechas indican las diferencias de masas entre los picos de masas intactos. Estas diferencias de masa probablemente corresponden a la masa de los azúcares que modifican la proteína.

Seguidamente, para determinar la naturaleza del glicano que modifica a las flagelinas, se analizó mediante espectrometría de masas uno de los múltiples picos correspondientes a iones cargados derivados de las proteínas ( $m/z$  999.4). El análisis MS/MS mostraba que su espectro estaba dominado por un pico intenso de ion oxonium de 404.4  $m/z$ . La disociación inducida por colisión (feCID) y la espectrometría de masas de alta resolución de este pico mostraban la pérdida consecutiva de agua y grupos metilo, dando lugar a un patrón de fragmentación similar al observado en ácidos nonulosónicos (Figura 3.1.8), siendo su fórmula más probable  $C_{19}H_{32}O_9$ . Muchos de los iones derivados de fragmentos de azúcar con  $m/z$ : 134.1, 162.1, 180.13, 221.19 y 281.1 también se han observados en el espectro MS/MS de Pse5Ac7Ac9Ac, que modifica las flagelinas polares de *Aeromonas caviae* (Schirm *et al.*, 2005). Por el contrario, los fragmentos de iones con  $m/z$  de 342.4, 355.4 y 373.2 difieren de los hallados en el espectro derivado de Pse5Ac7Ac9Ac. Todos estos datos, combinados con un análisis

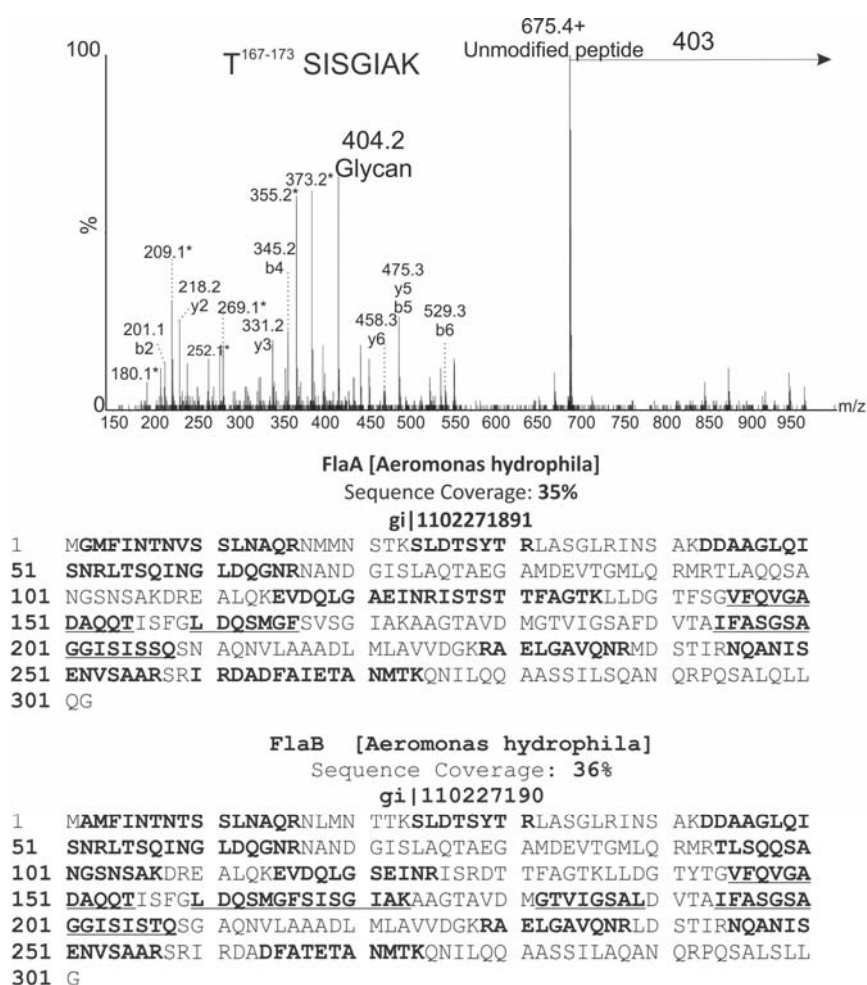
extensivo de las masas, sugieren que el azúcar de 404 Da podría ser Pse5Ac7Ac9Ac con adición de dos grupos metilo, dos moléculas de agua y una molécula desconocida de 25 Da.



**Figura 3.1.8** Caracterización del ion de 404  $m/z$  mediante disociación inducida por colisión (feCID) y espectrometría de masas de alta resolución. Puede observarse un patrón de fragmentación similar al observado en ácidos nonulosónicos. Los iones marcados con asteriscos también se han hallado en el espectro MS/MS del ácido pseudamínico.

Paralelamente, las flagelinas polares se digirieron con tripsina y se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a trampa iónica y asociada a espectrometría de masas en tándem (nLC-MS/MS), observándose secuencias peptídicas correspondientes a las proteínas FlaA y FlaB, con una cobertura de secuencia del 35% y del 36%, respectivamente. El espectro MS/MS derivado de los péptidos trípticos mostró numerosos iones con elevada  $m/z$ , observándose picos muy reducidos de iones derivados de fragmentos de péptidos de tipo y o b. La baja intensidad de estos picos hace difícil inferir información de la secuencia peptídica. El análisis de la secuencia peptídica de las flagelinas puso de manifiesto que la región central variable no presenta lugares de corte para tripsina, y por tanto, el tratamiento con tripsina genera péptidos demasiado largos para ser analizados mediante nLC-MS/MS. En consecuencia, para solventar este problema las flagelinas fueron tratadas con proteinasa K y los péptidos resultantes analizados mediante nLC-MS/MS. Se analizaron un total de cinco glicopéptidos, observándose uno o más glicanos de 403 Da, con un espectro dominado por un ion intenso de 404  $m/z$ , en todos ellos (Figura 3.1.9). Los iones derivados del glicano se observan en la región de valores bajos de  $m/z$  del espectro de glicopéptidos.

Además del ion oxonium (404  $m/z$ ), se aprecian iones derivados de fragmentos de glicano idénticos a los observados en la fragmentación de glicanos similares al ácido pseudamínico. Los glicopéptidos secuenciados corresponden a regiones idénticas de FlaA y FlaB, excepto en un caso (SISGIAK) (Figura 3.1.9). Por otro lado, la ausencia de residuos asparagina en los glicopéptidos secuenciados sugiere que los glicanos se hallan unidos mediante un enlace de tipo *O* a residuos de serina o treonina. Los análisis de espectrometría de masas no mostraron péptidos modificados con glicanos o cadenas de glicanos de 1060Da.



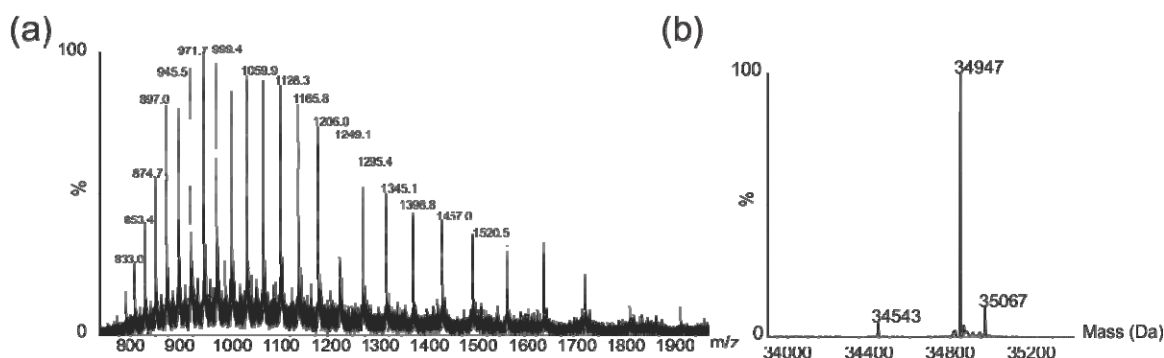
**Figura 3.1.9** Análisis MS/MS de los glicopéptidos de las flagelinas polares de *A. hydrophila* AH-1. El espectro está dominado por el ion de  $m/z$  675.4, correspondiente al péptido no modificado  $^{167}$ SISGIAK $^{173}$ . Se observó una pérdida de 403 Da con respecto al glicopéptido precursor, así como el correspondiente glicano en el valor 404 de  $m/z$ . Los iones derivados de fragmentos de péptidos de tipo y o b están indicados y son picos más bajos que los derivados del glicano, indicados con asteriscos. En la figura también se muestra la cobertura de secuencia en porcentaje de las flagelinas FlaA y FlaB. En negrita se

muestran péptidos no modificados. En negrita y subrayado se muestran péptidos modificados con el glicano de 404 Da.

El análisis mediante cromatografía de gases (GC) de la flagelina purificada de la cepa AH-1 mostró la presencia de ramnosa, azúcar que forma parte del antígeno O:11 del LPS, hecho que sugiere que el glicano de 1060 Da esté relacionado con el antígeno O del LPS de esta cepa.

### 3.1.2.4 Análisis de la glicosilación de las flagelinas polares en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* de *A. hydrophila*

Las flagelinas polares purificadas del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* se sometieron a análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) detectándose múltiples iones cargados (Figura 3.1.10A), que al someterse las cargas a deconvolución dieron lugar a tres picos de 34543, 34947 y 35067 Da (Figura 3.1.10B).



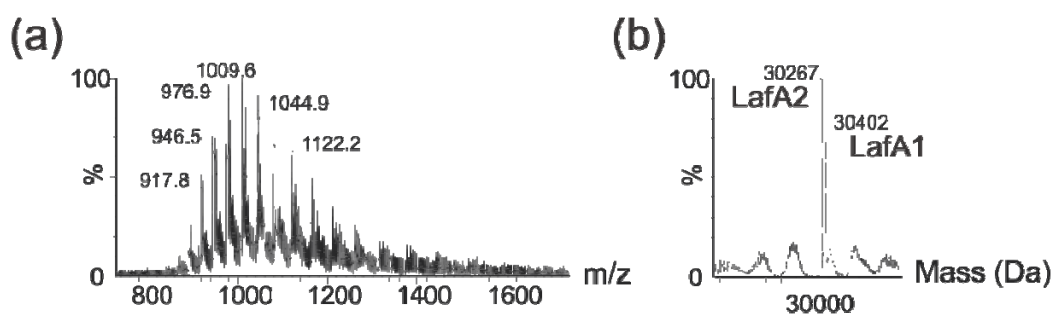
**Figura 3.1.10** (A). MS de las flagelinas polares intactas del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* mostrando multitud de iones cargados derivados de las proteínas. (B). Reconstrucción del perfil de masas moleculares de las flagelinas polares: 34543, 34947 y 35067 Da.

El análisis mediante nLC-MS/MS de los péptidos derivados de la digestión de las flagelinas polares del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* con proteinasa K mostró péptidos modificados con el glicano derivado del ácido pseudamínico de 404 Da, tanto en forma de monosacárido como en cadenas. No obstante, no se observó el glicano o cadena de glicanos de 1060 Da observado en la cepa parental AH-1.

### 3.1.2.5 Análisis de la glicosilación de las flagelinas laterales en los mutantes AH-1 $\Delta$ flaB-J y en el doble mutante AH-1 $\Delta$ wbpL $\Delta$ flaB-J

Las flagelinas laterales del mutante AH-1 $\Delta$ flaB-J se obtuvieron a partir de crecimientos en medio semisólido y se purificaron en gradiente de cloruro de cesio, sometiéndose posteriormente a análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), detectándose múltiples iones cargados (Figura 3.1.11A) característicos de proteínas.

Las cargas del espectro obtenido, se sometieron a deconvolución y dieron lugar a dos proteínas de 30402 y 30267 Da, respectivamente (Figura 3.1.11B). Estas masas corresponden casi exactamente a las masas predeterminadas a partir de la secuencia peptídica de las flagelinas laterales, LafA1 (30401 Da) y LafA2 (30297 Da). Las flagelinas laterales digeridas con tripsina fueron analizadas por nLC-MS/MS, mostrando secuencias peptídicas correspondientes a las proteínas LafA1 y LafA2, con una cobertura de secuencia del 42 y del 45%, respectivamente. La inspección manual de los datos de MS/MS no mostró evidencias de la presencia de glicanos. En consecuencia, los datos obtenidos sugieren que las flagelinas laterales de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* no se hallan modificadas post-traduccionalmente con glicanos, a diferencia de lo que sucede en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*.



**Figura 3.1.11** (A) MS de las flagelinas laterales mostrando multitud de iones cargados derivados de las proteínas. (B) Reconstrucción del perfil de masas moleculares de las flagelinas laterales mostrando dos masas de 30402 y 30267, correspondientes a LafA1 y LafA2.

Los análisis de la glicosilación de las flagelinas laterales en el doble mutante AH-1 $\Delta$ wbpL $\Delta$ flaB-J fueron los mismos que en el caso del mutante AH-1 $\Delta$ flaB-J.

### 3.1.3 Genes implicados en la glicosilación de las flagelinas polares

#### 3.1.3.1 Análisis de la glicosilación de las flagelinas polares en el mutante incapaz de producir el antígeno O:11 del LPS

La presencia de ramnosa en las flagelinas polares de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* junto con el hecho de que el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* perdía el glicano de 1060 Da, sugería una relación entre este glicano y el antígeno O del LPS de esta cepa.

Para confirmar este dato se procedió a mutar el gen *rmlB* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, un gen de biosíntesis del LPS que codifica para una proteína con función dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa, implicada en el segundo paso de la vía de biosíntesis de dTDP-L-Rha o dTDP-L-6dTal a partir de glucosa-1-P.

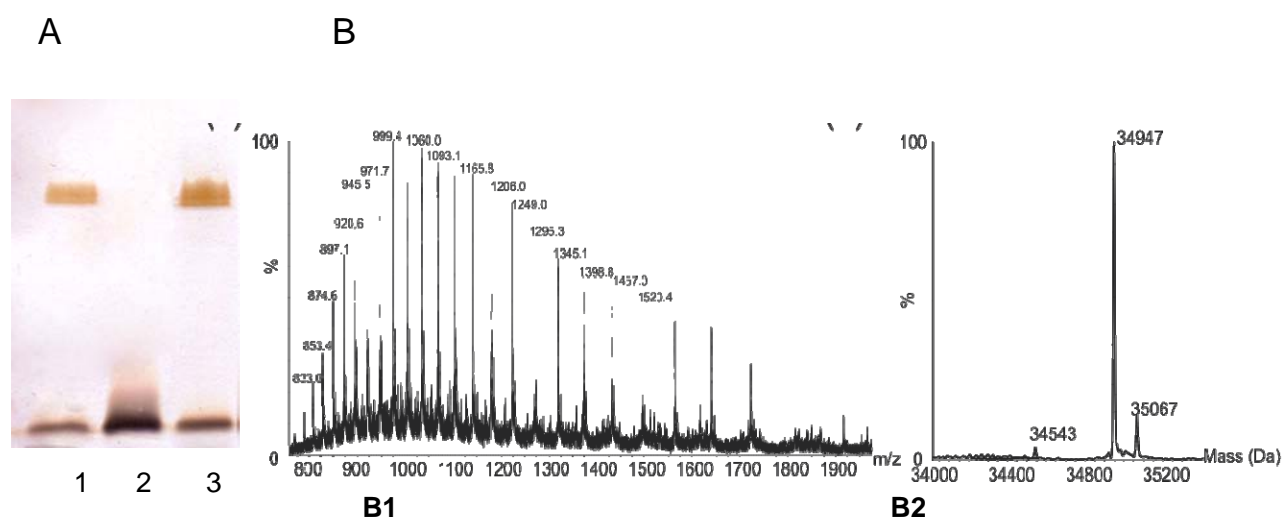
Se construyó un mutante mediante recombinación homóloga en pauta en el gen *rmlB*. Se amplificó a partir de ADN cromosómico de AH-1 un fragmento AB de 768 pb con los cebadores A-RmlB y B-RmlB, y un fragmento CD de 754 pb con los cebadores C-RmlB y D-RmlB. Los fragmentos AB y CD se unieron gracias a sus extremos complementarios y se amplificaron en un único fragmento mediante el empleo de los cebadores A y D. El amplímero derivado de la fusión de ambos fragmentos se digirió con la endonucleasa de restricción *Bgl*III, presente en los cebadores A y D, y se ligó al vector suicida pDM4, previamente digerido con *Bgl*III y defosforilado. El vector suicida recombinante pDM4-RmlB se electroporó en la cepa de *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir), seleccionando los transformantes en placas de LB suplementadas con cloranfenicol a una temperatura de 30°C. La presencia de inserto se comprobó mediante PCR utilizando los cebadores pDM4for y pDM4rev del vector. A continuación, el plásmido suicida recombinante (pDM4-RmlB) se introdujo en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* mediante conjugación triparental empleando como dadora, la cepa de *E. coli* MC1061 que contenía el plásmido suicida recombinante; como receptora, la cepa de *A. hydrophila* AH-1 rifampicina resistente; y como facilitadora, la cepa de *E. coli* HB101 con el vector pRK2073. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con rifampicina y cloranfenicol. La correcta inserción del plásmido en el genoma bacteriano se analizó mediante PCR con cebadores externos a la construcción amplificada, dando lugar los transconjugantes correctos a ausencia de amplímero; así como con los cebadores A y D empleados en la construcción, dando lugar los transconjugantes correctos a dos bandas de amplificación, una correspondiente al gen deleciónado y la otra correspondiente al gen salvaje. Con el fin de provocar la escisión del plásmido

pDM4 con la copia salvaje del gen, se sometieron los transconjugantes correctos a un crecimiento en TSB con sacarosa al 10% a 30°C durante toda la noche y posteriormente, se realizó un banco de diluciones que se sembró en placas de TSA suplementadas con sacarosa 10% e incubó a una temperatura de 30°C. Se analizó la sensibilidad de las colonias frente a cloranfenicol, seleccionando aquellas que eran sensibles y daban lugar a un amplicón de 1775 pb con los cebadores externos E-RmlB y F-RmlB.

La caracterización fenotípica del mutante AH-1 $\Delta$ rmlB mostró la ausencia de antígeno O en el LPS y una reducción en el peso molecular de las flagelinas polares, al igual que lo sucedido en el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL.

El análisis de glicosilación de las flagelinas polares mediante LC-MS mostró la presencia del derivado del ácido pseudamínico pero no se observó el glicano de 1060 Da.

Ensayos de complementación del mutante AH-1 $\Delta$ rmlB con el gen salvaje clonado en el vector pBAD33 (ver apartado 2.6.16 de Material y Métodos) restauran el fenotipo salvaje en relación a la formación del antígeno O y al peso molecular de la flagelina.

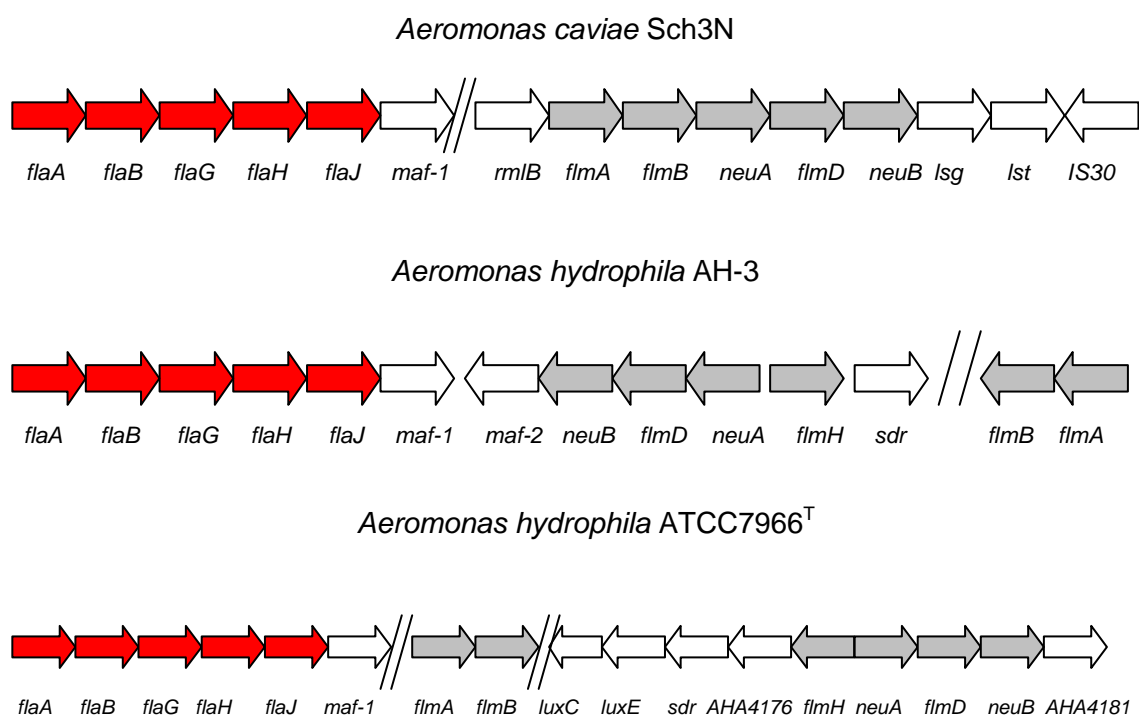


**Figura 3.1.12** (A) Gel de SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* (1), del mutante AH-1 $\Delta$ rmlB (2) y del mutante AH-1 $\Delta$ rmlB complementado con el plásmido pBAD-RmlB (3). Todas crecidas en TSB a 30°C. (B1) MS de las flagelinas polares intactas del mutante AH-1 $\Delta$ rmlB mostrando multitud de iones cargados derivados de las proteínas. (B2) Reconstrucción del perfil de masas moleculares de las flagelinas polares: 34543, 34947 y 35067 Da.



### 3.1.3.2. Detección y análisis de los genes implicados en la biosíntesis del derivado de ácido pseudamínico

En *A. hydrophila* AH-3, los genes implicados en la biosíntesis de ácido pseudamínico se hallan localizados en dos regiones cromosómicas: la agrupación *neuB-flmH*, se localiza adyacente a la región 2 de flagelo polar (Canals *et al.*, 2006), y *flmAB* se hallan fuera de esta agrupación. Sin embargo en *A. caviae* Sch3N, dichos genes se localizan adyacentes a genes implicados en la biosíntesis del antígeno O del LPS.



**Figura 3.1.13** Organización genética de la región *flm-neu* en *Aeromonas caviae* Sch3N, *A. hydrophila* AH-3 y *A. hydrophila* 7966<sup>T</sup>. Los sentidos de transcripción están indicados con flechas de bloque. Los genes en rojo corresponden a genes estructurales del flagelo polar, mientras que los genes en gris corresponden a genes de la ruta de biosíntesis del ácido pseudamínico.

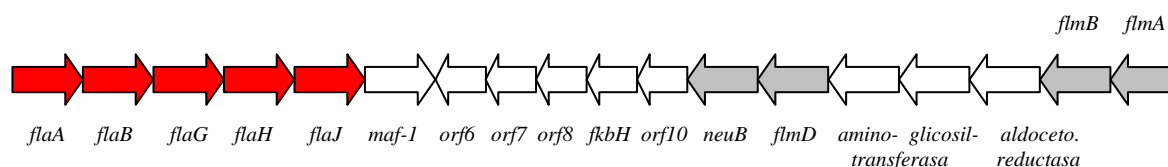
Dado que los estudios de glicosilación habían puesto de manifiesto que las flagelinas polares de la cepa AH-1 se hallaban modificadas por un glicano de 404 Da que podría ser un derivado de ácido pseudamínico (Pse5Ac7Ac9Ac) se determinará la localización de los genes implicados en la biosíntesis de ácido pseudamínico y si estos se hallan implicados en la formación del glicano que modifica las flagelinas polares.

Con este fin, se generaron sondas de diferentes genes implicados en la biosíntesis de ácido pseudamínico (*neuB*, *flmD* y *flmA*) de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* que se emplearon en ensayos de hibridación con DNA cromosómico de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*. Las sondas empleadas hibridaron tanto con AH-1 como con AH-3, lo que sugería la presencia de dichos genes en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*. Seguidamente, mediante alineamiento de los genes *neuB*, *flmD*, *flmA* y *flmB* de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup>, *A. caviae* Sch3N y *A. hydrophila* AH-3, se diseñaron cebadores para amplificar la región *neuB-flmD* y *flmA-flmB* en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*. La pareja de cebadores NeuBfor (interno al gen *neuB*) y NeuArev1 (interno al gen *flmD*) dio lugar a un amplicón de 1500 pb; la pareja de cebadores FlmA-alin3 (interno de *flmA*) y FlmA-alin4 (interno de *flmB*) dio lugar a un amplicón de 1500 pb. Ambos amplicones fueron secuenciados y analizados mediante el programa *BLAST*, presentando similitud con las regiones buscadas.

En la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, la agrupación *neuB-flmH* se localiza adyacente a la región 2 de flagelo polar, por tanto se diseñó un cebador interno de *flaH* (A1FlaHfor) y otro de *flmD* (A1flmDfor) que nos permitiesen determinar si estas dos agrupaciones de genes también se hallaban adyacentes en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*. Estos ensayos dieron lugar a un amplicón de 12 kb, cuya secuencia, al ser analizada con el programa *BLAST* de NCBI mostraba que los extremos del amplicón presentaban similitud con *flaHJ* en uno de los extremos y con *flmD* en el otro.

Por último se amplificó la región comprendida entre *flmD* y *flmB* usando los cebadores A1flmDrev-A1flmBfor, que generó un amplicón de aproximadamente 5 kb. La secuenciación del amplicón mostró tres pautas de lectura abiertas: una aminotransferasa de clase III, una putativa glicosiltransferasa y una aldo-ceto reductasa. Curiosamente no se encontró el gen *neuA*, a diferencia de lo que sucede en la cepa AH-3 y ATCC7966<sup>T</sup> de *A. hydrophila*. La distribución hallada en la cepa AH-1 es similar a la que presenta la cepa de *A. hydrophila* ML09-119.

La secuenciación completa de la región comprendida entre *flaA* y *flmA* de la cepa AH-1 mostró 18 pautas de lectura abierta (Figura 3.1.14 y Tabla 3.1.1). Adyacente a los genes de la región 2 de flagelo polar, encontramos el gen *maf-1*, al igual que sucede en las otras cepas de *A. hydrophila*. No obstante, encontramos una serie de genes que no se hallan en las otras cepas de *Aeromonas* previamente descritas, con funciones de tipo metiltransferasa/acetiltransferasa que podrían estar implicadas en las modificaciones que encontramos en el ácido pseudamínico que glicosila la flagelina polar en AH-1.



**Figura 3.1.14** Esquema de la organización genética de la región *neu-flm* en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*. Los sentidos de transcripción están indicados con flechas de bloque y nombrados como sus homólogos en otras especies bacterianas. Los genes en rojo corresponden a genes estructurales de flagelo polar, mientras que los genes en gris corresponden a genes de la ruta de biosíntesis del ácido pseudamínico.

**Tabla 3.1.1** Análisis y características principales de las 18 ORF de la agrupación en *A. hydrophila* AH-1, así como su localización en la secuencia nucleotídica (Anexo 7.1).

| ORF |                       | Proteína homóloga <sup>1</sup><br>(número de acceso)<br>(% Identidad/% Similitud)           | Posición<br>nucleotídica | G+C<br>(%) | aa  | PM <sup>2</sup><br>(kDa) | pI <sup>2</sup> | GRAVY <sub>2</sub> |
|-----|-----------------------|---|--------------------------|------------|-----|--------------------------|-----------------|--------------------|
| nº  | Nombre de la proteína |   |                          |            |     |                          |                 |                    |
| 1   | FlaA                  | FlaA, <i>Aeromonas hydrophila</i> (ABG56543) (99/99)  | 1-907                    | 51.5       | 302 | 31.5                     | 5.29            | -0.184             |
| 2   | FlaB                  | FlaB, <i>Aeromonas hydrophila</i> (ABG56544) (99/99)  | 910-1813                 | 52.3       | 301 | 31.5                     | 5.30            | -0.233             |
| 3   | FlaG                  | Proteína flagelar FlaG, <i>A. hydrophila</i> (WP_016350351) (99/100)                        | 1850-2270                | 46.8       | 140 | 15.3                     | 4.62            | -0.565             |
| 4   | FlaH                  | Proteína 2 asociada al gancho del flagelo, <i>A. hydrophila</i> ML09-119 (AGM43657) (97/98) | 2300-3684                | 37.1       | 465 | 49.1                     | 6.78            | -0.320             |
| 5   | FlaJ                  | Proteína flagelar FliS, <i>A. hydrophila</i> ML09-119 (AGM43658) (85/92)                    | 3718-4138                | 35.5       | 140 | 15.7                     | 5.13            | -0.216             |
| 6   | Maf-1                 | Pseudoaminil transferasa flagelar, <i>A. caviae</i> (JQ254915.1) (68/83)                    | 4464-6549                | 28.4       | 667 | 76.2                     | 5.47            | -0.013             |
| 7   | Orf6                  | Metiltransferasa de tipo 11, <i>A. caviae</i> (WP_010674295) (58/74)                        | 6583-7238                | 29         | 220 | 25.7                     | 7.72            | -0.425             |
| 8   | Orf7                  | Metiltransferasa, <i>Pseudoalteromonas</i> (WP_013465578) (39/56)                           | 7241-8544                | 29.7       | 434 | 49.6                     | 5.73            | -0.134             |
| 9   | Orf8                  | N-acetiltransferasa, <i>A. hydrophila</i> (WP_015500664) (85/90)                            | 8447-10180               | 27.6       | 561 | 63.5                     | 5.58            | -0.216             |
| 10  | FkbH                  | FkbH, N-acetiltransferasa <i>Rhodobacteraceae bacterium</i> HTCC2083 (EDZ42460) (36/55)     | 10175-11873              | 31.4       | 566 | 63.8                     | 5.21            | -0.143             |
| 11  | Orf10                 | Aminopeptidasa <i>R. bacterium</i> HTCC2083 (EDZ43041) (60/73)                              | 11872-13135              | 30.6       | 421 | 47.7                     | 5.73            | -0.273             |
| 12  | NeuB                  | Ácido pseudamínico sintasa, <i>A. hydrophila</i> ML09-119 (AGM43664) (94/95)                | 13268-14317              | 51.6       | 350 | 38.2                     | 5.59            | -0.098             |

|    |                      |  |             |      |     |      |      |        |
|----|----------------------|--|-------------|------|-----|------|------|--------|
| 13 | FlmD                 | N-acetiltransferasa asociada a la biosíntesis del ácido pseudamínico, <i>A. hydrophila</i> ML09-119 (AGM43665) (97/97) | 14301-15795 | 58.1 | 498 | 56.4 | 6.33 | -0.259 |
| 14 | Amino-transferasa    | Aminotransferasa de clase III, <i>A. hydrophila</i> ML09-119 (AGM43666) (99/99)  | 15797-17083 | 57.2 | 316 | 35.1 | 6.83 | -0.032 |
| 15 | Glicosil transferasa | Putativa glicosiltransferasa, <i>A. hydrophila</i> ML09-119 (AGM43667) (99/99)   | 17084-17836 | 56.4 | 250 | 28.1 | 5.26 | -0.286 |
| 16 | Aldo-ceto reductasa  | Aldo/ceto reductasa, <i>A. hydrophila</i> ML09-119 (AGM43668) (97/98)  | 17834-18676 | 56.6 | 281 | 31.1 | 5.53 | -0.041 |
| 17 | FlmB                 | Proteína biosíntesis polisacárido FlmB, <i>A. hydrophila</i> ML09-119 (AGM43669) (99/99)                               | 18671-19811 | 55.6 | 380 | 41.6 | 5.88 | -0.017 |
| 18 | FlmA                 | FlmA, <i>A. hydrophila</i> ML09-119 (AGM43670) (99/99)   | 19810-20530 | 51.7 | 240 | 26.5 | 6.31 | -0.075 |

<sup>1</sup> Las proteínas homólogas indicadas corresponden a las que presentaban mayor identidad y similitud con una función no putativa.

<sup>2</sup> El peso molecular (PM), el punto isoeléctrico (pI) y el promedio de hidrofobicidad de las proteínas (GRAVY) se han calculado usando el programa ProtParam de ExPASy.

### 3.1.3.3. Obtención y caracterización de mutantes en genes implicados en la biosíntesis de ácido pseudamínico de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*

Con objeto de determinar si los genes *neu-flm* se hallaban implicados en la biosíntesis del glicano de 404 Da que modificaba las flagelinas polares se procedió a la mutación de algunos de los genes.

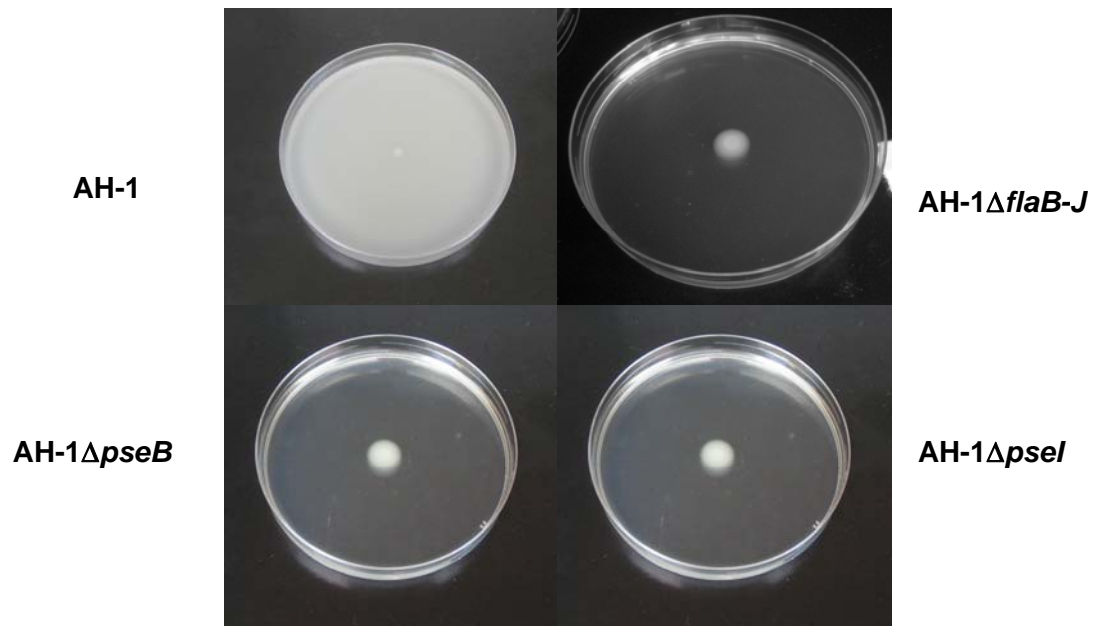
Para ello, se construyeron mutantes mediante recombinación homóloga en pauta en los genes *pseI* (*neuB*) y *pseB* (*flmA*). Para realizar la mutación del gen *pseI* se amplificó a partir de ADN cromosómico de AH-1 un fragmento AB de 764 pb con los cebadores A-PseI y B-PseI, y un fragmento CD de 630 pb con los cebadores C-PseI y D-PseI.

Para la mutación del gen *pseB* se amplificó a partir de ADN cromosómico de AH-1 un fragmento AB de 759 pb con los cebadores A-PseB y B-PseB, y un fragmento CD de 574 pb con los cebadores C-PseB y D-PseB. Los fragmentos AB y CD se unieron gracias a sus extremos complementarios y se amplificaron en un único fragmento mediante el empleo de los cebadores A y D. El amplímero derivado de la fusión de ambos fragmentos se digirió con la endonucleasa de restricción *Bam*HI, presente en los cebadores A y D, y se ligó al vector suicida pDM4, previamente digerido con *Bgl*II y defosforilado. El vector suicida recombinante pDM4-PseI o pDM4-PseB se electroporó

en la cepa de *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir), seleccionando los transformantes en placas de LB suplementadas con cloranfenicol a una temperatura de 30°C. La presencia de inserto se comprobó mediante PCR utilizando los cebadores pDM4for y pDM4rev del vector. A continuación, cada uno de los plásmidos suicidas recombinantes (pDM-PseI o pDM-PseB) se introdujo independientemente en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* mediante conjugación triparental empleando como dadora, la cepa de *E. coli* MC1061 que contenía el plásmido suicida recombinante; como receptora, la cepa de *A. hydrophila* AH-1 rifampicina resistente; y como facilitadora, la cepa de *E. coli* HB101 con el vector pRK2073. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con rifampicina y cloranfenicol. La correcta inserción del plásmido en el genoma bacteriano se analizó mediante PCR con cebadores externos a la construcción amplificada, dando lugar los transconjugantes correctos a ausencia de amplímero; así como con los cebadores A y D empleados en las respectivas construcciones, dando lugar los transconjugantes correctos a dos bandas de amplificación, una correspondiente a los genes delecionados y la otra correspondiente a los genes salvajes. Con el fin de provocar la escisión del plásmido pDM4 con la copia salvaje de los genes, se sometieron los transconjugantes correctos a un crecimiento en TSB con sacarosa al 10% a 30°C durante toda la noche y posteriormente, se realizó un banco de diluciones que se sembró en placas de TSA suplementadas con sacarosa 10% e incubó a una temperatura de 30°C. Se analizó la sensibilidad de las colonias frente a cloranfenicol, seleccionando aquellas que eran sensibles y daban lugar a un amplicón de 1635 pb con los cebadores externos E-PseI y F-PseI en el mutante para el gen *pseI*, y de 1610 pb con los cebadores externos E-PseB y F-PseB en el mutante para el gen *pseB*.

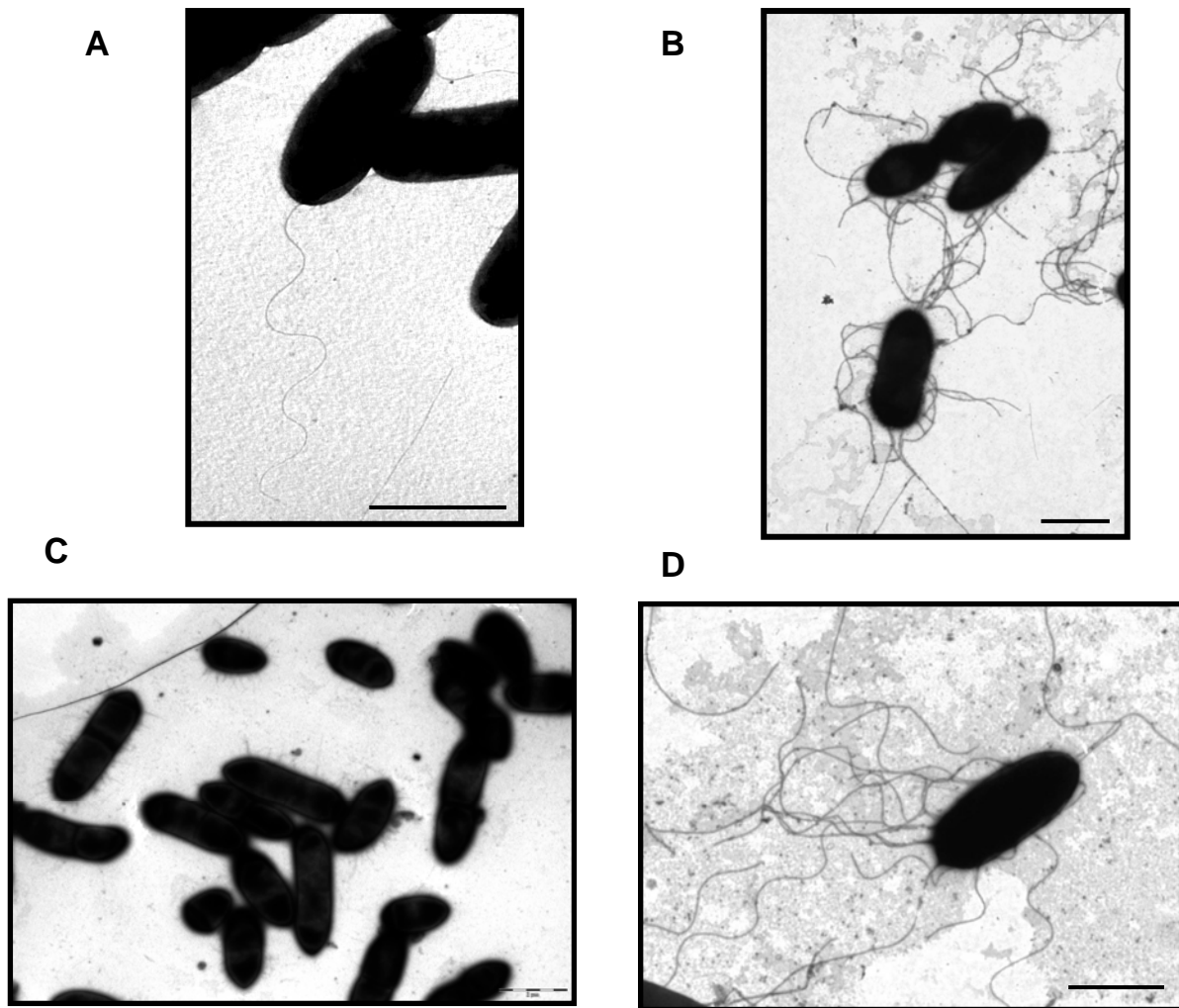
A continuación, se procedió a la caracterización fenotípica de los dos mutantes obtenidos en relación a su motilidad, presencia de flagelo polar/lateral, perfil de LPS y presencia/ausencia de fimbrias. (Tabla 3.1.2)

El análisis mediante microscopía óptica de la motilidad de los mutantes obtenidos en medio líquido, mostró que todos ellos presentaban un fenotipo inmóvil. El análisis de su motilidad en placas semisólidas mostraba que todos ellos presentaban un diámetro de expansión similar al del mutante carente de flagelo polar AH-1 $\Delta$ *flaB-flaJ* (Figura 3.1.15).



