



Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Departamento de Microbiología

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

Memoria presentada por Silvia Vilches Saez
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado
Microbiología Ambiental y Biotecnología
Bienio: 2003-2005

VºBº de la directora,

VºBº del codirector,

La doctoranda,

Dra. Susana Merino Montero

Dr. Juan Tomás Magaña

Silvia Vilches Saez

Barcelona, Noviembre 2007

Para mi familia, y, por supuesto,
para Carlos

*“... and when we turn to dust, and we fly away,
there’ll be a light still burning bright, and that’s
all that really matters...”*

R. Sambora

Ha llegado la hora de la verdad, y aquí estoy mirando fijamente una pantalla en blanco... ansiosa, porque parece que se echa encima el final del trayecto, y porque necesito encontrar las palabras para el apartado, sin duda, más difícil de escribir. Y es el más difícil porque se trata también de la parte más importante, la de dar las gracias a todos aquellos que, de una forma u otra, han formado parte de esta etapa... ¡¡y sin que la memoria falle en este preciso instante!! Así que, por si acaso olvidara mencionar a alguien, gracias a todos.

En primer lugar he de agradecer al Dr. Juan Tomás y a la Dra. Susana Merino no sólo el haber dirigido esta tesis, sino también el darme la oportunidad inicial de formar parte de su grupo de investigación y su voto de confianza. Gracias por enriquecer este trabajo desde dos puntos de vista distintos, y gracias en concreto a ti Susana por estar siempre dispuesta a “perder el tiempo” que haga falta para resolver cualquier tipo de duda y por tu gran apoyo a nivel experimental.

Me gustaría agradecer la importante colaboración, para el tema de esta tesis doctoral, del Dr. Ka Yin Leung y su equipo, del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Singapur.

Gracias a mis compañeros de “poyata”, aunque en tercer lugar, no menos importantes: son muchas las horas del día compartidas, con sus risas e historias, comidas y, por supuesto, su inestimable ayuda. Y es por eso de merecer la mención individual de cada uno de ellos, comenzando por aquellos que encontré el primer día: Ceci, Ina, Luis y María. Gracias a todos por sus consejos y su gran ayuda en esos primeros momentos, siempre preguntando, volviendo a preguntar, y preguntando una vez más. ¡Ay el día en que nos dejó la última!. Un millón de gracias también a vosotros, Maite Polo, Rocío, Sandra, Natalia, Markus, Maite Saló, Anna y Mercè, por ser los mejores compañeros que uno podría esperar, y por aguantar mis “ladridos” (ya sabéis, mucho ruido...). Maite Polo, qué sería de nosotros sin ti, vigilando que nunca nos falte de nada, preparada siempre para darnos ese empuje que a veces necesitamos, tranquilizándonos en los momentos de agobio máximo, y dándonos los primeros Buenos días. En toda regla, nuestra “mami” en el laboratorio. Sandra, por tus inesperadas contribuciones en determinadas conversaciones (¡eres la más grande!, ¡qué risa!), por escucharme y dejar que te escuche, en fin, por ser mi amiga, y por todos los buenos momentos fuera del laboratorio (igualmente allí dentro se te echa de menos). Rocío, mi compi frontal de poyata, por aguantar mi mala puntería con palillos, puntas y otro tipo de desechos (perdón, jeje), por compartir esos “pitis con café”, y por ayudarme a comprender lo que a veces no acababa de entender. Natalia, mi compañera de camino desde el primerísimo día, cuando empezó nuestra colaboración en el departamento, y mártir del baño a 37°C (cómo te hacemos sufrir); gracias por tu bondad, comprensión y paciencia, por tu ayuda en el labo y por tener siempre tiempo para hacer lo que los demás a veces olvidamos (nos tendrías que reñir un poquito de vez en cuando). Markus, por ser el ejemplo del superlativo en persona, es decir, el más alto, el más inteligente, el más guapo... y también el más viejo (jajaja); gracias por amenizar tantos ratos con tus aventurillas y también por tus consejos “experimentales” (aún no he

olvidado nuestro asunto con Brad Pitt). Maite Saló, nuestra “fragueña” (¿o era fragantina?), por hacer que esté tan bien contigo en tan poco tiempo, por esa picardía y agudeza en tus comentarios que tanto me hacen reír a veces, por haber sido vecina en la poyata y haber aguantado como una campeona (ya sabes que hay material que es común) y por instruirnos en el arte del “marujeo” (¡es broma!). Anna y Mercè, que han animado al grupo con su llegada. Espero que tengáis mucha suerte en el camino que comenzáis, podéis contar conmigo para lo que necesitéis. No me puedo olvidar de Esther, “mi niña”, dulce y encantadora, y una de las personas con más interés y ganas de saber que he conocido (gracias por toda tu ayuda, nunca cambies); y tampoco de otros chic@s que han estado o están con nosotros: Anna, Jessica, Cristina, Ada, Sergi, Eugenio, Judith y Raquel. También tengo que recordar los buenos momentos que he pasado con Sonia Secchi y Silvia Ramírez y, cómo no, a todos aquellos que han pasado un tiempito con nosotros, aportándonos un trocito de lugares distintos: Roberto Carlos, Esmeralda, Karolina, Janine y Daniella. Me gustaría incluir, por último, en este grupo, a Sara y Ana Celeste, del grupo del Dr. Miquel Regué, por aquellas charlitas cuando venían de “compras”.

Gracias a todos los que me habéis acompañado durante estos años como parte que sois de un mismo departamento, por compartir cursos de doctorado, charlas en los pasillos, aparatos comunes y propios (sobretudo esos termocicladores...) y material de laboratorio, por amenizar unas prácticas, en fin, por toda vuestra ayuda, y por responder positivamente siempre que lo he necesitado. A Ruth, por sus halagadores piropos; a Maite M., por su interés; a Carolina, por esas carcajadas tan contagiosas; a Susana C. y Aiora A., por su ayuda en cultivo celular; a Óscar, por tener siempre un ratito para hablar; a Ana C., por su ternura; a Eli, mi compi de convivencias obligatorias; a l@s chic@s de la puerta de al lado, por hacerme reír en tantas ocasiones... en fin, no puedo nombrar a cada uno de vosotros, así que ¡GRACIAS A TODOS!. Gracias al personal administrativo del departamento, Manolo, Bea, Macu y Fina, por facilitarnos el “papeleo” y, en concreto a Fina, por compartir mis peleillas con alguna que otra odiosa factura. Y, cómo no, a Rosario... ¡a la búsqueda del reactivo perdido!

Gracias también al personal del estabulario de la Facultad de Biología, por su ayuda con roedores y lagomorfos; y a Ina G., de nuevo, y Oriol N., por su ayuda en los ensayos con GFP.

Laura, ¿cuántos son?. Yo te lo digo: ¡22 añazos desde que me clavaste aquel punzón por la espalda! (jeje, sabías que lo tenía que decir una vez más...). Y aquí seguimos. Gracias por compartirlo TODO durante todos estos años. Y creo que no se puede decir más, porque si empezara, me iban a faltar hojas. Así que, tan sólo “*I’ll be there for you, always*”. Albert, no me olvido de ti (por cierto, hoy día existe una amplia variedad de productos para tu bronceado en el mercado, jeje). Gracias Ester, porque aunque escogimos caminos distintos, sigues estando ahí y sé que lo estarás. Y gracias también a tu gallego, ¡vaya chef de cocina!.