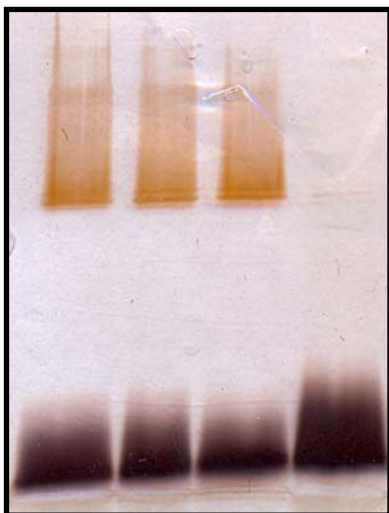
**Figura 3.1.15** Motilidad en placas de bactoagar.

Al ser analizados mediante microscopía electrónica de transmisión tras crecer en medio líquido, se observó que ninguno de ellos presentaba flagelo polar ensamblado, presentando todos ellos algunos fragmentos de flagelo polar en el medio, así como un porcentaje de células con fimbrias (Figura 3.1.16). Por el contrario, su análisis tras crecer en medio semisólido mostraba que el ensamblaje de los flagelos laterales no se hallaban afectados por estas mutaciones (Tabla 3.1.2).



**Figura 3.1.16** Microscopía electrónica de transmisión de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* en medio líquido (A) y en medio semisólido (B) y del mutante AH-1 $\Delta$ pseI(neuB) en medio líquido (C) y en medio semisólido (D). Barra = 2  $\mu$ m.

En relación al perfil del LPS no observamos cambios en estos mutantes con respecto a la cepa parental AH-1.



**Figura 3.1.17** Gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de *A. hydrophila* AH-1 (carril 1), AH-1 $\Delta$ pseI (carril 2), AH-1 $\Delta$ pseB (carril 3) y AH-1 $\Delta$ wbpL (carril 4).

**Tabla 3.1.2** Resumen de las características fenotípicas de los mutantes AH-1 $\Delta$ pseI y AH-1 $\Delta$ pseB en relación a la cepa parental AH-1 de *A. hydrophila*. (+: presencia, -: ausencia).

|  | Flagelo polar | Flagelo lateral | LPS          | Fimbrias |
|--|---------------|-----------------|--------------|----------|
| AH-1   | +             | +               | Antígeno O + | -        |
| AH-1 $\Delta$ <i>pseB</i><br>( <i>flmA</i> ) | -             | +               | Antígeno O + | +        |
| AH-1 $\Delta$ <i>pseI</i><br>( <i>neuB</i> ) | -             | +               | Antígeno O + | +        |

Ensayos de complementación de ambos mutantes con el respectivo gen salvaje clonado en el vector pBAD33 (apartado 2.6.16 de Material y Métodos) restauran el fenotipo salvaje en relación a la formación de flagelo polar.

### 3.1.3.4. Construcción de un mutante en el gen *maf-1* de *A. hydrophila* AH-1

Las proteínas Maf han sido descritas como una nueva familia de glicosiltransferasas responsables de la transferencia de los glicanos activos a la flagelina. En *Aeromonas caviae* Sch3N, concretamente se ha descrito la proteína Maf-1 como una putativa pseudaminil transferasa responsable de la transferencia del ácido pseudamínico activo (CMP-Pse5Ac7Ac) a la flagelina polar (Parker *et al.*, 2012). La mutación de *maf-1* en la cepa Sch3N y en la cepa AH-3 de *A. hydrophila* da lugar a células inmóviles sin flagelo polar, no hallándose los flagelos laterales afectados en ninguna de ellas.

Dado que la cepa AH-1 de *A. hydrophila* presenta un gen con similitud a *maf-1* y en la misma localización que en AH-3, ATCC7966<sup>T</sup> y Sch3N, se procedió a analizar su implicación en la formación del flagelo polar. Con este fin y dado que los genes situados detrás de *maf-1* se transcriben en sentido opuesto (Figura 3.1.14), se construyó un mutante mediante recombinación homóloga en un punto (apartado 2.6.15.1 de Material y Métodos).

Para ello, se amplificó un fragmento interno del gen *maf-1*, utilizando ADN cromosómico de la cepa AH-1 y las parejas de cebadores A1Maf1for y A1Maf1rev, dando lugar a un amplímero de 843 pb. El producto amplificado se ligó al vector de clonaje pGEM-T *easy*, y se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación, seleccionando los transformantes en placas de LB suplementadas con ampicilina, X-Gal e IPTG a una temperatura de incubación de 37°C. La presencia de inserto se comprobó mediante PCR utilizando los cebadores SP6 y M13 del vector pGEM-T *easy* y posterior secuenciación del plásmido recombinante.



Para extraer el inserto del plásmido recombinante, este se digirió con la endonucleasa *EcoRI*, situada a ambos lados del polilinker vector pGEM-T *easy* y posteriormente se trató con Klenow para convertir a extremos romos. Dicho inserto, se ligó al vector suicida resistente a cloranfenicol, pCM100, digerido con *EcoRV* y defosforilado, transformándose mediante electroporación a la cepa de *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con cloranfenicol a una temperatura de 30°C, y la presencia del inserto se comprobó mediante PCR con los cebadores pGPfor y pGPprev del vector pCM100 y posterior secuenciación del plásmido recombinante.

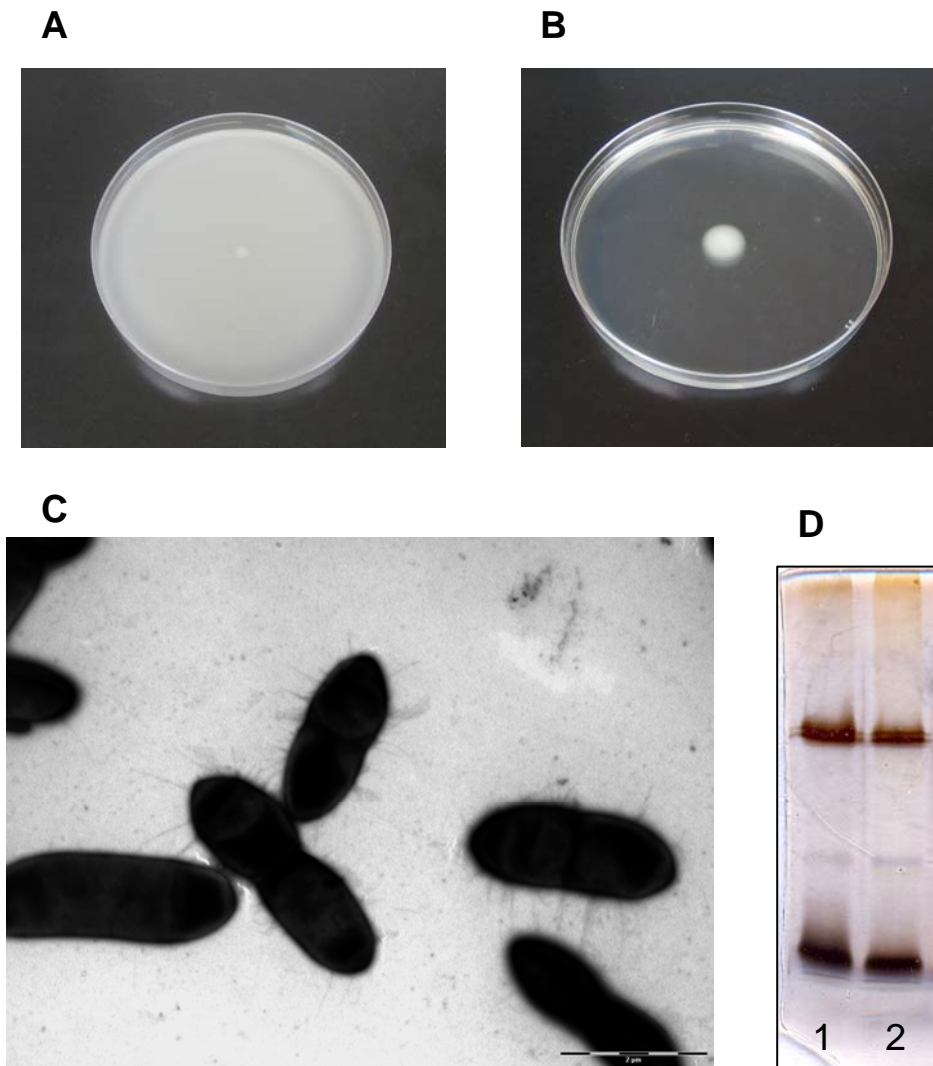
Para la obtención del mutante AH-1::*maf-1* se realizó conjugación triparental empleando *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir) que contenía el vector pCM100-*maf-1*, como cepa donante; la cepa salvaje AH-1 de *A. hydrophila*, como cepa receptora; y *E. coli* HB101 con el vector pRK2073, como cepa facilitadora de la conjugación. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con rifampicina y cloranfenicol.

La comprobación de la correcta inserción del vector pCM100 en el gen *maf-1* en los transconjugantes seleccionados se comprobó mediante *Southern blot*, empleando ADN genómico digerido con la endonucleasa *EcoRV*, tanto de la cepa salvaje como de los transconjugantes, y una sonda específica para el gen *maf-1*. La elección de la diana *EcoRV* obedece a que se halla en el vector pCM100 pero no en el gen *maf-1*, por lo que genera dos fragmentos diferentes que contienen parte del gen truncado en el material genómico mutado por recombinación en un punto, mientras que en la cepa salvaje tan sólo da lugar a un fragmento que contiene el gen completo.

A continuación, se procedió a la caracterización fenotípica del mutante en relación a su motilidad, presencia de flagelo polar/lateral, perfil de LPS y presencia/ausencia de fimbrias.

El análisis de la motilidad en medio líquido, mediante microscopía óptica, mostró que presentaba un fenotipo inmóvil, así como un diámetro de expansión similar al del mutante carente de flagelo polar AH-1 $\Delta$ *flaB-flaJ* en placas semisólidas (Figura 3.1.18B). Además, su análisis mediante microscopía electrónica de transmisión mostraba que al igual que los mutantes en genes implicados en la biosíntesis de ácido pseudamínico, era incapaz de ensamblar el flagelo polar, presentaba un porcentaje de células con fimbrias al crecer en medio líquido y la flagelación lateral no se hallaba

afectada (Figura 3.1.18). El análisis de su perfil del LPS en geles de SDS-PAGE teñidos con nitrato de plata mostraba la ausencia de cambios respecto a la cepa parental AH-1.



**Figura 3.1.18** Caracterización fenotípica del mutante AH-1::*maf-1*. Motilidad en placas de bactoagar de la cepa AH-1 (A) y el mutante AH-1::*maf-1* (B). (C) Microscopía electrónica de transmisión del mutante AH-1::*maf-1* en medio líquido crecido a 25°C y teñido negativamente con acetato de uranilo al 2%. Barra=2μm. (D) Gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de la cepa AH-1 (1) y el mutante AH-1::*maf-1* (2).



## 3.2 FIMBRIAS MSH DE *AEROMONAS HYDROPHILA*

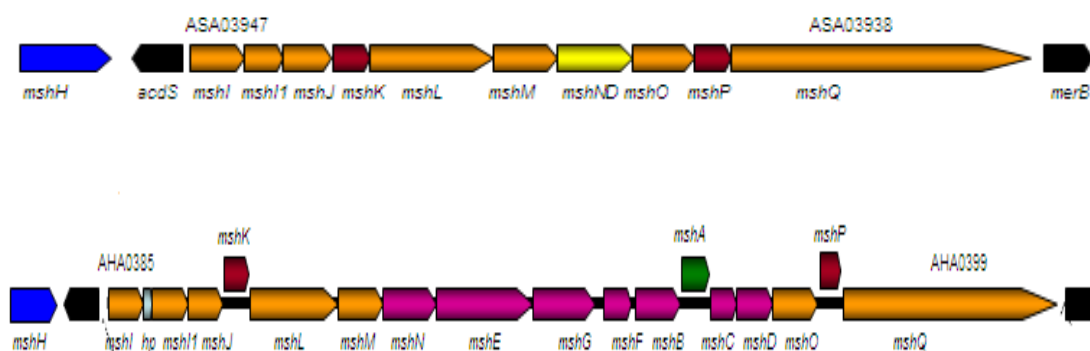
### 3.2.1 Análisis de las fimbrias expresadas en el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL

Estudios previos habían puesto de manifiesto que la mutación del gen *wbpL* de *Aeromonas hydrophila* AH-1, presente en la agrupación génica implicada en la biosíntesis del antígeno O:11, daba lugar a la expresión de abundantes estructuras filamentosas en su superficie al crecer en medio líquido. Además, el análisis de dicho mutante mediante microscopía óptica mostraba abundantes agregados celulares. Para descartar que dichas estructuras filamentosas pudiesen estar relacionadas de algún modo con el flagelo polar o lateral de la cepa AH-1, se mutaron genes relacionados con la biosíntesis del flagelo polar (*flaB-J*) y lateral (*lfgL<sub>L</sub>*), en el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL y en la cepa salvaje (AH-1 $\Delta$ wbpL $\Delta$ *flaB-J*, AH-1 $\Delta$ wbpL $\Delta$ *lfgL<sub>L</sub>*, AH-1 $\Delta$ *flaB-J*, y AH-1 $\Delta$ *lfgL<sub>L</sub>*). La presencia de dichas estructuras filamentosas fue analizada mediante microscopía electrónica de transmisión en los mutantes obtenidos, observándose que los mutantes AH-1 $\Delta$ wbpL $\Delta$ *flaB-J* y AH-1 $\Delta$ *flaB-J* carecían de flagelación polar al crecer en medio líquido, manteniendo el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL $\Delta$ *flaB-J* la expresión de las estructuras filamentosas. El análisis de los mutantes AH-1 $\Delta$ wbpL $\Delta$ *lfgF<sub>L</sub>* y AH-1 $\Delta$ *lfgF<sub>L</sub>*, tras crecer en medio semisólido, puso de manifiesto que ambos carecían de flagelación lateral y no mostraban las estructuras filamentosas. Sin embargo, el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL $\Delta$ *lfgF<sub>L</sub>* expresaba dichas estructuras filamentosas al crecer en medio líquido. Estos datos demostraban que las estructuras filamentosas presentes en el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL no presentaban relación con el flagelo polar ni lateral y por tanto, debían tratarse de fimbrias.

El análisis del genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> mostró seis regiones que presentaban similitud con genes implicados en la biosíntesis de pilis/fimbrias: AHA\_0383-0399, AHA\_0518-0526, AHA\_0686-0696, AHA\_1450-1459, AHA\_3190-3194 y AHA\_3868-3871 y el análisis del genoma de *A. salmonicida* A449 mostró tres regiones: ASA\_3949-3938, ASA\_3724-3730 y ASA\_2903-2915. Con objeto de detectar algunas de estas agrupaciones en *Aeromonas hydrophila* AH-1, se elaboraron sondas para algunos de los genes más conservados de estas agrupaciones. En caso de que alguna sonda diese positivo, uno o varios de los genes contenidos en ella se emplearían para generar mutantes específicos en el mutante AH-1 $\Delta$ wbpL y evaluar su capacidad de expresión de fimbrias/pili al crecer en medio líquido.

### 3.2.1.1 Obtención de una sonda específica para detectar una agrupación homóloga a AHA\_0383-0399 en la cepa de *A. hydrophila* AH-1

Con el fin de elaborar una sonda específica para un gen de la agrupación AHA\_0383-0399 de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> (Figura 3.2.1) que nos permitiese detectar la existencia de una agrupación homóloga en *A. hydrophila* AH-1, se analizó la similitud entre genes de esta agrupación y de su homóloga en *A. salmonicida* A449 (ASA\_3949-3938; Figura 3.2.1). Dichos análisis mostraron que el gen *mshM* (AHA\_0390), que codifica para una ATPasa, se halla altamente conservado, presentando un 91% de identidad y un 95% de similitud entre *A. hydrophila* y *A. salmonicida*.



**Figura 3.2.1** Esquema de la agrupación génica AHA\_0383-0399 en *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> y ASA\_3949-3938 en *A. salmonicida* A449.

Se diseñaron dos cebadores, MshMfor1 y MshMrev1, a partir del alineamiento entre el gen *mshM* de *A. salmonicida* (número de acceso *GenBank*: ZP\_12962008) y el gen *mshM* de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> (número de acceso *GenBank*: YP\_854919), elaborándose una sonda del gen *mshM* de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup>. La sonda obtenida se hibridó con DNA genómico de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, obteniendo resultado positivo en la detección de dicho gen. Seguidamente, los cebadores diseñados se emplearon para intentar amplificar el gen *mshM* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, obteniéndose un amplímero de 919 pb cuya secuencia presentaba una identidad del 99% con el gen *mshM* de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> y del 93% con el gen *mshM* de *A. salmonicida*.

### 3.2.1.2 Construcción de un mutante en el gen *mshM* en la cepa AH-1 $\Delta$ *wbpL* mediante recombinación homóloga en un punto

Con el fin de determinar si las fimbrias observadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* eran del tipo Msh, se construyó un mutante en el gen *mshM*. Si la agrupación génica que contiene este gen se halla implicada en la expresión de las fimbrias observadas, el doble mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*::*mshM* debería dejar de expresarlas.

Para la construcción del mutante, se amplificó un fragmento interno de 600 pb del gen *mshM*, utilizando ADN cromosómico de la cepa AH-1 y la pareja de cebadores MshMfor2-MshMrev2. El producto amplificado se ligó al vector de clonaje pGEM-T *easy*, y se transformó a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación, seleccionando los transformantes en placas de LB suplementadas con ampicilina, X-Gal e IPTG a una temperatura de incubación de 37°C. La presencia de inserto se comprobó mediante PCR utilizando los cebadores SP6 y M13 del vector pGEM-T *easy* y posterior secuenciación del plásmido recombinante. El plásmido recombinante se digirió con la endonucleasa *EcoRI*, situada a ambos lados del polilinker del vector pGEM-T *easy*, para la extracción del inserto. Dicho inserto, se ligó al vector suicida resistente a gentamicina, pFS100-Gm, digerido con *EcoRI* y defosforilado, transformándose mediante electroporación a la cepa de *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con gentamicina a una temperatura de 30°C, y la presencia del inserto se comprobó mediante PCR con los cebadores pGPfor y pGPrev del vector pFS100-Gm y posterior secuenciación del plásmido recombinante.

El plásmido suicida recombinante se introdujo, mediante conjugación triparental, en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* y en la cepa salvaje AH-1 de *A. hydrophila* para la construcción de los mutantes AH-1 $\Delta$ *wbpL*::*mshM* y AH-1:*mshM*, respectivamente. Las conjugaciones triparentales se realizaron empleando *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir) que contenía el vector suicida pFS100-Gm-*mshM*, como cepa donante; el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* o la cepa salvaje AH-1 de *A. hydrophila*, como cepa receptora; y *E. coli* HB101 con el vector pRK2073, como cepa facilitadora de la conjugación. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con rifampicina y gentamicina.

La comprobación de la correcta inserción del vector pFS100-Gm en el gen *mshM* en los transconjugantes seleccionados se comprobó mediante *Southern blot*, empleando ADN

genómico digerido con la endonucleasa *EcoRI*, tanto de la cepa salvaje como de los transconjugantes, y una sonda específica para el gen *mshM*. La elección de la diana *EcoRI* obedece a que se halla en el vector pFS100-Gm pero no en el gen *mshM*, por lo que genera dos fragmentos diferentes que contienen parte del gen truncado en el material genómico mutado por recombinación en un punto, mientras que en la cepa salvaje tan sólo da lugar a un fragmento que contiene el gen completo.

### **3.2.1.3 Caracterización fenotípica de los mutante AH-1 $\Delta$ wbpL::*mshM* y AH-1::*mshM***

Los mutantes obtenidos se analizaron mediante microscopía óptica y electrónica, con objeto de determinar la presencia de agregados y de fimbrias, respectivamente. A diferencia del mutante AH-1 $\Delta$ wbpL, en el doble mutante AH-1 $\Delta$ wbpL::*mshM* no se observan agregados celulares al crecer en medio líquido, correlacionándose este fenotipo con la ausencia de fimbrias. En relación al mutante AH-1::*mshM*, no se observó ninguna modificación con respecto a la cepa parental.

## **3.2.2 Clonaje de la agrupación *msh* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila***

### **3.2.2.1 Hibridación de la librería genómica de la cepa AH-1**

Se generó una sonda para el gen *mshM* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* que se empleó para hibridar una librería genómica de esta misma cepa, clonada en el cósmido pLA2917 y mantenida en *E. coli* DH5 $\alpha$  (apartado 2.6.9 material y métodos). La hibridación se realizó mediante *colony blot*, utilizando la cepa AH-1 como control positivo y la cepa DH5 $\alpha$  con el cósmido pLA2917 como control negativo. El análisis de la librería dio lugar a la detección de un clon positivo, pLA-mshM11.6 que fue confirmado mediante PCR empleando los cebadores utilizados para la elaboración de la sonda. Como control negativo, se empleó *E. coli* DH5 $\alpha$  con el vector de clonaje pLA2917 y como control positivo, la cepa AH-1 de *A. hydrophila*. Tanto el clon como la cepa AH-1 de *A. hydrophila* dieron lugar a una banda de amplificación específica del tamaño esperado.

### 3.2.2.2 Secuenciación de la agrupación *msh*

La secuenciación del clon pLA-mshM11.6, se inició con los cebadores CSpLA y RpLA, complementarios a las secuencias que flanquean la diana *Bg*III en el cósmido pLA2917, y con los cebadores MshMfor1 y MshMrev1, empleados para la elaboración de la sonda.

Los productos génicos de las secuencias obtenidas a partir de los cebadores CSpLA y RpLA en el clon pLA-mshM11.6 presentan similitud con la proteína MshH (AHA\_0383) y MerB (AHA\_0400), respectivamente, de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup>. Las secuencias obtenidas se emplearon de manera consecutiva para diseñar cebadores que permitiesen completar la secuencia del inserto presente en dicho clon. La secuenciación completa del inserto mostró que el clon pLA-mshM11.6 contenía la totalidad de los genes de la agrupación *msh*, así como que estos eran homólogos a los de la agrupación AHA\_0383-0399 de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup>.

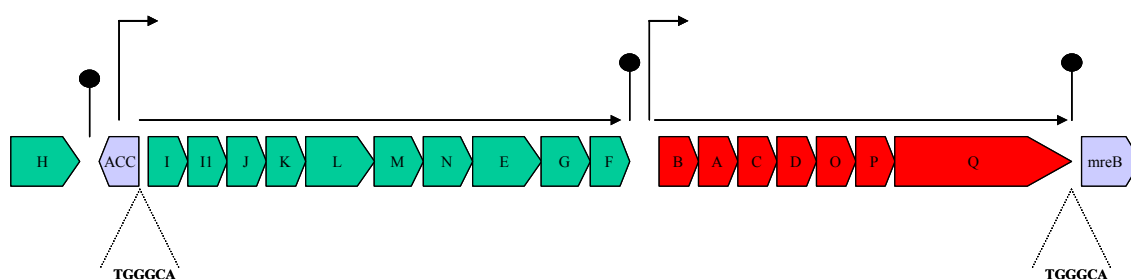
### 3.2.2.3 Análisis de la agrupación génica *msh* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*

Una vez obtenida la secuencia completa de nucleótidos de la agrupación génica implicadas en la formación de las fimbrias Msh de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, se procedió a su análisis. Mediante el empleo del programa *FramePlot* v. 2.3.2, se detectaron 20 pautas de lectura abierta (ORFs) superiores a 100 pb, que se organizan tal y como se muestra en la Figura 3.2.2. Sus secuencias nucleotídicas y aminoacídicas derivadas fueron sometidas a diferentes bases de datos con la finalidad de compararlas y detectar aquellas que mostraran similitud con productos génicos, previamente descritos.

Diecinueve ORFs (desde *mshH* hasta *mshQ*) codifican proteínas que muestran elevada similitud con proteínas implicadas en la formación de las fimbrias sensibles a manosa de tipo IV (MSHA) previamente descritas en *V. cholerae* El Tor (Marsh and Taylor, 1999). En consecuencia, las ORFs determinadas en *A. hydrophila* AH-1 se denominaron como sus genes ortólogos descritos en *V. cholerae* El Tor (Marsh and Taylor, 1999). En esta agrupación se hallan cinco genes que codifican para pilinas/pseudopilinas (MshB, MshA, MshC, MshD y MshO) y trece que codifican para proteínas relacionadas con la biogénesis de fimbrias Msh en otras especies bacterianas. Además, entre los genes *mshH* y *mshI* encontramos un gen que codifica para una ACC deaminasa/D-cisteína sulfhidratasa, que se transcribe en sentido contrario a todos los genes de la agrupación *msh*, también presente en la misma posición en las cepas de *A. salmonicida*



y *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup>. Al final de esta agrupación encontramos el gen *mreB* que codifica para una proteína relacionada en la determinación de la forma celular. El análisis del genoma completo de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> (Li Y *et al.*, 2011), *A. salmonicida* A449 (Reith *et al.*, 2008) y *A. veronii* B565 (Seshadri *et al.*, 2006) ha puesto de manifiesto que genes ortólogos a esta agrupación se hallan presentes en estas tres especies de *Aeromonas* AHA0383-AHA0399, ASA3949-ASA3938 y B565\_3672-B565\_3654, respectivamente. Sin embargo, *A. salmonicida* A449 presenta una delección entre los genes *mshN* y *mshD* (Boyd *et al.*, 2008). Curiosamente, la proteína MshI está codificada por dos genes, *mshI* y *mshII* en todas las cepas de *Aeromonas* (Seshadri *et al.*, 2006; Reith *et al.*, 2008 y Nahal *et al.*, 2012). Por otro lado, dicha agrupación también se halla en muchas cepas de *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella*. El análisis *in silico* de putativos promotores y terminadores rho-independientes puso de manifiesto la presencia de dos posibles promotores y tres posibles terminadores rho-independientes. El primero de los promotores se sitúa en la región 5' del gen *mshI* (concretamente dentro de la región del gen de *ACC deaminasa*) y el segundo, en la región 5' del gen *mshB*. Los terminadores rho-independientes se localizan en la región 3' de los genes *mshH*, *mshF* y *mshQ* (Figura 3.2.2).



**Figura 3.2.2** Esquema de la agrupación *msh* en *A. hydrophila* AH-1. Cada una de las flechas de bloque corresponde a una pauta de lectura abierta (ORF) e indica el sentido de transcripción. Los posibles promotores están marcados con flechas y los posibles terminadores con círculos.

**Tabla 3.2.1** Análisis y características principales de las 19 ORFs de la agrupación de fimbrias Msh en *A. hydrophila* AH-1, así como su localización en la secuencia nucleotídica (Anexo 7.2).

| ORF |                          | Proteína homóloga <sup>1</sup><br>(número de acceso)<br>(% Identidad/% Similitud)                          | Función<br>y localización  | Posición<br>nucleotídica | G+C<br>(%) | aa  | PM <sup>2</sup><br>(kDa) | pI <sup>2</sup> | GRAVY <sup>2</sup> |
|-----|--------------------------|--|--|--------------------------|------------|-----|--------------------------|-----------------|--------------------|
| n°  | Nombre de la<br>proteína |  |  |                          |            |     |                          |                 |                    |
| 1   | MshH                     | MshH, <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK39510) (99/99)                                 | Proteína reguladora con dominios GGDEF/EAL                                       | 8-1373                   | 66.5       | 456 | 46.6                     | 11.82           | -0.848             |
| 2   | ACC deaminasa            | 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK38906) (97/98) | ACC deaminasa/D-cisteína sulhidratasa  | 1456-2403                | 66.4       | 315 | 33.4                     | 8.67            | -0.087             |
| 3   | MshI                     | MshI, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK36754) (99/98)  | Proteína de membrana interna, N-terminal GspL like                               | 2473-3336                | 64.2       | 287 | 31.3                     | 5.84            | 0.113              |
| 4   | MshII                    | MshII, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK37696) (98/98)                                       | Proteína de membrana interna, C-terminal GspL like                               | 3336-3929                | 65.8       | 197 | 22                       | 9.85            | -0.370             |
| 5   | MshJ                     | MshJ, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK37309) (99/100)                                       | Proteína de membrana interna, GspM like  | 3928-4576                | 62.8       | 215 | 24.4                     | 5.78            | -0.139             |
| 6   | MshK                     | MshK, <i>A. hydrophila</i> ML09-119 (AGM42168) (99/100)  | Proteína periplasmática, GspC like   | 4569-4895                | 67         | 108 | 11.3                     | 9.85            | 0.186              |
| 7   | MshL                     | MshL, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK38588) (99/99)  | Secretina de membrana externa, GspD like   | 4966-6639                | 61.8       | 557 | 60.1                     | 5.88            | -0.327             |
| 8   | MshM                     | Proteína A vía secreción, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK36249) (99/99)                    | Proteína citoplasmática, ATPasa, GspA like                                       | 6717-7607                | 66.1       | 296 | 33.6                     | 9.27            | -0.087             |
| 9   | MshN                     | Proteína AHA_0391, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK38952) (99/100)                          | Proteína de membrana externa con dominio TPR ( <i>tetratricopeptide repeat</i> ) | 7703-8702                | 69.1       | 175 | 19.4                     | 5.16            | -0.574             |
| 10  | MshE                     | MshE, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK39289) (99/99)  | Proteína citoplasmática, ATPasa, GspE like                                       | 8735-10444               | 66.1       | 569 | 63.2                     | 5.84            | -0.166             |

| ORF |                          | Proteína homóloga <sup>1</sup><br>(número de acceso)<br>(% Identidad/% Similitud) | Función<br>y localización  | Posición<br>nucleotídica | G+C<br>(%) | aa   | PM <sup>2</sup><br>(kDa) | pI <sup>2</sup> | GRAVY <sup>2</sup> |
|-----|--------------------------|---|--|--------------------------|------------|------|--------------------------|-----------------|--------------------|
| n°  | Nombre de la<br>proteína |   |  |                          |            |      |                          |                 |                    |
| 11  | MshG                     | MshG, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK38845) (99/99)               | Proteína de membrana interna de la familia GspF                          | 10498-11720              | 65.1       | 408  | 42                       | 9.77            | -0.277             |
| 12  | MshF                     | Proteína AHA_0394, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK38179) (97/98)  | Proteína periplasmática, función desconocida                             | 11831-12296              | 61.4       | 156  | 17.6                     | 5.78            | -0.239             |
| 13  | MshB                     | MshB, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK37751) (99/99)               | Proteína secretada, pseudopilina   | 12370-13039              | 58.9       | 223  | 23.8                     | 5.44            | -0.143             |
| 14  | MshA                     | MshA, <i>A. hydrophila</i> SSU (EKB26033) (97/98)                                 | Proteína secretada, pilina   | 13056-13523              | 50.4       | 155  | 15.9                     | 6.18            | 0.321              |
| 15  | MshC                     | MshC, <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK37037) (96/96)               | Proteína secretada, pseudopilina   | 13600-14094              | 61         | 164  | 17.7                     | 8.46            | 0.186              |
| 16  | MshD                     | MshD, <i>A. caviae</i> ATCC7966 <sup>T</sup> (ABK36597) (96/96)                   | Proteína secretada, pseudopilina   | 14081-14650              | 63.7       | 189  | 20.4                     | 4.69            | -0.158             |
| 17  | MshO                     | MshO, <i>A. caviae</i> (WP_010672631) (85/88)                                     | Proteína secretada, pseudopilina   | 14939-15523              | 63.4       | 195  | 21.3                     | 9               | 0.060              |
| 18  | MshP                     | MshP, <i>A. caviae</i> (WP_010672632) (78/85)                                     | Proteína periplasmática, PilX like                                       | 15678-15977              | 63.8       | 109  | 11.3                     | 4.58            | -0.245             |
| 19  | MshQ                     | MshQ, <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449 (ABO91890) (64/79)     | Proteína de membrana externa, adhesina, PilY1 like, dominio lectina like | 16001-19907              | 59.9       | 1303 | 139.4                    | 6.54            | -0.440             |

<sup>1</sup> Las proteínas homólogas indicadas corresponden a las que presentan mayor identidad y similitud con una función no putativa.

<sup>2</sup> El peso molecular (PM), el punto isoeléctrico (pI) y el promedio de hidrofobicidad de las proteínas (GRAVY) se han calculado usando el programa ProtParam de ExPASy.

#### **3.2.2.4 Unidades transcripcionales independientes de la agrupación *msh* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila***

Para determinar las unidades transcripcionales independientes presentes en la agrupación *msh* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, se realizaron ensayos de RT-PCR entre diferentes genes de la agrupación. Con este fin, se aisló ARN total, libre de ADN, y mediante *random* RT se sintetizó la primera cadena de ADNc para posteriormente, amplificar con cebadores específicos los genes transcritos conjuntamente y determinar las unidades transcripcionales independientes.

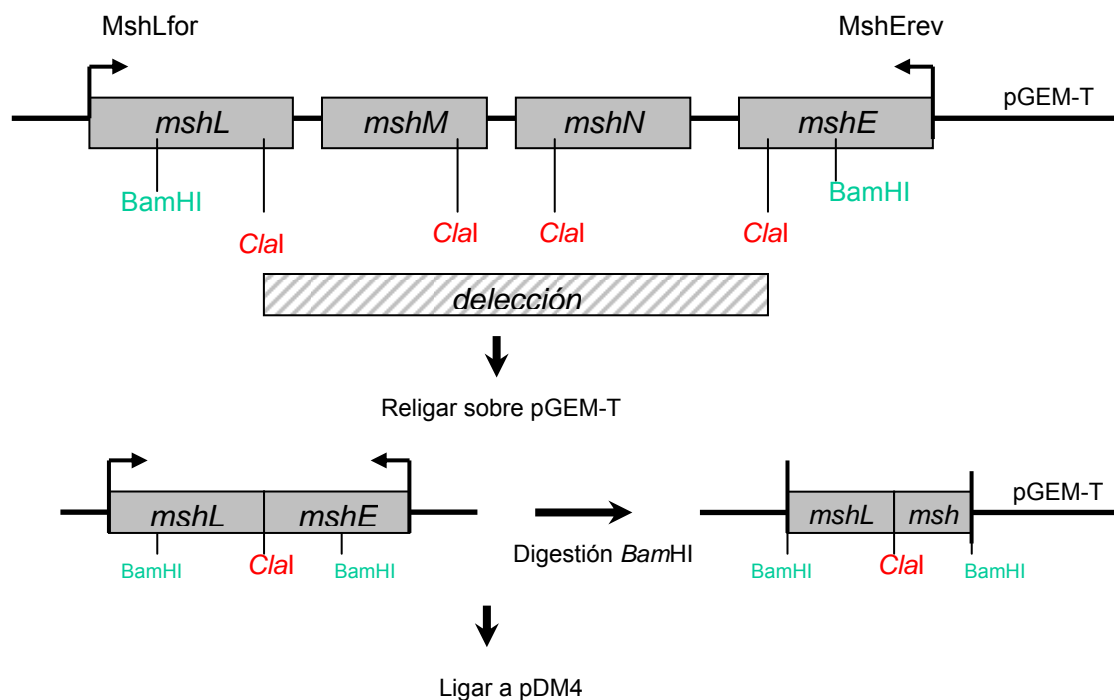
En base a las secuencias promotoras y terminadoras determinadas, se diseñaron cinco parejas de cebadores que englobaban la región *mshI-mshF*: MshIA1for-MshJrev, situados en los genes *mshI* y *mshJ*, respectivamente; MshJfor-MshLrev, situados en los genes *mshJ* y *mshL*, respectivamente; MshLfor2-MshNrev, situados en los genes *mshL* y *mshN*, respectivamente; MshNfor2-MshErev, situados en los genes *mshN* y *mshE*, respectivamente, y por último, la pareja MshEfor-MshGrev, situados en los genes *mshE* y *mshG*, respectivamente. Todas las amplificaciones fueron positivas, confirmando así que los genes *mshI-mshF* se transcriben conjuntamente. Por el contrario, no se obtuvo amplificación entre los genes *mshF* y *mshB* (MshFfor-BamPMshBrev). Para el análisis de la región *mshB-mshQ* se utilizaron dos parejas de cebadores específicos: MshBfor-MshCrev, situados en los genes *mshB* y *mshC* y la pareja MshCfor-MshOrev, situados en los genes *mshC* y *mshO*, respectivamente. Ambas amplificaciones fueron positivas, confirmando así que los genes se transcriben conjuntamente. Finalmente se analizó la región *mshO-mshQ* mediante la amplificación a partir de la pareja de cebadores MshOfor-MshQseq5rev, dando un resultado positivo. Estos resultados indican que la agrupación *msh* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* presenta dos unidades transcripcionales independientes: *mshI-mshF* y *mshB-mshQ*, confirmando así la hipótesis inicial de la presencia de un promotor delante del gen *mshI* y otro, delante de *mshB* (Figura 3.2.2).

#### **3.2.3 Construcción de un mutante carente de los genes *mshL*, *mshM*, *mshN* y *mshE* en las cepas AH-1 y AH-1 $\Delta$ *wbpL***

Con el fin de determinar si las fimbrias observadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en la cepa AH-1 $\Delta$ *wbpL* estaban codificadas por la agrupación *msh*,

se construyó, mediante delección interna manteniendo la pauta de lectura, un mutante carente de cuatro genes de la agrupación: *mshL*, *mshM*, *mshN* y *mshE*.