Gracias Eva y Dani, ¿quién nos lo hubiera dicho a nosotros hace tan sólo un par de años?. Que sepáis que sois mis copiones del hogar favoritos (¡es broma!, lo de favoritos quiero decir). Gracias Marcos y Geles, aunque estéis lejos, y Jordi y Neus, por todos los buenos momentos. Edu, Teru y Robert, por supuesto estáis incluidos.

A lo más importante, mi familia, principalmente por todo su cariño y apoyo. Especialmente a mis abuelos, Eduardo y Ramón, que aunque no pudieron verme empezar, estoy segura de que me ven por un pequeño agujerito. A mis abuelas, Ana y Josefina, que siempre me preguntan: -“¿y cómo se dice lo que tú has estudiado?”-, y a mi tío, por su interés. A la mejor tía del mundo mundial, la mía, por su envidiable verborrea (ya la quisiera yo para mi), y por su gran interés por todo lo que hago. Gracias también Maribel. A Modesto y Pilar, a Víctor y Susana, a las yayas María y Pilar, por su gran acogida desde el primer día, y por seguir teniendo el valor de pronunciar esas peligrosas palabras... -“y tú... ¿qué es lo que haces en el laboratorio?”. Y a “mis cositas”, Aina y Duna, por ser un “mimo”, y Horus y Anubis, justo por lo contrario.

Gracias papa y mama, por todo vuestro esfuerzo con mi hermano y conmigo, porque siempre lo hemos tenido todo, por vuestro cariño y vuestra confianza, y por vuestro apoyo en nuestras decisiones. Gracias Sergio, ni contigo ni sin ti... por supuesto, siempre contigo. Se te echa mucho de menos.

A Carlos, por todo tu apoyo y tu ayuda (especialización obligatoria en Biología, entre otras cosas...), por hacer de los dos uno sólo, porque cada día me haces sentir la más especial, y porque tú eres para mi lo más especial. Nunca me faltes.

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 La familia <i>Aeromonadaceae</i>	7
1.1.1 Taxonomía	7
1.1.2 Hábitat	9
1.1.3 Patogenia y epidemiología	9
1.1.4 Factores de virulencia	11
1.1.4.1 Cápsula	11
1.1.4.2 Lámina S	12
1.1.4.3 Adhesinas	14
1.1.4.3.1 Fimbrias o <i>pili</i> (adhesinas filamentosas)	15
1.1.4.3.2 Adhesinas no filamentosas	16
1.1.4.4 Lipopolisacárido (LPS)	16
1.1.4.5 Flagelo	19
1.1.4.6 Sistemas de captación de hierro	22
1.1.4.7 Secreción de exotoxinas y otras enzimas extracelulares	23
1.1.4.7.1 Exotoxinas	23
1.1.4.7.1.1 Enterotoxinas	24
1.1.4.7.1.2 Hemolisinas	25
1.1.4.7.2 Otras enzimas extracelulares	26
1.1.4.7.3 Toxinas asociadas al sistema de secreción de tipo III	27
1.2 Vías de secreción en bacterias Gram-negativas	27
1.2.1 Sistema de secreción de tipo I (T1SS)	29
1.2.2 Sistema de secreción de tipo II (T2SS)	31
1.2.3 Sistema de secreción de tipo III (T3SS)	34
1.2.4 Sistema secreción de tipo IV (T4SS)	35
1.2.5 Sistema de secreción de tipo V (T5SS)	37
1.2.5.1 Sistema de autotransporte o tipo Va	37
1.2.5.2 Sistema Vb	40
1.2.5.3 Sistema Vc	41
1.2.6 Sistema de secreción de tipo VI (T6SS)	41
1.3 Sistema de secreción de tipo III (T3SS)	42
1.3.1 Estructura del aparato de secreción tipo III	45
1.3.1.1 Estructuras presentes en la superficie bacteriana	47
1.3.1.2 Estructuras embebidas en las membranas: el cuerpo basal	51
1.3.1.3 Translocadores	53
1.3.2 Ensamblaje de la maquinaria de secreción	54
1.3.3 Efectores	56
1.3.4 Señales de secreción	58

1.3.4.1 Señal proteica	59
1.3.4.2 Señal de ARNm	59
1.3.4.3 Chaperonas de tipo III	59
1.3.5 Organización génica	62
1.3.6 Regulación	64
OBJETIVOS	71
2. MATERIAL Y MÉTODOS	73
2.1 Cepas bacterianas	75
2.2 Vectores	76
2.3 Cebadores	78
2.4 Medios de cultivo y suplementos	81
2.4.1 Medios de cultivo	81
2.4.2 Suplementos	81
2.5 Técnicas de genética molecular	82
2.5.1 Aislamiento de ADN genómico	82
2.5.2 Aislamiento de ADN plasmídico	82
2.5.3 Aislamiento de ARN	82
2.5.4 Purificación de ADN mediante extracción fenólica	83
2.5.5 Precipitación de ADN	83
2.5.6 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	84
2.5.7 Cuantificación del ADN	84
2.5.7.1 Cuantificación en geles de agarosa	84
2.5.7.2 Cuantificación espectrofotométrica	85
2.5.8 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	85
2.5.9 Reacciones enzimáticas con el ADN	85
2.5.9.1 Restricciones	85
2.5.9.2 Obtención de extremos romos	86
2.5.9.3 Desfosforilación de vectores	86
2.5.9.4 Ligación	86
2.5.10 Construcción de una librería genómica	86
2.5.11 Sustracción génica	87
2.5.12 Métodos de transferencia genética	89
2.5.12.1 Transformación mediante electroporación	89
2.5.12.2 Conjugación en medio sólido	90
2.5.13 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	90
2.5.13.1 Amplificación de fragmentos de ADN	90
2.5.13.2 Amplificación de fragmentos de ADN mediante <i>Genome walking</i>	92
2.5.13.3 Transcripción reversa (RT-PCR)	93
2.5.14 Secuenciación de fragmentos de ADN	94