Para amplificar la región comprendida entre los genes *mshL-E* de la cepa AH-1, se emplearon los cebadores MshLfor y MshErev, obteniéndose un amplímero de 4080 pb. El producto amplificado se ligó al vector de clonaje pGEM-T *easy*, y se transformó a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación, seleccionándose los transformantes en placas de LB suplementadas con ampicilina, X-Gal e IPTG a una temperatura de 37°C. La presencia de inserto en el plásmido recombinante se comprobó mediante PCR utilizando los mismos cebadores con los que se amplificó el fragmento inicial. El plásmido recombinante se digirió con la endonucleasa *Clal*, generándose cuatro fragmentos: tres corresponden a delecciones internas del inserto y el cuarto, de 4529 pb contenía el vector pGEM-T con un fragmento de inserto. El fragmento de 4529 pb se religó y posteriormente, se digirió con la endonucleasa *BamHI*, presente en los genes *mshL* y *mshE*, para la liberación del inserto deleccionado y su posterior clonaje en el vector suicida pDM4, previamente digerido con *BglIII* y defosforilado (Figura 3.2.3).



**Figura 3.2.3** Esquema de la construcción para generar un mutante carente de los genes *mshL*, *mshM*, *mshN* y *mshE*.

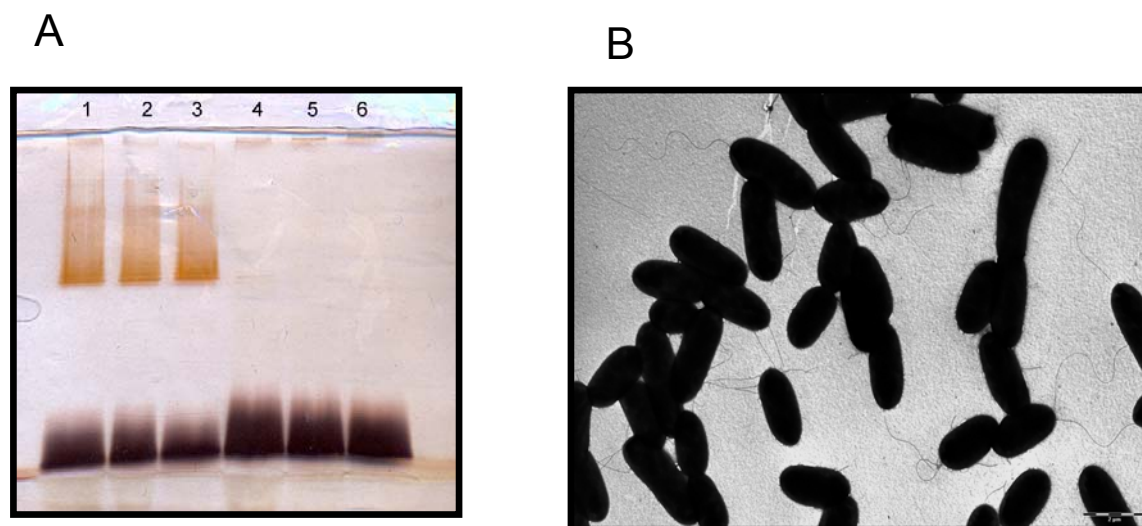
El vector suicida recombinante (pDM4-*mshL-E*) se transformó mediante electroporación en la cepa de *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con cloranfenicol a una temperatura de 30°C, y se comprobaron mediante PCR con cebadores específicos del vector; pDM4for y pDM4rev, los cuales flanquean el lugar de clonaje. Los mutantes AH-1 $\Delta$ *mshL-E* y AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshL-E*, se obtuvieron mediante conjugación triparental, utilizando como receptora la cepa AH-1 o AH-1 $\Delta$ *wbpL*, resistentes a rifampicina; la cepa de *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir) que contenía el vector pDM4-*mshL-E* como dadora y la cepa de *E. coli* HB101 con el vector pRK2073 como facilitadora de la conjugación. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con rifampicina y cloranfenicol.

La inserción del vector en el cromosoma, mediante una primera recombinación, se comprobó mediante PCR con la pareja de oligonucleótidos MshJfor y MshGrev, externos a la zona delecionada. Se seleccionaron aquellos transconjugantes que daban amplificación negativa, verificando así que la primera recombinación había tenido lugar. Seguidamente, se seleccionó un transconjugante de cada una de las cepas a mutar y se hizo crecer en LB suplementado con un 10% de sacarosa a 30°C, para forzar la segunda recombinación del vector, ya que el gen *sacB* presente en el vector pDM4 codifica para un producto tóxico para la bacteria cuando ésta crece en presencia de dicho azúcar. Las colonias obtenidas se analizaron en placas de TSA con y sin cloranfenicol, seleccionándose aquellas que eran sensibles a dicho antibiótico. La sensibilidad al antibiótico indica que se ha producido la segunda recombinación y el plásmido suicida ha sido expulsado, dejando en el cromosoma bacteriano la copia correcta de los genes o la copia delecionada. Para detectar las colonias que presentaban la copia delecionada, se procedió a amplificar dichos genes empleando los cebadores externos MshJfor y MshGrev. Se seleccionaron aquellas colonias cuyo producto amplificado presentaba una longitud inferior (1500 pb) al obtenido en la cepa salvaje AH-1 (4200 pb).

### 3.2.3.1 Caracterización fenotípica de los mutantes AH-1 $\Delta$ *mshL-E* y AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshL-E*

Los mutantes obtenidos se analizaron mediante microscopía óptica y electrónica tras crecer en medio líquido a 30°C. El mutante AH-1 $\Delta$ *mshL-E* presenta un fenotipo idéntico al de la cepa salvaje AH-1, dado que la cepa salvaje no expresa fimbrias al crecer en medio líquido. El mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshL-E* carece de fimbrias al crecer en medio líquido (Figura 3.2.4B) y sus células no forman agregados, a diferencia de lo que ocurre en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*. Estos datos, sugieren que la agrupación *msh* es la responsable de la expresión de las fimbrias presentes en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*. El análisis del perfil electroforético del lipopolisacárido (LPS) de los mutantes obtenidos, mediante SDS-PAGE, mostraba que la mutación *mshL-E* no afecta al antígeno O del LPS (Figura 3.2.4A).

Ensayos de complementación del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshL-E* con el cósmido pLAmshM11.6 transferido mediante conjugación triparental mostraron que el fenotipo del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* era restaurado, volviéndose a expresar las fimbrias Msh.



**Figura 3.2.4** (A) Gel de SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de muestras de LPS de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* (carril 1) y los mutantes: AH-1 $\Delta$ *wbpL* (carril 4), AH-1 $\Delta$ *mshL-E* (carril 2), AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshL-E* (carril 5), AH-1 $\Delta$ *mshA* (carril 3) y AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshA* (carril 6).

Todas las cepas fueron crecidas a 30°C. (B) Imagen de microscopía electrónica de transmisión a partir de crecimiento a 30°C en medio líquido del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshL-E*. Barra = 2  $\mu$ m.

### 3.2.4 Estudio de la pilina mayoritaria MshA

La subunidad de la pilina MshA había sido descrita previamente como la principal subunidad estructural de las fimbrias Msh (Jonson *et al.*, 1994) en *Vibrio* spp. No obstante el papel de las demás pilinas en la biogénesis de las fimbrias Msh no está todavía claro. Habían sido descritas dos hipótesis: a) las fimbrias Msh son un heteropolímero formado por subunidades de las diferentes pilinas, y b) la pilina mayoritaria es MshA y las demás pilinas son necesarias para el ensamblaje del aparato secretor.

Para determinar el papel de la pilina MshA en la formación de estas fimbrias en *A. hydrophila* AH-1, se procedió a construir un mutante en el gen *mshA*.

#### 3.2.4.1 Construcción de un mutante en el gen *mshA* en las cepas AH-1 y AH-1 $\Delta$ *wbpL* mediante doble recombinación

Con objeto de determinar si las fimbrias Msh de *A. hydrophila* AH-1 estaban formadas únicamente por una pilina mayoritaria (MshA) o si se trataban de un heteropolímero, se mutó el gen *mshA* en AH-1 y en AH-1 $\Delta$ *wbpL*. Se realizó una mutagénesis dirigida por doble recombinación de manera que no se alterase la pauta de lectura y se evitase un posible efecto polar en el resto de genes de la agrupación (ver apartado 2.6.15.2 Material y Métodos). A partir de ADN cromosómico de la cepa AH-1 se realizaron dos reacciones de PCR independientes en las que se amplificó: una región en posición 5' del gen *mshA*, así como los primeros nucleótidos del mismo gen (fragmento A-B) y una región en posición 3' del gen *mshA*, así como los últimos nucleótidos de dicho gen (fragmento C-D) con los cebadores descritos en la tabla 2.7 de Material y Métodos. Los amplímeros obtenidos sirvieron de molde para una amplificación con los cebadores A-D. El producto de amplificación obtenido (1344 pb) contenía una copia delecionada del gen *mshA*, que fue digerida con la enzima de restricción *Bgl*II, cuyas dianas habían sido incluidas en los cebadores A y D. El fragmento digerido se ligó al vector suicida pDM4 digerido con *Bgl*III y desfosforilado. El plásmido suicida recombinante se transformó a la cepa *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir) y los transformantes se seleccionaron a 30°C en placas de LB con cloranfenicol. La presencia de inserto en los transformantes se comprobó mediante PCR con cebadores específicos del vector pDM4 que flanquean el lugar de clonaje.



A continuación, la construcción obtenida se transfirió mediante conjugación triparental, a la cepa AH-1 y AH-1 $\Delta$ *wbpL* resistentes a la rifampicina. Los transconjugantes se seleccionaron a 30°C en placas de TSA con rifampicina y cloranfenicol. La primera recombinación en el cromosoma se comprobó mediante PCR con cebadores externos al fragmento A-D (cebadores E y F). Si se ha producido la primera recombinación, el vector suicida se habrá insertado en el gen y por tanto, la región comprendida entre los cebadores E y F será demasiado grande para poder ser amplificada.

Con aquellos transconjugantes que no dan lugar a amplificación se realizó un banco de diluciones que se plaqueó en TSA con sacarosa al 10% y se incubó a 30°C. Las colonias obtenidas se analizaron en placas de LB suplementadas con cloranfenicol, eligiéndose aquellas que eran sensibles al antibiótico. Los candidatos se comprobaron mediante PCR con los cebadores E y F, seleccionándose aquellos en los que la segunda recombinación había dejado en el cromosoma una copia delecionada del gen *mshA*. Para comprobar que en la región delecionada se mantenía la pauta de lectura, se secuenció el producto de la amplificación obtenida con los cebadores E-F en el mutante AH-1 $\Delta$ *mshA* y AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshA*.

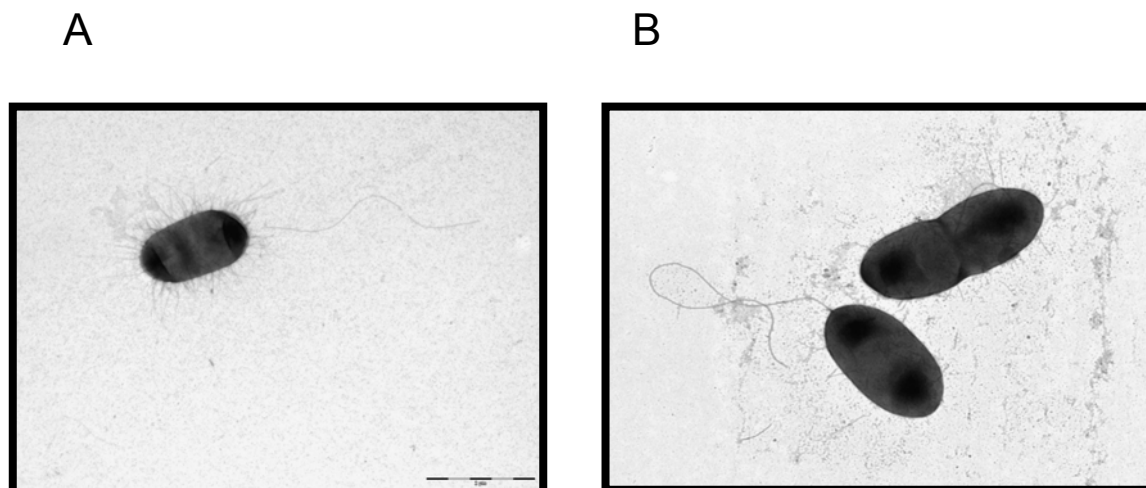
#### **3.2.4.2 Caracterización fenotípica de los mutantes AH-1 $\Delta$ *mshA* y AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshA***

Al igual que ocurría en el mutante AH-1 $\Delta$ *mshL-E*, el mutante AH-1 $\Delta$ *mshA* no expresa fimbrias al crecer en medio líquido, presentando por tanto, un fenotipo idéntico al de la cepa salvaje AH-1.

El análisis, mediante microscopía óptica, del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshA*, mostraba agregación de las bacterias, al igual que sucede en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* y a diferencia de lo observado en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshL-E*. Además, su análisis mediante microscopía electrónica mostraba que aunque sigue ensamblando las fimbrias Msh en su superficie, estas se hallan en menor cantidad y son más cortas que en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*, así como la presencia de pequeños fragmentos de fimbrias libres en el medio (Figura 3.2.5).

Estos datos sugieren que probablemente MshA es la pilina mayoritaria, pero en su ausencia, las otras cuatro pseudopilinas MshB, MshC, MshD y MshO, pueden llegar a formar la estructura aunque con mayor dificultad.

El hecho de observar fragmentos de fimbrias en la preparación, de tal manera que parece se han fragmentado de la célula bacteriana, indica que los pilis formados son inestables y se liberan al exterior.



**Figura 3.2.5** Imagen de microscopía electrónica de transmisión a partir de crecimientos a 30°C en medio líquido del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* (A) y del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshA* (B). Barra = 2  $\mu$ m.

El análisis del perfil electroforético del lipopolisacárido (LPS) de los mutantes obtenidos, mediante SDS-PAGE, mostraba que la mutación *mshA*, al igual que ocurría con la *mshL-E* no afecta al antígeno O del LPS (Figura 3.2.4A). En consecuencia, podemos concluir que las mutaciones en los genes *msh* no tienen ningún efecto sobre el antígeno O.

### 3.2.5 Distribución de la agrupación *msh* en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas

#### 3.2.5.1 Elaboración de sondas

Con el fin de determinar la prevalencia de la agrupación *msh* en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas se elaboraron sondas internas de tres genes: *mshI*, situado al principio de la agrupación; *mshM*, situado en posición central, y *mshQ*, situado en posición final de la agrupación. Para generar la sonda *mshI* se utilizaron los cebadores 0385for-0385rev; MshMfor2-MshMrev2 se emplearon para la sonda *mshM* y MshQfor-MshQrev para la sonda *mshQ*. Los productos de estas amplificaciones generaron fragmentos de 780 pb, 600 pb y 1600 pb, respectivamente. El protocolo

seguido está descrito en el apartado 2.6.14.1 de Material y Métodos y los cebadores utilizados en la Tabla 2.6 de Material y Métodos.

### 3.2.5.2 Hibridación con colonias

Se procedió a la hibridación de cincuenta cepas de *Aeromonas* mesófilas con serotipos diferentes para el antígeno O del lipopolisacárido con cada una de las tres sondas generadas (según describe el apartado 2.6.14.2 de Material y Métodos). Las cepas fueron crecidas a 30°C en medio TSA. También se incluyeron como controles positivos la cepa de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> y AH-1 de *A. hydrophila*, mientras que como control negativo se empleó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Todas las cepas analizadas fueron positivas para las sondas *mshI* y *mshM*, situados en la primera unidad transcripcional. Sin embargo, la sonda *mshQ*, perteneciente a la segunda unidad transcripcional, únicamente hibridó en 39 de las 50 cepas analizadas. Estos resultados ponen de manifiesto que en general la agrupación *msh* está ampliamente distribuida entre las *Aeromonas* mesófilas.

### 3.2.6 Estudio de la cepa A62 de *A. hydrophila* como modelo de expresión constitutiva de fimbrias Msh

Una de las cepas de *A. hydrophila* que dio positivo en la reacción de hibridación para las tres sondas fue la cepa A62, la cual expresa fimbrias de modo constitutivo (Sato *et al.*, 1989).

#### 3.2.6.1 Construcción de un mutante en el gen *mshM* en la cepa A62 de *A. hydrophila*

Con el fin de averiguar si las fimbrias que expresa la cepa A62 en su superficie son las mismas que las inducidas en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*, se procedió a realizar un mutante en el gen *mshM* de A62 mediante recombinación homóloga en un punto. En primer lugar se procedió a amplificar un fragmento interno del gen *mshM* de la cepa A62, empleando los cebadores de la cepa AH-1: MshMfor2-MshMrev2. Esta pareja de cebadores dio lugar a un amplicón de aproximadamente 600 pb en la cepa A62 cuya secuencia mostraba una identidad del 96% con el gen *mshM* de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> y del 93% con el gen *mshM* de *A. salmonicida*.

Para la construcción del mutante, el amplicón obtenido a partir de la cepa A62 se ligó al vector de clonaje pGEM-T *easy*, y se transformó a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante

electroporación, seleccionando los transformantes en placas de LB suplementadas con ampicilina, X-Gal e IPTG a una temperatura de incubación de 37°C. La presencia de inserto se comprobó mediante PCR utilizando los cebadores SP6 y M13 del vector pGEM-T *easy* y posterior secuenciación del plásmido recombinante. El plásmido recombinante se digirió con la endonucleasa *EcoRI*, situada a ambos lados del polilinker del vector pGEM-T *easy*, para la extracción del inserto. Dicho inserto, se ligó al vector suicida resistente a kanamicina, pFS100-Km, digerido con *EcoRI* y defosforilado, transformándose mediante electroporación a la cepa de *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir). Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con kanamicina a una temperatura de 30°C, y la presencia del inserto se comprobó mediante PCR con los cebadores pGPfor y pGPrev del vector pFS100-Km y posterior secuenciación del plásmido recombinante.

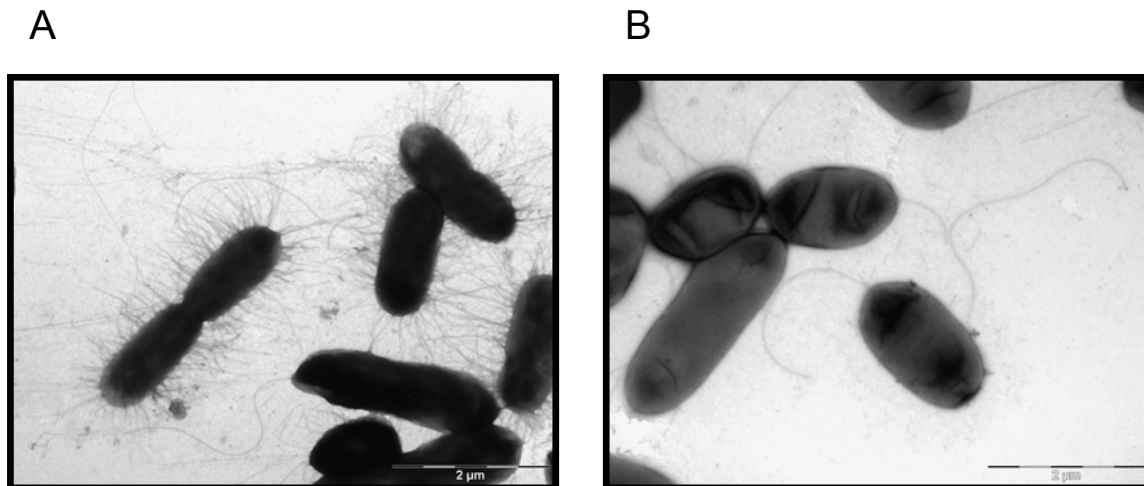
El plásmido suicida recombinante, pFS-A62*mshM*, se introdujo, mediante conjugación triparental, en la cepa salvaje A62 de *A. hydrophila* para la construcción del mutante A62::*mshM*. La conjugación triparental se realizó empleando *E. coli* MC1061 ( $\lambda$ pir) que contenía el vector suicida pFS-A62*mshM*, como cepa donante; la cepa salvaje A62 de *A. hydrophila* resistente a rifampicina, como cepa receptora; y *E. coli* HB101 con el vector pRK2073, como cepa facilitadora de la conjugación. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con rifampicina y kanamicina.

La comprobación de la correcta inserción del vector pFS-A62*mshM* en el gen *mshM* en los transconjugantes seleccionados se comprobó mediante *Southern blot*, empleando ADN genómico digerido con la endonucleasa *EcoRI*, tanto de la cepa salvaje como de los transconjugantes, y una sonda específica para el gen *mshM*. La elección de la diana *EcoRI* obedece a que se halla en el vector pFS100-Km pero no en el gen *mshM*, por lo que genera dos fragmentos diferentes que contienen parte del gen truncado en el material genómico mutado por recombinación en un punto, mientras que en la cepa salvaje tan sólo da lugar a un fragmento que contiene el gen completo.

### **3.2.6.2 Caracterización fenotípica del mutante A62::*mshM***

El análisis mediante microscopía óptica, tras crecer en medio líquido, mostró que ni la cepa parental A62, ni el mutante A62::*mshM* formaban agregados al crecer en medio líquido. Estos resultados, diferían de los observados en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* cuando expresa las fimbrias Msh. El análisis mediante microscopía electrónica de la cepa A62, tras crecer en medio líquido, mostraba que ésta presenta fimbrias alrededor

de toda la superficie bacteriana, así como flagelación polar. Sin embargo, el mutante A62::*mshM* mantenía el flagelo polar pero dejaba de expresar las fimbrias. Estos datos sugieren que las fimbrias observadas en la cepa A62 son del mismo tipo que las inducidas en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*.



**Figura 3.2.6** Imagen de microscopía electrónica de transmisión a partir de crecimientos a 30°C en medio líquido de la cepa A62 (A) y del mutante A62::*mshM* (B). Barra = 2  $\mu$ m.

### 3.2.7 Estudio de la regulación de las fimbrias Msh en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*

#### 3.2.7.1 Análisis de la transcripción de la agrupación *msh* mediante fusiones transcripcionales promotor-*lacZ*

Con objeto de analizar en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* y en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* la transcripción de los transcritos independientes determinados en la agrupación *msh*, se clonaron ante el gen *reporter lacZ*, que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa, cada una de las secuencias promotoras determinadas *in silico* mediante el programa *Softberry* (Marsh and Taylor, 1999; Hadi *et al.*, 2012), que contiene putativos promotores  $\sigma^{70}$ . La fusión transcripcional que contiene el promotor de la agrupación *mshI-F* (*mshI-lacZ*) se obtuvo mediante amplificación de un fragmento de 500 pb en la cepa AH-1, con los cebadores EcoACCA1for/BamMshIrev. Para la construcción de la fusión

transcripcional que contiene el promotor de la agrupación *mshB-Q* (*mshB-lacZ*), se amplificó un fragmento de 350 pb en la cepa AH-1, utilizando los cebadores EcoPMshBfor/BamPMshBrev (ver Tabla 2.4 de Material y Métodos).

Los promotores amplificados se digirieron con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, incluidas en los extremos 5' de los cebadores utilizados, y se ligaron al vector pDN19lac $\Omega$  digerido con las mismas enzimas, asegurando así su correcta orientación. Las construcciones obtenidas se clonaron en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionaron en placas de LB suplementadas con tetraciclina, puesto que es la resistencia que posee el vector pDN19lac $\Omega$ . Los candidatos se comprobaron mediante PCR empleando los cebadores del vector, pDNlacF y pDNlacR, y posterior secuenciación del plásmido.

Las construcciones pDN19lac $\Omega$ -promotor *mshI-F* y pDN19lac $\Omega$ -promotor *mshB-Q*, fueron transferidas a la cepa AH-1 de *A. hydrophila* rifampicina resistente y al mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* mediante conjugación triparental, seleccionando los candidatos en placas de TSA suplementadas con rifampicina y tetraciclina a una temperatura de incubación de 30°C. En paralelo, se transfirió a la cepa AH-1 y al mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*, el vector pDN19lac $\Omega$  sin promotor, para ser empleadas como controles negativos de transcripción del gen *lacZ*.

El análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las fusiones transcripcionales introducidas en la cepa AH-1 y en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* permitió correlacionar la actividad de dicha enzima con el nivel de actividad de los respectivos promotores (ver apartado 2.6.17.2 de Material y Métodos).

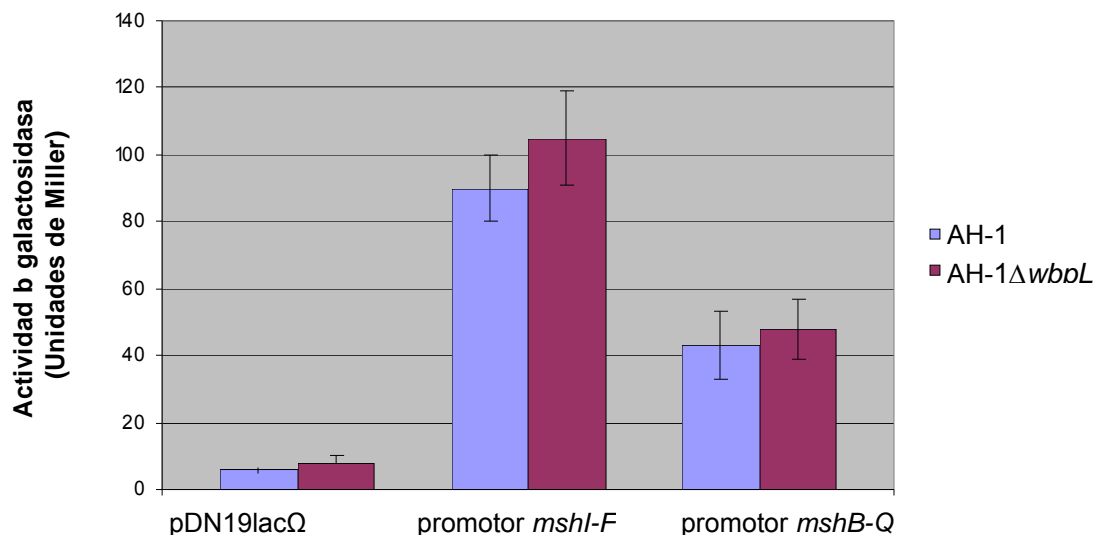
Todas las muestras se analizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa a 30°C tanto de la fusión transcripcional pDN19lac $\Omega$ -promotor *mshI-F*, como de la fusión pDN19lac $\Omega$  -promotor *mshB-Q*, no mostraron diferencias significativas entre la cepa AH-1 y el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*. La expresión basal del plásmido sin promotor presentaba valores no significativos y similares en ambas cepas.

Estos datos indican que ambos promotores están activos en las dos cepas, y que por lo tanto las diferencias fenotípicas observadas (AH-1 no presenta fimbrias mientras que el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* sí las presenta), no son causadas por una regulación transcripcional.

Por otro lado, los datos obtenidos sugieren que el promotor *mshI-F* presenta mayor actividad que el promotor *mshB-Q*, ya que los valores del primero duplican aproximadamente a los del segundo. Este dato corrobora lo que sucede en *Vibrio*

*cholerae* (Marsh and Taylor, 1999) y en *Aeromonas veronii* bv. Sobria (Hadi *et al.*, 2012), donde el promotor *mshI-F* presenta mayor actividad que el promotor *mshB-Q*.



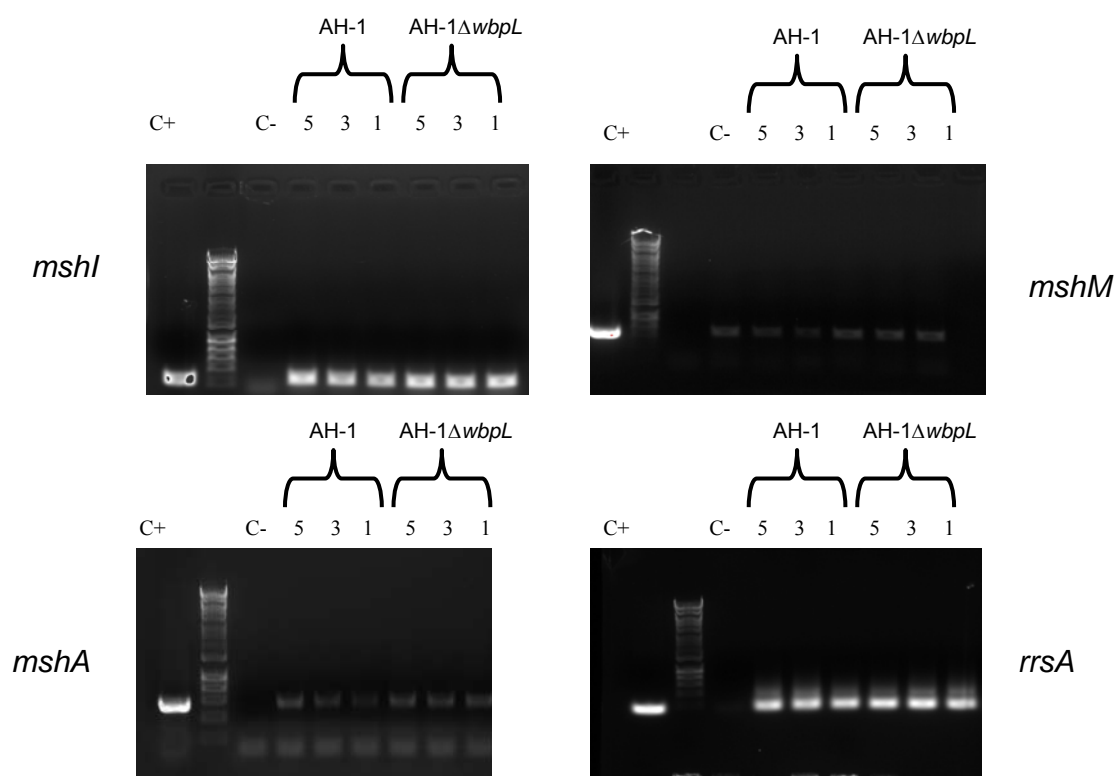
**Figura 3.2.7** Análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los plásmidos pDNlac-promotor *mshI-F* y pDNlac-promotor *mshB-Q* en *A. hydrophila* AH-1 y en el mutante AH-1ΔwbpL crecidos a 30°C. Como control se midió la actividad del plásmido pDN19lacΩ sin promotor. Los datos son la media +/- la desviación estándar de las muestras analizadas por triplicado en tres experimentos independientes.

### 3.2.7.2 Análisis transcripcional de la agrupación *msh* mediante RT-PCR semicuantitativa

Con objeto de determinar si la cantidad de transcritos de las agrupaciones *mshI-F* y *mshB-Q* en la cepa AH-1 y en el mutante AH-1ΔwbpL eran similares o si, a pesar de estar ambos promotores activos, los transcritos se degradaban en la cepa AH-1, se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativa de una región interna al gen *mshI*, una región interna al gen *mshM* y una región interna al gen *mshA*, tanto en la cepa salvaje como en el mutante.

Se aisló ARN total, libre de ADN, de la cepa salvaje (*A. hydrophila* AH-1) y del mutante AH-1ΔwbpL crecidos a 30°C en agitación (ver apartado 2.6.3 de Material y Métodos) y, mediante *random* RT, se sintetizó la primera cadena de ADNc partiendo de diferentes cantidades de ARN: 5, 3 y 1  $\mu$ g.

Las PCR semicuantitativas se llevaron a cabo con los cebadores 0385for/MshIA62rev (200 pb) para amplificar un fragmento interno del gen *mshI*, con los cebadores MshMfor2/MshMrev2 (600 pb) para amplificar un fragmento interno del gen *mshM* y con los cebadores A1MshASmaI/A1MshAHisXbaI (500 pb) para amplificar un fragmento interno del gen *mshA*. Paralelamente, también se realizó un ensayo con cebadores del gen *rrsA* (137 pb), que codifica el ARNr 16S de *A. hydrophila*, como control de los niveles de transcripción (ver apartado 2.6.11.3 de Material y Métodos). El análisis en geles de agarosa de los productos de PCR obtenidos a partir de diferentes cantidades de ARN, no mostró diferencias significativas entre la cepa AH-1 y el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* en relación con los niveles de transcripción de los genes estudiados.



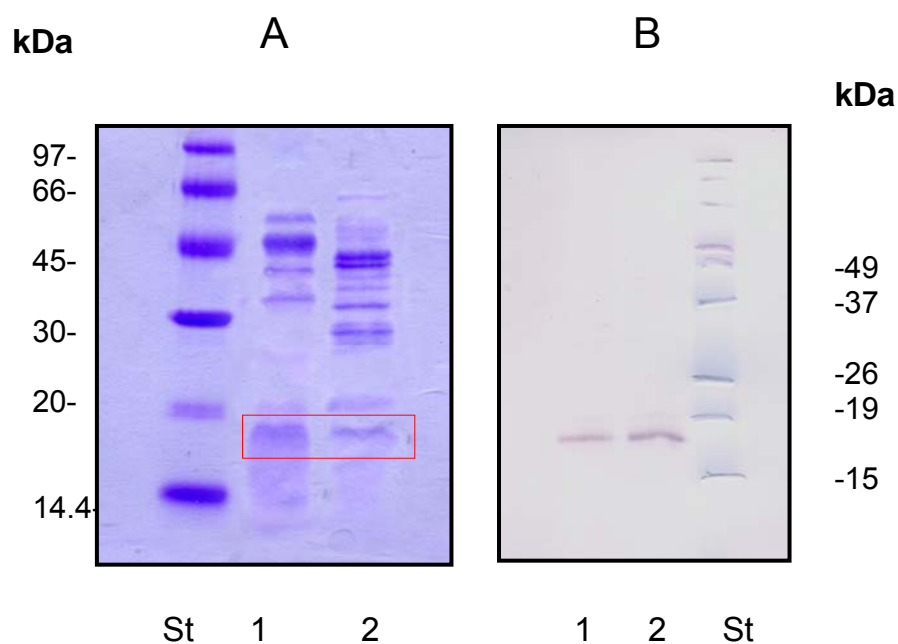
**Figura 3.2.8** RT-PCR semicuantitativa de la región interna de los genes *mshI*, *mshM*, *mshA* y *rrsA* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* y del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* a partir de diferentes cantidades del ARN total: 5, 3 y 1  $\mu$ g, aislado de las cepas crecidas a 30°C. C+: control positivo empleando cromosómico de AH-1. C-: control de la RT-PCR.

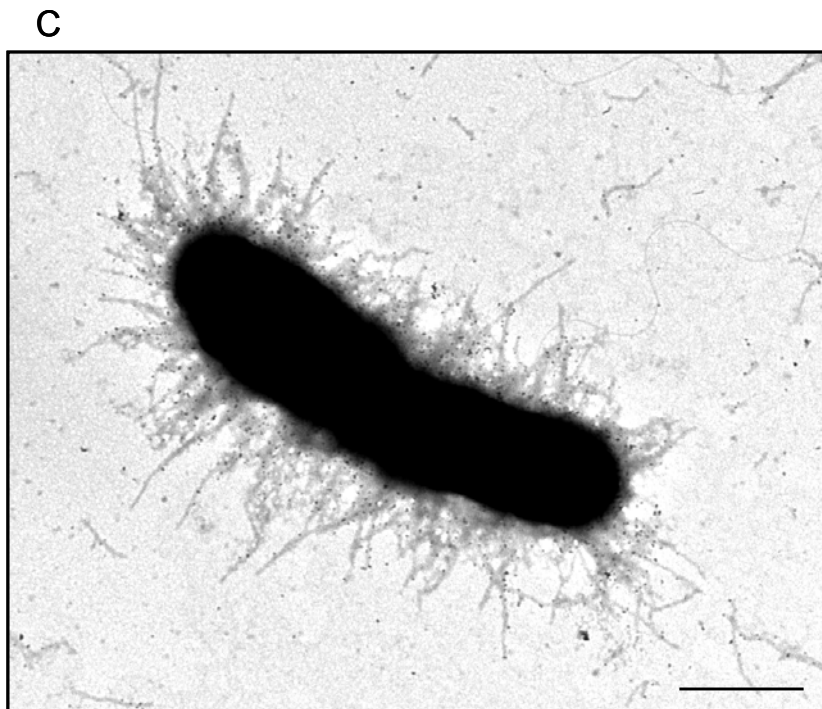


### 3.2.7.3 Análisis de la expresión de las fimbrias Msh en la cepa AH-1

Debido a que no se observaron diferencias significativas en los niveles de transcripción de las agrupaciones *mshI-F* y *mshB-Q* de las cepas AH-1 y AH-1 $\Delta$ *wbpL*, se procedió a detectar si había expresión de fimbrias en la cepa AH-1 mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y *Western blot*, utilizando un anticuerpo “anti-fimbrias A62” cedido por Minoru Sato (Sato *et al.*, 1989). Dado que ya se había demostrado que las fimbrias inducidas en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* y las expresadas en la cepa A62 de forma constitutiva eran del mismo tipo, se esperaba obtener reacción cruzada al emplear dicho anticuerpo en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*.

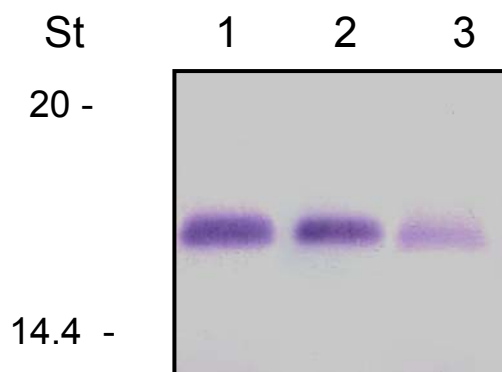
En primer lugar, se purificaron fimbrias de la cepa A62 y del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*, mediante el protocolo descrito en el apartado 2.7.4.2 de Material y Métodos, analizándose posteriormente mediante *Western blot* con el anticuerpo específico para las fimbrias Msh de la cepa A62. Tal y como muestra la figura 3.2.9B, el anticuerpo frente a las fimbrias Msh de A62 presenta reacción cruzada con las fimbrias expresadas en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*. En paralelo, se realizó un marcaje con oro coloidal del anticuerpo anti-fimbrias A62 en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* (ver apartado 2.10.2.2 de Material y Métodos). La microscopía electrónica mostró reconocimiento de las fimbrias de dicho mutante por parte del anticuerpo, mostrándose las esferas de oro coloidal adheridas a la superficie de las fimbrias (Figura 3.2.9C).





**Figura 3.2.9** (A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de fimbrias purificadas de la cepa A62 (carril 1) y del mutante AH-1 $\Delta$ wbpL (carril 2). Las fimbrias se muestran dentro del recuadro rojo. (B) *Western-blot* con anticuerpo anti-fimbrias A62 de fimbrias purificadas de AH-1 $\Delta$ wbpL (carril 1) y A62 (carril 2). (C) Imagen de microscopía electrónica de transmisión de AH-1 $\Delta$ wbpL con anticuerpo anti-fimbrias A62 unido a oro coloidal. Barra = 0.5  $\mu$ m.

Seguidamente, se obtuvieron extractos totales (apartado 2.7.4.1 de Material y Métodos) de las cepas: A62 (control positivo del ensayo), AH-1 y AH-1 $\Delta$ wbpL.



**Figura 3.2.10** *Western-blot* con anticuerpo anti-fimbrias A62 de extractos totales de A62 (carril 1), AH-1 $\Delta$ wbpL (carril 2) y AH-1 (carril 3).

Los resultados mostraron que tanto en el extracto total del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* como en el extracto total de la cepa parental AH-1 se detectaban las fimbrias, por lo tanto la ausencia de fimbrias Msh en la superficie de la cepa AH-1 no parece deberse a un problema de traducción proteica.

Con objeto de determinar si la pilina mayoritaria de las fimbrias Msh era exportada al exterior en la cepa AH-1, y dado que disponíamos de una baja cantidad de anticuerpo, realizamos la fusión transduccional de una cola de seis histidinas con el extremo carboxi-terminal de la pilina MshA de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*. Esta construcción nos permitiría detectar la pilina mayoritaria de estas fimbrias (MshA) empleando anticuerpos comerciales frente a histidinas.

#### **3.2.7.4 Construcción de la fusión transduccional de la pilina MshA de la cepa AH-1 con una cola de histidinas**

Se diseñaron cebadores específicos para la amplificación del gen *mshA*, A1MshA-SmaI y A1Msh-His-XbaI (ver Tabla 2.5 del apartado Material y Métodos); éste último cebador contiene en posición 5' el codón de parada del gen seguido de una cola de seis histidinas. El empleo de esta pareja de cebadores y ADN cromosómico de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* dio lugar a la obtención de un amplicón de 500 pb mediante PCR. El amplicón obtenido se digirió con las endonucleasas *SmaI* y *XbaI*, cuyas dianas se hallaban contenidas en los cebadores, y se ligó al vector de expresión pBAD33-Gm digerido con las mismas enzimas, con objeto de asegurar la correcta orientación del gen bajo el control del promotor de arabinosa del vector. Dicha construcción se electroporó a la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* y se seleccionaron los transformantes a 37°C en placas de LB suplementadas con gentamicina, los cuales fueron confirmados mediante PCR con cebadores específicos del vector (pBAD-F y pBAD-R), que también se utilizaron para secuenciar el plásmido y verificar la orientación del inserto.

Una vez obtenida la construcción, ésta se transfirió a la cepa AH-1 de *A. hydrophila* y al mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* mediante conjugación triparental. Los transconjugantes fueron seleccionados a 30°C en placas de TSA con gentamicina y rifampicina y se comprobaron mediante PCR.

### 3.2.7.5 Análisis de la secreción y ensamblaje de las fimbrias Msh en la cepa AH-1

Las cepas AH-1 y AH-1 $\Delta wbpL$  que contenían el vector pBAD33-Gm con la pilina MshA fusionada a una cola de histidinas (pBAD-MshA-His) se hicieron crecer en TSB con un 0.2% de arabinosa a 30°C para inducir el promotor del pBAD y de esta manera sobreexpresar el gen *mshA*.

Para analizar la ausencia de fimbrias Msh en la superficie de la cepa AH-1, a pesar de existir transcripción de los genes implicados en biosíntesis, se procedió a detectar la pilina MshA en diferentes fracciones celulares, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y *Western blot* utilizando un anticuerpo comercial frente histidinas. Paralelamente al *Western blot* se analizaron las muestras mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie (ver apartado 2.7.2 de Material y Métodos) para estudiar el perfil de proteínas.

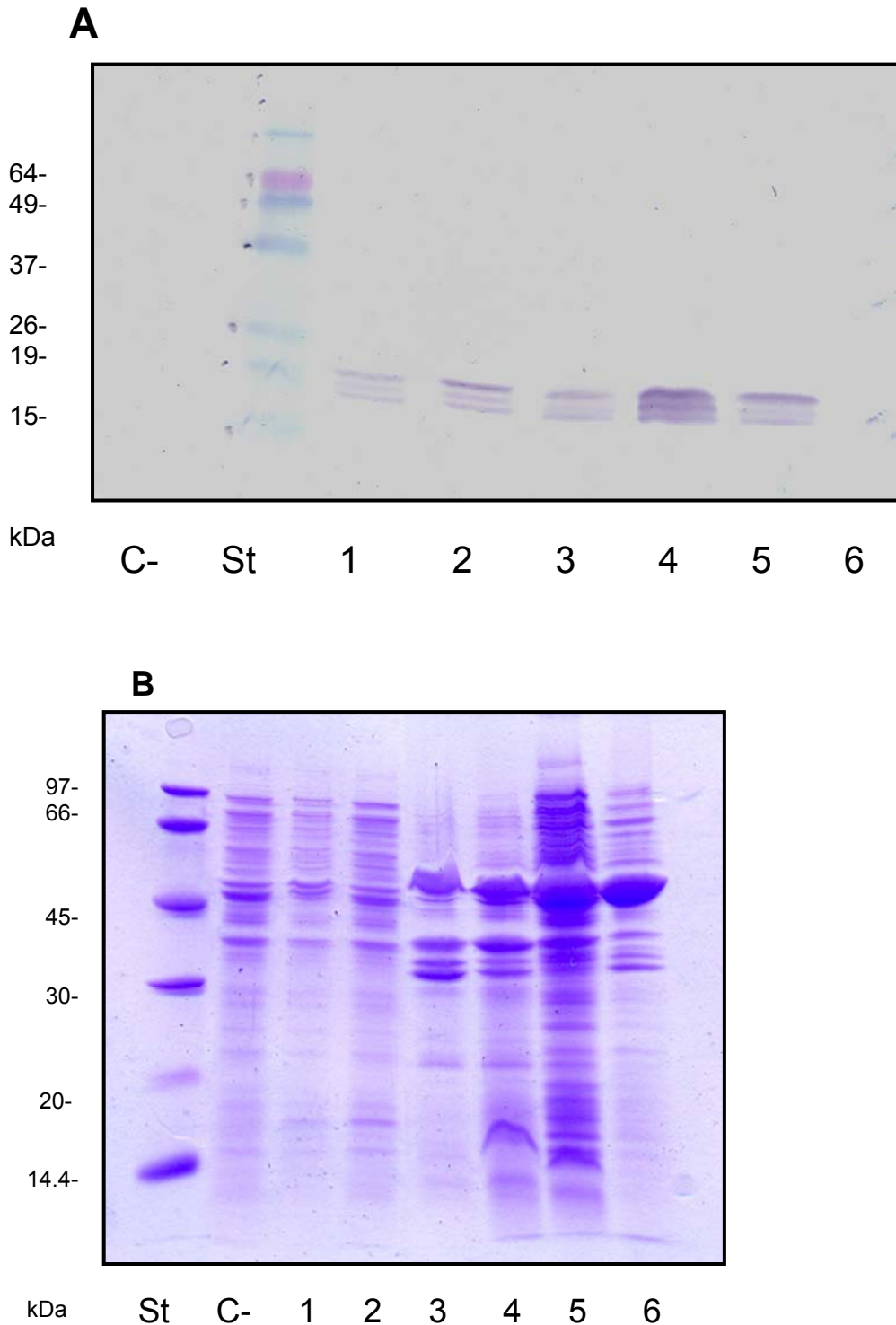
Con este fin se obtuvieron extractos de proteína celular total, pilis purificados, y sobrenadantes concentrados. Todo ello se llevó a cabo mediante los protocolos descritos en el apartado 2.7.4 de Material y Métodos.

Estos ensayos mostraron que la pilina MshA se detectaba en los extractos totales de ambas cepas con la construcción inducida, pero no en el control negativo correspondiente a AH-1 $\Delta wbpL$  sin la construcción. En los carriles correspondientes a los pilis purificados se observa detección de la pilina en ambas cepas, aunque es mucho mayor en AH-1 $\Delta wbpL$ +pBAD-MshA-His, dato que sugiere que la pilina fusionada con cola de histidinas en posición carboxi-terminal es capaz de ensamblarse como la pilina salvaje. En AH-1+pBAD-MshA-His detectamos la pilina en la fracción correspondiente a los pilis purificados, que puede corresponder al 0.1% de células fimbriadas que se observan en la AH-1 salvaje. Además, cabe destacar que la fracción pili procede de un mayor número de células que la fracción correspondiente al extracto celular, debido a que se encuentra concentrada.

Cabe destacar que en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, la inducción de la expresión de la pilina fusionada no provoca cambio en su fenotipo relacionado con la presencia de fimbrias, ya que se su análisis mediante microscopía electrónica muestra el mismo aspecto que la cepa AH-1 sin la construcción.

La diferencia principal se observa en la fracción correspondiente a los sobrenadantes concentrados, ya que en la cepa AH-1 se detecta una importante cantidad de pilina MshA, no detectándose dicha pilina en el sobrenadante del mutante AH-1 $\Delta wbpL$  que

contiene la misma construcción. Este dato sugiere que los monómeros de pilina son inestables o no ensamblan adecuadamente en la cepa AH-1, siendo liberados al exterior de la célula.

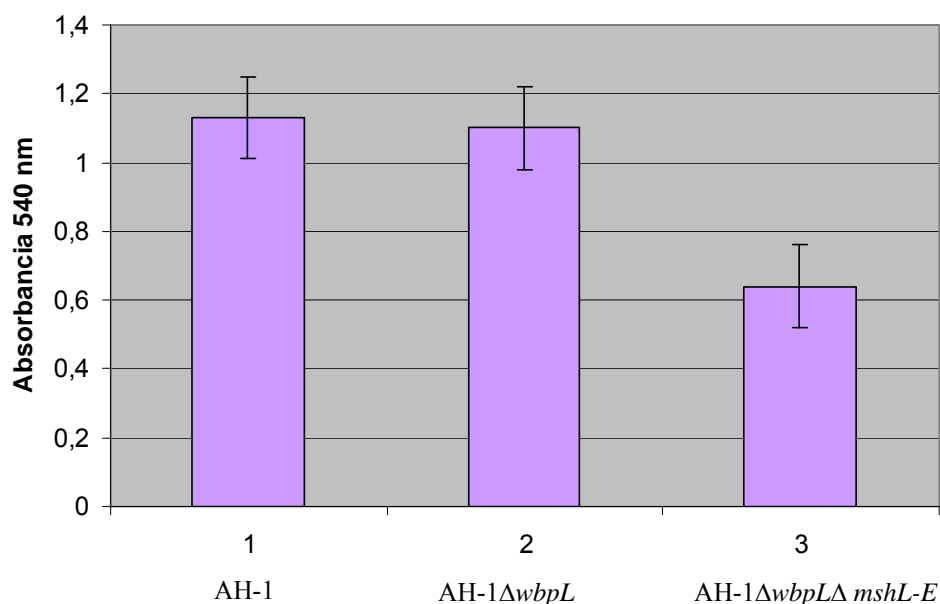


**Figura 3.2.11** (A) *Western-blot* con anticuerpo anti-Histidina de diferentes fracciones celulares y (B) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de diferentes fracciones celulares. C-, extracto total de AH-1 $\Delta$ wbpL; carril 1, extracto total de AH-1+pBAD-MshA-His; carril 2, extracto total de AH-

1 $\Delta wbpL$ +pBAD-MshA-His; carril 3, pilis purificados de AH-1+pBAD-MshA-His; carril 4, pilis purificados de AH-1 $\Delta wbpL$ +pBAD-MshA-His; carril 5, sobrenadante concentrado de AH-1+pBAD-MshA-His; carril 6, sobrenadante concentrado de AH-1 $\Delta wbpL$ +pBAD-MshA-His.

### 3.2.8 Ensayo de biofilms

Con objeto de analizar si las fimbrias Msh juegan algún papel en la formación de biofilms se realizó un ensayo en placas multipocillo de poliestireno tal y como se describe en el apartado 2.12 de Material y Métodos. La evaluación de la capacidad de formación de biofilms de la cepa salvaje (AH-1 de *A. hydrophila*) y los mutantes AH-1 $\Delta wbpL$  y AH-1 $\Delta wbpL\Delta mshL-E$  se realizó tras incubar las cepas durante 24 horas a una temperatura de 30°C.



**Figura 3.2.12** Biofilm producido en placa de 96 pocillos de poliestireno tras incubarse durante 24 horas a 30°C. Los valores corresponden a la media de tres réplicas +/- la desviación estándar.

Los datos obtenidos muestran que la cepa parental AH-1 y el mutante AH-1 $\Delta wbpL$  tienen una capacidad similar para la formación de biofilms, pese a que el mutante carece de antígeno O y de lámina S, dos estructuras superficiales que tienen gran implicación en adherencia a superficie y formación de biofilms. Esto nos indica que las fimbrias Msh, presentes en AH-1 $\Delta wbpL$  pero no en AH-1, podrían estar compensando la falta de antígeno O y lámina S.

Si comparamos los mutantes AH-1 $\Delta$ *wbpL* y AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshL-E* podemos concluir que las fimbrias son un elemento crucial en la formación de biofilms, ya que al mutarlas se observa una reducción de prácticamente la mitad en el valor de absorbancia.

## 4. DISCUSIÓN





#### 4.1 GLICOSILACIÓN DEL FLAGELO DE LA CEPA AH-1 DE *AEROMONAS HYDROPHILA*

La cepa AH-1 de *A. hydrophila* posee un antígeno O del lipopolisacárido (LPS) de serogrupo O:11, constituido por L-Ramnosa y D-N-acetilglucosamina. Cepas con este serotipo para el antígeno O del LPS se han asociado con la producción de gastroenteritis y septicemia en diversos estudios clínicos (Kokka *et al.*, 1991).

La mutación de los genes de biosíntesis del antígeno O:11 *wbpL* y *wbgZ*, da lugar a la pérdida del antígeno O del LPS, así como a una importante agregación de las células al crecer en medio líquido, que se correlaciona con la expresión de fimbrias de tipo Msh. Además, aunque las bacterias continúan siendo motiles en medio líquido, las flagelinas polares muestran un peso molecular inferior a las de la cepa salvaje AH-1. Este dato sugería que las flagelinas polares de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* podían hallarse glicosiladas, al igual que ocurre en la cepa de *A. hydrophila* AH-3 (Wilhelms *et al.*, 2012). La purificación y análisis de las flagelinas polares de la cepa AH-1 mediante LC-MS mostró que se hallaban modificadas con más de 3 kDa de glicanos, detectándose un glicano de 403 Da y un glicano o cadena de glicanos de 1060 Da. El patrón de fragmentación del glicano de 403 Da es similar al descrito para el ácido pseudamínico, azúcar que modifica las flagelinas polares de *Aeromonas caviae* (Schirm *et al.*, 2005) y que forma parte del heptasacárido que modifica las flagelinas polares de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* (Wilhelms *et al.*, 2012). Además, en las flagelinas purificadas de la cepa AH-1 se detectó la presencia de ramnosa, azúcar que forma parte del antígeno O del LPS. Por el contrario, el análisis de las flagelinas laterales, purificadas a partir de crecimientos en medio sólido del mutante carente de flagelo polar AH-1 $\Delta$ *flaB-J*, mostró que no presentaban modificaciones post-traduccionales con glicanos, a diferencia de lo que sucede en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, cuya flagelina lateral LafA se encuentra O-glicosilada con un derivado del ácido pseudamínico de 376 Da (Wilhelms *et al.*, 2012).

El análisis de las flagelinas polares de los mutantes AH-1 $\Delta$ *wbpL* y AH-1 $\Delta$ *rmlB*, mediante LC-MS, mostró que únicamente se hallaban modificadas con el glicano de 403 Da, no observándose el glicano de 1060 Da. Estos datos parecen indicar que el glicano de 1060 Da no es crucial para el ensamblaje del flagelo en la cepa AH-1. Por otro lado, dado que *wbpL* codifica para una glicosiltransferasa implicada en la

transferencia del primer azúcar de la cadena de antígeno O:11 al lípido transportador undecaprenol fosfato (Und-P) y que *rmlB* codifica para un enzima implicado en la biosíntesis de ramnosa (azúcar que forma parte del antígeno O:11), el glicano de 1060 Da, presente en las flagelinas polares de la cepa salvaje AH-1 y ausente en estos mutantes, parece hallarse relacionado con azúcares implicados en la biosíntesis del antígeno O:11.

Se han descrito diferentes relaciones entre el LPS y el flagelo. En algunas bacterias como *Rhizobium leguminosarum* (Vanderlinde *et al.*, 2009) o *Campylobacter jejuni* (Holden *et al.*, 2012), mutaciones en genes implicados en la biosíntesis del LPS dan lugar a la pérdida de flagelo. En mutantes del núcleo del LPS de tipo R (*Rough*) de *E. coli* se ha descrito una pérdida de flagelo así como un incremento en la producción de biofilms (Nakao *et al.*, 2012). En *Campylobacter jejuni* se ha descrito que la mutación del gen que codifica para la fosfoetanolamina transferasa (pEtN) afecta tanto al LPS como al flagelo, ya que la fosfoetanolamina modifica al lípido A del LPS y a la proteína del flagelo FlgG (Cullen and Trent, 2010). En *Pseudomonas aeruginosa*, la mutación del gen *rmlC* afecta al LPS y al peso molecular de la flagelina (Lindhout *et al.*, 2009), al igual que ocurre en los mutantes AH-1 $\Delta$ *wbpL* y AH-1 $\Delta$ *rmlB* de *A. hydrophila*. Finalmente, cabe destacar el caso de *Proteus mirabilis*, en que los mutantes defectivos en el gen que codifica para la ligasa del antígeno O (*waaL*) son incapaces de diferenciarse en células capaces de presentar *swarming* (Morgenstein *et al.*, 2010).

Los datos obtenidos sugieren que en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, el glicano de 1060 Da y el antígeno O:11 se hallan relacionados, a diferencia de lo que sucede en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, en la que el heptasacárido que modifica a las flagelinas polares no está relacionado con el antígeno O:34 de su LPS, constituido por repeticiones de un tetrasacárido compuesto por D-manosa, D-GalNAc y 6-deoxitalosa (Knirel *et al.*, 2002). En la cepa Sch3N de *A. caviae*, se ha descrito que el ácido pseudamínico se encuentra tanto en el antígeno O del LPS como modificando ambas flagelinas polares (Tabei *et al.*, 2009).

Con objeto de analizar los genes implicados en la biosíntesis del glicano de 403 Da cuyo patrón de fragmentación es similar al del ácido pseudamínico, se diseñaron cebadores a partir de alineamiento de genes de diferentes cepas de *Aeromonas* implicados en la biosíntesis de ácido pseudamínico. Estos cebadores permitieron amplificar en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* una región cromosómica que contiene los

genes *neuB-flmD* y los genes *flmAB*. Al igual que sucede en la cepa AH-3 de *A. hydrophila* (Canals *et al.*, 2006), la agrupación *neu-flm* se localiza adyacente a la región 2 del flagelo polar. Sin embargo, en *A. caviae* Sch3N, dichos genes se localizan adyacentes a genes implicados en la biosíntesis del antígeno O del LPS (Tabei *et al.*, 2009).

En la cepa AH-1, a diferencia de lo que sucede en las cepas AH-3 y ATCC7966<sup>T</sup> de *A. hydrophila*, se encuentran diversos genes que codifican proteínas con función metiltransferasa/acetiltransferasa, posiblemente implicados en las modificaciones presentes en el ácido pseudamínico que modifica las flagelinas polares. Otra diferencia es que en la cepa AH-1, a diferencia de lo que sucede en las cepas AH-3 y ATCC7966<sup>T</sup> de *A. hydrophila*, no se encuentran los genes *neuA* ni *flmH*.

Por último, cabe destacar que los genes *flmAB*, tanto en la cepa AH-3 como en la cepa ATCC7966<sup>T</sup> de *A. hydrophila*, se hallan en una región cromosómica diferente a la agrupación *neu-flm*, separados por kilobases en las que se codifican diferentes glicosiltransferasas. Sin embargo, en la cepa AH-1, los genes *flmAB* se hallan prácticamente contiguos a los genes *neuB-flmD*, separados únicamente por tres pautas abiertas de lectura que codifican para una aminotransferasa, una glicosiltransferasa y una aldo-ceto reductasa, respectivamente.

La proteína NeuB, PseI en *Campylobacter jejuni*, es una sintasa del ácido pseudamínico mientras que la proteína FlmA, PseB en *C. jejuni*, tiene función deshidratasa y cataliza la primera reacción enzimática de la síntesis de CMP-pseudamínico (ácido pseudamínico activado) a partir de su precursor activo, la UDP-GlcNAc (Liu y Tanner, 2006).

La mutación de los genes *pseB (flmA)* y *pseI (neuB)* de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, da lugar a la pérdida del flagelo polar, pero no afecta ni a los flagelos laterales ni al perfil de LPS de la cepa. Esto es debido a que los flagelos laterales de la cepa AH-1 no se hallan glicosilados, y el LPS del antígeno O:11 no contiene ácido pseudamínico. Por el contrario, la mutación de sus ortólogos (*pseB, pseI*) en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, produce la pérdida completa de ambos tipos de flagelos (polar y lateral), no observándose ningún efecto en el perfil del LPS (Canals *et al.*, 2006; Wilhelms *et al.*, 2012). En la cepa Sch3N de *A. caviae*, la mutación de estos genes no solo produce la pérdida de flagelo polar sino que también da lugar a la ausencia del antígeno O del LPS (Tabei *et al.*, 2009), dado que éste presenta ácido pseudamínico.

El hecho de que mutaciones en genes implicados en la síntesis del ácido pseudamínico en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* produzca la pérdida del flagelo polar, muestra que la modificación de la flagelina polar con ácido pseudamínico es un requisito esencial para la correcta exportación de la flagelina y posterior ensamblaje. Sin embargo, la ausencia del glicano de 1060 Da no parece afectar ni a la motilidad ni al ensamblaje del flagelo polar.

La ausencia, alteración de la composición de los glicanos o nivel de glicosilación de las flagelinas modificadas provoca alteraciones en el fenotipo de motilidad de diferentes microorganismos. Así, en *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori* la ausencia de glicosilación de las flagelinas da lugar a la pérdida de motilidad a causa del no ensamblaje de las flagelinas (Twine *et al.*, 2009; Thibault *et al.*, 2001; Schirm *et al.*, 2003). En la cepa AH-3 de *A. hydrophila* la mutación de los genes implicados en la biosíntesis de ácido pseudamínico da lugar a la pérdida tanto del flagelo polar como del lateral, causada por la imposibilidad de ensamblarse las flagelinas no modificadas con el derivado de ácido pseudamínico (Wilhelms *et al.*, 2012). Sin embargo, modificaciones en el resto de azúcares que constituyen el heptasacárido que modifica las flagelinas polares de la cepa AH-3 únicamente provocan alteraciones en la estabilidad del flagelo, dando lugar a una motilidad alterada (Merino *et al.*, 2014b). Por el contrario, en *Burkholderia* y *Pseudomonas* la glicosilación de las flagelinas no es un requisito indispensable para el ensamblaje del flagelo (Scott *et al.*, 2011; Taguchi *et al.*, 2008).

Al igual que en las cepas AH-3 y ATCC7966<sup>T</sup> de *A. hydrophila* y Sch3N de *A. caviae*, la cepa AH-1 presenta adyacente al gen estructural de flagelo polar *flaJ* (situado en la región 2 del flagelo polar), el gen *maf-1*. Este gen codifica para una proteína de la familia Maf que engloba glicosiltransferasas responsables de la transferencia de glicanos activos a flagelinas. En *A. caviae* Sch3N se ha descrito la proteína Maf-1 como una pseudaminil transferasa responsable de la transferencia del ácido pseudamínico activo a la flagelina polar (Parker *et al.*, 2012).

La mutación de *maf-1* en la cepa Sch3N y AH-3 da lugar a células inmóviles sin flagelo polar, no hallándose afectados ni los flagelos laterales ni el perfil de LPS. La ausencia de alteraciones en el perfil de LPS se debe a que el antígeno O del LPS de la cepa AH-3 no contiene ácido pseudamínico y en la cepa Sch3N a que el enzima encargado de

transferir el ácido pseudamínico activo al transportador lipídico es Lst y en un siguiente paso, Lsg se encarga de transportar la subunidad formadora del antígeno O a través de la membrana citoplasmática (Tabei *et al.*, 2009). Esto demuestra que en *A. caviae*, la proteína Maf-1 parece tener un rol específico en relación a la movilidad mediante flagelación polar y que no juega ningún papel en la síntesis del ácido pseudamínico ni en la activación de éste. La situación es más compleja en el caso de *A. hydrophila* AH-3, donde se hallan dos putativos genes *maf* adyacentes a la región 2 del flagelo polar (*maf-1* y *maf-2*) y uno más en la región del flagelo lateral (*maf-5*). Se ha descrito que la proteína Maf-5 puede ser la encargada de transferir el ácido pseudamínico a la flagelina lateral (Canals *et al.*, 2006b), dado que mutaciones en este gen resultan en una pérdida de flagelo lateral pero no polar. Por su parte, Maf-2 solo varía el grado de glicosilación de las flagelinas polares y no afecta al ensamblaje de éstas.

En *Campylobacter jejuni* se han descrito siete putativos genes *maf* (Karlyshev *et al.*, 2002) y se ha visto que mutaciones en estos genes cambian el patrón de glicosilación de las flagelinas.

Todos estos resultados sugieren que el número de genes *maf* existentes se correlaciona con la diversidad de azúcares que modifican las flagelinas.

En el caso de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, la mutación de *maf-1* ocasiona la pérdida del flagelo polar pero no se hallan afectados ni los flagelos laterales, ni el perfil del LPS, al igual que sucede en la cepa AH-3 y en *A. caviae* Sch3N. Podemos sugerir que Maf-1 únicamente reconoce al ácido pseudamínico, porque si fuera específico del glicano que modifica la flagelina polar (ácido pseudamínico + glicano de 1060 Da), entonces los mutantes AH-1 $\Delta$ *wbpL* y AH-1 $\Delta$ *rmIB*, carentes del glicano de 1060 Da, no serían reconocidos por Maf-1. Sin embargo, estos mutantes presentan ácido pseudamínico en sus flagelinas polares, lo que sugiere la presencia de otra proteína específica para la transferencia de este glicano de 1060 Da.

## **4.2 ESTUDIO DE LAS FIMBRIAS MSH DE *AEROMONAS HYDROPHILA***

La mutación de determinados genes implicados en la biosíntesis del antígeno O:11 (*wbpL*, *wbgZ*), así como genes implicados en la biosíntesis de ácido pseudamínico (*pseB*, *pseI*) o en la transferencia de este azúcar a la flagelina polar (*maf-1*) de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, da lugar a la expresión de abundantes fimbrias al crecer en

medio líquido. El análisis del genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> y de *A. salmonicida* A449 mostró seis agrupaciones que contienen genes implicados en la biosíntesis de pilis/fimbrias en la cepa ATCC7966<sup>T</sup> y tres agrupaciones en la cepa A449. La elaboración de una sonda del gen *mshM* de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> permitió su detección en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*. Además, los cebadores diseñados para la construcción de la sonda permitieron obtener un amplímero de 919 pb en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* cuya secuencia presenta una identidad del 99% con el gen *mshM* de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup> y del 93% con el gen *mshM* de *A. salmonicida*. La mutación del gen *mshM* en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* (AH-1 $\Delta$ *wbpL*::*mshM*) provoca la reversión al fenotipo salvaje y por tanto, anula la expresión de fimbrias observadas en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*. Este hecho sugiere que las fimbrias expresadas en mutantes para determinados genes implicados en la biosíntesis del antígeno O:11, la biosíntesis de ácido pseudamínico (*pseB*, *pseI*) o en la transferencia de este azúcar a la flagelina polar, son de tipo Msh.

El análisis de la librería genómica de la cepa AH-1 con una sonda específica para el gen *mshM* permitió la detección de un clon positivo. La secuenciación de dicho clon mostró 20 pautas de lectura abierta, 18 de las cuales presentan elevada similitud con proteínas implicadas en la formación de las fimbrias sensibles a manosa de tipo IV (MSHA) previamente descritas en *V. cholerae* El Tor (Marsh and Taylor, 1999). Dicha agrupación génica se halla en cepas de *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella*, así como en la cepa ATCC7966<sup>T</sup> de *A. hydrophila* (Li Y *et al.*, 2011), en *A. veronii* B565 (Seshadri *et al.*, 2006) y en *A. salmonicida* A449 (Reith *et al.*, 2008), si bien esta última presenta una delección entre los genes *mshN* y *mshD* (Boyd *et al.*, 2008). La agrupación *msh* de *A. hydrophila* AH-1 contiene cinco genes que codifican para pilinas/pseudopilinas (MshB, MshA, MshC, MshD y MshO) y trece genes que codifican para proteínas relacionadas con la biogénesis de las fimbrias Msh. Tal y como sucede en otras cepas de *Aeromonas* y *Shewanella*, se hallan dos genes *mshI*: *mshI* y *mshII*, que codifican proteínas equivalentes a los dominios N-terminal y C-terminal, respectivamente, de la proteína MshI descrita en especies de *Vibrio* y *Photobacterium* (Hadi *et al.*, 2012).

Se han detectado secuencias invertidas y repetidas (TGGGCA) en la región 5' del gen *mshI* y en la región 3' del gen *mshQ*, al igual que sucede en *Vibrio* (TAGAGAA) y en la cepa ATCC7966<sup>T</sup> de *A. hydrophila* (TGGGCA). El hecho de hallar un ortólogo del gen *mshH* (primer gen de la agrupación) y un ortólogo del gen *mreB* (último de la

agrupación) adyacentes en especies de bacterias entéricas que no poseen las fimbrias Msh, como *Serratia*, *Enterobacter* y *Yersinia*, sumado a la presencia de secuencias invertidas y repetidas que flanquean los genes *mshI* y *mshQ*, sugiere que la agrupación *msh* se ha deleccionado en bacterias entéricas o que bien, en las bacterias que poseen dicha agrupación, ésta se ha insertado entre los genes *mshH* y *mreB* a partir de un ancestro común que sí poseía dicha agrupación.

Estudios previos habían puesto de manifiesto que la agrupación *msh* se encuentra ampliamente distribuida entre diversas cepas de *Aeromonas* mesófilas (*A. hydrophila*, *A. veronii* bv. Sobria y *A. caviae*); sin embargo no se observó hibridación con *Aeromonas* psicrófilas (Hadi *et al.*, 2012). Este dato concuerda con el hecho de que la sonda utilizada se encuentra en la zona comprendida entre los genes *mshN* y *mshD*, que se encuentra deleccionada en *A. salmonicida* (Boyd *et al.*, 2008).

Con el fin de determinar la prevalencia de la agrupación *msh* en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas que disponía nuestro laboratorio se elaboraron tres sondas internas a los genes *mshI*, *mshM* y *mshQ*. Las cincuenta cepas de *Aeromonas* mesófilas analizadas fueron positivas para las sondas de los genes *mshI* y *mshM*, situados en la primera unidad transcripcional. Sin embargo, la sonda *mshQ*, perteneciente a la segunda unidad transcripcional, únicamente hibridó en 39 de las 50 cepas analizadas.

Estos resultados ponen de manifiesto que la agrupación *msh* está ampliamente distribuida entre las *Aeromonas* mesófilas. No obstante, debido a los pocos resultados negativos para la hibridación del gen *mshQ*, podemos decir o bien que este gen presenta una mayor variabilidad a nivel nucleotídico, cosa que dificulta la reacción de hibridación, o bien que se encuentra parcialmente o totalmente deleccionado en las cepas analizadas, como sucede entre los genes *mshN-mshD* de la agrupación en la cepa *A. salmonicida* A449 (Boyd *et al.*, 2008).

Una de las cepas que dio positivo en los ensayos de hibridación fue la cepa A62 de *A. hydrophila*, la cual presenta fimbrias de manera constitutiva pero no da lugar a la formación de agregados celulares. Con el fin de averiguar si las fimbrias que expresa la cepa A62 son las mismas que las inducidas en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*, se construyó un mutante en el gen *mshM*. La caracterización fenotípica del mutante A62::*mshM* puso de manifiesto que dejaba de expresar las fimbrias sugiriendo así que las fimbrias observadas en la cepa A62 son del mismo tipo que las inducidas en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*. Otro dato que confirma esto es el hecho de que anticuerpos anti-fimbrias A62



marcados con oro coloidal eran capaces de reconocer las fimbrias expresadas en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* mediante microscopía electrónica de transmisión.

De estos resultados podemos inferir que los mecanismos que regulan la expresión de las fimbrias Msh en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas son distintos, ya que en algunas cepas se expresan de manera constitutiva (como es el caso de la cepa A62 de *A. hydrophila* o *A. veronii* bv. Sobria) y en otras, su expresión se induce o incrementa ante determinadas señales, como sucede en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*.

Estudios previos en *Vibrio cholerae* han mostrado la alternancia entre dos sistemas antagonistas de fimbrias de tipo IV que la bacteria regula mediante factores de transcripción: las fimbrias TCP (*toxin co-regulated pilus*), descritas como un factor de colonización de la mucosa intestinal y las fimbrias MSHA, descritas como un factor de anticolonización ya que se unen a las inmunoglobulinas A del huésped provocando la eliminación de la bacteria de la mucosa intestinal (Hsiao *et al.*, 2009). Esta alternancia también ha sido descrita en *Vibrio parahaemolyticus*, que dispone de las fimbrias ChiRP (*chitin-regulated pilus*) y MSHA; en este caso ambas contribuyen a la formación de biofilms pero en diferentes etapas del proceso (Shime-Hattori *et al.*, 2006).

El hecho de que la cepa A62 no forme agregados celulares al crecer en medio líquido y los mutantes de la cepa AH-1 que expresan las fimbrias Msh si los forman sugiere que el fenotipo de agregación podría deberse a diferencias post-transcripcionales en las fimbrias expresadas por una u otra cepa o bien, no ser causado exclusivamente por la expresión de dichas fimbrias, sino por participación de otras estructuras de la superficie bacteriana. Así, en los mutantes de la cepa AH-1 carentes de antígeno O:11 (AH-1 $\Delta$ *wbpL* o AH-1 $\Delta$ *wbgZ*) el fenotipo de agregación podría deberse a la ausencia del glicano de 1060 Da que modifica las flagelinas polares de la cepa salvaje AH-1 o a la ausencia del antígeno O:11 y la consiguiente imposibilidad de ensamblar la lámina S en la superficie de estos mutante. El fenotipo de autoaglutinación/agregación se ha descrito en bacterias que presentan alteraciones en la composición de los glicanos que modifican sus flagelinas polares. Así, en *Campylobacter* la pérdida de residuos de ácido pseudamínico no afecta a la motilidad del flagelo, pero si a la autoaglutinación, probablemente a causa de la interacción con otros glicanos flagelares de bacterias adyacentes (Guerry *et al.*, 2006; Ewing *et al.*, 2009).

La subunidad de la pilina MshA había sido descrita como la principal subunidad estructural en las fimbrias Msh (Jonson *et al.*, 1994) en *Vibrio* spp. Para determinar si

en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* las fimbrias Msh son un heteropolímero formado por subunidades de las diferentes pilinas, o bien, si la pilina mayoritaria es MshA y las demás son únicamente necesarias para el ensamblaje del aparato secretor, se procedió a construir un mutante en el gen *mshA* en la cepa AH-1 $\Delta$ *wbpL*. El análisis mediante microscopía electrónica puso de manifiesto la presencia de fimbrias en el doble mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshA* aunque en menor cantidad que en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*; así como la presencia de pequeños fragmentos de fimbrias libres en el medio. Estos resultados sugieren que la pilina mayoritaria sea MshA y en su ausencia, las otras pilinas minoritarias pueden llegar a formar la estructura del pili aunque de forma muy inestable. En *A. veronii* bv. Sobria, se ha detectado únicamente la pilina mayoritaria MshA a partir de filamentos de pilina purificados; no obstante estudios en la misma cepa han demostrado que tanto la pilina mayoritaria como las pseudopilinas se requieren para una estructura funcional del pili (Hadi *et al.*, 2012).

El análisis de la secuencia en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* mostró dos posibles secuencias promotoras: una en la región 5' del gen *mshI* y otra, en la región 5' del gen *mshB*. Ensayos de RT-PCR pusieron de manifiesto la presencia de dos unidades transcripcionales independientes: *mshI-mshF* y *mshB-mshQ*, al igual que en la cepa *A. veronii* bv. Sobria (Hadi *et al.*, 2012).

Con objeto de analizar la transcripción de estas unidades transcripcionales independientes en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* y en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*, se realizaron fusiones transcripcionales de cada uno de los promotores con el gen *reporter lacZ*, que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa. El análisis de la actividad de las fusiones transcripcionales introducidas en la cepa AH-1 y en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* permitió correlacionar la actividad de dicha enzima con el nivel de actividad de los respectivos promotores. Los resultados pusieron de manifiesto que ambos promotores están activos en las dos cepas, y que por lo tanto las diferencias fenotípicas observadas entre AH-1 y AH-1 $\Delta$ *wbpL* en cuanto a la presencia de fimbrias no son causadas por una regulación transcripcional. Por otro lado, los datos obtenidos muestran una mayor actividad del promotor *mshI* con respecto al promotor *mshB*, al igual que sucede en *V. cholerae* (Marsh and Taylor, 1999) y en *A. veronii* bv. Sobria (Hadi *et al.*, 2012).

El análisis mediante RT-PCR semicuantitativa de la transcripción de los genes *mshI* y *mshM*, contenidos en la unidad transcripcional *mshI-F*, y del gen *mshA*, contenido en la

unidad transcripcional *mshB-Q*, no mostró diferencias significativas en el nivel de transcripción de estos genes en la cepa AH-1 y el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*, corroborando los datos obtenidos en el estudio de las fusiones transcripcionales de los promotores con el gen *reporter lacZ*.

Dado que no se observaron diferencias en la transcripción de estas agrupaciones en la cepa AH-1 y el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*, se determinó si había traducción proteica en la cepa AH-1. Con este fin se obtuvieron extractos totales de las cepas: A62, AH-1 y AH-1 $\Delta$ *wbpL*, evaluándose la presencia de pilina mediante *Western blot* con anticuerpos específicos para las fimbrias de la cepa A62, los cuales reconocen también las fimbrias presentes en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*. Los resultados obtenidos mostraban presencia de pili en las tres cepas analizadas, sugiriendo que no existía ningún bloqueo de la traducción de los pili Msh en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*.

En *Vibrio cholerae* O1 clásico, se ha descrito que la subunidad de la pilina MshA se expresa, pero los pili no se ensamblan en su superficie, por lo que estas subunidades se encuentran en una localización extracitoplasmática (Chiavelli *et al.*, 2001). Los datos obtenidos hasta el momento sugerían que algo similar podía suceder en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, ya que a pesar de expresar la pilina no presentaba fimbrias en su superficie (únicamente las encontramos en un 0.1% de la población). Con objeto de determinar si la hipótesis era correcta, se clonó, en un vector de expresión, la pilina MshA de la cepa AH-1 fusionada a una cola de seis histidinas en posición carboxi-terminal y dicha construcción se introdujo en la cepa AH-1 y en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*. Tras obtener diferentes fracciones celulares de ambas cepas conteniendo la construcción: extractos de proteína celular total, pilis purificados, y sobrenadantes concentrados, se procedió a detectar la pilina MshA mediante anticuerpos contra histidinas. Los resultados obtenidos mostraban presencia de la pilina MshA fusionada en los extractos de proteína celular total y en los pilis purificados de ambas cepas. El hecho de detectar pilina MshA en la fracción de los pilis en la cepa salvaje AH-1, corresponde al pequeño porcentaje de células que expresan este tipo de pili que posiblemente se haya visto incrementado debido a la inducción con arabinosa de dicha pilina. También cabe destacar que en la muestra de pilis purificados la concentración celular de la que se parte es más elevada en comparación con los extractos totales.

Sin embargo, únicamente se detectó la pilina en la fracción sobrenadante de la cepa salvaje (AH-1), lo que sugería que en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* la pilina con colas de

histidina se ensamblaba dando lugar a los pilis Msh en la superficie de la bacteria y que por el contrario, en la cepa salvaje dicha pilina, a pesar de ser exportada al exterior del microorganismo, no podía ensamblarse y quedaban los monómeros libres en el medio externo. Estos resultados confirman la hipótesis planteada anteriormente y por tanto, al igual que sucede en la cepa de *Vibrio cholerae* O1 clásico, la regulación de la expresión de los pilis Msh en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* se produce a nivel del ensamblaje de los monómeros de la pilina.