2.5.15 Software utilizado para el análisis de secuencias	95
2.5.16 Detección de fragmentos de ADN	96
2.5.16.1 Preparación de sondas	96
2.5.16.2 <i>Colony blot</i>	96
2.5.16.3 <i>Dlot blot</i>	97
2.5.16.4 <i>Southern blot</i>	97
2.5.17 Técnicas de mutagénesis	98
2.5.17.1 Mutagénesis dirigida mediante recombinación en un punto	98
2.5.17.2 Mutagénesis dirigida mediante doble recombinación	98
2.5.17.2.1 Inserción de un determinante de resistencia a Km	98
2.5.17.2.2 Delección en pauta de un fragmento interno del gen a mutar	100
2.5.18 Estudio de la expresión génica mediante el uso del gen <i>reporter gfp</i>	100
2.6 Técnicas experimentales con proteínas	102
2.6.1 Obtención de proteínas bacterianas	102
2.6.1.1 Proteína celular total	102
2.6.1.2 Proteína de membrana externa	103
2.6.1.3 Proteína de membrana interna	103
2.6.1.4 Proteína de extractos crudos	104
2.6.1.5 Proteína periplásmica	104
2.6.1.6 Purificación y concentración de sobrenadantes	105
2.6.2 Cuantificación de proteínas por el método Bradford	105
2.6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida	106
2.6.4 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana (<i>Western blotting</i>)	107
2.6.4.1 Transferencia de proteínas a membrana por sistema semi-seco	107
2.6.4.2 Inmunodetección y revelado colorimétrico	107
2.6.5 Obtención de proteínas recombinantes	108
2.6.5.1 Clonaje de la región codificante de la proteína de interés	109
2.6.5.2 Sobreexpresión y localización subcelular de proteínas recombinantes	110
2.6.5.3 Purificación de proteínas recombinantes	111
2.6.6 Ensayo de la actividad ADP-ribosiltransferasa	111
2.7 Técnicas experimentales con células eucariotas	111
2.7.1 Cultivo de células eucariotas	111
2.7.2 Ensayo de citotoxicidad	112
2.7.3 Ensayo de translocación	112
2.7.4 Ensayos con células fagocíticas	113
2.7.4.1 Aislamiento de células fagocíticas	113
2.7.4.2 Observación microscópica de células fagocíticas infectadas	114
2.7.4.3 Ensayo de fagocitosis	114
2.8 Técnicas experimentales con animales	115
2.8.1. Obtención de sueros inmunes	115

2.8.1.1	Inmunización de conejos	115
2.8.1.2	Obtención de suero	115
2.8.2	Experimentos de dosis letal ₅₀	115
3.	RESULTADOS	117
3.1	Identificación de genes potencialmente implicados en virulencia en <i>A. hydrophila</i> mediante sustracción génica	119
3.2	Caracterización de la agrupación génica implicada en la formación del sistema de secreción de tipo III de <i>Aeromonas</i> mesófilas	122
3.2.1	Clonaje de la agrupación génica del T3SS de la cepa AH-1 de <i>A. hydrophila</i>	122
3.2.1.1	Obtención de un fragmento génico de la agrupación	122
3.2.1.2	Secuenciación de la agrupación génica	123
3.2.2	Clonaje de la agrupación génica del T3SS de la cepa AH-3 de <i>A. hydrophila</i>	124
3.2.2.1	Obtención de una sonda específica	124
3.2.2.2	Hibridación de la librería genómica de la cepa AH-3	124
3.2.2.3	Secuenciación de la agrupación génica	124
3.2.3	Análisis de las secuencias de nucleótidos de las agrupaciones génicas del T3SS	125
3.2.3.1	ORF34: Puente periplásmico del T3SA	130
3.2.3.2	ORF2, ORF3, ORF4 y ORF14: Componentes de membrana del aparato de exportación	131
3.2.3.3	ORF1 y ORF6: Regulación de la especificidad de sustrato	134
3.2.3.4	ORF28: Otra proteína de membrana interna	136
3.2.3.5	ORF5, ORF8, ORF35 y ORF36: Complejo ATPasa	137
3.2.3.6	ORF27: La secretina del T3SS	140
3.2.3.7	ORF30: Unidad formadora de la aguja	141
3.2.3.8	ORF29 y ORF31: Complejo chaperona de la subunidad formadora de la aguja	141
3.2.3.9	ORF7: Reconocimiento de sustratos de secreción	142
3.2.3.10	ORF9, ORF10, ORF11 y ORF26: Válvula AopN de regulación de la secreción	143
3.2.3.11	ORF15, ORF16, ORF17, ORF18, ORF19 Y ORF20: Válvula AcrG de regulación de la secreción y formación del complejo de translocación	145
3.2.3.12	ORF12 y ORF13: Formación de un T3SA competente	149
3.2.3.13	ORF32: Putativo factor de virulencia	150
3.2.3.14	ORF21, ORF22, ORF23, ORF24 y ORF25: Cascada de regulación transcripcional específica de T3SS	151
3.2.3.15	ORF33: Función desconocida	153
3.2.4	Unidades transcripcionales de las agrupaciones génicas del T3SS de <i>A. hydrophila</i> AH-1 y AH-3	156
3.2.4.1	Unidades transcripcionales de la agrupación génica del T3SS de <i>A. hydrophila</i> AH-1	156
3.2.4.2	Unidades transcripcionales de la agrupación génica del T3SS de <i>A. hydrophila</i> AH-3	157

3.2.5 Distribución de los genes del T3SS en diferentes cepas de <i>Aeromonas</i> mesófilas	157
3.2.5.1 Obtención de sondas	157
3.2.5.2 Hibridación de ADN mediante <i>dot blot</i>	158
3.3 Análisis de la relación T3SS-virulencia en <i>A. hydrophila</i>	159
3.3.1 Construcción de mutantes en los genes <i>aopB</i> y <i>aopD</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-1 mediante recombina- ción homóloga en un punto	159
3.3.2 Complementación de los mutantes AH-1:: <i>aopB</i> y AH-1:: <i>aopD</i> con el cósmido pLA- A1T3SS	160
3.3.3 Caracterización fenotípica de los mutantes en <i>aopB</i> y <i>aopD</i>	160
3.3.3.1 Cálculo de la DL ₅₀	160
3.3.3.2 Ensayos de citotoxicidad	161
3.3.3.3 Ensayos de fagocitosis	162
3.3.4 Construcción de un mutante en el gen <i>ascV</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3 mediante recombina- ción homóloga en un punto	164
3.3.5 Complementación del mutante AH-3:: <i>ascV</i> con el cósmido pLA-T3SS4	165
3.3.6 Caracterización fenotípica del mutante en <i>ascV</i>	165
3.3.6.1 Cálculo de la DL ₅₀	165
3.3.6.2 Ensayos de citotoxicidad	166
3.3.6.3 Ensayos de fagocitosis	167
3.4 Caracterización del efector AexT de <i>A. hydrophila</i> AH-3	168
3.4.1 Detección del efector AexT en <i>A. hydrophila</i> AH-3	168
3.4.2 Caracterización de la región génica codificante del gen <i>aexT</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3	169
3.4.2.1 Clonaje de la región génica codificante del gen <i>aexT</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3	169
3.4.2.2 Secuenciación de la región génica codificante del gen <i>aexT</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3 ..	170
3.4.3 Estudio de la codistribución de la agrupación génica del T3SS y el gen <i>aexT</i> en diferentes cepas de <i>Aeromonas</i> mesófilas	171
3.4.4 Obtención de suero contra la proteína AexT de <i>A. hydrophila</i> AH-3	172
3.4.4.1 Obtención y purificación de la proteína recombinante AexT-His	172
3.4.4.2 Obtención de suero anti-AexT	173
3.4.5 Análisis de la mutación en el gen <i>aexT</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3	173
3.4.5.1 Construcción del mutante <i>aexT</i> mediante recombina- ción en un punto	173
3.4.5.2 Complementación del mutante AH-1089	173
3.4.5.3 Caracterización fenotípica del mutante AH-1089 (AH-3:: <i>aexT</i>)	174
3.4.5.3.1 Inmunodetección de la proteína AexT en citoplasmas	174
3.4.5.3.2 Cálculo de la DL ₅₀	174
3.4.5.3.3 Ensayo de citotoxicidad	175
3.4.5.3.4 Ensayo de fagocitosis	176
3.4.6 Ensayo de la actividad ADP-ribosiltransferasa de la proteína AexT de <i>A. hydrophila</i> AH-3 ..	177
3.5 Análisis de la expresión del T3SS y del efector AexT de la cepa AH-3 de <i>A. hydrophila</i>	178
3.5.1 Obtención del recombinante para la fusión promotor <i>aopNaopD-gfp</i> (AH-1206)	178

3.5.2 Obtención del recombinante para la fusión promotor <i>aexT-gfp</i> (AH-1199)	179
3.5.3 Condiciones de activación de la expresión	180
3.5.4 Efecto de diferentes proteínas bacterianas en la expresión de genes de tipo III en <i>A. hydrophila</i> AH-3	184
3.5.4.1 Componentes del T3SS	185
3.5.4.2 Sistema de dos componentes PhoP/PhoQ	187
3.5.4.3 Sistema AhyI/AhyR	188
3.5.4.4 Subunidad AceA de la enzima piruvato deshidrogenasa	189
3.5.4.5 Proteína periplásmica DsbA	191
3.5.4.6 Genes implicados en la biosíntesis del flagelo polar	192
3.5.4.7 Genes implicados en la biosíntesis del lipopolisacárido	194
3.6 Inducción del T3SS de <i>A. hydrophila</i> AH-3	195
3.6.1 Construcción de un mutante en el gen <i>aopN</i> mediante doble recombinación	195
3.6.2 Complementación del mutante AH-1114	196
3.6.3 Inducción del T3SS por depleción de calcio	197
3.6.4 Inducción del T3SS por contacto con células eucariotas	198
4. DISCUSIÓN	201
4.1 Identificación, mediante sustracción génica, de genes potencialmente implicados en virulencia en <i>A. hydrophila</i>	203
4.2 Caracterización de la agrupación génica del sistema de secreción de tipo III de <i>Aeromonas</i> mesófilas	204
4.2.1 Análisis de la secuencia de nucleótidos del T3SS de <i>Aeromonas</i> spp.	204
4.2.2 Distribución de los genes del T3SS en diferentes cepas de <i>Aeromonas</i> mesófilas	209
4.3 Análisis de la relación T3SS-virulencia en <i>A. hydrophila</i> AH-1 y AH-3	209
4.4 Caracterización del efector AexT de <i>A. hydrophila</i> AH-3	213
4.4.1 Análisis de la secuencia de la región génica codificante del gen <i>aexT</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3	213
4.4.2 Estudio de la codistribución de la agrupación génica de T3SS y el gen <i>aexT</i> en diferentes cepas de <i>Aeromonas</i> mesófilas	216
4.4.3 Mutagénesis del gen <i>aexT</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3	216
4.5 Análisis de la expresión del T3SS y del efector AexT de la cepa AH-3 de <i>A. hydrophila</i>	217
4.5.1 Condiciones de activación de la expresión	217
4.5.2 Efecto de diferentes proteínas bacterianas en la expresión de genes de tipo III en <i>A. hydrophila</i> AH-3	220
4.5.2.1 Componentes del T3SS	220
4.5.2.2 Sistema de dos componentes PhoP/PhoQ	221
4.5.2.3 Sistema AhyI/AhyR	222
4.5.2.4 Subunidad AceA del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa	224
4.5.2.5 Proteína periplásmica DsbA	225

4.5.2.6 Genes implicados en la biosíntesis del flagelo	226
4.5.4.7 Genes implicados en la biosíntesis del lipopolisacárido	228
4.6 Inducción del T3SS de <i>A. hydrophila</i> AH-3	230
4.6.1 Inducción del T3SS por depleción de calcio	230
4.6.2 Inducción del T3SS por contacto con células eucariotas	231
5. CONCLUSIONES	233
6. BIBLIOGRAFÍA	237
7. ANEXOS	279
7.1 Nomenclatura de los genes del sistema de secreción de tipo III	281
7.2 Secuencia nucleotídica de la agrupación génica del sistema de secreción de tipo III de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-1	283
7.3 Secuencia nucleotídica de la agrupación génica del sistema de secreción de tipo III de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-1	303
7.4 Secuencia nucleotídica de la región génica codificante del efector de tipo III AexT de <i>Aeromonas hydrophila</i> AH-3	323

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

ADN-T: ADN tumoral

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

ARNr: ADN ribosómico

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

Col: colistina

cpm: cuentas por minuto

DEPC: dietilpirocarbonato

DL₅₀: dosis letal₅₀

DMF: dimetilformamida

DNasa: desoxiribonucleasa

ddNTP: didesoxinucleótido trifosfato

dGTP: desoxiguanina trifosfato

dNTP: desoxiribonucleótido trifosfato

Da/kDa: Daltons / KiloDaltons

DO_x: densidad óptica a una longitud de onda de x nanómetros

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

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*

EPC: epiteloma papiloso de carpa

EPEC: *E. coli* enteropatogénica

F-G

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

FT3SS: sistema de secreción de tipo III flagelar (*flagellar type III secretion system*)

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

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

G+C: guanina + citosinas

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

GCAT: glicerofosfolípido aciltransferasa

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

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*)

HTH: motivo hélice-vuelta-hélice (*Helix-Turn-Helix motif*)

IPTG: isopropil-B-D-tiogalactopiranosido

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

Km: kanamicina

L-M

L-15: medio Leibowitz L-15

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

LCR: respuesta a baja concentración de calcio (*low calcium response*)

LIC: clonaje independiente de ligación (*ligation-independent cloning*)

LOS: lipooligosacárido

LPS: lipopolisacárido

tipo S: liso (*smooth*)

tipo R: rugoso (*rough*)

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

MEM: medio mínimo esencial

MOI: multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*)

MTB: rama terminal principal (*main terminal branch*)

N-O

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NBT: disodio-nitroazul tetrazolio

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

NET: tampón cloruro sódico-tris-EDTA

Npt: neomicina fosfotransferasa

NDP: nucleósido difosfatasa

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)

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

PLC: fosfolipasa C

PM: peso molecular

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro

PPD: Departamento de Producción Primaria Singapur (*Primary Production Department*)

R-S

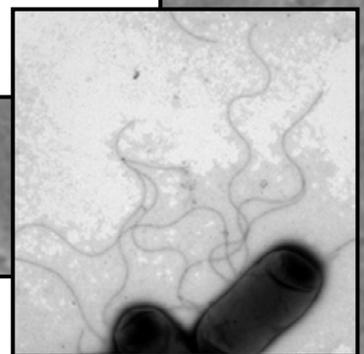
RBS: sitio de unión a ribosoma (*ribosome binding site*)