En diferentes microorganismos se han relacionado las fimbrias Msh con la formación de biofilms. Así, en *V. cholerae* se ha descrito que las fimbrias MSHA no juegan ningún papel en la colonización de la mucosa intestinal de mamíferos (Tacket *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha mostrado que mutantes en *mshA* son incapaces de formar biofilms (Watnick *et al.*, 1999), sugiriéndose que estas fimbrias se hallan implicadas en los pasos iniciales de formación de biofilm en *V. cholerae*, por lo que tienen un importante papel en la supervivencia y persistencia de dicha especie en el ambiente. Además, en las cepas de *V. cholerae* O1 El Tor y *V. cholerae* O139 se han relacionado con la adherencia al zooplancton (Chiavelli *et al.*, 2001), mediando la unión entre la bacteria y los exoesqueletos de quitina del crustáceo *D. pulex*. En *Vibrio parahaemolyticus* y *Aeromonas veronii* bv. Sobria también se han relacionado las fimbrias Msh con la formación de biofilms (Shime-Hattori *et al.*, 2006; Hadi *et al.*, 2012) y en *Pseudoalteromonas tunicata* se ha descrito que tienen un papel tanto en la unión de la bacteria a superficies abióticas (poliestireno o celulosa) como bióticas, ya que median la unión entre esta bacteria y la superficie de la alga *Ulva australis* (Dalisay *et al.*, 2006). Con el fin de determinar la implicación de la fimbrias Msh de *A. hydrophila* en la formación de biofilms analizamos en placas multipocillo de poliestireno la cepa salvaje AH-1 y los mutantes AH-1 $\Delta$ *wbpL* y AH-1 $\Delta$ *wbpL* $\Delta$ *mshL-E*, este último incapaz de formar las fimbrias Msh. Los resultados obtenidos mostraron que las fimbrias Msh de *A. hydrophila* participan en la formación de biofilms, dado que la mutación de los genes *mshL-E* y en consecuencia la incapacidad para la formación de estas fimbrias, reduce prácticamente a la mitad su capacidad de formar biofilms sobre poliestireno con respecto al mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL*. Por otro lado, la similitud de los valores obtenidos en el mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* y la cepa AH-1, se debe a que aunque la cepa AH-1 apenas expresa las fimbrias Msh en su superficie, presenta tanto antígeno O:11 como lámina-S,

estructuras ausentes en la superficie del mutante AH-1 $\Delta$ *wbpL* e implicadas tanto en procesos de adhesión como de formación de biofilms.

### **4.3 LA GLICOSILACIÓN COMO NEXO DE UNIÓN ENTRE FLAGELO, EL LPS Y LAS FIMBRIAS MSH EN LA CEPA AH-1 DE *A. hydrophila***

La cepa AH-1 de *A. hydrophila* presenta un antígeno O:11 del lipopolisacárido y un flagelo polar que se halla glicosilado con un derivado del ácido pseudamínico y un glicano de 1060 Da relacionado con el antígeno O:11. Además, se ha observado que determinadas condiciones inducen la expresión de las fimbrias de tipo IV Msh en esta cepa. Así, la mutación de genes implicados en la biosíntesis del antígeno O:11, como *wbpL* y *wbgZ*; la mutación de genes relacionados con la biosíntesis del ácido pseudamínico, como *pseI* y *pseB*; o la mutación de la glicosiltransferasa *maf-1*, promueven la expresión de estas fimbrias.

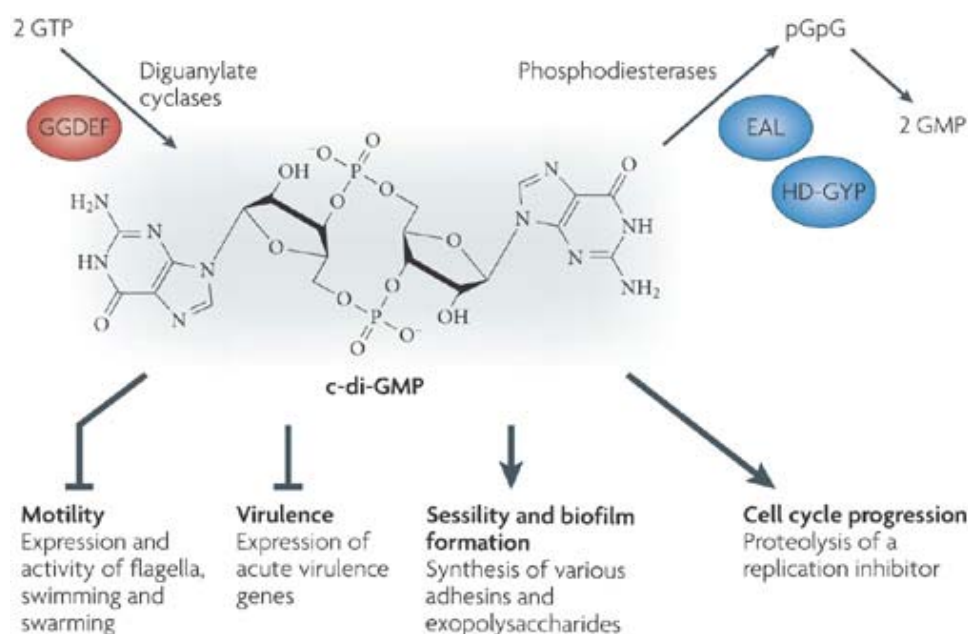
Todos estos mutantes tienen en común la acumulación de azúcares activos a nivel intracelular. En los mutantes AH-1 $\Delta$ *wbpL* y AH-1 $\Delta$ *wbgZ* se produce la acumulación de UDP-GlcNAc y dTDP-L-Ramnosa, dado que el primer azúcar implicado en la formación del antígeno O:11 no puede unirse al lípido transportador. En el mutante AH-1 $\Delta$ *pseB* se acumula UDP-GlcNAc, ya que PseB cataliza la primera reacción enzimática de la vía de síntesis del pseudamínico, acumulándose en el mutante AH-1 $\Delta$ *pseI* un intermediario de dicha vía. Por último, en el mutante AH-1 $\Delta$ *maf-1* se estaría acumulando el derivado del CMP-Pse5Ac7Ac, ya que no podría ser transferido a la flagelina.

Todos estos datos sugieren que el acúmulo intracelular de estos azúcares activos induciría el ensamblaje de fimbrias Msh en *A. hydrophila* AH-1, las cuales parecen participar en la formación de biofilms.

Existen numerosas evidencias en la bibliografía de que la concentración intracelular del mensajero secundario c-di-GMP es capaz de modular gran variedad de procesos fisiológicos de la célula bacteriana. Concretamente, la concentración intracelular de c-di-GMP modula la transición de forma de vida bacteriana sésil a forma móvil y viceversa. En numerosas bacterias, como *V. cholerae*, niveles altos de c-di-GMP se asocian con formación de biofilms y por tanto, persistencia en el medio acuático,

mediante la formación de fimbrias, adhesinas y otros exopolisacáridos. Sin embargo, niveles bajos de c-di-GMP se asocian con una forma de vida móvil donde intervienen factores de patogenicidad como el flagelo, con el fin de colonizar la mucosa intestinal en el huésped (Hengge, 2009).

Los niveles de c-di-GMP se regulan a través de proteínas con dominios GGDEF (dominios con actividad diguanilato ciclasa) y EAL (dominios con actividad fosfodiesterasa). El dominio GGDEF cataliza la formación de c-di-GMP a partir de dos moléculas de GTP. El dominio EAL cataliza la hidrólisis del c-di-GMP a una molécula pGpG que es rápidamente hidrolizada dando lugar a dos moléculas de GMP.

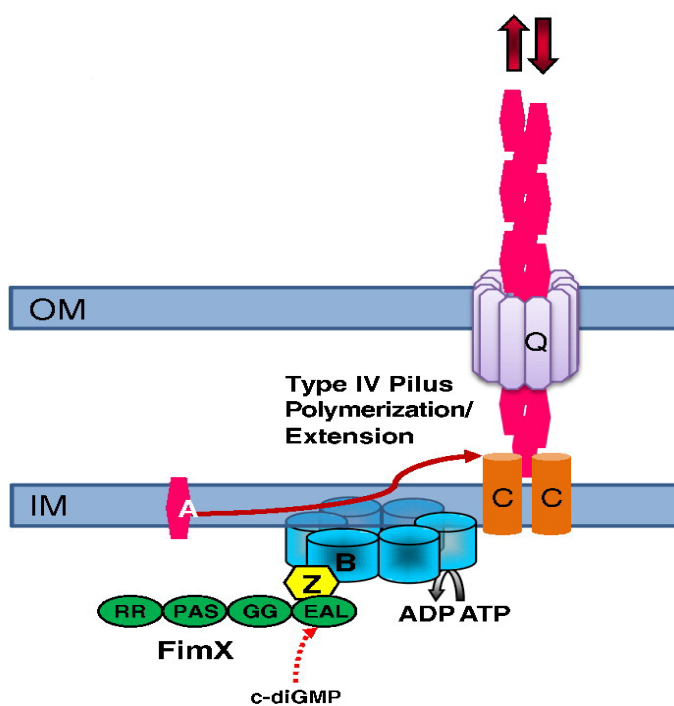


**Figura 4.1** La molécula c-di-GMP está controlada por diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas. Niveles elevados de esta molécula estimulan la producción de biofilms a través de la formación de fimbrias, adhesinas y exopolisacáridos. Adaptada de Hengge, 2009.

En la agrupación que codifica para las fimbrias Msh de *V. cholerae* se ha hallado una proteína con dominios GGDEF/EAL, MshH, sugiriéndose una regulación por c-di-GMP en estas fimbrias (Tamayo *et al.*, 2007). Esta proteína también se ha hallado en la agrupación presente en *Aeromonas veronii* bv. Sobria, habiéndose descrito la proteína MshH como responsable de la modulación de los niveles de c-di-GMP (Hadi *et al.*, 2012) y provocando niveles bajos de esta molécula una reducción en la capacidad de adhesión y de formación de biofilms (Rahman *et al.*, 2007). Por lo general, la molécula

de c-di-GMP se une a un efector que puede ser una proteína o una molécula de RNA (*riboswitch*) que a su vez interacciona con una molécula o estructura diana. Esta diana puede ser un promotor de ADN (si el efector es un factor de transcripción), enzimas o estructuras celulares complejas como el cuerpo basal del flagelo (Hengge, 2009).

Recientemente, se ha descrito en *Xanthomonas citri* una regulación de fimbrias de tipo IV a través de c-di-GMP. Este mensajero se une al dominio catalítico EAL de la proteína FimX, que interacciona con la proteína efectora PilZ actuando sobre la ATPasa de membrana interna responsable de la polimerización de la fimbria (Guzzo *et al.*, 2013).



**Figura 4.2** Modelo propuesto para la biogénesis de fimbrias de tipo IV en *Xanthomonas*. Estructura del complejo PilZ-FimX-c-di-GMP. Figura adaptada de Guzzo *et al.*, 2013.

En *Pseudomonas aeruginosa* se ha descrito que una delección en FimX puede conllevar a un defecto en el ensamblaje de los pilis; no obstante, esto se compensa si los niveles de c-di-GMP son elevados (Jain *et al.*, 2012). Además, también se ha descrito que Psl, la matriz de exopolisacáridos compuesta por glucosa, ramnosa y manosa, es capaz de activar dos diguanilato ciclasas para producir el mensajero secundario c-di-GMP, que a su vez incrementa la producción de Psl y otros componentes del biofilm, produciéndose una regulación con retroalimentación positiva (Irie *et al.*, 2012).

Al igual que en *V. cholerae* y en *Aeromonas veronii* bv. Sobria, la agrupación que codifica para la biosíntesis de las fimbrias Msh en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* también presenta una proteína ortóloga a MshH, por lo que probablemente también existe en esta cepa una regulación mediante c-di-GMP.

La red que existe alrededor de la molécula de c-di-GMP es compleja en el género *Aeromonas*, dado que en el genoma de *A. hydrophila* se han encontrado 13 proteínas con dominios GGDEF/EAL, 31 con el dominio GGDEF únicamente y 9 con el dominio EAL (Seshadri *et al.*, 2006). La acumulación de azúcares activados podría promover en la cepa AH-1 de *A. hydrophila* la activación de alguna proteína con dominios GGDEF, como MshH, generándose niveles elevados de c-di-GMP, el cual de un modo similar a lo que ocurre en *X. citri* podría afectar al ensamblaje de los monómeros de pilina que constituyen la fimbria Msh.

Cabe destacar que las mutaciones que promueven el ensamblaje de fimbrias Msh en la cepa AH-1 dan lugar paralelamente, al no ensamblaje del flagelo polar (*pseI*, *pseB* y *maf-1*) o bien a alteraciones en los glicanos que modifican las flagelinas polares y pérdida de antígeno O:11, con la consiguiente ausencia de lámina S en la superficie bacteriana (*wbpL* y *wbgZ*). La ausencia o alteración de estas estructuras de superficie provoca una menor respuesta inmunitaria en la célula huésped si se compara con la cepa parental AH-1 (Merino *et al.*, 2014) y hace que la cepa pase de un estado “infectivo” a un estado de persistencia ambiental, en el cual se inducen este tipo de fimbrias como consecuencia del aumento de los niveles de c-di-GMP, posiblemente debido al estrés generado por los azúcares activos que se acumulan. En consecuencia, parece existir una regulación entre factores de virulencia (flagelo, antígeno O) y factores de persistencia ambiental (fimbrias Msh).





## 5. CONCLUSIONES



1. Las flagelinas polares (FlaA y FlaB) de la cepa AH-1 de *Aeromonas hydrophila* se hallan modificadas post-traduccionalmente mediante *O*-glicosilación con un derivado del ácido pseudamínico y un glicano desconocido de 1060 Da. Sin embargo, las flagelinas laterales (LafA1 y LafA2) no se hallan modificadas post-traduccionalmente.
2. El glicano de 1060 Da que modifica las flagelinas polares está probablemente relacionado con el antígeno O:11 del LPS de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, ya que se ha detectado ramnosa formando parte del glicano que modifica las flagelinas polares y la mutación de los genes *rmlB*, *wbpL* y *wbgZ*, implicados en la biosíntesis del antígeno O:11, da lugar a la desaparición de dicho glicano.
3. La mutación en los genes *wbpL* y *wbgZ*, implicados en la biosíntesis del antígeno O:11 del LPS de *A. hydrophila* AH-1, provocan la pérdida del antígeno O, el no ensamblaje de la lámina S y la expresión de fimbrias de tipo IVa, denominadas Msh.
4. En la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, los genes implicados en la biosíntesis del derivado de ácido pseudamínico: *neuB* (*pseI*), *flmD*, *flmB*, *flmA* (*pseB*); la glicosiltransferasa *maf-1*; y diversos genes que codifican para metilasas y acetilasas, los cuales podrían hallarse implicados en las modificaciones que presenta el derivado de ácido pseudamínico, se hallan adyacentes a la región 2 del flagelo polar.
5. La mutación de genes implicados en la biosíntesis de ácido pseudamínico o de la glicosiltransferasa *maf-1* da lugar a la pérdida del flagelo polar y a la expresión de fimbrias de tipo IVa, denominadas Msh.

6. La modificación de las flagelinas polares de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* con el derivado del ácido pseudamínico es crucial para su exportación y ensamblaje; sin embargo el glicano de 1060 Da no es esencial para su ensamblaje.
  
7. En la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, la agrupación génica implicada en la biosíntesis de las fimbrias Msh se halla flanqueada por secuencias invertidas y repetidas, y consta de 18 pautas de lectura abierta que se transcriben en dos unidades transcripcionales independientes.
  
8. Las fimbrias Msh se encuentran ampliamente distribuidas entre las *Aeromonas* mesófilas, expresándose de modo constitutivo en algunas cepas, como la cepa A62 de *A. hydrophila*, y siendo inducidas en otras, como en la cepa AH-1 de *A. hydrophila*.
  
9. Las fimbrias Msh de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* juegan un importante papel en la formación de biofilms.
  
10. El acúmulo de azúcares activos a nivel citoplasmático es el inductor de la expresión de las fimbrias Msh en los mutantes de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, posiblemente debido a la activación de alguna proteína con dominios GGDEF.
  
11. La expresión de las fimbrias Msh en los mutantes de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* no se debe a modificaciones a nivel transcripcional ni transduccional, sino a alteraciones en el ensamblaje de los monómeros de pilina que las constituyen.

## 6. BIBLIOGRAFÍA



- Abbott, S. L., Cheung, W. K., & Janda, J. M.** (2003). The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of clinical microbiology*, *41*(6), 2348–2357.
- Aguilar, A., Merino, S., Rubires, X., & Tomas, J. M.** (1997). Influence of osmolarity on lipopolysaccharides and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37 degrees C. *Infection and immunity*, *65*(4), 1245–1250.
- Alberti, S., Alvarez, D., Merino, S., Casado, M. T., Vivanco, F., Tomas, J. M., & Benedi, V. J.** (1996). Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, *64*(11), 4726–4732.
- Allen L. N. and Hanson, R. S.** (1985). Construction of broad host-range cosmid cloning vector: identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol. *J. Bacteriol.* **161**: 955-962.
- Allen, W. J., Phan, G., & Waksman, G.** (2012). Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens. *Current opinion in structural biology*, *22*(4), 500–6.
- Alm, R. A., Boderer, A. J., Free, P. D., & Mattick, J. S.** (1996). Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, *178*(1), 46–53.
- Altarriba, M., Merino, S., Gavín, R., Canals, R., Rabaan, A., Shaw, J. G. and Tomás, J. M.** 2003. A polar flagella operon (*flg*) of *Aeromonas hydrophila* contains genes required for lateral flagella expression. *Microb. Pathog.* (34): 249-259.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.



- Ames, G. F., Spudich, E. N., & Nikaido, H.** (1974). Protein composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations. *Journal of bacteriology*, 117(2), 406–16.
- Anderson, M. S., Eveland, S., and Price, N. P. J** (2000). Conserved cytoplasmic motifs that distinguish sub-groups of the polyprenol phosphate: N-acetylhexosamine-1-phosphate transferase family. *FEMS Microbiol. Lett.*, 191, 169-175.
- Arora, S. K., Neely, A. N., Blair, B., Lory, S., & Ramphal, R.** (2005). Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infection and immunity*, 73(7), 4395–4398.
- Asakura, H., Churin, Y., Bauer, B., Boettcher, J. P., Bartfeld, S., Hashii, N., Meyer, T. F.** (2010). *Helicobacter pylori* HP0518 affects flagellin glycosylation to alter bacterial motility. *Molecular microbiology*, 78(5), 1130–44.
- Attridge, S. R., Manning, P. A., Holmgren, J., & Jonson, G.** (1996). Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor. *Infection and immunity*, 64(8), 3369–73.
- Austin, B., Austin, D. A., Dalsgaard, I., Gudmundsdottir, B. K., Hoie, S., Thornton, J. M., Powell, R.** (1998). Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. *Systematic and applied microbiology*, 21(1), 50–64.
- Ayers, M., Howell, P. L., & Burrows, L. L.** (2010). Architecture of the type II secretion and type IV pilus machineries. *Future microbiology*, 5(8), 1203–18.
- Bakaletz, L. O., Baker, B. D., Jurcisek, J. A., Harrison, A., Novotny, L. A., Bookwalter, J. E., Munson, R. S.** (2005). Demonstration of Type IV pilus expression and a twitching phenotype by *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*, 73(3), 1635–43.
- Barber, M. A.** (1908). The rate of multiplication of *Bacillus coli* at different temperatures. *Journal of infectious diseases*. Vol. 5, No. 4: 379-400.

- Barnett, T. C., Kirov, S. M., Strom, M. S., & Sanderson, K.** (1997). *Aeromonas* spp. possess at least two distinct type IV pilus families. *Microbial pathogenesis*, 23(4), 241–247.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S. R., Griffiths- Jones, S., Howe, K. L., Marshall, M. and Sonnhammer, E. L.** (2002). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **30**: 276-280.
- Bechet, M., & Blondeau, R.** (2003). Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 1072–1078.
- Belanger, M., Burrows, L. L., and Lam, J. S.,** (1999). Functional analysis of genes responsible for the synthesis of the B-band O antigen of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O6 lipopolysaccharide. *Microbiology*, 145, 3505-3521.
- Belland, R. J., & Trust, T. J.** (1987). Cloning of the gene for the surface array protein of *Aeromonas salmonicida* and evidence linking loss of expression with genetic deletion. *Journal of Bacteriology*, 169(9), 4086–4091.
- Bertrand, J. J., West, J. T., & Engel, J. N.** (2010). Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 192(4), 994–1010.
- Beveridge, T. J., Pouwels, P. H., Sara, M., Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Kari, K., Koval, S. F.** (1997). Functions of S-layers. *FEMS microbiology reviews*, 20 (1-2), 99–149.
- Blomfield, I. C., Vaughn, V., Rest, R. F., & Eisenstein, B. I.** (1991). Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Molecular microbiology*, 5(6), 1447–57.
- Boyd, J. M., Dacanay, A., Knickle, L. C., Touhami, A., Brown, L. L., Jericho, M. H., Reith, M.** (2008). Contribution of type IV pili to the virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Infection and immunity*, 76(4), 1445–1455.

- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–54.
- Braun, M., Stuber, K., Schlatter, Y., Wahli, T., Kuhnert, P., & Frey, J.** (2002). Characterization of an ADP-ribosyltransferase toxin (AexT) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Journal of bacteriology*, 184(7), 1851–8.
- Burghardt, R. C., Droleskey, R.** (2006). Transmission electron microscopy. *Current protocols in microbiology*. Chapter 2. Unit 2B.1.
- Burke, V., Cooper, M., & Robinson, J.** (1986). Haemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. related to species and source of strains. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 64 ( Pt 6)(Pt 6), 563–570.
- Burr, S. E., Stuber, K., Wahli, T., & Frey, J.** (2002). Evidence for a type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Journal of bacteriology*, 184(21), 5966–70.
- Byers, B. R., Massad, G., Barghouthi, S., & Arceneaux, J. E.** (1991). Iron acquisition and virulence in the motile aeromonads: siderophore-dependent and -independent systems. *Experientia*, 47(5), 416–418.
- Canals, R.** 2007. Estudio de la movilidad: característica fundamental de las *Aeromonas* mesófilas. Tesis doctoral.
- Canals, R., Altarriba, M., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J. G., Tomas, J. M., & Merino, S.** (2006b). Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. *Journal of Bacteriology*, 188(3), 852–862.
- Canals, R., Ramirez, S., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J. G., Tomas, J. M., & Merino, S.** (2006a). Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 188(2), 542–555.

- Chiavelli, D. A., Marsh, J. W., & Taylor, R. K.** (2001). The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 3220–5.
- Chu, S., Cavaignac, S., Feutrier, J., Phipps, B. M., Kostrzynska, M., Kay, W. W., & Trust, T. J.** (1991). Structure of the tetragonal surface virulence array protein and gene of *Aeromonas salmonicida*. *The Journal of biological chemistry*, 266(23), 15258–15265.
- Colwell, R. R., M. T. McDonell and J. de Ley** (1986). Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 266(36), 855–856.
- Cullen, T. W., & Trent, M. S.** (2010). A link between the assembly of flagella and lipooligosaccharide of the Gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 5160–5.
- Dacanay, A., Knickle, L., Solanky, K. S., Boyd, J. M., Walter, J. A., Brown, L. L., Reith, M.** (2006). Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 6), 1847–56.
- Dalisay, D. S., Webb, J. S., Scheffel, A., Svenson, C., James, S., Holmström, C., Kjelleberg, S.** (2006). A mannose-sensitive haemagglutinin (MSHA)-like pilus promotes attachment of *Pseudoalteromonas tunicata* cells to the surface of the green alga *Ulva australis*. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 10), 2875–83.
- Darveau, R. P., & Hancock, R. E.** (1983). Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *Journal of bacteriology*, 155(2), 831–8.
- Ditta G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X-W., Finlay, D. R., Guiney, D. and Helinski, D. R.** (1985). Plasmids related to the broad host range

vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. Plasmid. **13**:149-153.

**Dooley, J. S., Lallier, R., Shaw, D. H., & Trust, T. J.** (1985). Electrophoretic and immunochemical analyses of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, *164*(1), 263–269.

**Dooley, J. S., & Trust, T. J.** (1988). Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: identification of a surface array protein. *Journal of Bacteriology*, *170*(2), 499–506.

**Dower, J. W., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W.** 1988. High efficiency transformants of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Research*. **16**: 6127-6145.

**Esteve, C., Alcaide, E., Canals, R., Merino, S., Blasco, D., Figueras, M. J., & Tomas, J. M.** (2004). Pathogenic *Aeromonas hydrophila* serogroup O:14 and O:81 strains with an S layer. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(10), 5898–5904.

**Esteve, C., Gutierrez, M. C., & Ventosa, A.** (1995). *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *45*(3), 462–466.

**Ewing, C. P., Andreishcheva, E., Guerry, P.** (2009). Functional characterization of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Journal of bacteriology*, *191*(22), 7086-7093.

**Fairbanks, G., Steck, T. L., & Wallach, D. F.** (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, *10*(13), 2606–17.

**Fehr, D., Burr, S. E., Gibert, M., d'Alayer, J., Frey, J., & Popoff, M. R.** (2007). *Aeromonas* exoenzyme T of *Aeromonas salmonicida* is a bifunctional protein that targets the host cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*, *282*(39), 28843–52.

- Fehr, D., Casanova, C., Liverman, A., Blazkova, H., Orth, K., Dobbelaere, D., Burr, S. E.** (2006). AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF-kappaB signalling pathway. *Microbiology (Reading, England)*, *152*(Pt 9), 2809–18.
- Figueras, M. J., Guarro, J., & Martinez-Murcia, A.** (2000). Use of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified 16S rRNA gene for the identification of *Aeromonas* spp. *Journal of clinical microbiology*, *38*(5), 2023–2025.
- Fröls, S., Ajon, M., Wagner, M., Teichmann, D., Zolghadr, B., Folea, M., Albers, S.-V.** (2008). UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Molecular microbiology*, *70*(4), 938–52.
- Garduño, R. A., Thornton, J. C., & Kay, W. W.** (1993). *Aeromonas salmonicida* grown in vivo. *Infection and immunity*, *61*(9), 3854–3862.
- Garrote, A., Bonet, R., Merino, S., Simon-Pujol, M. D., & Congregado, F.** (1992). Occurrence of a capsule in *Aeromonas salmonicida*. *FEMS microbiology letters*, *74*(2-3), 127–131.
- Gavin, R., Rabaan, A. A., Merino, S., Tomas, J. M., Gryllos, I., & Shaw, J. G.** (2002). Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Molecular microbiology*, *43*(2), 383–397.
- Goon, S, Kelly, J. F., Logan, S. M., Ewing, C. P., & Guerry, P.** (2003). Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene. *Molecular microbiology*, *50*(2), 659–671.
- Goon, Scarlett, Kelly, J. F., Logan, S. M., Ewing, C. P., & Guerry, P.** (2003). Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene. *Molecular microbiology*, *50*(2), 659–71.

- Gryllos, I., Shaw, J. G., Gavin, R., Merino, S., & Tomas, J. M.** (2001). Role of flm locus in mesophilic *Aeromonas* species adherence. *Infection and immunity*, 69(1), 65–74.
- Guerry, P., Ewing, C. P., Schirm, M., Lorenzo, M., Kelly, J., Pattarini, D., Logan, S.** (2006). Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Molecular microbiology*, 60(2), 299–311.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., and J. Beckwith.** (1995). Tight regulation, modulation and high level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology*, 177(14), 4121-4130.
- Guzzo, C. R., Dunger, G., Salinas, R. K., & Farah, C. S.** (2013). Structure of the PilZ-FimXEAL-c-di-GMP Complex Responsible for the Regulation of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis. *Journal of molecular biology*, 425(12), 2174–97.
- Guzzo, C. R., Salinas, R. K., Andrade, M. O., & Farah, C. S.** (2009). PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. *Journal of molecular biology*, 393(4), 848–66.
- Haase, E. M., Stream, J. O., & Scannapieco, F. A.** (2003). Transcriptional analysis of the 5' terminus of the flp fimbrial gene cluster from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 1), 205–15.
- Hadi, N., Yang, Q., Barnett, T. C., Tabei, S. M., Kirov, S. M., & Shaw, J. G.** (2012). Bundle-forming pilus locus of *Aeromonas veronii* bv. Sobria. *Infection and immunity*, 80(4), 1351–1360.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harf-Monteil, C., Fleche, A. L., Riegel, P., Prevost, G., Bermond, D., Grimont, P. A., & Monteil, H.** (2004). *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 2), 481–485.

- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D.** (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 68(4), 692–744.
- Hengge, R.** (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 7(4), 263–73.
- Holden, K.M., Gilbert, M., Coloe, P. J., Li, J., Fri, B. N.** (2012). The role of WlaRG, WlaTB and WlaTC in lipooligosaccharide synthesis by *Campylobacter jejuni* strain 81116. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 1165–1171.
- Honma, Y., & Nakasone, N.** (1990). Pili of *Aeromonas hydrophila*: purification, characterization, and biological role. *Microbial pathogenesis*, 52(6), 344–352.
- Hsiao, A., Xu, X., Kan, B., Kulkarni, R. V, & Zhu, J.** (2009). Direct regulation by the *Vibrio cholerae* regulator ToxT to modulate colonization and anticolonization pilus expression. *Infection and immunity*, 77(4), 1383–8.
- Huys, G., Kampfer, P., Altwegg, M., Kersters, I., Lamb, A., Coopman, R., Kersters, K.** (1997). *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 1165–1171.
- Irie, Y., Borlee, B. R., O'Connor, J. R., Hill, P. J., Harwood, C. S., Wozniak, D. J., & Parsek, M. R.** (2012). Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20632–6.
- Ishikawa, J. and Hotta, K.** (1999). Frameplot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**: 251-253.
- Jain, R., Behrens, A.-J., Kaefer, V., & Kazmierczak, B. I.** (2012). Type IV pilus assembly in *Pseudomonas aeruginosa* over a broad range of cyclic di-GMP concentrations. *Journal of bacteriology*, 194(16), 4285–94.



- Janda, J. M.** 1991. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 397-410.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L.** (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *27*(2), 332–344.
- Janda, J. M., Abbott, S. L., Khashe, S., Kellogg, G. H., & Shimada, T.** (1996). Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *Journal of clinical microbiology*, *34*(8), 1930–1933.
- Janda, J. M., Oshiro, L. S., Abbott, S. L., & Duffey, P. S.** (1987). Virulence markers of mesophilic aeromonads: association of the autoagglutination phenomenon with mouse pathogenicity and the presence of a peripheral cell-associated layer. *Infection and immunity*, *55*(12), 3070–3077.
- Jiménez, N.** 2008. Caracterización del lipopolisacárido de *Aeromonas* mesófilas. Tesis doctoral.
- Jiménez, N., Canals, R., Salo, M. T., Vilches, S., Merino, S., & Tomas, J. M.** (2008). The *Aeromonas hydrophila* wb\*O34 gene cluster: genetics and temperature regulation. *Journal of Bacteriology*, *190*(12), 4198–4209.
- Jonson, G., Lebens, M., & Holmgren, J.** (1994). Cloning and sequencing of *Vibrio cholerae* mannose-sensitive haemagglutinin pilin gene: localization of mshA within a cluster of type 4 pilin genes. *Molecular microbiology*, *13*(1), 109–118.
- Josenhans, C., & Suerbaum, S.** (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International journal of medical microbiology: IJMM*, *291*(8), 605–614.
- Kadrmas, J. L., Brozek, K. A., & Raetz, C. R.** (1996). Lipopolysaccharide core glycosylation in *Rhizobium leguminosarum*. An unusual mannosyl transferase resembling the heptosyl transferase I of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, *271*(50), 32119–32125.

- Karlyshev, A. V., Linton, D., Gregson, N. A., & Wren, B. W.** (2002). A novel paralogous gene family involved in phase-variable flagella-mediated motility in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 2), 473–480.
- Kay, W. W., Buckley, J. T., Ishiguro, E. E., Phipps, B. M., Monette, J. P., & Trust, T. J.** (1981). Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Bacteriology*, 147(3), 1077–1084.
- Kay, W. W., Phipps, B. M., Ishiguro, E. E., Olafson, R. W., & Trust, T. J.** (1984). Surface layer virulence A-proteins from *Aeromonas salmonicida* strains. *Canadian journal of biochemistry and cell biology = Revue canadienne de biochimie et biologie cellulaire*, 62(11), 1064–1071.
- Kay, W. W., Phipps, B. M., Ishiguro, E. E., & Trust, T. J.** (1985). Porphyrin binding by the surface array virulence protein of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Bacteriology*, 164(3), 1332–1336.
- Kirn, T. J., Jude, B. A., & Taylor, R. K.** (2005). A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature*, 438(7069), 863–6.
- Kirov, S. M.** (1997). *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. Beuchat and T. J. Monteville (ed), *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington D. C., 265-287.
- Kirov, S. M., Barnett, T. C., Pepe, C. M., Strom, M. S., & Albert, M. J.** (2000). Investigation of the role of type IV *Aeromonas* pilus (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. *Infection and immunity*, 68(7), 4040–4048.
- Kirov, S. M., Jacobs, I., Hayward, L. J., & Hapin, R. H.** (1995). Electron microscopic examination of factors influencing the expression of filamentous surface structures on clinical and environmental isolates of *Aeromonas veronii* Biotype sobria. *Microbiology and immunology*, 39(5), 329–338.
- Kirov, S. M., O'Donovan, L. A., & Sanderson, K.** (1999). Functional characterization of type IV pili expressed on diarrhea-associated isolates of *Aeromonas* species. *Infection and immunity*, 67(10), 5447–5454.

- Kirov, S. M., & Sanderson, K.** (1996). Characterization of a type IV bundle-forming pilus (SFP) from a gastroenteritis-associated strain of *Aeromonas veronii* biovar sobria. *Microbial pathogenesis*, 21(1), 23–34.
- Kirov, S. M., Tassell, B. C., Semmler, A. B., O'Donovan, L. A., Rabaan, A. A., & Shaw, J. G.** (2002). Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *Journal of Bacteriology*, 184(2), 547–555.
- Knirel, Y. A., Shashkov, A. S., Senchenkova, S. N., Merino, S., & Tomas, J. M.** (2002a). Structure of the O-polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* O:34; a case of random O-acetylation of 6-deoxy-L-talose. *Carbohydrate research*, 337(15), 1381–1386.
- Knirel, Y. A., Shashkov, A. S., Senchenkova, S. N., Merino, S., & Tomas, J. M.** (2002b). Structure of the O-polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* O:34; a case of random O-acetylation of 6-deoxy-L-talose. *Carbohydrate research*, 337(15), 1381–1386.
- Knirel, Y. A., Vinogradov, E., Jimenez, N., Merino, S., & Tomas, J. M.** (2004). Structural studies on the R-type lipopolysaccharide of *Aeromonas hydrophila*. *Carbohydrate research*, 339(4), 787–793.
- Kokka, R. P., Janda, J. M., Oshiro, L. S., Altwegg, M., Shimada, T., Sakazaki, R., & Brenner, D. J.** (1991). Biochemical and genetic characterization of autoagglutinating phenotypes of *Aeromonas* species associated with invasive and noninvasive disease. *The Journal of infectious diseases*, 163(4), 890–894.
- Kokka, R. P., Vedros, N. A., & Janda, J. M.** (1990). Electrophoretic analysis of the surface components of autoagglutinating surface array protein-positive and surface array protein-negative *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *Journal of clinical microbiology*, 28(10), 2240–2247.
- Kostakioti, M., Newman, C. L., Thanassi, D. G., & Stathopoulos, C.** (2005). Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *Journal of Bacteriology*, 187(13), 4306–4314.

- Kus, J. V., Kelly, J., Tessier, L., Harvey, H., Cvitkovitch, D. G., & Burrows, L. L.** (2008). Modification of *Pseudomonas aeruginosa* Pa5196 type IV Pilins at multiple sites with D-Araf by a novel GT-C family Arabinosyltransferase, TfpW. *Journal of Bacteriology*, 190(22), 7464–7478.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–5.
- Li, Y., Liu, Y., Zhou, Z., Huang, H., Ren, Y., Zhang, Y., Wang, L.** (2011). Complete genome sequence of *Aeromonas veronii* strain B565. *Journal of Bacteriology*, 193(13), 3389–3390.
- Liu F., Tanner, M. E.** (2006). PseG of pseudaminic acid biosynthesis: a UDP-sugar hydrolase as a masked glycosyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 281(30), 20902–20909.
- Lindhout, T., Lau, P. C. Y., Brewer, D., & Lam, J. S.** (2009). Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 10), 3449–60.
- Logan, S. M.** (2006). Flagellar glycosylation - a new component of the motility repertoire? *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 5), 1249–1262.
- Logan, S. M., Hui, J. P., Vinogradov, E., Aubry, A. J., Melanson, J. E., Kelly, J. F., Soo, E. C.** (2009). Identification of novel carbohydrate modifications on *Campylobacter jejuni* 11168 flagellin using metabolomics-based approaches. *The FEBS journal*, 276(4), 1014–1023.
- Logan, S. M., Kelly, J. F., Thibault, P., Ewing, C. P., & Guerry, P.** (2002). Structural heterogeneity of carbohydrate modifications affects serospecificity of *Campylobacter* flagellins. *Molecular microbiology*, 46(2), 587–597.

- Majeed, K. N., Egan, A. F., & Mac Rae, I. C.** (1990). Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5 degrees C. *The Journal of applied bacteriology*, 69(3), 332–337.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.** (1982). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Marsh, J. W., & Taylor, R. K.** (1999). Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *Journal of Bacteriology*, 181(4), 1110–1117.
- Martinez, M. J., Simon-Pujol, D., Congregado, F., Merino, S., Rubires, X., & Tomas, J. M.** (1995). The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes O:11 and O:34. *FEMS microbiology letters*, 128(1), 69–73.
- Martinez-Murcia, A. J.** (1999). Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas* DNA hybridization group 11 and *Aeromonas* group 501. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 4, 1403–1408.
- Martinez-Murcia, A. J., Benlloch, S., & Collins, M. D.** (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(3), 412–421.
- Massad, G., Arceneaux, J. E., & Byers, B. R.** (1994). Diversity of siderophore genes encoding biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Aeromonas* spp. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 7(3), 227–236.
- McCarthy, D. H.** 1975. Fish furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* var. *achromogenes*. *J. Wildl. Dis.* **11**: 489-493.
- McIntosh, D., & Austin, B.** (1991). Atypical characteristics of the salmonid pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Journal of general microbiology*, 137(6), 1341–1343.

- McNally, D. J., Aubry, A. J., Hui, J. P., Khieu, N. H., Whitfield, D., Ewing, C. P., ... Soo, E. C.** (2007). Targeted metabolomics analysis of *Campylobacter coli* VC167 reveals legionaminic acid derivatives as novel flagellar glycans. *The Journal of biological chemistry*, 282(19), 14463–14475.
- McNally, D. J., Hui, J. P., Aubry, A. J., Mui, K. K., Guerry, P., Brisson, J. R., Soo, E. C.** (2006). Functional characterization of the flagellar glycosylation locus in *Campylobacter jejuni* 81-176 using a focused metabolomics approach. *The Journal of biological chemistry*, 281(27), 18489–18498.
- Meibom, K. L., Li, X. B., Nielsen, A. T., Wu, C.-Y., Roseman, S., & Schoolnik, G. K.** (2004). The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2524–9.
- Merino, S, Aguilar, A., Rubires, X., Simon-Pujol, D., Congregado, F., & Tomas, J. M.** (1996). The role of the capsular polysaccharide of *Aeromonas salmonicida* in the adherence and invasion of fish cell lines. *FEMS microbiology letters*, 142(2-3), 185–189.
- Merino, S, Alberti, S., & Tomas, J. M.** (1994). *Aeromonas salmonicida* resistance to complement-mediated killing. *Infection and immunity*, 62(12), 5483–5490.
- Merino, S, Camprubi, S., & Tomas, J. M.** (1992). Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *Infection and immunity*, 60(10), 4343–4349.
- Merino, S, Camprubi, S., & Tomas, J. M.** (1993a). Detection of *Aeromonas hydrophila* in food with an enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of applied bacteriology*, 74(2), 149–154.
- Merino, S, Gavin, R., Vilches, S., Shaw, J. G., & Tomas, J. M.** (2003). A colonization factor (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. is inactive in *Aeromonas salmonicida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 663–667.