Rif: rifampicina

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

rpm.: revoluciones por minuto	TCA: ácido tricloroacético
RT-PCR: retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa	TBE: tampón Tris-borato-EDTA
SDS: sodio dodecil sulfato	TE: tampón Tris-EDTA
SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato	TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
SLS: lauril sarcosinato sódico	TI: insoluble en Triton
Spc: spectinomicina	Tm: temperatura hibridación ADN/cebador
SRP: partícula de reconocimiento de señal (<i>signal recognition particle</i>)	TPR: repeticiones tetratricopéptido (<i>TetratricoPeptide Repeats</i>)
SSC: Tampón citrato de sodio salino	Tris: Tris (hidroximetil) aminometano
SSH: hibridación supresiva-sustractiva (<i>suppression subtractive hybridization</i>)	TS: soluble en Triton
st: estándar	TSA: agar de triptona y soja (<i>tryptic soy agar</i>)
	TSB: caldo de triptona y soja (<i>tryptic soy broth</i>)
	U: unidad
	UFR: unidad de fluorescencia relativa
	UndPP: undecaprenil pirofosfato
	X-Gal:5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosido
	Yop: proteínas secretadas vía T3S por <i>Yersinia</i> spp. (<i>Yersinia outer proteins</i>)
	NOTA: no se incluyen unidades de medida.
T-U-V-W-X-Y-Z	
T1S: secreción de tipo I (<i>type I secretion</i>)	
T2S: secreción de tipo II (<i>type II secretion</i>)	
T3S: secreción de tipo III (<i>type III secretion</i>)	
T3SA: aparato de secreción de tipo III (<i>type III secretion apparatus</i>)	
T4S: secreción de tipo IV (<i>type IV secretion</i>)	
T5S: secreción de tipo V (<i>type V secretion</i>)	
T1SS: sistema de secreción de tipo I (<i>type I secretion system</i>)	
T2SS: sistema de secreción de tipo II (<i>type II secretion system</i>)	
T3SS: sistema de secreción de tipo III (<i>type III secretion system</i>)	
T4SS: sistema de secreción de tipo IV (<i>type IV secretion system</i>)	
T5SS: sistema de secreción de tipo V (<i>type V secretion system</i>)	
T6SS: sistema de secreción de tipo VI (<i>type VI secretion system</i>)	
TAE: tampón Tris-acetato-EDTA	
Tat: translocación mediante motivo de dos argininas (<i>twin arginine translocation</i>)	
Tc: tetraciclina	

1. Introducción



1.1 La familia *Aeromonadaceae*

1.1.1 Taxonomía

La familia *Aeromonadaceae* incluye el género *Aeromonas*, que está constituido por 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 de este género bacteriano son generalmente móviles por flagelación polar, habiéndose descrito *A. salmonicida* y *A. media* como especies no móviles. Se diferencian de la mayoría de especies del género *Vibrio* porque son resistentes al agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina) y son capaces de crecer sin NaCl (Kirov, 1997). El porcentaje de guanina-citosina del ADN del género oscila entre el 57% y el 64%.

La taxonomía del género es compleja y se ha visto sometida a continuos cambios. La publicación de Saranelli en 1891 se considera la primera descripción de un aislamiento de *Aeromonas*, con el nombre *Bacillus hydrophilus fuscus*, a partir de sangre y tejido ganglionar de una rana infectada. A partir de entonces, varios autores describieron cepas similares aisladas en diferentes animales y su nomenclatura fue cambiando progresivamente, hasta que en 1936 Kluver y van Neil propusieron la asignación de este microorganismo a un nuevo género, *Aeromonas*, nombre que deriva de las palabras griegas *aer*, que significa aire o gas, y *monas*, que significa unidad, es decir, unidades productoras de gas. Durante muchos años el género *Aeromonas* fue clasificado dentro de la familia *Vibrionaceae* con los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Photobacterium* (Popoff, 1984), hasta que estudios realizados por Colwell y colaboradores demostraron que el género presentaba una evolución filogenética suficientemente distinta de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, y propusieron elevar el género *Aeromonas* a la categoría de familia con rango taxonómico propio (Colwell *et al.*, 1986). De igual manera, en la primera edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (Popoff, 1984), el género *Aeromonas* fue dividido en dos grandes grupos: las especies mesófilas y móviles (*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*), y las especies psicrófilas e inmóviles (*A. salmonicida*). En la

clasificación actual aún se mantiene esta división, distinguiendo entre: el grupo de las *Aeromonas* mesófilas, que contiene diferentes especies móviles por flagelación polar y un 60% también por flagelación lateral (a excepción de *A. media*); y el grupo de las *Aeromonas* psicrófilas, que contiene una única especie inmóvil, *A. salmonicida*.

Las primeras clasificaciones dentro del género 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 número creciente 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 σ^{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 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) y bv. *veronii* (HG10)), *A. jandaei* (HG9), *A. schubertii* (HG12), *A. trota* (HG14), *A. allosaccharophila* (HG15), *A. encheleia* (HG16), *A. popoffii* (HG17), y los dos grupos

de hibridación de ADN, *Aeromonas* sp. HG11 y *Aeromonas* sp. HG13 (previamente Grupo Entérico 501), que aún no tienen asociada una especie concreta. Recientemente se han descrito tres nuevas especies: *A. culicicola* (Pidiyar *et al.*, 2002), *A. simiae* (Harf-Monteil *et al.*, 2004) y *A. molluscorum* (Miñana-Galbis *et al.*, 2004). Se han propuesto otras especies como *A. ichthiosmia* y *A. enteropelogenes*, que actualmente se consideran sinónimas de *A. veronii* y *A. trota*, respectivamente (Collins *et al.*, 1993).

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).

1.1.3 Patogenia y epidemiología

Las especies del género *Aeromonas* se reconocen desde hace más de 100 años como patógenos de animales poiquilotermos, 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 (formación de

lesiones o furúnculos) 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 (ojos saltones) y distensión abdominal. A nivel interno, se puede observar anemia, e hinchamiento de hígado y riñón (Miyazaki and Kaige, 1985).

Se han descrito brotes epidémicos en granjas de conejos, con un alto nivel de mortalidad, atribuidos a *A. hydrophila* (Paniagua *et al.*, 1998), y se han aislado cepas de *Aeromonas* de heces de perros y gatos (Ghenghesh *et al.*, 1999), con una mayor incidencia en los primeros (10.8%) que en los segundos (6.7%), así como de heces de caballo (Hathcock *et al.*, 1999), indicando estos hechos que los animales domésticos deben ser considerados como otra fuente potencial de infecciones por *Aeromonas*.

Las *Aeromonas* mesófilas están emergiendo como importantes patógenos en humanos, causando gran variedad de infecciones extraintestinales y también infecciones gastrointestinales. Aproximadamente el 85% de los aislamientos clínicos del género *Aeromonas* pertenecen a tres genoespecies: *A. hydrophila* (HG1), *A. caviae* (HG4) y *A. veronii* bv. *sobria* (HG8) (Janda, 1991). Entre las infecciones extraintestinales, se incluyen: septicemia, generalmente observada en individuos inmunocomprometidos; infecciones de heridas, principalmente infecciones cutáneas superficiales, aunque pueden complicarse y afectar a tendones, músculos y huesos; infecciones del tracto respiratorio, desde epiglotitis a neumonía; y, con menor frecuencia, meningitis, peritonitis, infecciones oculares y síndrome hemolítico urémico (Janda and Abbott, 1998). Por otro lado, las infecciones gastrointestinales asociadas a *Aeromonas* spp. dan lugar a procesos diarreicos que van desde una forma de diarrea líquida autolimitante hasta una diarrea más severa e invasiva. Desde el punto de vista geográfico, la presencia de *Aeromonas* en heces asociada a sintomatología diarreica oscila entre el 80% en Canadá y el 0.18% en Dinamarca, siendo otros países documentados Perú (54.2%),

Tailandia (18-31%), Japón (11.1%), Australia (11%) e Inglaterra (11%) (Borrell, 1998). Estos procesos entéricos se dan en todos los grupos de edad, aunque la población infantil es la más afectada, en particular niños con una edad inferior a los 2 años. 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).

1.1.4 Factores de virulencia

El conocimiento de las moléculas y los mecanismos que intervienen en la patogenicidad bacteriana es uno de los principales temas de investigación en microbiología, investigación que a su vez da lugar a una variedad de aplicaciones prácticas, tales como el desarrollo de refinados diagnósticos y nuevos antibióticos o la mejora de vacunas. Además de estas utilidades prácticas, el estudio de la patogenicidad bacteriana ha permitido la comprensión de parte de las complejas interacciones entre los patógenos y sus huéspedes a nivel celular y molecular.

La variedad de manifestaciones clínicas observadas en las infecciones provocadas por *Aeromonas* concuerda con la idea de que estas infecciones 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).

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, y el sistema de secreción de tipo III y la secreción de otras exotoxinas y enzimas extracelulares.

1.1.4.1 Cápsula

La cápsula es una estructura polisacáridica que recubre la membrana externa de la bacteria. 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 *A. 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 JCM3980 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).

1.1.4.2 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, que se autoensamblan constituyendo una estructura supramolecular con una morfología ultraestructural precisa. Debido a su posición se ha descrito que cumple diversas funciones biológicas: adhesión, protección frente a 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



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

un método para la detección de las aeromonadas O:11 en alimentos, mediante la realización de un ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Merino *et al.*, 1993a).

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 de 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).

1.1.4.3 Adhesinas

La capacidad de la bacteria de adherirse y colonizar las mucosas del organismo huésped es un paso crítico para el desarrollo de la infección. Las *Aeromonas* spp. producen adhesinas que les permiten adherirse a receptores específicos que se encuentran en la superficie de células eucariotas. Muchos de los receptores en el huésped son carbohidratos que se expresan en eritrocitos. En este sentido, la

hemoaglutinación se ha utilizado para la detección de adhesinas, aunque no todas las adhesinas presentan la capacidad de hemoaglutinar. Se han descrito dos clases de adhesinas en *Aeromonas*, unas se han asociado con apéndices filamentosos (fimbrias o *pili*), y otras con proteínas de la membrana externa (Burke *et al.*, 1984) y otras estructuras.

1.1.4.3.1 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. Se han descrito diferentes tipos de fimbrias atendiendo a su morfología y a los antígenos que presentan. En aislados tanto clínicos como ambientales de *Aeromonas* mesófilas, 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 μm , 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 ($< 22^\circ\text{C}$, en medio líquido).

Las fimbrias L/W son largas, finas (4-7 nm), 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 1.2). 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

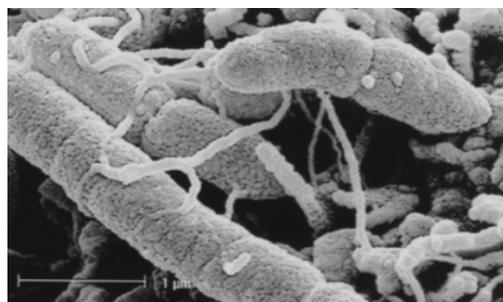


Figura 1.2 Micrografía electrónica de barrido de la adhesión de *A. veronii* bv. *sobria* a células Henle 407 mediante *pili* Bfp. Kirov, 1999.

“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). En especies de *Aeromonas* asociadas con gastroenteritis, existen dos familias de *pili* de tipo IV: Bfp (*Bundle-Forming Pili*) y Tap (*Type IV Aeromonas Pili*) (Barnett *et al.*, 1997). 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).

1.1.4.3.2 Adhesinas no filamentosas

Aeromonas spp. presenta en su superficie otras macromoléculas que han sido consideradas adhesinas, como los monómeros constituyentes de la lámina S, el lipopolisacárido y diferentes proteínas de membrana externa. Entre las proteínas de membrana externa, se ha descrito que las porinas podrían actuar como adhesinas tipo lectina para la unión de la bacteria a superficies ricas en carbohidratos, como los eritrocitos y probablemente las células del intestino humano (Quinn *et al.*, 1994).

1.1.4.4 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 (figura 1.3). La única porción lipídica, el lípido A, es una estructura altamente conservada y ligada de manera covalente al complejo polisacárido. Está compuesto de azúcares y ácidos grasos, y permite el anclaje del LPS en la capa externa de la membrana externa. 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. El núcleo se compone de azúcares y derivados de éstos, como el ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico (Kdo). El antígeno O es una estructura que se extiende hacia el exterior celular y se compone de unidades oligosacáridicas repetidas, generalmente compuestas por 3-6 azúcares (unidades O), que frecuentemente

se repiten entre 10 y 30 veces. 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).

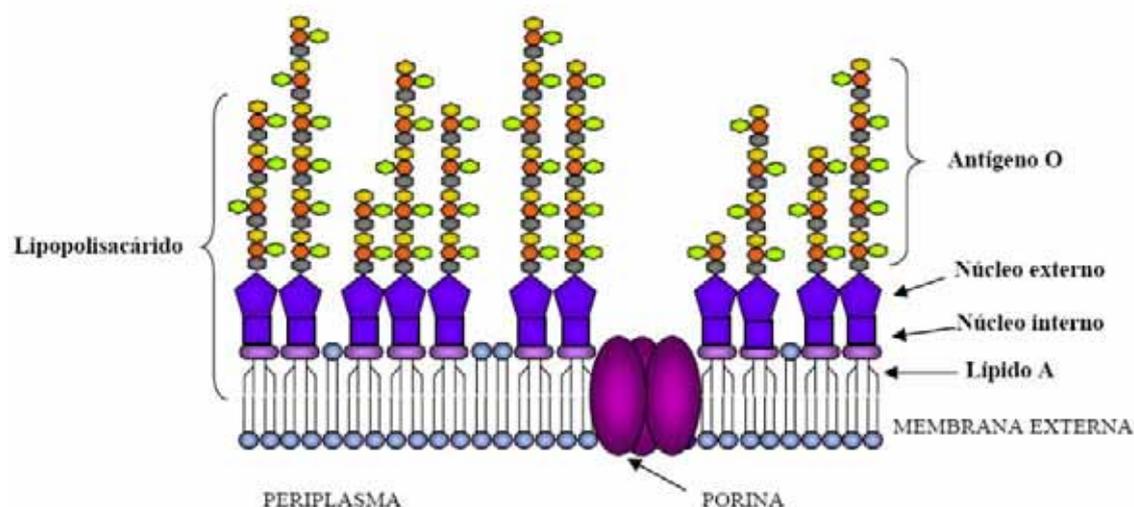


Figura 1.3 Estructura y disposición del LPS en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas.