**Merino, S, Rubires, X., Aguilar, A., Alberti, S., Hernandez-Alles, S., Benedi, V. J., & Tomas, J. M.** (1996). Mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:11 resistance to complement-mediated killing. *Infection and immunity*, *64*(12), 5302–5309.

**Merino, S, Rubires, X., Aguilar, A., & Tomas, J. M.** (1997). The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains. *FEMS microbiology letters*, *151*(2), 213–217.

**Merino, S, Rubires, X., Knochel, S., & Tomas, J. M.** (1995). Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *International journal of food microbiology*, *28*(2), 157–168.

**Merino, S, Shaw, J. G., & Tomas, J. M.** (2006). Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS microbiology letters*, *263*(2), 127–135.

**Merino, Susana, Jimenez, N., Molero, R., Bouamama, L., Regué, M., & Tomás, J. M.** (2011). A UDP-HexNAc:polyprenol-P GalNAc-1-P transferase (WecP) representing a new subgroup of the enzyme family. *Journal of bacteriology*, *193*(8), 1943–1952.

**Merino, S., Tomás, J. M.** (2014a). Gram-negative flagella glycosylation. *International journal of molecular science*, *15*(2), 2840–2857.

**Merino, S., Fulton, K. M., Twine, S. M., Wilhelms, M., Molero, R., Tomás, J. M.** (2014b). *Aeromonas hydrophila* flagella glycosylation: involvement of a lipid carrier. *Plos one*, *9* (2).

**Miller, J. H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.

**Milton, D. L., O'Toole, R., Horstedt, P., & Wolf-Watz, H.** (1996). Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *Journal of bacteriology*, *178*(5), 1310–9.

**Miñana-Galbis, D., Farfan, M., Fuste, M. C., & Loren, J. G.** (2004). *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(Pt 6), 2073–2078.

- Miyazaki, T. and Kaige, N.** 1985. A histopathological study on motile aeromonad disease in Crucian carp. *Fish Pathol.* **21**: 181-185.
- Molero, R., Wilhelms, M., Infanzon, B., Tomas, J. M., & Merino, S.** (2011). *Aeromonas hydrophila* motY is essential for polar flagellum function, and requires coordinate expression of motX and Pom proteins. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 10), 2772–2784.
- Morgenstein, R. M., Clemmer, K. M., & Rather, P. N.** (2010). Loss of the waaL O-antigen ligase prevents surface activation of the flagellar gene cascade in *Proteus mirabilis*. *Journal of bacteriology*, 192(12), 3213–21.
- Morrison, D. C.** 1983. Bacterial endotoxins and pathogenesis. *Rev. Infect. Dis.* **5 Suppl 4**: S733-747.
- Najimi, M., Lemos, M. L., & Osorio, C. R.** (2009). Identification of iron regulated genes in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: genetic diversity and evidence of conserved iron uptake systems. *Veterinary microbiology*, 133(4), 377–382.
- Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S. N., & Uhlin, B. E.** (2012). Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS one*, 7(12), e51241.
- Neilands, J. B.** (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of biological chemistry*, 270 (45), 26723–26726.
- Noonan, B., & Trust, T. J.** (1995). Molecular analysis of an A-protein secretion mutant of *Aeromonas salmonicida* reveals a surface layer-specific protein secretion pathway. *Journal of Molecular Biology*, 248(2), 316–327.
- Noonan, B., & Trust, T. J.** (1997). The synthesis, secretion and role in virulence of the paracrystalline surface protein layers of *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*. *FEMS microbiology letters*, 154(1), 1–7.



- O'Toole, G. A., & Kolter, R.** (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, 30(2), 295–304.
- O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B., & Kolter, R.** (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in enzymology*, 310, 91–109.
- Palmer, T., & Berks, B. C.** (2003). Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 3), 547–556.
- Parker, J. L., Day-Williams, M. J., Tomas, J. M., Stafford, G. P., & Shaw, J. G.** (2012). Identification of a putative glycosyltransferase responsible for the transfer of pseudaminic acid onto the polar flagellin of *Aeromonas caviae* Sch3N. *MicrobiologyOpen*, 1(2), 149–60.
- Pepe, C. M., Eklund, M. W., & Strom, M. S.** (1996). Cloning of an *Aeromonas hydrophila* type IV pilus biogenesis gene cluster: complementation of pilus assembly functions and characterization of a type IV leader peptidase/N-methyltransferase required for extracellular protein secretion. *Molecular microbiology*, 19(4), 857–869.
- Phipps, B. M., & Kay, W. W.** (1988). Immunoglobulin binding by the regular surface array of *Aeromonas salmonicida*. *The Journal of biological chemistry*, 263(19), 9298–9303.
- Pidiyar, V., Kaznowski, A., Narayan, N. B., Patole, M., & Shouche, Y. S.** (2002). *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 5), 1723–1728.
- Popoff, M.** (1984). Genus III. *Aeromonas*. Kluwer and Van Neil 1936, 398 AL. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 Section 5, IX ed, Baltimore/London: Williams and Wilkins, 545-547.

- Price, N. P., & Momany, F. A.** (2005). Modeling bacterial UDP-HexNAc: polyprenol-P HexNAc-1-P transferases. *Glycobiology*, *15*(9), 29R–42R.
- Proft, T., & Baker, E. N.** (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, *66*(4), 613–635.
- Quintela, O., Cruz, A., Concheiro, M., Castro, A. De, & López-Rivadulla, M.** (2005). Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Revista de Toxicología*, *22*(1), 7–14.
- Rabaan, A. A., Gryllos, I., Tomás, J. M., & Shaw, J. G.** (2001). Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infection and immunity*, *69*(7), 4257–67.
- Raetz, C. R., & Whitfield, C.** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, *71*, 635–700.
- Rahman, M., Simm, R., Kader, A., Basseres, E., Römling, U., & Möllby, R.** (2007). The role of c-di-GMP signaling in an *Aeromonas veronii* biovar sobria strain. *FEMS microbiology letters*, *273*(2), 172–9.
- Reeves, P. R., Hobbs, M., Valvano, M. A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., ... Rick, P. D.** (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends in microbiology*, *4*(12), 495–503.
- Reith, M. E., Singh, R. K., Curtis, B., Boyd, J. M., Bouevitch, A., Kimball, J., ... Brown, L. L.** (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. salmonicida A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC genomics*, *9*, 427.
- Roberts, I. S.** 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 285-315.
- Rocchetta, H. L., Burrows, L. L., Pacan, J. C., & Lam, J. S.** (1998). Three rhamnosyltransferases responsible for assembly of the A-band D-rhamnan polysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*: a fourth transferase, WbpL, is

- required for the initiation of both A-band and B-band lipopolysaccharide synthesis. *Molecular microbiology*, 28(6), 1103–1119.
- Rozen, S., & Skaletsky, H.** (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 132, 365–86.
- Rubires, X., Saigi, F., Piqué, N., Climent, N., Merino, S., Albertí, S., Regué, M.** (1997). A gene (*wbbL*) from *Serratia marcescens* N28b (O4) complements the *rfb-50* mutation of *Escherichia coli* K-12 derivatives. *Journal of bacteriology*, 179(23), 7581–6.
- Sakazaki, R., & Shimada, T.** (1984). O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. *Japanese journal of medical science & biology*, 37(5-6), 247–255.
- Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., & Namba, K.** (2001). Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 410(6826), 331–337.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–7.
- Sato, M., Arita, M., Honda, T., & Miwatani, T.** (1989). Characterization of a pilus produced by *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 59(3), 325–329.
- Schirm, M., Arora, S. K., Verma, A., Vinogradov, E., Thibault, P., Ramphal, R., & Logan, S. M.** (2004). Structural and genetic characterization of glycosylation of type a flagellin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2523–2531.

- Schirm, M., Schoenhofen, I. C., Logan, S. M., Waldron, K. C., & Thibault, P.** (2005). Identification of unusual bacterial glycosylation by tandem mass spectrometry analyses of intact proteins. *Analytical Chemistry*, 77(23), 7774–7782.
- Schirm, M., Soo, E. C., Aubry, A. J., Austin, J., Thibault, P., & Logan, S. M.** (2003). Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. *Molecular microbiology*, 48(6), 1579–1592.
- Schoenhofen, I. C., Lunin, V. V, Julien, J. P., Li, Y., Ajamian, E., Matte, A., Young, N. M.** (2006). Structural and functional characterization of PseC, an aminotransferase involved in the biosynthesis of pseudaminic acid, an essential flagellar modification in *Helicobacter pylori*. *The Journal of biological chemistry*, 281(13), 8907–8916.
- Schoenhofen, I. C., McNally, D. J., Vinogradov, E., Whitfield, D., Young, N. M., Dick, S., Logan, S. M.** (2006). Functional characterization of dehydratase/aminotransferase pairs from *Helicobacter* and *Campylobacter*: enzymes distinguishing the pseudaminic acid and bacillosamine biosynthetic pathways. *The Journal of biological chemistry*, 281(2), 723–732.
- Scott, A. E., Twine, S. M., Fulton, K. M., Titball, R. W., Essex-Lopresti, A. E., Atkins, T. P., & Prior, J. L.** (2011). Flagellar glycosylation in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Journal of bacteriology*, 193(14), 3577–87.
- Seshadri, R., Joseph, S. W., Chopra, A. K., Sha, J., Shaw, J., Graf, J., ... Heidelberg, J. F.** (2006). Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *Journal of Bacteriology*, 188(23), 8272–8282.
- Sha, J., Pillai, L., Fadl, A. A., Galindo, C. L., Erova, T. E., & Chopra, A. K.** (2005). The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and immunity*, 73(10), 6446–57.

- Sha, J., Wang, S. F., Suarez, G., Sierra, J. C., Fadl, A. A., Erova, T. E., Chopra, A. K.** (2007). Further characterization of a type III secretion system (T3SS) and of a new effector protein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*--part I. *Microbial pathogenesis*, 43(4), 127–46.
- Shaw, D. H., & Squires, M. J.** (1984). O-antigen structure in a virulent strain of *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 24(2-3), 277–280.
- Shime-Hattori, A., Iida, T., Arita, M., Park, K.-S., Kodama, T., & Honda, T.** (2006). Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS microbiology letters*, 264(1), 89–97.
- Sierra, J. C., Suarez, G., Sha, J., Foltz, S. M., Popov, V. L., Galindo, C. L., Chopra, A. K.** (2007). Biological characterization of a new type III secretion system effector from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*--part II. *Microbial pathogenesis*, 43(4), 147–60.
- Skurnik, M.** (1999). The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. *Molecular Microbiology*, 31 (5), 1443-1462.
- Soler, L., Yañez, M. A., Chacon, M. R., Aguilera-Arreola, M. G., Catalan, V., Figueras, M. J., & Martinez-Murcia, A. J.** (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 5), 1511–1519.
- Soo, E. C., Aubry, A. J., Logan, S. M., Guerry, P., Kelly, J. F., Young, N. M., & Thibault, P.** (2004). Selective detection and identification of sugar nucleotides by CE-electrospray-MS and its application to bacterial metabolomics. *Analytical Chemistry*, 76(3), 619–626.
- Stintzi, A., & Raymond, K. N.** (2000). Amonabactin-mediated iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Aeromonas hydrophila*: direct measurement of individual microscopic rate constants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 5(1), 57–66.

- Strom, M. S., & Lory, S.** (1993). Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annual review of microbiology*, *47*, 565–96.
- Szymanski, C. M., Burr, D. H., & Guerry, P.** (2002). *Campylobacter* protein glycosylation affects host cell interactions. *Infection and immunity*, *70*(4), 2242–2244.
- Szymanski, C. M., Logan, S. M., Linton, D., & Wren, B. W.** (2003). *Campylobacter*-a tale of two protein glycosylation systems. *Trends in microbiology*, *11*(5), 233–238.
- Tabei, S. M., Hitchen, P. G., Day-Williams, M. J., Merino, S., Vart, R., Pang, P. C., Shaw, J. G.** (2009). An *Aeromonas caviae* genomic island is required for both O-antigen lipopolysaccharide biosynthesis and flagellin glycosylation. *Journal of Bacteriology*, *191*(8), 2851–2863.
- Tacket, C. O., Taylor, R. K., Losonsky, G., Lim, Y., Nataro, J. P., Kaper, J. B., & Levine, M. M.** (1998). Investigation of the roles of toxin-coregulated pili and mannose-sensitive hemagglutinin pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection. *Infection and immunity*, *66*(2), 692–5.
- Taguchi, F., Shibata, S., Suzuki, T., Ogawa, Y., Aizawa, S., Takeuchi, K., & Ichinose, Y.** (2008). Effects of glycosylation on swimming ability and flagellar polymorphic transformation in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 6605. *Journal of Bacteriology*, *190*(2), 764–768.
- Taguchi, F., Takeuchi, K., Katoh, E., Murata, K., Suzuki, T., Marutani, M., Ichinose, Y.** (2006). Identification of glycosylation genes and glycosylated amino acids of flagellin in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci. *Cellular microbiology*, *8*(6), 923–938.
- Takeuchi, K., Taguchi, F., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y.** (2003). Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. glycinea and its role in host specificity. *Journal of Bacteriology*, *185*(22), 6658–6665.

- Tamayo, R., Pratt, J. T., & Camilli, A.** (2007). Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual review of microbiology*, *61*, 131–48.
- Telford, J. R., & Raymond, K. N.** (1998). Coordination Chemistry of the Amonabactins, Bis(catecholate) Siderophores from *Aeromonas hydrophila*(1). *Inorganic chemistry*, *37*(18), 4578–4583.
- Thelin, K. H., & Taylor, R. K.** (1996). Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infection and immunity*, *64*(7), 2853–6.
- Thibault, P., Logan, S. M., Kelly, J. F., Brisson, J. R., Ewing, C. P., Trust, T. J., & Guerry, P.** (2001a). Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *The Journal of biological chemistry*, *276*(37), 34862–34870.
- Thibault, P., Logan, S. M., Kelly, J. F., Brisson, J. R., Ewing, C. P., Trust, T. J., & Guerry, P.** (2001b). Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *The Journal of biological chemistry*, *276*(37), 34862–34870.
- Thomas, S. R., & Trust, T. J.** (1995). A specific PulD homolog is required for the secretion of paracrystalline surface array subunits in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, *177*(14), 3932–3939.
- Thomas, L. V., Gross, R. J., Cheasty, T., & Rowe, B.** (1990). Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species. *Journal of clinical microbiology*, *28*(5), 980–984.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.

- Thompson, F. L., Neto, A. A., Santos, E. de O., Izutsu, K., & Iida, T.** (2011). Effect of N-acetyl-D-glucosamine on gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbes and environments / JSME*, 26(1), 61–6.
- Totten P. A., and Lory, S.** (1990). Characterization of the Type a Flagellin Gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK. *Journal of bacteriology*, 172(12), 7188-7199.
- Trust, T. J., Kostrzynska, M., Emody, L., & Wadstrom, T.** (1993). High-affinity binding of the basement membrane protein collagen type IV to the crystalline virulence surface protein array of *Aeromonas salmonicida*. *Molecular microbiology*, 7(4), 593–600.
- Tsai, C. M., & Frasch, C. E.** (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 119(1), 115–9.
- Twine, S. M., Reid, C. W., Aubry, A., McMullin, D. R., Fulton, K. M., Austin, J., Logan, S. M.** (2009). Motility and flagellar glycosylation in *Clostridium difficile*. *Journal of bacteriology*, 191(22), 7050-7062.
- Umelo, E., & Trust, T. J.** (1997). Identification and molecular characterization of two tandemly located flagellin genes from *Aeromonas salmonicida* A449. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5292–5299.
- Vanderlinde, E. M., Muszynski, A., Harrison, J. J., Koval, S. F., Foreman, D. L., Ceri, H., ...and Yost, C. K.** (2009). *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, deficient in 27-hydroxyoctacosanoate-modified lipopolysaccharide, is impaired in desiccation tolerance, biofilm formation and motility. *Microbiology*, 155, 3055-3069.
- Verma, A., Arora, S. K., Kuravi, S. K., & Ramphal, R.** (2005). Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. *Infection and immunity*, 73(12), 8237–46.



- Vik, A., Aas, F. E., Anonsen, J. H., Bilsborough, S., Schneider, A., Egge-Jacobsen, W., & Koomey, M.** (2009). Broad spectrum O-linked protein glycosylation in the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(11), 4447–4452.
- Vila, J., Ruiz, J., Gallardo, F., Vargas, M., Soler, L., Figueras, M. J., & Gascon, J.** (2003). *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerging infectious diseases*, *9*(5), 552–555.
- Vilches, S.** 2007. Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas. Tesis doctoral.
- Vilches, S., Urgell, C., Merino, S., Chacón, M. R., Soler, L., Castro-Escarpulli, G., Tomás, J. M.** (2004). Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Applied and environmental microbiology*, *70*(11), 6914–9.
- Vilches, S., Wilhelms, M., Yu, H. B., Leung, K. Y., Tomás, J. M., & Merino, S.** (2008). *Aeromonas hydrophila* AH-3 AexT is an ADP-ribosylating toxin secreted through the type III secretion system. *Microbial pathogenesis*, *44*(1), 1–12.
- Wang, Z., Larocque, S., Vinogradov, E., Brisson, J. R., Dacanay, A., Greenwell, M., ... Altman, E.** (2004). Structural studies of the capsular polysaccharide and lipopolysaccharide O-antigen of *Aeromonas salmonicida* strain 80204-1 produced under in vitro and in vivo growth conditions. *European journal of biochemistry / FEBS*, *271*(22), 4507–4516.
- Wang, Z., Li, J., & Altman, E.** (2006). Structural characterization of the lipid A region of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* lipopolysaccharide. *Carbohydrate research*, *341*(17), 2816–2825.
- Wang, Z., Li, J., Vinogradov, E., & Altman, E.** (2006). Structural studies of the core region of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* lipopolysaccharide. *Carbohydrate research*, *341*(1), 109–117.

- Wang, Z., Vinogradov, E., Larocque, S., Harrison, B. A., Li, J., & Altman, E.** (2005). Structural and serological characterization of the O-chain polysaccharide of *Aeromonas salmonicida* strains A449, 80204 and 80204-1. *Carbohydrate research*, 340(4), 693–700.
- Watnick, P. I., Fullner, K. J., & Kolter, R.** (1999). A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *Journal of bacteriology*, 181(11), 3606–9.
- Whitchurch, C. B., Leech, A. J., Young, M. D., Kennedy, D., Sargent, J. L., Bertrand, J. J., Mattick, J. S.** (2004). Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 52(3), 873–93. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04026.x
- Whitfield, C., Amor, P. A., & Koplín, R.** (1997). Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Molecular microbiology*, 23(4), 629–638.
- Wilhelms, M.** 2011. Motility, regulation and host-cell interaction of *Aeromonas hydrophila* flagella. Tesis doctoral.
- Wilhelms, M., Fulton, K. M., Twine, S. M., Tomás, J. M., & Merino, S.** (2012). Differential glycosylation of polar and lateral flagellins in *Aeromonas hydrophila* AH-3. *The Journal of biological chemistry*, 287(33), 27851–27862.
- Wilhelms, Markus, Molero, R., Shaw, J. G., Tomás, J. M., & Merino, S.** (2011b). Transcriptional Hierarchy of *Aeromonas hydrophila* Polar-Flagellum Genes. *Journal of bacteriology*, 193(19), 5179–5190.
- Wilhelms, Markus, Vilches, S., Molero, R., Shaw, J. G., Tomás, J. M., & Merino, S.** (2009). Two redundant sodium-driven stator motor proteins are involved in *Aeromonas hydrophila* polar flagellum rotation. *Journal of bacteriology*, 191(7), 2206–2217.

- Yáñez, M. A., Catalan, V., Apraiz, D., Figueras, M. J., & Martínez-Murcia, A. J.** (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(Pt 3), 875–883.
- Yu, H. B., Rao, P. S. S., Lee, H. C., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J. M., & Leung, K. Y.** (2004). A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infection and immunity*, 72(3), 1248–56.
- Yu, H. B., Zhang, Y. L., Lau, Y. L., Yao, F., Vilches, S., Merino, S., Leung, K. Y.** (2005). Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4469–4477.
- Zhang, Y. L., Arakawa, E., & Leung, K. Y.** (2002). Novel *Aeromonas hydrophila* PPD134/91 genes involved in O-antigen and capsule biosynthesis. *Infection and immunity*, 70(5), 2326–2335.
- Zywno, S. R., Arceneaux, J. E., Altwegg, M., & Byers, B. R.** (1992). Siderophore production and DNA hybridization groups of *Aeromonas* spp. *Journal of clinical microbiology*, 30(3), 619–622.

7. ANEXO



## 7.1 Secuencia nucleotídica de la zona *neu-flm* adyacente a la región 2 de flagelo polar de *Aeromonas hydrophila* AH-1

Los codones de inicio están marcados en negrita y cursiva, mientras que los codones de parada están en negrita y subrayados.

*flaA*      →

1    ***ATG***GGCATGT TTATCACCAC TAACGTTTCA TCACTCAACG CTCAGCGTAA  
51    CATGATGAAT TCGACAAAAT CACTGGATAC ATCCTACACC CGTCTGGCAT  
101   CTGGCCTGCG CATCAACAGC GCCAAAGACG ATGCCGCCGG CCTGCAGATT  
151   TCCAACCGTT TGACCTCCCA GATCAATGGT CTGGATCAGG GGAACCGCAA  
201   CGCCAATGAC GGCATCTCTT TGGCACAAAC TGCTGAAGGG GCTATGGATG  
251   AAGTCACCGG CATGCTGCAG CGCATGCGTA CTCTGGCACA ACAGTCGGCT  
301   AACGGCTCTA ATTCAGCCAA GGATCGTGAA GCCCTGCAAA AAGAGGTTGA  
351   TCAACTGGGG GCAGAGATAA ACCGTATCTC TACTTCCACC ACTTTTGCAG  
401   GAACTAAATT GTTAGATGGC ACTTTTAGTG GTGTTTTCCA GGTGGCGCT  
451   GATGCGCAAC AAACAATTAG CTTTGGCTTG GATCAATCGA TGGGATTCAG  
501   TGTCTCCGGG ATAGCTAAGG CCGCAGGTAC AGCCGTTGAC ATGGGAACCG  
551   TGATTGGTTC GGCGTTTGAT GTCACAGCAA TATTTGCCAG TGTTCCGCT  
601   GGTGGGATTA GCATCAGCAG TCAAAGTAAT GCGCAAAACG TGTTGGCTGC  
651   TGCAGACCTG ATGTTGGCAG TTGTAGATGG TAAACGAGCC GAACTGGGGG  
701   CGGTACAGAA TCGGATGGAT TCGACCATCC GCAATCAGGC CAACATCTCG  
751   GAAAACGTCA GTGCTGCTCG CTCTCGGATC CGTGACGCAG ATTTTGCTAT  
801   CGAAACGGCC AATATGACCA AGCAGAATAT TCTGCAACAG GCTGCCTCCA  
851   GTATCCTGTC GCAGGCTAAC CNGCGGCCTC AGTCTGCACT TCAACTGCTG

*flaB*      →

901   CAAGGC**TAAA** ***TG***GCCATGTT CATTAACTACT AATACCTCAT CACTGAACGC  
951   CCAGCGTAAC TTGATGAATA CCACCAAATC TCTGGATAACC TCATATACCC  
1001   GTTTGGCATC TGGTTTGC GC ATCAACAGTG CAAAAGACGA TGCGGCGGGG  
1051   CTGCAGATCT CGAACCGTTT GACCTCCAG ATCAATGGTT TGGACCAGGG

1101 TAACCGCAAC GCCAACGATG GTATATCTCT GGCACAGACT GCCGAAGGGG  
 1151 CCATGGATGA AGTCACCGGC ATGCTGCAGC GTATGCGTAC TCTGTCACAA  
 1201 CAGTCTGCCA ATGGTTCGAA CTCAGCCAAG GATCGTGAAG CTCTGCAAAA  
 1251 AGAGGTTCGAT CAGCTCGGTT CTGAGATTAA TCGTATCTCC AGAGATACTA  
 1301 CATTTCGCGG CACCAAATTG CTGGATGGTA CATAACAGG GGTCTTCCAG  
 1351 GTTGGGGCGG ATGCACAACA AACCATAAGC TTTGGCTTGG ATCAATCGAT  
 1401 GGGATTGAGT ATCTCGGGTA TTGCCAAAGC TGCGGGTACA GCCGTTGACA  
 1451 TGGGGACTGT GATTGGTTTCG GCGTTGGATG TCACGGCAAT ATTTGCCAGT  
 1501 GGTTCTGCTG GTGGGATCAG CATCAGCACT CAAAGTGGTG CACAAAATGT  
 1551 GTTGGCTGCT GCAGATCTGA TGCTGGCCGT TGTAGATGGC AAGCGTGCTG  
 1601 AGCTTGGTGC CGTGCAAAAC CGCTTGGACT CCACCATTCG CAACCAGGCA  
 1651 AACATCTCGG AAAACGTTAG CGCAGCACGT TCCCGTATCC GTGATGCAGA  
 1701 CTTTGCCTGCT GAAACTGCCA ATATGACTAA ACAGAATATT CTGCAACAGG  
 1751 CCGCATCCAG CATTTTGGCT CAGGCTAACC AGAGACCGCA GTCTGCTCTG

*flaG* →

1801 TCCTTGCTTG GATAATGAGT AGACGGCTGA CTAAGATGGG AGGGATAAGA  
 1851 **TG**ACAACCTGA AATAGGTAAT CTGTCATCTG CCAATGGCGC TTCCTTACAG  
 1901 CAAAGTGACA AGAGCGGCCA AATGGCCGCT CAACTGCTTT CTGGTTCTGT  
 1951 GGAGGATACA GAAGCTGTAT CGCAGAAAAGA TAAGGAACCT AAAGATGTTG  
 2001 CTCTTCAACA AGAGCAGAAT CGGGCAGAAT TTGAAAAGCA GGTACAGAAC  
 2051 TTGCAGGACT TTGGGAAGAT GCAGGGATGG ACCGTTAACT TTAGCATGGA  
 2101 GCAAGAGTCT GGACAGGTCG TCATAAAAGT GCTTGATTCTG GATACTCGCT  
 2151 CAGTTATTCTG CCAAATTCCA ACTGAAGAAT TGATCGCTAT CCACAAGCGG  
 2201 ATCCAGGCGT TGCAGCAAGG CGAAGCGGGG GCGAATCCCA AACTCGGTCT

*flaH* →

2251 ATTGCTTGAT AGCGAGATTT GAATCGCATT GATGAGGAGA AGAAAA**ATG**  
 2301 GCCATTACTT CTGCCGGGGC AGGTTCTGGA ATTGACCTTG AAAGCGTGAT  
 2351 TTCTGCTAGT GTGGCAGCTA AGAAGGCTCA GCTACAGAAA CCTATCTTGA  
 2401 CCAAGCAAAA TAGTACCCAA ATCAGCATAT CTGGTCTAGG TCAACTGAAA  
 2451 TCATCTCTCA CTGCGTTTAC CGACATTCTT GATACCCTGA GCAAACCCGG

2501 CGCTTTCAAC AAGCGAGCTG TCAATATCAC TCAAGACAAA GACAATCCAG  
 2551 TGATGAAGGT GGAGAGCAAA AGTGGTGGGT CTAATGGTCA GTACAATATA  
 2601 ACTGTCAATA AATTGGCGAC CACTAGCCGT TTTGAAGGTG AGTTCAGCAG  
 2651 TTCGACCACC TCACTTGTCA CTCAAGATGG TCAGTTGACC TTCACTGCTG  
 2701 GTGATAAGGT GTTCAAGGTT GATGTTAAAG CTGGTGACAC CTTGCAAGAT  
 2751 ATCCGTAAAA GCATCAATAG CAATGGTGAT AACTTTGGTC TTAGTGCGAA  
 2801 TATTGTTAAT ACCGCAGGCG GTAAGGCAAA ATTTGTTATC GATTTCAGGGA  
 2851 TCTCGGGAGA TGGTAAGGAT TTAGTTATTA CTGGAGATAA CTCGGAGCTG  
 2901 AATGTTTTTTG CAACGGGAGC TACTGGTACC GTGATGAACC AGACGCAGCC  
 2951 TGCTAGTAGT GCTGAAATTA TTGTTGATGG AAATACGCTT AAAAGTGATA  
 3001 CCAATGTTTTT TGATGACTCA ATCCAGGATC TAAAAGTTAC TGTGCTGAGA  
 3051 GTTTCTGATA AAGAAAGTGA TGGTTCTCTT AAATCCAATA AAGTTGCAAT  
 3101 AACGACTGAT AAGACAGCTA TTCAAGATAT GGTTAAGCAG TTTATTGATG  
 3151 GCTATAACGC TTTGCAAGAC AAAATGGATG CATTGGGTAA GCGTAACAGT  
 3201 ATTGTTGGTG GTGTCAGACA AGATGATGGT GGCGCTCTTG CCGGTGATGC  
 3251 AAGCACTCGA ACTATTAGCA ATTTTATGGC AAATACTGTC ACGAGCAAAG  
 3301 CTGGAACGAG TACAACCTAT TCCACCATTT TTGAGGTGGG CATAAAAATG  
 3351 GATAACAAAG GAAAGTTGTC TCTTGACAAG AAAANGTTCG ATGAGGCTGT  
 3401 TGATAAGAAC TTTGATCACG TTGTTGGCCT ATTTGGCGGT GAAAAAGGAA  
 3451 TTGCAGCAAC CTTGAAGTCA GATCTGAAAG AGTATTCTAA ATCTGGCGGT  
 3501 ATGCTGGATC AACGAACGGA TGTTCCTAAAT TCTGATTTAC GTAGCCTTAA  
 3551 TCAAAAACAG GCTATATCTA ATGCGCAGTT AGTGAAATAT GAGGCATCAC  
 3601 TACGTGCTCA ATATGGTAGC CTGGATGCGT TGCTCGTGAA AATGAATCAT  
 3651 TCCGCGGCAG CATTACAATC ACTGCAAGTT AACAACCAGA AGTAAACATA

*fla.I*       $\longrightarrow$

3701 CATTAAGAGG ATACAGTGAT **GT**ACCAGCGT AACCTGAAAG CATATAAGGC  
 3751 AACAAGTGTC GCTGCTGATT TAGCCGTTGC CGATCCTCAT CGAGTTATTC  
 3801 AGTTAATGAT GCAAGGCTTT CTTGAGAAGC TGGCTCAGGC CAAAGGTGCT  
 3851 ATAGAGCGAC GTGATATGGA GGCGAAAGCG ATTGCTGTTT CCAAAGCTCA  
 3901 AGGGCTATTG CATGGGTTAC AAGATGCTCT TGATATGAGT CAGGGAGAAT



3951 TGGCTGAAGA TTTGTATCGA CTATATTCTT ATATGGATGG ACGAATTTGG  
 4001 GATGCTAGTT TGACCTTGGA TTCAACTCCA ATTGACGAAG TGATAGCGTT  
 4051 GATGATTACG ATCAAGTCAG GTTGGGATCA ATTATCTGAA GTAGCTAAAC  
 4101 AACAAAGGCTA TCAAATGAGA CAACAGCTAG GGGAGTTATA ATGGCTACTC  
 4151 TGGCCTCTTT GCAACAAAAA TTTACAGAGA ATTGTGCTCA GATAAAGTTT  
 4201 TTCTTGGAAT TAAAAAACTA TGATGGAGCT CTAGTGGCTA TGGATGATCG  
 4251 ACTTATCTTG ATTGATCATC TATTACGATT GGTTCGCGAT GAGCCAAGCT  
 4301 TGGAGCAGGA GGTAATTCTG TTGGCGGCGA TGCTTTCTCA GCAAGAGGAA  
 4351 AGCATGAAAA ATTTAGCTTC TTATCATCAT CAGACAGTAT TCCAAGAGCT  
 4401 CTCTTCAATT GGAATGGCAA GTAAGGTTAA GAAATTTTAT AGTGTGAATA

*maf-1* →

4451 GCAAGGAGTT CTGATGTCAA AAAATATTGA CGATATTTTG AAAAAAGCCG  
 4501 AGTTTGATGC CTTAAGACTA AAAAAAAGAG CAGAGCAAGA GGCTGCTATG  
 4551 TCGGTTGCAT TGCCACTTCG CTATTCACAG AGCATAAAAAG CATTTTCGCAA  
 4601 GTATATCCCC CATATTGCAG ATATATATGA GTCATATCAA CCGACTCGCC  
 4651 CGTTTAGATT TTTTTGCAAT GAGAATGGTC AGCCGAATGT AGCTTGGCTT  
 4701 GATGATGATA TTGCTGTCTA TGGAGATGAA CCATATCTTG CTTGTGAAAC  
 4751 GTTGGTTAAA GAATTCATGG CTAAGGGAGT TCTTTCCAAG TTATCCTTTA  
 4801 GCCAAGAAGA TAATCCATTA GGATTTATGC ACGTGGAGTA TCTAAATAAG  
 4851 ATTAATGCGT ATTTTGAAGA TATTTCTTCC CAAGATGATT TACTACACAA  
 4901 GGTTCCAAAT GAGGTTCTTA GTGCCTTGAT ATTTGGAGTC GGTCTTGGCT  
 4951 ATCACCTTGG CTATCTTTAT GAGCAATGTA GGATTGGTAC GCTGTTTCTT  
 5001 TTTGAGCCTG ACTTAGATCT TTTTATGCA TCTCTTTTTT GTTTCGATTG  
 5051 GGCCCCTCTC TTAGATTATC TTCATCAGGA AAACCTTGGT TTACATATAT  
 5101 TATTAGGGCA GGACGAGAAA TCTATTATGG CTGATTTCCG TGCTGCAATT  
 5151 CATAGCCGAG GAATTTTTCT CATAGCGAAT GCTTTTATCA TGTGGGGATA  
 5201 CCAGAATGAT GCAATAAAAA ATCTAATGGA AAAAGTTAAG ATTGAATATT  
 5251 ATTTATTGGT CATGGGATGG GGATTCTTTG ATGATAATCT AATTGCTCTA  
 5301 TCTCATAACAG TAGAAAATAT TAGTAGAGCG GTACCATTTT TAAAGGTAAA  
 5351 TAATAAATTA CCATCAAGGT ATCATCATGT ACCAATATTT ATCATTGCCA

5401 ATGGACCATC TCTAGATCTA TCTTTGCCAG TTATTGAAAA AAATAAAGAT  
5451 AGTGCAATAT TAATATCTTG TGGAAGTGCA ATCTCAGCTT TGCATAAAGT  
5501 TGGGATAAAA CCAGATATTC ATGTAGAAAC AGAACGGACT AAAATAGTTT  
5551 ATGATTTTTT AGTCGGCATT GATGATCATG AGTATTTACG TGATATTGTT  
5601 TTTATTAGTA CAGATGTCAT TCATCCTTAT TGTGCTACAT TGTTTGATAA  
5651 TTCAGTTTTA TTTTTTAAGG CTAGTGAACC CGGTGTTACT ATTTGTCATA  
5701 TTAACCTTCC TCATGCAAGA GAATACACTT CAATTGGTGG TGTCAAATCCA  
5751 TTAGTTGGAA ATATTGGTGT GAGTATGCCG ATCCACCTTG GGTTC AAGAA  
5801 TCTATTTTTA TTTGGACTGG ATAGTGGTTA TAAACAAAAG GGGTATCATC  
5851 ATTCAAAGTT TAGCGCCTAT TATAATAGTG CCGAAGGTGC AGAGGCTCTT  
5901 GGTGACCTGA TGTATGGTGA TAGCCAATGG CAGCATGAGG GGAATTTCCG  
5951 TGGTGTGTG ACAAGTAATG CCATGTTTAA TACATCTCGC CGCGTTATTG  
6001 AACAAATGCT GGCTGCACAT GAACATGTTT ATTGTTTCAA CTGTAGTGAT  
6051 GGCGCCAAAA TTGAAAATGC TAGACCACTT CCAAATAGTG AAGTTGTTTT  
6101 TTATGAAAAG ATAAATAAGA TTGAGCTACT TCATCAGATT ATAAAGTTAT  
6151 CAGCACCGAT ACCTTTGTCA AAAGAAGACT TCAAACCCTA TCTTGATGTA  
6201 GAGTTCTTTA ATATCTTAAT AGACAAGATG ATTGATGAAT GGCAACNAGA  
6251 GTTCTCCTCT AGGAATGAAC TAAACCAGTT AATGCTGCGA AACTTTGGCT  
6301 ATTTATCACA AATAGCAGTG ACTCGCCAAA AACATATATA TCAAGTTATG  
6351 ATCGGTTCAA TGAATTATGT ATTCACATTG TTAAGCTCTA TTCTTTATTC  
6401 CTTTGAAGGA GAGAGGAAAA CGATGGAGCT GATGAAGCCA GCAATAAATT  
6451 TATGGATAGA TTTTTTAGAG AAATTA AAG AGATGTATCC AAGCGCATT A  
6501 GACAGTGTCTG ATTTGGTGG AATGCATGG ATGAAATTTT TTAGAAAATA  
6551 GAAATAAATG CCGACGATAT GTCGGCATT ATTTATAGTT CATATGGATT  
6601 GTTGGCTATA AGAAGTTGTT CATTTTTTTTT GATAATTTGT ACTGAGACGA  
6651 GTGAGTCAAG CATAAACTCA GAGTGT TTTAT CATGATGCTG AACCAACTCA  
6701 ANGATACGAT GGTATGCTGG ATGCCAGCAA AGCATATGAC TGTAGTTCAT  
6751 TTTATAACTA TAGACATTGT TTTGATGTAT GTATTTATTT CTGTAGTAAC  
6801 CATGAGGTGG ATGAAAATCT ACAATAGCAA CGACACCTCT GTCTTGAAGT  
6851 AGTTCATGGC AACGGCTCGC TATTTTAAAT AGATCATTAG GCTCACATAG

6901 ATATAGACAG AATCCAAAA TAATTAAGTC AACAGGTTCT ATTGTTGGGA  
 6951 AATTATCTGC CGTTCCTGA GTAAGTTGTA CATTCTGATA TATCTTCAAA  
 7001 CCATCCTTAA TTGCTGTGAG TGATGGGTCA ATACCATATC CGGTAGCATT  
 7051 ATAATGTTTA GATAAAGCCG AACTCTCCA TCCATTGGCG CACCCAATTT  
 7101 CTAGAATTCT TTTGGGATTG AAGTTCACTT GTTGGAGCGC TTTGAAAACA  
 7151 AGATCATCCT GAATTTTTTT ATGAATATAG CCATGCTTAT TTCGTTTATA  
 7201 CCAAGAGTTG CCTTCTTGT TTATAAATAT ATCTTTCTGA **TTCA**TGATTT