Las moléculas de LPS que presentan el antígeno O, con diversas longitudes de cadena, unido al núcleo-lípido A, se conocen como formas de LPS de tipo S (*Smooth*). No obstante, también se pueden encontrar algunas moléculas que sólo contienen el lípido A y el núcleo, completo o truncado, y se conocen como LPS de tipo R (*Rough*). Esta nomenclatura de las formas de LPS se debe al aspecto que presentan las colonias bacterianas, observándose lisas en las formas S y con bordes rugosos en las R (Whitfield *et al.*, 1997). Por otro lado, algunos patógenos Gram-negativos de las mucosas, como los géneros *Haemophilus* o *Neisseria*, no poseen 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).

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 Abbott, 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 *A. hydrophila* O:34 se han observado cambios fenotípicos en el LPS como consecuencia de una adaptación térmica. Así, temperaturas elevadas (37°C) provocan un incremento 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 de tipo R (Aguilar *et al.*, 1997).

Se ha caracterizado la estructura química del lípido A, del núcleo del LPS (Knirel *et al.*, 2004) y del antígeno O (Knirel *et al.*, 2002) de *A. hydrophila* O:34, y también del lípido A (Wang *et al.*, 2006a) y el núcleo del LPS (Wang *et al.*, 2006b) de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, presentando ésta última una estructura similar a la de *A. hydrophila* y diferenciándose sólo en un fragmento trisacárido del extremo del núcleo externo. Además, se han descrito las estructuras químicas del antígeno O:11 de *A. hydrophila* LL1 (Dooley *et al.*, 1985) y del antígeno O de varias cepas de *A. salmonicida* (Wang *et al.*, 2005). Cabe destacar que la cepa 80204-1 de *A. salmonicida*, sólo en las condiciones en que es capaz de producir la cápsula, produce un antígeno O diferente que presenta una estructura idéntica a la del polisacárido capsular (Wang *et al.*, 2004).

En la cepa PPD134/91 de *A. hydrophila* (serogrupo O:18), se ha descrito una agrupación génica implicada en la biosíntesis del antígeno O del LPS. Tal y como sucede en otras agrupaciones génicas que codifican el núcleo del LPS, el antígeno O o la cápsula, esta agrupación incluye 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. La función de muchos de estos genes todavía no ha podido ser asignada debido a que no se dispone de la estructura química (Zhang *et al.*, 2002).

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).

1.1.4.5 Flagelo

El flagelo bacteriano es un apéndice largo (15-20 μm 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 1.4). 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

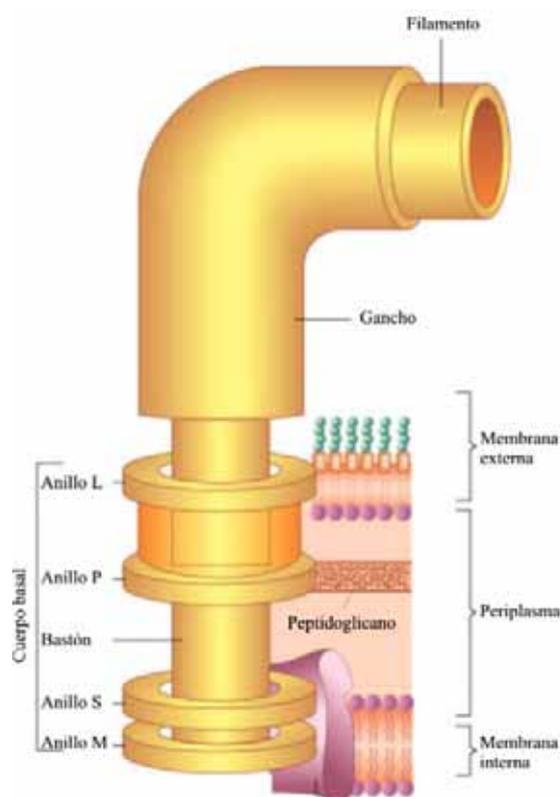


Figura 1.4 Estructura del flagelo de bacterias Gram-negativas. Figura tomada de <http://www.educa.aragob.es>

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.

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 subpolar; 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 ocurre 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* (“enjambrado”). 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 del 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, al menos, en seis regiones cromosómicas distintas. 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, 2007). 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 para 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).

1.1.4.6 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. Algunas *Aeromonas* spp. también podrían adquirir el hierro *in vivo* por contacto directo entre proteínas secuestradoras de hierro del huésped y alguna proteína de membrana de unión de la bacteria (Stintzi and Raymond, 2000). Otro mecanismo alternativo para obtener hierro sin la intervención de sideróforos es el uso del grupo hemo como fuente de hierro, sobretodo en forma de hemoglobina, caso en que se requiere de la destrucción hemolítica de las células huésped para acceder al hierro del grupo hemo (apartado 1.1.4.7.2).

La mayoría de *Aeromonas* mesófilas producen uno de 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-dihidroxidobenzoico (2,3-DHB) conjugado con aminoácidos (Telford and Raymond, 1998). De este modo, en *Aeromonas* spp. la biosíntesis de 2,3-DHB está codificada por dos agrupaciones génicas diferentes: la agrupación *amo*, presente en las cepas productoras de amonobactina, y la agrupación *aeb* (del inglés *Aeromonad Enterobactin Biosynthesis*), propia de las productoras de enterobactina (Massad *et al.*, 1994).

Los sistemas de captación de hierro mediante sideróforos se componen de un segundo elemento, además del sideróforo propiamente dicho. Se trata del aparato asociado a la célula y responsable de procesar el sideróforo unido a hierro con la finalidad de entregar el metal al metabolismo bacteriano. Este sistema incluye un receptor, específico para el sideróforo, unido a membrana. En *A. hydrophila*, se ha descrito un único receptor y transportador de hierro en la membrana externa de la bacteria, que es dependiente de amonabactina. El transporte implica un proceso de intercambio de ligando, o mecanismo lanzadera, que tiene lugar en la superficie celular cuando el ferri-sideróforo transfiere el átomo de hierro a un apo-sideróforo previamente unido al receptor. Además, el receptor de amonabactina de *A. hydrophila* presenta baja especificidad, y ello le permite transportar un extraordinariamente amplio rango de sideróforos, con grupos quelantes tan variados como catecolato, hidroxamato o hidroxipiridonato (Stintzi and Raymond, 2000). También se ha secuenciado el gen que codifica el receptor de sideróforos en *A. salmonicida*, *ftsA*, que muestra homología con otros genes *ftsA* de bacterias patógenas Gram-negativas (Pemberton *et al.*, 1997).