← *orf6*

7251 ATCCATATCT ACAGGCAAAT GATGTTTTTTG TTGGTTTAAT AGTAAAGATG  
 7301 GAATTAGTAT TTTACCTTTC CAGCCTAAAC TAATGAGTTC CGATGATATT  
 7351 TCTTTATGGA AACCTGATGT TATAACCATC AATGATTCCG TACTATCTTG  
 7401 ACTAATTAAT GATGATACAA CATCTGGTGC ATACTCAATA ATAATAGATG  
 7451 AGCCAGGCAT TCTGCTTCCC ACCTTGCTCA TGTTCCTATC AATTATTCTG  
 7501 CTAGGCTCTA ACTTGCATAC TGACATGATT AGAGTGCAAT ATGATCCAGC  
 7551 TCCCCAAAAG ATCAAGTCTT TGCTATCGAC ATGATGTGAC AGTTGCTCTT  
 7601 GCCATGCTGT AATACATCGA GAGTAGTTTC TAGTATCTGG AGCCGGAATG  
 7651 ATATTTTCCG TGGTGTGACT ATTGAGCATA TTAGTAGAGG TAATACCACG  
 7701 TTCAAAAAC ACTAACCATAT TACCTAGCTC GGTGATATG GATTGCTGAT  
 7751 ACCTCCAGTT AAATGTCGAT GCCAATTTAA TTAAAGAGGA AAGAGAAAAC  
 7801 ACGTGTACAT GTTCATGGTG AAAAGGATCT AACGAGTTAC CATCTAAATF  
 7851 CTTTTCTAAA GAAGGTGTTT CAATTAACAA GTAAGACTCA GGGTTTGCAA  
 7901 TATTAGACAT GCCTTTAAAA AATTCATTAA AATCGAAAAT ATGTTCTATC  
 7951 ACATGACGGT GATATATTAT GTCAAAATAT TGATTTTTAT TAAGCAACAA  
 8001 GAGGTTTTTG GAATTTTCAT GAGTGAAAAA ACAGTTTGAT ACTTTAAAGC  
 8051 CTAGGTTGTT GCATATAGTT GCATTTGCGA TATTTGGTTC ACACCCAAAAG  
 8101 TATGTATCAT TAGGAAAGGT ATTTTTTAAA TCTTTTAGCA TTTGTCCGGA  
 8151 AGAGCATCCT ATTTCTAAAA CAGTAAGGTG CTCATGGTAA ATTAGTTCCC  
 8201 TAACATTACG GTACAAATTA ATAAAATCAT TCCGTTGTGA GTATGCAATA  
 8251 TTTGCAGCGT CTGCCCCCA ATAATGATGT CGATATATGT CTTCTAAAAAT  
 8301 ATCCATATCA TAATCAGGGA TAAATGCATG CCCACATTCC ATACAGCAGG

8351 CATAATCTAG GTCACGATAT AGTTGTTCAA CATCATCTCC TACCGCATGC  
8401 AAATAGATAG GAAAATCAGG TATTGAAAGA AAAGAATGTA GTCTGGTTGA  
8451 TGAGCATACA GGACAAGCAA TAGCTCTAAT ATTCTTTATA TACATG**TTAT**  
8501 TCCTTATTTT CAAAGTCAGA TAGAAGAAAAG GCGCGACCAA GTT**CATTCAG**

← *orf7*

8551 TTTAGGTTCC ACCCAAGCTC GAGATGTGGT ATCTAGAAAA ATTAATGGAT  
8601 CTTTATGCAG CTCATTTTTTA AGCACGTCTA CACAAGCTCT TGCATCTACA  
8651 TAGAAACCCA ACTTAGGGTA TCCATTTACA AGCGGTTGGA GCACTCCTTT  
8701 ATCTCGTAAT ATATTTTCTA CGATTATCCA ATCGTAATCA AGGTCACATC  
8751 CCCATGGCCT GACATGTGTA GTCCATTCTA TATGATGGAG GATACCATGA  
8801 TCATCAATGA GTTCTCCGGA GAAGGATTTT TTATAGCGAT AAGGAACGCC  
8851 TTCAATTTTG CTTTCTATAT AATGTAAAAA TGTCAGAGAG CTTATTCTTG  
8901 CACCATACAT TACTATTGCA CCACCTCCTT TCTCCAAGTA GGAGAAAATA  
8951 GACTCCCTGC CAAAAGCATC TAAGTTTTTA GTTGGCTGGA AGGGTGCATT  
9001 CCCACGGCCT AAAACAGAAA ACATTGGATC AAATGATCTA TAGTTAGCCC  
9051 AATTGCATTC ATGTAGATAC TGGTTAAGCG AACCAACCTC TATAGGTGCA  
9101 GTTCGCAGGT CTAGCTTTTT CAATTTTGGGA AATTGATAAT TAAAGGCTGG  
9151 GATTAAACAG TTAATTGGTA ATGTATTAAG AAATTCCTTG TGTGACTCAA  
9201 GTGGATTCAT TTCTTCTGTG TTTGCAATGA GAGGTTGTGT ATATAATATA  
9251 TCAGTGTGAA TTAATGCAGG CCTCCCTTCA TAGTCACGTA AACTAGATTT  
9301 CATAATATTC TGCAATATCC GAGCATCGCT TTTATTTTTT TTGAGGAACT  
9351 NAGTTTTTGA TAAACTATTC TTTTCAATTA GAACATCAGC TTTCTTGCTA  
9401 TGGAAATTTG CTTCTATCCA ATTAGATATT TCTCTGAAAG ATGTTAGTTC  
9451 ATCAAATATA GTCGATGGTA TATTACAGTC TAACTCTAAC TCTAATGCCA  
9501 TGATTAATCT TATTTGCATG AGTGAATCCC ACTGGGGAGT ACTTGCTATA  
9551 GTGGCATTAA AAATTTTCTG AGGTGTAAGC ATGGGCATTA AATGATGAAA  
9601 TACACGCTCA AGTTTTTCTG CATTAGCCAG TGAGCTTGAA TTATTAGTTT  
9651 TTTTTGCTAA ATCATCCAAA TCATCCAAAT CATCCAAATC ATCCAAATCA  
9701 TCCAAATCAT TGGATAATGA TGGTTTATAT GTTTTCGGAT AAGCTTCTAC  
9751 CAACTCCATT AATCCATGAG TTTGGTGTAA GATAAATGCT ATTCTGCGAT

9801 CATCGAATGC AGGGTCTGGT GTTGGAGCAA CCATGCATGT TGCCCCCAT  
 9851 TTTTTTGCTA TATCTAGTGC TATATCTATA TCATCTACAG CATAACAAAT  
 9901 GTGGTATAACC CCACCACCTC TTGATAAATG GCCACGAATA GGGCTCTTTT  
 9951 CGCTTAATGG AGCAAGGATC TCAAAAGTTA CCCCTCCAGA TACTTGAACG  
 10001 AATGCATAACC TCACATCTTG AGCCGTATTT AACTCGGCC CTTTCCATAA  
 10051 TCTAGCTCCG GGCAATGAAA TATAATCTGC TAGTGTTTTT TCTAGATTAG  
 10101 TTGTTGTCAC AGCAATATGG TCAATATATA GAACGCCTAT ATGTGACAAAT  
 10151 AATGTAATGT TTTTTTTGTG ACAATTTAGCC **ATT**GTTTGAA ACCTCTAGCC

← *orf8*

10201 ACTCTGGTGT GATGGCATT A TAACTTTCA AGTTATAGTA ATATTCATTG  
 10251 TTACAAGACA AAGTGAAACC ATGCTTAGAG TAGATATCTG CAGCTGGTTT  
 10301 ATTACGCTCT GTGGGTATAA ATAAACCACG CAGAGCGTTA AAACCATTGA  
 10351 CTTTGGCATA GTTCATTGCC CATAACAAGG CTCCTGTCTC GATGCCACGA  
 10401 CCAAGAACCC TGCAAGATAG AATGAAAGTT TCAATGTCTA GTATATCGTT  
 10451 ATTTTGTGGT TGCAGAATCA GTACGCCAAT GATTTTCATTA CTAATATATC  
 10501 GATCACTTAA ACTTATTGTG GCTATATGTG AACCATTCTG CTGCAGGTGC  
 10551 TCAAGTTCTA CTTCACTATG TCGTCTAGTT GTTGATTGA ATTGGTTTGT  
 10601 CTTGCTATT AATTGAAGTA TTCTTTGCTT ATTTGAATCT GAAATTGGGG  
 10651 AAAAAGACAA CTTTCTCTGT AAACTTTTTA AGTAATCTAA CTTGGAGGTA  
 10701 AATTTATTTT TGTCTGAGAG AGCTAGTTGG CGTGACTTGT ATTTTGTACC  
 10751 TCTGACTTTA TCTTCCTCAG TAAGGGATAT GCTAGCAAAA CAGGGAAGAG  
 10801 AAGCAATAAA ATCAGCATAT TCTGTAATGT CATCGGGCAG CTCAGGTACG  
 10851 ATGACTTCAG GTAATGAGCT GCGGACTTCC TCACGTTTAT AAAGGCTATC  
 10901 ATCAATGAAA CATAATGAAG AAAGACCAAC CCCAATCTCC TGAGCGATCT  
 10951 CGCGAATATT ATCTGATTTG GGCAGCCAGT TTATTTTTTTT TATAAGAAAAG  
 11001 TCATCCTCCC TTAAAATCAT ATCAGGATGA CAATTTATGG CTTGCAAAGC  
 11051 TATGTTTTCA GTATTTTTTAC TACATATCGC CAATATTATT CCTCGCGTTG  
 11101 CTAACGCTTT TACTACATGC TGTACTGCAA CGAATACATT GCCTGGGTAA  
 11151 TCCGAACCTA GTTTGATAACC TGAAATCCCA TCATCCCCAA TAATTCCTCC  
 11201 CCAAAGAGTA TTATCTAAAT CGAGAATTAG CACTCTAGCT GTTTTCCCTA

11251 GCAGTGCTTG ATGAGCGCTA ATCATGCAAT CTATCAACAT GTCGGAAAAC  
 11301 TCTGGAGTNT ATGAGAAGCG TCCAAGAGAC CAATNTTTTA GGGACCAAGC  
 11351 ATTTTCACTC CCTTTAAAAT GCAAACAAGC AGAGAGTGGT AAAATATGGC  
 11401 AATCAGCGAT TTCACTAGAT AGCTGTACAA GTTTTTGGTT TGCATTAATA  
 11451 ACCAGCTTTG TTAAAGATGA GTGATCCCTA TATGCAGTAT CTGTTAAGCT  
 11501 TTGAACGAAA ACCTTTACTG GCGAAAAATC GAAGATAAAA AACATTCCGT  
 11551 CTAAGTGAGA TCTAGCTTCA CGAATAGAAA GTATATAATC CTCTATACGC  
 11601 TGATATATTT CTGTGTCCAG AGACTCATCA TATTGACTAT CGGATTCTGG  
 11651 CAGCAAGTCT TCAATGCGCT CACAAAAAAT GCATATATTG GGATTGCCTT  
 11701 TCCTTAAACA TGATTCTTCA TCTGTCAGTT GTATCCGGTA TTGCCCAAAT  
 11751 GGAATGTCAA TTATTTTCCA TGAAGAGAAA TACAGCTCAG ATGTTCTTCT  
 11801 TTTTAAGTAT TCAGCCGCTA AAGTCCAATT TGCCTGCCT AAAAATGCAG  
 11851 CGCTGGGAAC ATATGATGTA GTCATGAAAAC TTTCTCCATA ACACCATGAG

← *fkbH*

11901 TAGTTAATTT ACGACACCAA TCTATGCATT CTTGTAATGG CACTCCGGTA  
 11951 ATGTCTGAAA TTGAAATACA ATCATTCTCT CCATCAGAGT AACCAATAAC  
 12001 ATTCATCATG TTCTCAACTA TTTTTTGGGT ATTTGCTGTG CTTGTCTGTG  
 12051 GATAAAGGCC ACGTTTGCCT AGTTGGGGTT CACAGGGGTG AATCATTCTA  
 12101 TATGTATTAT TGCCTTCTAT TGCCAAGAGG CATTGTTGTA GGACACCGAA  
 12151 TCCTCCTGCA AGTCCTGTTG GCGTCACGAG GTTAAGGTCA TCTAATGAAG  
 12201 TATGATATTC AGGATAGCAG CCATATTTGC TTCTCATCAC AGATGCAATT  
 12251 GGTAATCAA CACCAGGACT ACAGTATTGA CGCTCGTCAC TGCCTCGCTG  
 12301 TAAGTATGAA TACTTTATAA AGTCAGGTGA AACGTCTCGG AGCACTAATA  
 12351 ATGCAGCCCT GTCAGAAATC GAGTTCCCTT TCCTAGATGG TAAGAATGAA  
 12401 AATGTGCGTT CGTCACCTAA ACATGTCAAT ACATACCCTG CAACAACATT  
 12451 CTTTTTTAAA TGTTCTATAT GTTTACTTAG GTATACAATT GCTCCAATCG  
 12501 TTTCTGGTAC AAAGACAAAT CTATATGTAT AACGTCTACG ATGTAAAGTC  
 12551 TTTAGCCATT GAGCTAATGC TAAAGCGACA ACGGGGCCAG AGAGTTCGTT  
 12601 ATTTGCCATC GAAGGGTGGC AGATATAGGT AGATAAAAGG ATCTCTTCTT  
 12651 CAGTCTCACC TGGAAGAATA AAATCAGCAT AATTTAACTG GCCTGGCTCT

12701 AGCTCACTAT CTATTTTTAC ATGAAGCGGT TCATTAGGTG GTAGCTCATT  
 12751 AAATTGATTT TGAGTTAGAC AAAACCCCA GTTTTTTGCG TAATATGATG  
 12801 TCACATAGGG TATTGCATCA GGTTGGTTTG GTAGTGAAAA CAAATTTGGT  
 12851 TGTAATTGTT CTTTGGTCAT CCATGTATCG ATAGGGATAG AGTATCCCAT  
 12901 GACATGAAGG TTATTATTTT NTATGTTCGAT TAATTTTTCG TTTTGTCTGT  
 12951 TGGCGATCCA AGCTTCTCTG ATATTCCATT CATCTGGAAC GGTCCAGTCA  
 13001 AAAATGGATG AGCCAGATGC AATTGCGTGG ACATTCAGTT CTGGTAACTC  
 13051 TTTTTTAATA TAGTCAAGAG TTTTACGGAC ACCATTTCCA GTGAGGCTAC  
 13101 GATGAATAGG AAAAAGGTCA TGCATCCATT TGTG**CAT**TTT GCTGTCCAAT

← *orf10*

13151 CTCTGCGCTC ATTTGTATCC CTGTTTTATT TTCAATTGAT TGATGAATAG  
 13201 TTAGTATATA ACTTAGGCTA TCTCGATATT TTTTAAGTCA CGCCTTGTA  
 13251 ATAGTGTTGT ATCATCG**CTA** TTTACTAATG AAATCATTA GTCTGACTGC  
 13301 TTTGCCTCGT CTGATATCTG TTCTGGTTAT TTTCCCGATA ACTATGGGGA  
 13351 GTGCATCTGG AGGTAACCCA TAACCTGGCC GGATTTCGCCG GATGTGTTCC  
 13401 GGCTTTATGG TGGTACCCGC AGGAATGTCG GCAACAAAAT ACAGAGAACG  
 13451 ACGGAATCTC AGGTTTGCTT GTTCAGCCTG GTTGTACCA CTTTTTCCTG  
 13501 ACCCCAACGC TTGCCAGCAG AGTTTTGCCT GGCTGCAGAG CTCTTTCAAT  
 13551 TCATGTGGTT CAAGAGAGAA TTCTGCATCC GGGCCGCCAT CAGCGCGAGC  
 13601 CAAGGTCAAG TGTTTCTCGA TGGCCACAGC ACCCAATGCG ATTGCCAGCT  
 13651 GAGCGGCGGT ATTCCCCAGC GTGTGATCAG AGAGACCAAT AGGTA CTGAA  
 13701 AATGTCTCTG CTAAGCGGGT AATCCGCTTG AGATTGATAT CGGCAAGAGG  
 13751 GGTGGGGTAG CCACTGACAC AGTGAAGCAG CAGGATCTGT GAGCAACCAT  
 13801 TTTACGCAA AATGGTCAGA GCCTTGCAA TTTCAATTT AGTCGACATG  
 13851 CCAGAAGAGA TAATGACCGG CTTTCCTTGC TGAGCTATGT AGCTGAGCAG  
 13901 GGAAGGTCG GTAATTTCTGA ATGAGGCAAT TTTGTATGCG GGAGTACCCA  
 13951 GCTCTTCTAA AAAATCAACA GCACTCTCGT CGAAGGGGGT GGAGAAAATG  
 14001 GTCAATCCGC GTGACTTGGC TCGTTCAAAG AGAGGCTGGT GCCATTTCCA  
 14051 CGGGGTATGG GCCAGGGTGT AGAGATCGTA AAGGGTATGG CCATCCCATA  
 14101 AACCGCCCTG AATATGAAAA TCCGGCAGAT CACAGTCGAT TGTCATGGTG

14151 TCAGCGGTAT AGGTTTGCAG CTTGATGGCA TCAGCTCCCG CATCGGCAGC  
 14201 CGCATCTACC AGCGCCAGTG CCCTATCCAG CTGGCCATTA TGGTTGCCGG  
 14251 AGAGTTCGGC AATGATGTAG GGCGGGCTAT TTGGGCCTAT CTCGCGGCCA  
 14301 TTAATAGTGA ACTGAGG**CAT** GAAACGTCTC CTTGGGAGAA AAATGAAACC

← *neuB*

14351 AGTTCTGCGT GCTACTGCAC TGATATCCAG CTGACTGGAA GAGCGCCAGA  
 14401 GAGCCCTGGT TTTCGGGGCT GATATAGGCG TGAAAAGTGA ACCACGGGAA  
 14451 AAGTTGGTGC AACAGATTCA GGGCCCGCTT GCCATGCCCT CGCTGATGTT  
 14501 GATCGGGGTC AACGTAGATA GAGACTTCGT TATATCCTTC CGGTTTACAG  
 14551 GCTTCATCCA GCCTTACGAC GGCGCAAGGA CCTGTGACTG ACATGACCTT  
 14601 GAACAGCCAG CGCTGAGGAT TTTGTAAAGC TCCGTGCAGC CAGGTTTTAT  
 14651 GCTCACCGAG GGGAGGGCAA TCGGGATTTC GGCTATAGCG GCGGGTTACC  
 14701 GCATCCTGTT GCCACCGCCA TATCCACTCT GCGTCTTCTT CTCTGACTGG  
 14751 CTGCAGCCAG TACGAGTGCT GCTGCGATGT GAGCTTCTGC AGCAGACGCT  
 14801 GTGCTCCCGT GCCATCACAC AGTGCGGCAC TATGTTTGCC GAGCTGCAGC  
 14851 AAGGTCTCTT GATTGGGCCA GTGAACTAAC AGCTGTTGTA GCAGTTGCTC  
 14901 ATCATCCAGC ATTCTCAGAT CGCCAAGCCA TATCACGGCA CTTGCCTGCG  
 14951 CCAGCCGTCT GGCATTTTCC AGTTGGTTGT CGGCAAGAGT GAACAGCAGT  
 15001 GTAGGCAGAG CCAAGGTGGC GCGCTCCCAG CAACTGGTTC CGCCAGCACC  
 15051 GATGGCGAGA TCGGCCTGCA GCATCAATTC GGCCATGTTG TTTGCATTGA  
 15101 GGTGCAATTT GACGTGATGG CACTCTTCG CCATGACCTC TTTGAGTGCA  
 15151 TCGATATGAG GGGCTTTGCT TGCCAGTACC AGATCAATTT CCAATGCAGG  
 15201 GATGGGCAGT TGATCGAGCA GGGGCAGAAT GCGGGACAGA TGATTGTCAC  
 15251 TGTCCATTGC TCCAAGGAG AGCAGCAGCC GTCTGATCCT GCTATTTGAA  
 15301 GCTCTTCTGG CCAGCGCTGC AGGCCGTAGC TTGGCAAACCT CTGGTGCAG  
 15351 TGGTGCATAA CCAGGGCCCA GCAGAGGCAC TTCTTCAAAC CGACTTTTCGC  
 15401 CATAATCGGC AGGTTGGCGG TATGGGGTAA TATCAAGCAA CCGGGTTGCT  
 15451 TCATGCGACC TATCTGCCAG ATCGTCGAGA ACCAGTTGTT GGGGAAGAG  
 15501 GGCAGCCAGC GGCTGCTCCC AACGGCAATC CAGCTGATAG TGATCCACAA  
 15551 TCAGCCAGTC ACTGCCTCCC CACGCCATGA TGGCGCGATA GAGCGAACGC



15601 CAGTCAGGTT GTGCAGGAAG CAGCGTCAGA CCATGCTGGC GAGCAATGAC  
 15651 CTGAGCGCTA TCAAAGCCGG GCAAATCGGC AAAAAAGAAG TGGCACTCGT  
 15701 CACCTCGGCA GGCGGCAAGA TCGGCGATGC TAAGGCACCG CATGAGATGG  
 15751 CCGGCGCCTA TTGTCGTACT GGCATCACAT CGGAACAGCA ACCG**CATCAG**

← *flmD*

15801 CGTACCCGGA ATACGGGCTG AATGGGTTCG CCATCAAGCA CACTGGCCAG  
 15851 TGTCAGATCT CTATCGTGGC GAATGAGCAC TGGCAGTATG TCGCGATAGG  
 15901 CGGCCAGCAA AACGGCCACA TCCTGTTCGC TGTGGGCCAG ATTCATATTA  
 15951 TGACTGCCAA GGGTGAGGAT CCCCCGCTTG CACAACCTCT GGATCAGATA  
 16001 GCTCTTGAGA AGCCAGGTAG AGTGGTTTGC TGAATCAGCA ACCAGCAGAA  
 16051 AGCTCCAGCT CGGGTGTCCG GCAGTTTGCA GCCAGTCCGG GGCATCGATT  
 16101 TGTTTTAGCA AGCTATCGAG TCCATCCAGT ACCTGTTGTC CTCGCTCAGT  
 16151 CAGCCTCTTT GGTACATCCA GTCGCCGCAT CTTTTTGATG ACGGCGTTGG  
 16201 CTGCAGCGAG TGCAATCACA TCCCCGCCGA AGGTGCCGGA GAAGAAGATG  
 16251 TCTTCCATCC GTTTCATATA TTGGCGGCGG CCAACCACGG CGGAAATAGG  
 16301 GAAACCGTTG GCCATGCCTT TGCCGAACGC CGCAAGATCC GGTGTCACGC  
 16351 CAAAGAGGCT CTGCGCCCCG CCCAAGTGGT AGCGAAAGCC GGTAATGGTC  
 16401 TCATCAAAGA TGAGCAGCGC GCCATGGGCA TCGCAGAGTT GCGCAGACC  
 16451 AGGCAGAAAA TCCGGGGTTG GCCAAGTTAC ATTCATCGGT TCCAGAATGA  
 16501 CGGCTGCAAA CTCGCCCCGG TGAGCTTCCA GCAGACGTTG CAGCGAGGCA  
 16551 AGATCGTTGT AGTCAAATCT GTGGGTCAGC TCTCTCACGC ACTCGGGGAC  
 16601 CCCCAAATGG CGGGTGGTCG AGCCTATGTA CCAGTCTTGC CAGCCATGAT  
 16651 AGCCACAGAC GGCTACCCGC TCGCGGTCGG TGA CTGCGCGG GGAGAGCCGG  
 16701 ATACAGGCTG AGGTGGCATC AGTCCCGTTT TTGCCAAAAG GAACCATTTT  
 16751 GGCGCAGGGG ATGAGCTCAA TGAGCTGTTC AGCGACCTCG GTTTCCAGCC  
 16801 GGTGGGGAAG GGAGAAGATT GAGCCCAGAT TGAGCTGTTC CATTACCGCC  
 16851 TCATTACGT CTGGATCGCA ATATCCAAGA CTGATGGCCA GCAGGCCGCT  
 16901 GGCAAAATCG AGATACTCGT TGCCATCTAC ATCCCAAACC TGCGCCCCCT  
 16951 TACCGCGCTC GATAAAGAGT GGTGCGGCAC CATAGGGAAA ACAGAGGCGA  
 17001 CTTTTGGAGA AGGTTTGGGA GCCAAGAGGA ATGCTCTGTT CCGCACGTGC

17051 CGAGAGAGCC AGTGAATGTT GATAACGTGA GGTCATATGT GATTCTCCTT

← *aminotransferasa cl. III*

17101 GGCCAGCGAA TCAGCCAATC CTTCGTTGCG CTGGTGCCGG GTATTTCAGTG

17151 TTGCCAGCTC CGGCTGCTGC GCCAGTAGTT CGAGGATATC GTCGGTCGTA

17201 AAGGTTGGGT TGGTAGGATA GAGAGCCTGA TAAATGCGCT CTACCAGTTT

17251 AAAATCGGCA GGCTCATCAA CGGTCCAGCG CAGGTGGGCC AGCGAAGGCG

17301 AGCGCTGCAG TTCGCCGATG GAAAACCTGCT CGGAATGACA GCGAACGTAA

17351 TAGGTGACAT GTTCCCGCTC GGTCTGCGTG GTGGCTTTTTT CCTGCAAGGT

17401 TGCCAGAGTC GCTCCGCTCA TGATCTCGGC ATCCAGCCCA TCCGGATAAC

17451 TGGGATTGCC GCAGTTGCTG CTGTAGTCGA ACTTGCCCGA GAGATGCAGG

17501 GCTATCAGCT CGTCTATTAC CATTGGATCA GCCAGTGGGC AGTCCCCAGT

17551 GAGGCGTACA ACGTGGGTCG GACTGTAGGG CTGGGCCGCC AGATAGAAGC

17601 GCAGCAGCAC ATCGTCAAGA GGACCACAGA AGCAGGAAAC ATGTAGCCTT

17651 TCGCACAGTT CGGCAATGGC GCGATCTTCT GGCTTATCGC TGGTGGCAAC

17701 CAACAGTTTG TCCAGCAGCT TGCTCTGCTG CAGCCGTTCA ATCTGCCTTG

17751 CCAGCATGGG TTCGCCAGC AGTTCTTTCA GTACCTTGTG GGGCAGGCGG

17801 GAAGAACTGG TTCTGGCCTG CAGAATACCC AAGATTCATCG TGTTCTCCAG

← *elicosiltransferasa*

17851 AGTCCGGGGT TGATAAGTAC CTGTTTCATA GACGCCAGAT GGGCGATATC

17901 TGCCTCGTTG CACTCATGCA GCGCGTGA CTGGCTGATACG ATAGCGGCCA

17951 GCTCCTGGGC ATGGCACACA CCGACCACAA AGCGGCTTAC CTGTGGTAGG

18001 GCCGTCATGA TGGAGAGGGC TCGGTCAAGC GGGGCCATCG AGGGATGCCA

18051 GTGGTCAAAC CGTTCAAGTT CGGTGCGAAA GCGCCGAAAA TAGTCAGGTC

18101 GCTGCGTCGG CTGCATCAGC AACAGCCCCT GTAAAAAGAG CGAGCGAACA

18151 TGGATTTTAC ACCCCATATC TACCAGTTTG TCGAGCCATC CAGTGCGCAA

18201 AAAGCGTTGG TCGAGCAAAT TGGCTGGTAA TTGCACCAGT TCCAGAGGAT

18251 AGCCAGCTGC GCTCCAGGCA TCGAGCTCCT CCGGGGAGTA GACGGATATC

18301 CCGAGTTTGC CGATCGAGCC CTGTTGCTGC AAATCGGTGA GTAACCTGAA

18351 CATGGCTGGA GAGGCATCCT GGCTGCGGTG CAGCAGCAAA CCATCGAGCC

18401 GTTTTCGCCC CAGCAAACGC AAACTGTTGT TAATCGCGGC CTGAACATCG

18451 GAGAGCAGGA GCCCCGGTGC CAGCTTGTCTG ATTAGCGTGA AGCCGGTGGT  
 18501 ATCTCTTTGC CCCAGCCTCT GCTCGGCATT GCCATAGGCC TGCCTGTAT  
 18551 CCAGGGTATC GATACTGCA TGACGAGCCA ATGCAATGAT CGCGTCGAGT  
 18601 TCCTCATCGC TGA~~CT~~TGTCC GTCGTGATTG CTGATCCCGT AATCCAGACC  
 18651 GAATTGCACT GTGCCAGGG CTAATCGCAT AGTGCCTGCT CCAGCGCATC

← *aldo ceto reductasa*

18701 TACGACCTGT TGCTGCTCTG AGTGTGTCAG AGCCGAAAC AGCGGGAGGG  
 18751 AGATTGCTCT CTGGTAGTAG GCTTGC~~GC~~ CCGGATAGGC GGCTGGATCA  
 18801 TGTCCAACC CACGGTAGTA AGGCTGGGCA GGGATAGGAA TATAGTGAAC  
 18851 GTTGACGCCA ATACCGGAG CACGCATCCG AGCAAATACC TGATCTCGTT  
 18901 CAGCTACTTG AATAACATAG AGGTGATAAC CGCTCTGGCG GTTATTACTC  
 18951 TGCTGCAACG GCTGGACTGG CAGGGGGGAT AACAGCTCGT CATATCGCCT  
 19001 GGCAAGTTCA CATCGCTGGG CAATGAATTG ATCAAGACGG CTTAACTGAC  
 19051 TAAGCCCTAG TGCTGCTTGA ATGTCGGTCA GGCGATAGTT GAAGCCGAGC  
 19101 AGTTGCTGCT CGTAATACCA CTCTCCGGGG GAGGGCATGA GCAGCGCTTG  
 19151 CGGATCACGA GTGATTCCGT GGCTGCGATA GAGTCGCAAT TTGGCCGCCT  
 19201 GCCGCTGATC CCGGGTGGTG ACGGCACCTC CCTCTGCGGT CGTAATCGGC  
 19251 TTGACCGGAT GAAAGCTGAA GACCGTCATG TCGCTGTGAA GGCAACTACC  
 19301 GATAGGTGAC CCCTGATAGT GGGCACCCAG TGTATGGCAG GCATCCTCGA  
 19351 TCAGGATGAT TCCGTA~~CT~~GG CGACAGAGCA CCCC~~GAT~~CTC TTCGAGATCG  
 19401 CAAGGCTGCC CGGCCAGATG CACCGCAATC AGGGCTTTGG GCAGGGTGTG  
 19451 GGTAAGCACT GCTTTCTGCA GTTTCTTATT CAGTGCCACT ACATCGAGGT  
 19501 TACCGGTAGC AGGCTCAACG TCAACAAAGT CAACGTTGGC ATCGCAGTAG  
 19551 CGAACACAGT TCGCCGAGGC CACAAA~~ACT~~G ACCGCGGAAA CCCAAACTGT  
 19601 ATCTTTGGCA CCAAGCTCCA GTACGGCACA GGCAAGATGG AGTGCCGTGG  
 19651 TACCGTTGCT GCAAGCAACC ACATGCGGCA CCTGGCAATA ATTGGCCAAC  
 19701 CCTTGCTCGA ATGCCGGGAC AGCCTGACCT TGGGTCAGAT AATCAGATTT  
 19751 CAGTACGGCA ACGACGGCCT CGATATCGGC ATCACTGATT GATTGGCGGC  
 19801 CATAAGGGAT CATTCGGACA ACACCTGCTG GTTCATGTTC TGTAGTTCAG

← *flmB*

19851 CTATCGACAG AAAGTACTGA TTGTTTAGGG AATTGTATTC AAACCCCGGA  
19901 GCAACCAGCG TGGCTGTTTC ACCCAGCGCA TTCATGCTGA AATCATTGTT  
19951 GCGGCTATTG AAGCTGATGC TGGGAGCTAT TACGTAGTAG TCGTTGAACT  
20001 CATAGGTGTG AAAAGAGTCG TCTGCTGGAC ACATCACCTC GTGGAGCTTC  
20051 TCCCTGGGGC GGATCCCGAT AATCTCCTGA TTGAGTGATG GGGCCATGGC  
20101 AGTAGCAAGT TCGGTGATCC TGACCGACGG AATTTTTGGT ACGAACAACCT  
20151 CACCGCCACG CATGCGCTTG AAATTGTTCA GTACAAAATC CACCCCTTGC  
20201 TGTAGGGTCA GCCAGAAACG GGTCATCTCT GGATGGGTAA TGGGAAGCGT  
20251 ATTGGCGCCG CTCTTGATCA GATTGTGCGAA GAAGGGAACC ACCGAGCCCC  
20301 GTGAACCGAC GACGTTACCA TAACGCACGA CCGAGAAAAT GGTTGGATTC  
20351 TTGCCTGCCA TATTGTTGGC GGCGACAAAG AGCTTGTCAG AACAGAGCTT  
20401 GGTGGCGCCA TACAGGTTGA TCGGGTTGGC TGCCTTGTCG GTCGAGAGTG  
20451 CGATAACCTT CTGGACACCA TTATTGAGTG CCGCCTTGAT GACGTTCTCG  
20501 GCCCCCCCAA CGTTGGTCTT GATGCACTCC **ATGG**

← *flmA*



## 7.2 Secuencia nucleotídica de la agrupación génica de las fimbrias Msh de *Aeromonas hydrophila* AH-1

Los codones de inicio están marcados en negrita y cursiva, mientras que los codones de parada están en negrita y subrayados. Las posibles secuencias promotoras se indican entre corchetes. Las posibles secuencias terminadoras rho-independientes se indican mediante cursiva y subrayado. Las posibles *inverted repeats* se indican mediante doble subrayado.

*mshH* →

```

1   TNGCGAGATG GCCGCAGCCG GCCAGCCAGG CCCTCGACTA TCTGCTGGCA
51  GAGCTGGCGG ATGCCCCGAA GGAGCGCAGC CGTTTCGACA ACTTCATCCG
101 CAGCAACGCC TTCGTCGACA AGATGACCGG CATCGGCAAC CGGCTGTTCT
151 TCGACAACCG GCTGGAGAGC GCCATCATGG AGGCGAGCGT GATGAGCGGC
201 GGCCTGCTGC TGATCGAGCT GGCCGGGCTG GAGGAGCTGG ATCCCGAGCT
251 GAACGGCCGC CAGAGCCAGG ATCTGCTGAT GGAGGCGAGC GCTTCCATCG
301 CCGCCTTCGT GCGCAAGCAC AACGGTGCCC TGCAGGCCCG CTATGCCGGC
351 CAGGTGTTTG CCGTGCTGCT GCCCAACATG TCGGAAAGCG AGATGGTGGA
401 TGGCGCCGGC CAGCTGCACA AGAGCCTGCA GCGGCTGCAC TGGCCCGAAG
451 CGGTCAATCC AGACACCGCC GTCTATCTCG GCGCGGTCTG CTATCAGGCC
501 GAGGATTCTC TGCTCAAGGT GCAGGAGGAG GCGGAGCTGG CGCTCAAGAG
551 CGCGCGGCTG CAAGGCCACA CCGGCTGGTT CCTCTACGAG AAACAGCTGG
601 ACGAGGAGCA GAGCAGCAAG GGCACGGTGC GCTGGCGTAC CCTGATCGGC
651 CGGCGCATCG AAGAGCACGG CATCGACTTC TACGTGCAGC CGGTGCAGCA
701 GGAGCGGGAT CAGGTGGTGT TGCAGCAGGA TCTGTTGATC CGGATCCACG
751 ACGAGCAGGG GCGGGAGCTG CAGGCCGGCG TCTTCATGCC GATGGCGGAG
801 AAGGCGGGGC TGTTGCTGCC GCTGGATCGG CTGGTGGCGG AACAGACCCT
851 CGGCCTGCTG CGCCTGCGCT CCGAACAGAG CTGCCCCATC AGCCTGACCC
901 TCTGTGCCCA GAGCCTGCTG CACCGGGAGT TTCAGCGCTG GCTGTTCTTC
951 GATCTGTTCC AGCTGCCGCG CAGCACCAAC GAGCGCTTGA TCCTGCAACT

```



*mshI* →

2451 GGGCAGCCAG GTGCGGGTTT CA**ATG**AAACA ACTTTTCAGA CGTTCGACCC  
 2501 CCAGCCGTCA GGTAGGACTC CTGCTGGCCA GCGATCGGAT CATGCTGGCT  
 2551 TCGCTCGGCA ACCCGCCGAT CTTCCGCCACC CGCGCCATCA ATGGCCCGCA  
 2601 AGAGTGGCCC CAGGCCATGG CCGAGCTGTT CAGCCGCCAC GGCCTCGCCA  
 2651 AGTCTAAGGT GCGAGTCGCC CTCGCGGCCA GCCTTTATCA ACAGGTCCAG  
 2701 ATCGACAAGC CCGCCGTCCC CGATGCCGAA ATGGCCGGTG CCCTGCCCTG  
 2751 GGCGATCAAG GATTACGTCA GTGAATCCGT GCTGCAACTC GCCATGGATT  
 2801 ATGTGGATCT GCCCACCCCG CCGGCGGGCC GGCCGCGCAT CAACGTGATC  
 2851 TCGGTGCCCA AGGCGCGGNT ACAGCAGCTG GCGGATGCAG TCAACGGCAT  
 2901 CGCCAGCCTG GACGCCATCG TCAGCGACGA GCTGGCGATG ACCGCGCTGT  
 2951 ACGAGCCGGA TCAGACGGTG CGCATGCTGC TGTGGNAGCC GAAGGGGCAG  
 3001 GATCTGCAAC TGCTGGTGTT CCATCAGAGG GGGCTCTGCT TCTCCCAGCA  
 3051 GTTGC GCGGT TTCGGCGCCC TCACCGGCGA GCATGAGCCT GACGCCATGC  
 3101 TGCTCGATTC GCTGGCGCTG GAGATCCAGC GCTCTCTCGA CTACTTGGTG  
 3151 GGCCAGCTCA AGCTGCCGGA ACTCGGTCAG ATGCAGCTCG CCATCGCCTC  
 3201 GCCCTTCATC GGTACTCTGG TCGCCACAT GGAGCAGACC TTCGGCTTTG  
 3251 CCGTCTCCGC CATGGCCAAC AAGGCGATCC TGTCCGGCGT GGAATATCTT

*mshII* →

3301 TCGGCCTATG CAGCTGCTCT GGGGGAGGAT GCCT**TGATGAA** ACGCCAGATC  
 3351 AACCTCTACG GCGCCGAGTT TCGCCCCAGA CGACAGTGGG CCAGCCTCAA  
 3401 CCAGATGGCG CTGGTATGGG GCGGCAGCGT GCTGTTGCTG CTGTGCGCCG  
 3451 CCGGCGTCAT CGCCTGGCAG CAACACGCTG TCGAGCGCGA GCTGGTGCAG  
 3501 GTGCGGGCTG CACTGGAGAT CAAGCGTAGC GAGGCGCAGC GGCTGGATGC  
 3551 CGATCTGGCC CGCCACCAGG CCGATGGCCT GCTGCAACAA CAGCTTGCCA  
 3601 CCAAGCAGGA GGAGCTGACC GCCAAGCAGG GCCTGATGCG GCAGCTGGGC  
 3651 AGCTTGGCGC TGCAAAAATC CCAGGGCTAT GCCGGGCTGA TGGCCGATCT  
 3701 GTCCCGCATC CGCGATCCGC AGCTCTCCTT GCAGCGAATC GAGATCGCCG



3751 ACGGCTACGT CAACCTGTCC GGCTTCGCCG GGCGCAGCCA GGATGTGCCG  
 3801 GCCTGGGTCA ACCGTTTCAA GCAGACCCCG TCGCTGGCGG GCAAGCAGTT  
 3851 TGGTGAGCTG ACGTTAAGCC GTGACAAGGA GGGCCGGCTG GCCTTCCAGC

*mshJ* →

3901 TCAGCGGTAT CGAGCGGGAG AAGCCCTGAT GAGCCTGAAA GAGCAGTGGC  
 3951 AGGCCTGGGC CGACAAGATC GCCGCCCTCA GCCAGCGCGA GCGAGTACTG  
 4001 ATCCTGCTGA CCGGGGTGGT CGTGGTTGGC GCCGTTGCTA TCTATGGCTG  
 4051 GCTGGATGGG GCCGCGGTGC GGCTGGAGCA GGAGCGGCTG GCGCTGAGCA  
 4101 CTGCCCAGCG GGATCTGGAG ATCATGGATC TCGAAAACCA GGGCAAGCAG  
 4151 GCCAAACTGG CGCGGGATCC GGATCTGCAC GTGCGTACCC AGCTGGCGCA  
 4201 GCTGGATGGA GAGTTGGGCA AGCTGAACGC CGAACTCAAG GCCCAGACGG  
 4251 TGGATCTGAT CCAGGCCAC GAGATGCCGG CCGTGCTGGA GGCCCTGCTG  
 4301 TCGCGATCCG CCAATCTGCA CATGGTGGCA CTCACTTCGC TGACGCCGGA  
 4351 GCCGCTGATG GCGGGCGAGC AGCGCATCAA CCTGTTCAAG CACGGCATCC  
 4401 GGCTCAAGCT GGAGGGCGGC TATTTGATG TGTATCAGTA TCTCAAGGCG  
 4451 CTGGAGGGGC TGCCGCGCCA CTTCTACTGG AAGCAGTTTG ACTACCAGGT  
 4501 GCAGGAGTAT CCCAAGGCAG TGGTGGAGAT GGAGATCTAC ACCCTCAGCA

*mshK* →

4551 CCAGCAAGGA GTTTATCCGT GGCTAGATGG TTTCCCCTGT GGGCGTGTCT  
 4601 GTTCAGTCTG CTGGCCCAGG CGCAGCCCGA GCTGTTGCAA GACCCACCG  
 4651 CACCACTGAG CGGCGCGACC AGCGGCGCCA GTGCAACCGG CCAGCGCGAG  
 4701 GCCGGTCTGC CCAGGCTGCA GAGCATCATG CTGGGCAACG GCCCGGCACT  
 4751 GGCGGTGCTC AACGGCAGCA GTTATCGGGT CGGCCAGCAG GTCGACGGTT  
 4801 ATCGCGTGGT GGCCATAGGT GCAGATGCCG TGGTGCTGGA GAAGGGGGGC  
 4851 AAGCGCCAGT CGCTGACCCT GTTTGCCAGC AAGGTCCGGA TCTGAACGCG  
 4901 CTCCACCCAG GATGGGCGGA GCCAGGTTTG TCGAGTTTAA TTGCAAGTCA

*mshL* →

4951 GGGTGCACTT ATTACATGAA AAAACATCAT CTCTGCCTGA TCTCCGCCGC

5001 CGTGTGACG GCAGGCTGTA CCAGCTACCG GCACCCCGAA CCCGTGCAGG  
5051 CCAAGGACGC ACTCAGGCAT GCCATGACCG AGCAGAACAA GGGCGGGGCG  
5101 CTGACCAGCG TGCCCAAGTC GGTACAGAGC GAACTGCTGC AGCTCAATCG  
5151 TCCGCCCCAG GCCATCAGCA TGCCGGAAGC GCGGCTGCGC ATTGCCGCC  
5201 ACGACGTGGA TGCGGTGGAG TTTTTCGGCT CCCTGTTCAA GGGCTCCCGC  
5251 TACAGCGTGG CGGTGCACCC CGGGGTGGCC GGCCAGATCT CGGTGAGCT  
5301 CAAGGACGTG ACCCTGACCG AAGTGTGGC GGTGGTGGGC GACATGTACG  
5351 GCTTCGACGT GCAGCGCAAG GGCAATGTGT TCCACGTCTA TCCGGCCGGG  
5401 CTGCGCACCG AGACCATCCC GGTCAACTAC CTGATGATGT CCCGGCGCGG  
5451 TCTCTCCCGT ACCTCGGTCA GCACCGGCGG GGTGGCCTCT AACGACAACA  
5501 ACAGCAGTAA TAACAACAAC TTCGATAACG CTAACAACAA CACCAACAAC  
5551 AGTACCAGCA ACCGCTCTTC CAACGGCAAC TCAAACAGCG ACAGCAACGG  
5601 CACCCGCATC GAGACCGACA CCAACAGCGA CTAAGTGGACC GATCTGCGCG  
5651 ACACCCTGCA GACCCTGATC GGCAGCGGCG ACGGCCGCGC CGTCATCACC  
5701 AGCCCGCAGG CGGGCCTGGT GACTATCCGG GCCTATCCGA AGGAGCTCAA  
5751 GGCGGTGC GC GAGTTCCTCA ATCAGTCAGA GAGCCACTTG AAGCGTCAGG  
5801 TGGTGTGGA GGC GCGGATC CTGGAAGTGT CCCTCAACGA GGGTTACGAG  
5851 CAGGGGGTGG ACTGGAGCGG TCTCTCCGCC AGCTGGGATG GCAACAAGGG  
5901 CATCACCGGT GGTGGTTCGC TGACACCGAG CACGATTGCC AACACCCCGA  
5951 ACCAGATCTT CAGCGCTTTG GGTGGCGGGG CCGGCTTCAA GATTTCCGAC  
6001 GGCAACTTCA ACGTGGCGGT CAATCTGCTC AAGACCCAGG GGGACGTGAA  
6051 TACCCTCTCC AGCCCGCGGG TGACGGCGAC CAACAACCAA AAGGCGGTGA  
6101 TCAAGGTAGG GACCGACGAG TATTTTCGTCA CCAACGCCTC TACCACGACC  
6151 ACAACCTCAG GCACATCGGC ACCGATAGTC ACGCCCAATG TAGAGCTGAC  
6201 TCCCTTTTTT TCCGGCATCG CGCTGGACGT GACGCCGCGAG ATCGACGAAG  
6251 AGGGCAAGGT GCTGCTGCAT ATCCACCCCT CCGTCATCGA CACCGAAGAG  
6301 CAGAAGAAAA CCATCGATGT CGGCACGGCG GACCCCTTGA TCCTGCCACT  
6351 GGCCAAGAGC TCGATCCGCG AGTCCGATAC CGTGGTGCAG GCCAACAATG  
6401 GCGACATCAT CGTCATCGGC GGCCTGATGA AGACCGACAA GCAGGAGATC  
6451 GTCAGCAAGG TGCCGCTGCT GGGGGACATT CCCTGGGTGCG GCGAGGCTTT

6501 CACCAACCGC CGGGAAAGCA CCAAGAAGGT GGAGCTGGTG ATCCTGCTCA  
 6551 AGCCGACCGT GGTGGAGAAG GACACCTGGC AGAACGAACT GCAGCGCTCC  
 6601 TCCGAGCTGC TCGACAAATG GTATCCGCCT AAGGGCTGAG TCATGATCCT  
 6651 GGACCGGTTT GATCACGTGC CGGGGGCCAT CACGGGCTCC CTGGCAGAGA

*mshM* →

6701 TGGCAGGGGA TTGCCCATGT ACCTGAACCA CTTTCGGTTTG CAGGAGGCTC  
 6751 CCTTCGGCCT CACCCCCAAC ACCGGTTTCT ATTACGGGCT GCCCCGCAC  
 6801 GAGGAGGCGC TGCAGGTACT CAACTGGGCG CTGGCGCAGG GGGAGGGCTT  
 6851 CATCAAGGTG ACCGGCGAGG TCGGCACAGG CAAGACCCTG CTCTGCCGCA  
 6901 AGCTGCTGAG CGAACTGGGC TCCGAGGAGC GGCCGGTGCG TCTGGCCTGG  
 6951 TTGCCCAACC CCCATCTCAA CCCGGCCGAG CTGCGCATAG CCCTGGCGCT  
 7001 GGAGCTGGGA CTGGCGGTGC GGGATCAGAG CGAGCTGGAT CTGACCGATC  
 7051 GCATCCATCG CCACCTCATC GCCTTGCATC AGCAGGGGAG CCGGGTGGTG  
 7101 GTGCTGATCG ACGAGGCGCA GGCCTGCCG GACGAGACGC TGGAGGCGAT  
 7151 CCGGCTGTTT GGCAACCTGG AGACCGAATC GAGCAAGCTG CTGCAGATCG  
 7201 TGCTGTTCGG ACAGCCCGAG CTGGATGCCA GGCTGGCCAA GCCCTATCTG  
 7251 CGCCAGCTGC GCCAGCGGAT CGGCTTCTCC TACTGCCTGC GGCCGCTGCG  
 7301 TTTTCGATGAA ACCCGGGCCT ACCTGGAGCA CAGATTGCAG ATTTCCGGTT  
 7351 ATCGCGGGGC CCCGCTGTTT GGC GGCCGGG CGCTGCGCCA GCTGTGGCGT  
 7401 GCCTCGCGCG GTATTCCGCG ACTCATCAAC ATACTGGCGC AGAAGTGCCT  
 7451 GATGCTGGCC TATGGCCAGG GGGCGGCCA GATCGATAGC CGGCTGGTGC  
 7501 GGCTGGCCGT ACGCGACACC GACGATGCCC GCCACTTCGT AGCGCGACGC  
 7551 TGGTGGCCAC TCGTACTGCT GCTGGGTTGT GCCCTCGCCT ATGGAGTCTG

*mshN* →

7601 GCAATGAGCG TGATCAATCA GATGCTCAAG GATCTGGAAC AGCGCCAGCA  
 7651 GGGGGGCGAG GGGGCCGTCT ATGTGCCACC CGTGCGCCAG CAGGGCTGGT  
 7701 GGATGCTGTT GCTGACCCTG ATCTGCGGGC TGGCCCTCGG CATTCTGGGC  
 7751 TGGCGTACCT GGATCTACTG GCAGCAGAGC CAGCGGGTCG TCGAGGCCCG  
 7801 CCAGCTGCAG GCGGCCGGCG AACCCACACC GGACGCCATC GCCCGCGCGG

7851 TTCCCGCAGC GGTGCCGGCC AGTGCAGAAC AAGAGCCGGT GGATCAGGTG  
 7901 GTGGCGCTGC CAACCCCGCG CCACCTTGCC ACCTCGCCTA CCGCCGAGCC  
 7951 GCAGCAGGCG GAGGAGCGCA CAGCCGATGA CGCTGACGTG GCTGCCATCG  
 8001 ATGAGGAGGG GCCGAGCGAC GAGGAGCTGC AACCCGACCT CTATGCCGAG  
 8051 CTCGCGGGCG AGCAGGAGGC CCCC GCGCCGCGCA AGCCCGGCGT  
 8101 GCTCAAGATA GAGACGGTCA ACCTCTCCGA GGCCGAACTG GCCACCCTGG  
 8151 CCGAGCGCAA GGCCACCACT GCCATGGCCA AGGGACAGCT GCGCGATGCC  
 8201 CAGGACAACT ACTATCAGGT GCTGGCCCAC GATCCGCGCA ATCAGGGGGC  
 8251 GCGCGAGCAG CTGGCGGGCC TGCTCTACGG CGAGGGGCGG CTGAGCGAGG  
 8301 CGAGCCAGTT GCTGGAAGAG GGGCTCAGAT TCGATCCCGA ACAGGCCGAT  
 8351 TTCCGGCTGC TGCTGGCGCG GCTCGCCATC AGCGGCGGGC ATCAGCTCAA  
 8401 GGCCTCGGC TGGCTGACCG GCCATCGACC GGATCTGGCC AGCAATCTGG  
 8451 ATTATTACGC CACCTGGGCC GGGCTCAGCC AGGAGCTGGG TCAGCATGCC  
 8501 GAGGCGGGCG ATCTTTACGT GAAATTGTTG CGCCAGCAGC CGGATCAGGG  
 8551 CCGCTGGTGG CTCGGGCTCG GCGTGGCCGA AGATGGCCAG GGCCACAGCC  
 8601 AGCGGGCGCT GGATGCCTAT CGCAATGCCC AGTTGCACGG CAACCTGGGC  
 8651 GAGGCGTCGA CCAGCTGGCT CGAACAGCGG ATTGCCCAGC TCGCCCCCTG

*mshE* →

8701 ACGGGCGGCC GGGATCACTT TTTTGGAGTT TGCATGGCAC AACCCAGACT  
 8751 GAAAATGCGC CTCGGCGACC TGCTGGTACA AGAGCAGATC ATCTCGGATG  
 8801 ATCAGCTGCA GCTCGCCCTG CAGCAGCAGC GTCAGACCGG CCGCAAGCTG  
 8851 GGCACCACCC TGATCGATCT CGGCTTCATC AGCGAGGTGC AACTGCTGCA  
 8901 GTTTCTCGCC CGCCAGCTGG ATGTGCCCTT CTTGATCTC AACAACTCA  
 8951 CCATAGATGC GTCGGCGGTG CCGCTGCTGC CGGAAGTGCA GGC GCGCCGC  
 9001 TATCGTGCGC TGGCGGTCAA CCTCACCGAC AACAAAGGTGA CGGTGGCCAT  
 9051 GTCGGATCCG GCCGACTTGA GCGCCCTCGA CGCCATCGCG GCGCTGCTGC  
 9101 GCCC GCGGGGA GATGGGGCTG GCGGTGGCGC GGGAAAGCCA GCTGCTGGAG  
 9151 TATTTGACC GCCTCTATCG TCGCACCCGC GAAATAGNGA GCTTCGCCGA  
 9201 ACAGCTACAT GAGGAGTATC AGGACGCCGG CTTGAGCTG GGTTCAGCA

9251 ATCTGGGGGC GGGTGACGAG GGGGAGGCCA CGGTGGCCAA GCTGCTGCGC  
 9301 TCCCTGTTTC AGGATGCGGT GCAGGTGGGG GCCTCCGATA TTCACATCGA  
 9351 GCCGGACGAG AAGGTGCTGC GCATTCGCCA GCGCATCGAC GGCATCCTGC  
 9401 ACGAGAACAT CCTGAGCGAG GTGCGTATCG CCCAGGCGCT GGTACTGCGC  
 9451 CTCAAGCTGG TGGCCGGCCT CGACATCTCC GAGAAGCGGC TGCCGCAGGA  
 9501 TGGCCGCTTC AACATGAAGG TGCGCGGCCG CGACGTGGAT GTGCGGATGT  
 9551 CGACCATGCC GGTGCAGTAC GGCGAATCCG TGGTGATGCG GCTGCTGGAC  
 9601 CAATCCTCCG GCATCCTGTC GCTGACCGAG ACCGGCATGC CGCCGGAGAT  
 9651 CCTGACCCGC TTCCGGCGCC AGCTCAAGCG ACCCCACGGA ATGATCCTGG  
 9701 TGACGGGCCC GACCGGCAGC GGCAAGACCA CCACCCTCTA CGGCGCCCTC  
 9751 TCCGAGCTCA ACCAGGCCAG CCAGAAGATC ATCACGGTGG AAGATCCGGT  
 9801 GGAATATCGG CTGCCCAGGG TCAACCAGGT TCAGGTCAAC CCCAAGATCG  
 9851 GGCTGACCTT CTCCCACGTG CTGCGCTCCA CCCTGCGCCA GGATCCGGAC  
 9901 ATCCTGCTGG TGGGCGAGAT GCGGGACAAC GAAACGGTGG AGATCGGCCT  
 9951 GCGCGGCGCC ATCACAGGTC ACCTGGTGCT GACCACGCTG CACACCAACG  
 10001 ATGCGGTAC CAGCGCCCTG CGCCTCATTG ACATGGGGGC CCCCGGTTAT  
 10051 CTGGTGGCGA GCGCGCTGCG GGCGGTGGTG GCTCANCGGC TGGTGCGGCG  
 10101 GGTGTGCGAG CACTGCGTCG AGGAGAAGGC GCCGGATGAA GGCCAGGCCA  
 10151 CTTGGCTGAC CGTGCTCTCC GGTGAAGCGC CGGGCCAGCA CGTCTATCAC  
 10201 AAGGGGCGCG GCTGCCAGAG CTGCAACTTC ACCGGCTATG CCGGCCGGAT  
 10251 CGGGGTGTAC GAGCTGCTGG AGCTGGATCA GCCCATGATG GACTCCCTGC  
 10301 GCCGCAATGA CGCCGAGGGG TTTGCCAAGG CGGCCCAGCA GCACCCGCAC  
 10351 TACCGGCCGC TGGCGCTGAC CGCACTCGAT TACGCCCGTC AGGGGATCAC  
 10401 CTCGGTGGAC GAGGTGCTGC GGCTGGCGGA GGACCTGGGG **TAA**GTGATGA

*mshG* →

10451 CCAACTTCAT CGGCAATGAA CGCGGCCGGC TGGCGCGAGG CACCCC**ATGA**  
 10501 GCAGCTTCGC CTACAAGGGG CGCGACAGCC AGGGCAATGC CGTCAGCGGG  
 10551 GTGGTGGACG CGGCCACCGA GATGGCTGCG GCCGAGCAGC TGATGCGCCC  
 10601 CGGCGTGATG CCGACCGAGT TGAAGCCCGG CAAGGCGAAG GCGGCCGCC  
 10651 TCGACTGGTC CCTCTTGCTG GAGCGGGGCG TGCGGCTGGA CGAGCTGGTG

10701 GTGTTTCAGCC GCCAGATGTA TGCCCTGACC CGGGCCGGCA TCCCCATCCT  
 10751 GCGCGCCATC GCCGGGCTGG AGGAGAGCGC CCATAGCAAG CCGCTCAAGC  
 10801 GGGCGCTGCA CGCGCTGGGA GAGGATCTGG GCAACGGCCG GCCACTGTGC  
 10851 AGCTCGATGC AGGCCACCC CAGGGTGTTT AGCAGCCTGT TCGTGGCCAT  
 10901 CATCCACGTC GGCAGAGAACA CGGGTCAGCT GGAAGAGGCG TTCTTGCAGC  
 10951 TTGCCAACTA TTTCGAGCTG GAGCTGGAAA CCCGCAAGCG GATCAAGACC  
 11001 GCCATGCGCT ACCCAGCTTT CGTGCTGATT GCCATCGGTA TCGCCATGGT  
 11051 GATCCTCAAC ATCATGGTGA TCCCAGTCTT TGCCGGCATG TTTGCCAAAT  
 11101 TTGGCGTCGA GCTGCCGCTG GCGACCCGGA TCCTGCTCGC CACCTCCCAC  
 11151 TTCTTCGTGC ACTACTGGTG GGTGATGCTC GGCGTGTTGC TGGCCATGGT  
 11201 GTTTGGCTGG CGGCGCTGGG TGAGCACGGT CAAGGGCAAG CTGACCTGGC  
 11251 ACAGATGGCA GCTCAAGTTG CCGATCGTCG GCACCATCAT AGAGCGCTCC  
 11301 CTGCTGGCCC GTTTTGCCCC CAGCTTCTCC ATGATGCTCA AGGCCGGGGT  
 11351 GCCGCTCAAT ACGGCGCTGA GCCTGGTGAC CGATGCGGTG GACAACGCCT  
 11401 GGATGGCGGG CCGGATCCGC GACATGCGGG CCGGCATCGA GCGGGGCGAG  
 11451 AGCCTGCTGC GCACCGCCGG CAGCAGCGGC CTGTTCACCC CGCTGGTGAT  
 11501 GCAGATGATC GCGGTGGGGG AAGAGACCGG CCAGGTGGAT GATCTGCTGC  
 11551 ACGAGGCAGC AGAGTATTAC GAGCGGGAGG TGGATTATGA CCTCAAGAGC  
 11601 CTCACCGCCC GGATCGAGCC GATCCTGATC GGGATCGTGG CCGTCATGGT  
 11651 ATTGATCCTG GCGCTGGGCA TCTTCACGCC GATGTGGGAC ATGATGCGTG  
 11701 CCGTGCGCGG CAAGTAACCG GTATCTTTAC CGCCACTGAG GCGGGGCATG  
 11751 ATGTGGGCCG TGCCTGGCAA GTAACCGGGC AATGAGGCGG GCGGTATGGG

*mshF* →

11801 TAAGCGGCAG AGAGTGGAGC GAGATGGG**GTG** AGTCGACAGT CACAACAGGA  
 11851 TGAGCACTGG CTGGGGAGCT ATCGGCGGCT GGCCGTGGGG ATCCTGTTGC  
 11901 TGATCATGGT GGCGACCCTG GCCCGAAGCT ATCTTGTCCA CCGGGAGGAG  
 11951 GCGCTGGCCG TCAGCCTGAC CCTGCTGGGG GAGCAATTTG CCGAGCGCGC  
 12001 ACAAAGGTTG CATGGGCTCT GGCTCGATCA GCGGCGTCCC GCCGTGCTGC  
 12051 ATGCCGATGG AATGGCCTGG CAGTTTGTATG AACGTGGCTG GCCACTGGGT  
 12101 GCCGGTACAG TTATGACGCC GTCGGAAAAC TGCCGTTGGC TGTGGGAGCA

12151 ACTCATCGGT ACGGCAGCGT CGACCCAGCC GCCGGTGCAG GCCTTGGCGA  
 12201 GCCTGGATGG CGAAGGGTGC CAGTTCGGCT GGGAGAATAA TTGGCTGATT  
 12251 TATCAATTTT CTGACGGCAG AGTGCAACAA AAGCCCTGAA TGAG[GCTTGT  
 12301 TTTGCGATTC AGCTAAATGA TTTTTTTATA TCTGCATGAA ATAAT]GCGGG  
 -35 -10 promotor  $\sigma^{70}$

*mshB* →

12351 TTATTACGGA GGGTCCATGA CAACAACGCG ACTGGTACCA AGATATTCCG  
 12401 GTGTGGCGAG TCCCCATCGG GCAGCGGGTT TCTCGTTGAT CGAGCTGGTG  
 12451 ATCGTCATCG TCATCCTGGG GATCCTGGCG GTCACCGCCT TGCCCCGTTT  
 12501 TCTCGATGTC ACGGACGAAG CCAAGAAAGC CAGCGTGGAG GGGGTCTCCG  
 12551 GCGGGTTTGC CACCGGCGTG TCGCTGGTGC GGGCTCAATG GGAGGCCGAA  
 12601 GGGCGCGCCA AGCAGGACAG CCTCAACACT GTGCTCTATG ACGGTTACAG  
 12651 TTTTTATCTG ACCACGCCGA CCGACACCCA GGTCAGCAAC GGCGAGCTCT  
 12701 CCCCCGGCTA TCCCATGGAT ACCTCGGCCG GTGGCGGCAT CGACGTGGAT  
 12751 CCGGCCAACC TGACGGCCCC GCGCTGTCTC AAGATTTGGG AGGGTCTGCT  
 12801 GCAGAATCCG CCAAGGCTA CCGCCAGCTT CAGCGAGGTG CGTGGTAGCG  
 12851 GCAATGACCT GAAATACTAT GTCAGTGTGA CCAATAACGG CCTGGACTCG  
 12901 GTCTGCCGCT ACTATCTGGT CAATAGTTTG AGTAAGGGTA GTGATGGCAA  
 12951 GTATCAGGAT CCGCAAGGCA GTACTGATGC ATTCATGAGT TTCAGTTACC  
 13001 GTCCGGCCTC CGGTCAGGTG ACCACCAATA TCAATTGACA GAGGAAAGTA

*mshA* →

13051 ATATGAAAAA ACAGGCGGGT TTTACCCTGA TCGAACTGGT CATCGTGATC  
 13101 ATCATTCTGG GTATCCTGGC AGTGACCGCT GCTCCCAAGT TCCTGAATCT  
 13151 ACAGGATGAT GCCAGAACGT CCACCTTGAA AGGCGTTGCC GGTTCCTTGA  
 13201 ACTCGGCCGG AGCAATGGTT TACAGCAAGT CCGTTCTCAA AGGGAAAAGAC  
 13251 AAAGAGAGCA CTGCTTACGA TCTGGATCTG GGCAATGGCA AAACAGTTTC  
 13301 TACTGTTTT GGTTACCCGG TCGCGACCTC TGCTGCGCTA TCAACTGTTG  
 13351 TTGAGTTGAA TGGTGCTGAA TGGGCGTTTG CTGCTCCTAC TGGTTCTAAT  
 13401 CCTGCCGCCA TCAAGATTTT CCCGAATGGA GTATCTACCA CTTTCGACCAC

13451 TTGCTTCGTG ACTTACACCG AGGCAACGTC GACTTCAGTA CCGACAGCGG  
 13501 TGACCACTGA CTGCAATTAA TACAATGCTC GGGTGAGCAG AGAGAGTTTC

*mshC* →

13551 TCTCTGCTCA TTTTGTGATGG GTAAAAATGG TATGCGAACG ACCTCC**ATGA**  
 13601 GCAGACTTGG CTTTACCCTG ATTGAACTGG TTATCGTGAT CCTGTTGCTG  
 13651 GGGATTCTGG CCGCCTTTGC CGTGCCCAA T TGCTGGGCA AAGGCGGCTT  
 13701 TGAAACCAA ACCCTTCGTG ATGAGCTGCT GACCCGGCTG CGGTTGGTAC  
 13751 AGACCATCAA CATGCATGAG CCCGCCGACC GCTGTACCCA GCTGGTGGTG  
 13801 GAGGCTTCCC GCTTTGCCCA TATCACGCTG GCGGTTGCCG GTGCAGCGTG  
 13851 CCCGGCTCCC GGCCCCATGA CCGGCTGGAG CGACAATCAG CGCACCCGTG  
 13901 GCCGCCTTGT GACCCCTTCC GCCGGTATGG CGGTCTCCCT CAATAACGCC  
 13951 AGCAGTTTCG TGATCCGTTT TGATCAGATG GGCAGGCCGC TCGACAGCTG  
 14001 TGCCACGGGT TGTACCCTGC TGGTGAGCGA TGGCCGCGAA ACCGGCCGCC

*mshD* →

14051 TCAAGATAGA GTCCGAGGGC TATATCC**ATG** AGAGCCCCTG AGCGCGGTTT  
 14101 TACCCTGATT GAGCTGATCG TCGGCATAGT GCTGCTGGCG GTGGCGCTGA  
 14151 CCGGCATCCT CGGCCTGTTG ATCAATCAGG CTCCTCAGGC GGTGGATCCG  
 14201 GTGCAGCAGG TGCGGGCCGC CCAGCTGGCC CAGCGGATTT TGAACGAAGT  
 14251 GCTGCAAAAA TCCTTCGATG AACACTCGGA TCACAATGGC GGCCGTTTTTC  
 14301 GCTGCGGCGA GACCGTAGGC ACGCCTCCCG TGATCTATCC CGCCTGCACC  
 14351 CCCGGCGCCG ATTACGGTCC GGATGGCGGT GAGACCCGCC CCTACGCCTT  
 14401 CAGCGACGTG GATGATTTTCG ATACCGCAGG CAACTGGGTG GACGCCAACC  
 14451 AGTTTACCCA GACGAATGCC GAGGGCGTCA GCGACCAGGA GTATCGCCAC  
 14501 TATCAGGTCA GGATCGCCGT CACCCCGGAT ACCCTGTTTCG GCAGCCCAGG  
 14551 CCTGGGAGCC GAATCCATCG GCAAGCGCGT CGCCCTGACC GTGCGGCTGC

*mshO* →

14601 CGGATGGGGG CGAGCTGGCC TTTGCCCTCT ATCGGGGGAA CTACTTGATGG



14651 ACAAGCCGCA TTCCCGTTAT GCCGCGTCCG ATGACGCAGC TGTTACCACA  
 14701 ACCCGTTACC GCGTCCGATT AGGCTTTCGCT AATCGAACCT GCGCCCAACC  
 14751 TGGGCGAGGG CGGGGCTTCA CCCTGGTCGA GTTGGTGATG GTGATCCTGC  
 14801 TGCTCGGGGT CATGGCCACC TTCTCCAGCC AGTTTATCGG TATAGGCACC  
 14851 CAGATTTACG GGGATGCCAG CCGCCGGGAG CAGCTGATGA GCGATGCCCG  
 14901 CTTTCGCCCTG GAGCGGCTCA ACCGCGAGCT GCGCGATGCG GTGCCGGGTT  
 14951 CGGTGCGCAT CGAGGATGAA CGGGCAATCC TCTGGATCAG GGGGTCTGTC  
 15001 TGCGCTTTTTT GGCCGATTGC CACCGCCAGC CGTTATCTGG GCTCCGCGGC  
 15051 CAGCGCCGGG CTCACCATAG TGGTGCCGGA CGAGCGGCCA CGGGATAAGG  
 15101 ACCTGGCCAT CGTCTATCCC CTTGCCGATC CGGCTCTCAC CCTGGACGAG  
 15151 GGCTGTCTTC ATGGCAAGTG CGTGGCCAGG GTTATTTTCGG TGGGGAGCCC  
 15201 GGTCTCGGGA GCCTTGCCGC TGACGGTGGA TGGCTCCTTC GCCAGGGAGT  
 15251 CACCGGGGCA GCGAATCTAT TTTTCCCGTC AGCAGGTGCG TTACTIONCGTG  
 15301 ACGAATGCCG TCCTGACCCG GGCCAGCGCC GCCATAGGCA CTGACTTCCA  
 15351 CGGGATCACG CCGGCACTGA TGGCCGAGCA TATCCGCCCT GCGCCCTATT  
 15401 ACTTCTACCT TGAGCCTGCC GCCTTCAGCC AGAGCGAGGT GGGGTTGAGG  
 15451 CTGGAGCTTG AGCAGCGCGG TGAGCACGTC CTCTTCAATC ACAAGCTGGA

*mshP* →

15501 GACGCTCAAT **GTACCCTAGG** CCTCCCCGCA CAATGGCGCC CCAGCGTGGC  
 15551 AGCGCCATCA TGGTCGCCCT CTTTCGTCATC GTCATCATGG CCCTGCTGGC  
 15601 GGCTGCCATG GGTTCGCTTCC TAGTGGACAG CGGCGATAAG CACACGGTGG  
 15651 AGGTGCGCGG CGTTCGCTGCC CTGATGGCGG CTCAAAGCGG GCTCGAAGTT  
 15701 GCACTGTACC GGCTCTATCC CAATGGGGAG TGGCAGGGGC AAGCCAGCCC  
 15751 GTGCGCGCCC ATCGAGCTCG ACTTCACCGA GCCCGGACTT GCCGAGTGTC  
 15801 AGGCCAGCAT CACCTGCAAC AAGGTGGCGG TGAGCGCGGC CGGCGGGACC  
 15851 CAGACAGGCT ACAGATTCCG CAGCGAAGGG CGTTGTGGCA GCCCGAGTCA  
 15901 GAGCGGTGCC AACCCGGACT TTGCCGTCAG CCGCACCCCTG GTGGCGGAAG

*mshO* →

15951 CCTTTGACGG AGTGAGTCCA **TGA**GACTTTG GTTGCTGGTC TTAACAATGC

---

16001 TCTCTGGCAT GGCTCATGGG TTTGAAACTG TCGACACTGA TACTTATTTTC  
16051 CCGGCTGTGG TTCAGGGTCA CCGCGGTAAT AACAAACGCGG TCTGTACTGG  
16101 TCAGGATGCT GCCAAGCTGA CCCAGAACAA CCAGGCGAAA ATAACGGGCA  
16151 CAGCAGGTGC TGCATTGAAT TTCTGCGACT CGAATCAGGG TTCCGGCATG  
16201 CCATTGGATG GTTGTGACAA CGCCAATGGT TCTCGCCGGC TTTGCTCCAT  
16251 CAGCGGCAGC TCCATCCGAG GGATGTCTAC GTCGGGTGCT AACAGCTTCC  
16301 TGAGCAGAAC CGGCGCGGAT GGTAGCCTAG GGTACTGTAA CGCGGGACAA  
16351 CAGTTGACCA TGGGTAGCGC CAGCCAATAT CAGTTCGGTG CGATCAGCCT  
16401 CTACAGCGCT TGTACCCTGA CATTCTCCTC TGCCCGCAAT GAATATCGGA  
16451 TTGATAGCCT TGCCATAGGG GGAGGGGCCA AGGTCATTCT GCCCGCCGGG  
16501 GACTACTGGA TTGGCAGCTT GACTATCAAC CAGGGAGGGG TGATCGAAAC  
16551 ACAGGGCGCC GTGCGCATT TGTAAATGA GCAAGCCGCT TTTAACGATG  
16601 GACGTCTCAA TCCGGACAAC CTGGGGCCAG TGTTGTTGTT TGGTTATGCA  
16651 GATATCAATT TGAACGGGGA TAGTCTTATC AATGGATTGG TGTATTCGGA  
16701 TAAGACTCTG AACATGAATG GCTCCAGCAT CATCAACGGC AGAACAACCA  
16751 GCCGATCCCT GTTCATGACT GGCTCCACGG CGATCAATGA CAAGGCCCT  
16801 CCCGTGCCGC TCGCCTGCTT CAGCGACGAC TTCTCCGCTA GCTCCCTCAG  
16851 CAACAACCTGG GTGGTGGCCC GCAGCAGTGG CAACTTTACC CCCGCCATCG  
16901 TCAATGGTCG TCTGGGGATG ACCCAGGCCA GCACCAAACA ATCCACCTCG  
16951 GCCACCTATC AGCGGCTCTT CCCCCTGCC AACAACTGG TAACCATCGA  
17001 ATTCGACCAG TATGCCACA GCGGCAACGG GCGGACGGC ATGGCGGTGG  
17051 TGCTTTCCGA CGCCAAGGTG ACCCCCAGC CCGGCGCCTT CGGCGGGCCC  
17101 CTCGGCTATG GCTTCAAGAC CGGGGTCAAC GGCTTTGCCG GCGGCTGGCT  
17151 CGGGGTGGGG ATCGACGAGT ACGGCAACTT CTCCGGCGAA GGGGGAACGA  
17201 TCAACAAGGG GCGGCGCCAG CAGTCCGTGG CGGTGCGCGG CTCGGGCTCC  
17251 GGCACCAACG GCTACAATA CCTCAAGGGC ACTTGCAACG ATGGCAGCAG  
17301 CAACACCACG GGCAACTGCC TCTCGCCGAC CGTGGACAGT GGCTCGGACA  
17351 GCAATCGCCC CCATCGCTAT CGCCTGACCA TAGATTGCGG CATCAGCGGC  
17401 CAGTCCCTGG TCAAGGTGGA GCGCAACACC GGCAGTGGCT ACAGCACCT  
17451 GATCGACAGC TTCAATGCCG CCGCCAGAG CGGCCAGGTG GCGATCCCGG  
17501 AGAACCTCCT GCTGTCGCTG ACGGGGTCCA CCGGGGATCT CACCAATGCC

17551 CACCAGATCG ACAACGTCCA GATCTGTGCC CTCAACTCCA GCCCGGTGGG  
 17601 CACTCAGATC GATCACTTCG AGTTTCGATCA CAGCGGCAAT GCCCTGACCT  
 17651 GCAACCCGGA GACCCTCACC ATCCGCGCCT GTGCCAACGC CAGTTGCAGC  
 17701 ACACCTGGTC ACGGGCCCCG TAAGCGCCGT CCTGACCCCC TCAAGAGTGG  
 17751 CAGCAACGGT TGGGTAGCCG GCAGCCAGGT GAGCTACAGC GGCAACACCG  
 17801 CTACCGTGAC CTTTCAGCGGC GGCACCACCA AATTGCAGCT TCGCAACAAT  
 17851 CTGGCGAGCG CCATGACGGT GGGGGTGAGT GGATCGACGC CTTCCACCAA  
 17901 ACCCCTGAGC ACCACCCTGT GCCGCGCCGG CAGCGGCGCC CTGAGCGCCG  
 17951 CCGCCTGTAC CTTGAGCTTT GCCGACAGCG GCTTCGTGTT CGATGTGCTG  
 18001 GATACCCTGG CCAACAGGCC ACAACAGGTG GTGATGAAGG CGGTCAAGAA  
 18051 AGACGACGCC AGCCAGCAGT GCGTGCCGAG TTTTGCCAGC GTAAGCAAAC  
 18101 CCGTCAGCTT CTGGAGCGAC TATGTCAGCC CGGCGAGCAA CGCCTTCGGC  
 18151 AGCAAGGTGA CCGTCAATGG CAGTGTAATC GCCACCTCGC AAGGGGCGGC  
 18201 CACCACCAGC AACCTGAGCT TCGATACCAA TGGTGAGACC ACTTTTACCG  
 18251 TGAATTACCC GGATGCGGGC CAGATGCGGC TCAATGCCCG CCATGATGGC  
 18301 AGCGGCGACA GCGCGGGTCT GGTGATGACG GGGTCGGATC TATTCGTCAG  
 18351 CCGTCCGGTC GGGCTTTGCA TCACGCCTGC CCAAGGGGCC TGTGCGGCAG  
 18401 GGGATGCCAG TTGTCCGGTG TTCAAGAAGA CCGGTGAGGC GTTCCAGCTG  
 18451 AATATCAAAG GTGTGGCCTG GCAAGCGGAC GATGACAAAAG ACTTGTGCAG  
 18501 CGGCAATCTG GCAACCCCA ACTTCGTGCT GGCCAATATT GCGCTGGGCA  
 18551 GCGAGCTGGC GGCACCCAAA CCCGGTGTCT AGGCAGTTGT CGGCACGGCT  
 18601 AGTTATGACC ACTCCAACGC GAAAGGCAGC AACAACTCA ACTCCGTCGG  
 18651 CCAATCGGTC AACGATGTCG GGGTGTTCCT GATGACGGCG ACTCCACCGG  
 18701 AAGCAGGTTA TTTCAACTAC ACCATACCTC CCGCTGTCAG CGTGCCTGTG  
 18751 GGACGTTTTA TTCCGGTGGA CTTCAACCTG GTGAGTGGCA ACATAGTCCC  
 18801 CGCCTGCGAT GAGTTTTCTT ATATGGGGCA GCCCTTCCTG ACGGAGTTGC  
 18851 ACATCCAGGC CCGTAATCAG TTTGGCGAGA CAGCCCCAAA CTATCGAGAG  
 18901 GACTTCGCCA AGGGGAATGC CTATCTGACG ACGGCCAACA ACAGAGACGG  
 18951 GGAGTCGCTT TCTGTCCGGC TGCGCAGTCT GGGGCCGCTG CCCTGGGTGG  
 19001 AAGGGGAGGC CGACTTCAAC GGGCCGACCG AGTTTGTGCG CCGTTCCGAT

---

19051 GATCAGCCGG ACGGTCCCTA CCGCGCCCTG TTGTTTGGCC TCTATATGCA  
19101 GGACAACGAT GGTGAGCAGA CCCTGATCGC CAATCCAGAC TTCAATGACG  
19151 GGCAGCCTGG GTCATGCAGT GGCATCAGCT GCAATGCCAG GTCATCGAT  
19201 GAGGTGCCCA TGGCGGCGTA CTTCCGGCCGG GTGCAGGCAG GCACACGTCA  
19251 AGGGATCGCT ACGGCCTGGC TGGCGGTGCC GCTGCAACTG CAGTATCACG  
19301 AGGCGGACAC CTGGCATGCC ATGGGAACAG ATCAATGTAC CCGGCTCTCC  
19351 TTGCAAGATG GGGGCATGGA GTTCACCGAT GGCAGCCAGT ATTTTCGATGA  
19401 GGGAAAGTGGC GATCTGGTGC TGGATGGCAA CACCCGGATC AGGCTCGGTT  
19451 TTGGTCCGGT CGCCCCTGGC GCCATGGTGG AGAGAGCGAA GGATGGTGTGTC  
19501 ATCACCTTGC AGTTTGCTGC TCCAGGCAGG ACAGTGCGCA TTCCTTTCCG  
19551 GATCGATCTG AGCAAGCAAC CTGAGTCAGA ACTGCAATCT GGACGGCGAC  
19601 CGCTCTGGCT TTCGGACCCT GACAGTCTGG ATGGCATGGC GATTTTCGGT  
19651 CTCGGTCGGG GTAATGACAG AATTATTTAT CGGCGCGAAG TGATGCACTAG  
19701 AGCGGGGAGT TGGGGCGGAT CTGTCAACTT CGCCCCCCTA TCCCCTTGTT  
19751 TATTAGCGTT TGTCGGCTTG TCGGGGTGAG TGATGACTCG CATTTTTGTC  
19801 GCGCCCGATG GGTTGGCGAC AGTTTGAGCG CTTGCCGATT GGGGTGGGCA  
19851 TTGGTAAAGT TAGCCGGTTT TCTGCACCTC CAAATTCTTA GGATTTCCCG  
19901 TAGCCATGTT CAAAAAGCTC AGAGGCGTCT TTTCCCAACG ATCTGTTCGAT  
19951 CGANCTTGGG AANCTGCCAA CCACCCTATC NNATANGGN NGGTTNNNNN  
20001 T