1.1.4.7 Secreción de exotoxinas y otras enzimas extracelulares

1.1.4.7.1 Exotoxinas

Se ha descrito que el género *Aeromonas* produce una gran variedad de exotoxinas. No obstante, no todas las cepas del género producen la totalidad de toxinas descritas hasta la fecha y, aunque ciertas cepas posean los genes que codifican una toxina en concreto, éstos sólo se expresan en determinadas condiciones de crecimiento.

1.1.4.7.1.1 Enterotoxinas

Se han descrito dos tipos diferentes de enterotoxinas en *Aeromonas* spp.: citotóxicas, que provocan daños importantes en el epitelio del intestino delgado, y citotónicas, que no producen degeneración del epitelio.

Enterotoxinas citotóxicas

También conocidas como enterotoxinas citolíticas, β -hemolisinas o aerolisinas. Dañan seriamente el epitelio intestinal y las cepas productoras se aíslan habitualmente de enfermos diarreicos. Pueden llegar a producir hemólisis, citotoxicidad y enterotoxicidad (Chopra *et al.*, 1993). Se sintetizan como preproteínas que contienen una secuencia señal que se separa al atravesar la membrana. El producto resultante, o proproteína, continua siendo inactivo hasta que pierde 25 aminoácidos de su extremo carboxi-terminal (C-terminal), es decir, la proteína necesita ser activada por proteólisis, siendo entonces capaz de oligomerizar y formar poros en la membrana de las células huésped. Estos poros pueden provocar un desequilibrio aniónico que explicaría su efecto enterotóxico (van der Goot, 1994).

Asao y colaboradores purificaron, a partir de *A. hydrophila*, una hemolisina que presentaba varias actividades biológicas: hemolítica, citotóxica, enterotóxica y letalidad en ratones (Asao *et al.*, 1984). Más tarde, dos grupos diferentes publicaron el clonaje de un gen aerolisina, *aerA*, de *A. trota* y *A. bestiarum* (Chakraborty *et al.*, 1986; Howard and Buckley, 1986). A nivel de ADN, la región codificante de estos genes presentan un 75% de homología, sin embargo, la región 5' de ambos es bastante divergente. Posteriormente, Ferguson y colaboradores, a partir de la cepa SSU de *A. hydrophila*, purificaron una nueva enterotoxina citotóxica, Act, que mostraba actividades similares a las asociadas a enterotoxinas previamente descritas (Ferguson *et al.*, 1997). Estudios detallados de las funciones y estructuras de la aerolisina descrita por Howard y colaboradores y de la enterotoxina Act descrita por Chopra y colaboradores indican que ambas proteínas están íntimamente relacionadas, aunque presentan heterogeneidad aminoacídica en algunas regiones (Buckley and Howard, 1999).

También se ha demostrado que la enterotoxina citotóxica Act tiene un papel importante en la patogénesis de infecciones causadas por *Aeromonas* (Xu *et al.*, 1998) y se han realizado estudios de las cascadas de señalización intracelular, inducidas por Act,

que llevan a la producción de mediadores de la inflamación en macrófagos (Galindo *et al.*, 2003) y en células epiteliales humanas (Galindo *et al.*, 2005). Además, se ha investigado el papel de esta enterotoxina como inductor de la apoptosis (Galindo *et al.*, 2006).

Enterotoxinas citotónicas

No producen degeneración del epitelio, sino que presentan un sistema de actuación similar al de la toxina colérica, elevando los niveles de AMPc y prostaglandinas en células del epitelio intestinal, lo que provoca una secreción fluída por activación de la adenilato ciclasa (Chopra, 1992).

En el género *Aeromonas* se han descrito diversas enterotoxinas que presentan diferentes pesos moleculares y una reactividad variable con la antitoxina colérica (Chakraborty *et al.*, 1984; Potomski *et al.*, 1987; McCardell *et al.*, 1995). Estas enterotoxinas pueden dividirse en dos tipos: termolábiles (56°C durante 10 minutos) sin reactividad cruzada con la toxina colérica, y termoestables (100°C durante 30 minutos) que reaccionan con la antitoxina colérica (James *et al.*, 1982).

Chopra y colaboradores purificaron una enterotoxina citotónica termolábil, Alt, a partir de la cepa SSU de *A. hydrophila* (Chopra and Houston, 1989). La secuencia proteica muestra similitud con el extremo C-terminal de la fosfolipasa C (PLC) de *A. hydrophila* y causa un incremento de los niveles de AMPc y de prostaglandinas en la mucosa intestinal de rata (Chopra *et al.*, 1996). También detectaron la enterotoxina citotónica termoestable (56°C durante 20 minutos), Ast (Chopra *et al.*, 1994), y demostraron, utilizando como modelo animal la rata, que Ast provoca la secreción de fluido en el intestino delgado y un aumento de los niveles de AMPc en las células de la mucosa (Chopra and Houston, 1999).

1.1.4.7.1.2 Hemolisinas

Las *Aeromonas* spp. producen al menos dos clases de hemolisinas: α -hemolisinas y β -hemolisinas.

Las α -hemolisinas, producidas durante la fase estacionaria del crecimiento, causan efectos citotóxicos reversibles y lisis incompleta de los eritrocitos, pero no se han relacionado con propiedades enterotoxigénicas (Thelestam and Ljungh, 1981). Por otro

lado, además de la enterotoxina citotóxica con actividad β -hemolítica, las *Aeromonas* producen otras β -hemolisinas. Éstas provocan la formación de agujeros en las membranas celulares dando lugar a lisis osmótica y destrucción completa de los eritrocitos. Las β -hemolisinas son termolábiles (56°C durante 5 minutos) y, generalmente, se forman durante la fase exponencial del crecimiento (Thelestam and Ljungh, 1981; Kirov, 1997).

1.1.4.7.2 Otras enzimas extracelulares

Las *Aeromonas* spp. pueden producir una gran variedad de enzimas extracelulares como proteasas, lipasas, amilasas, quitinasas, nucleasas o gelatinasas entre otras. Aunque en muchos casos su papel en la patogenicidad está todavía por determinar, representan un gran potencial en la adaptación a los cambios ambientales.

Proteasas

En general, las proteasas pueden contribuir a la patogenicidad causando lesiones directas del tejido o mediante la activación proteolítica de toxinas, potenciando la invasión (Kirov, 1997). Además, también pueden contribuir al establecimiento de la infección ayudando a superar las defensas del huésped, mediante inactivación del complemento, y proporcionando nutrientes para la proliferación celular (Leung and Stevenson, 1988). Se han identificado tres tipos de proteasas en *Aeromonas* spp.: una serina proteasa termolábil y dos metaloproteasas, ambas termoestables pero sensible e insensible al EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), respectivamente. Además, también existen aminopeptidasas que pueden presentar diversas actividades específicas: el catabolismo de péptidos exógenos, la activación extracelular de la aerolisina o la eliminación de la metionina amino-terminal (N-terminal) de nuevas cadenas peptídicas sintetizadas (metionina aminopeptidasas) (Pemberton *et al.*, 1997).

Lipasas/Fosfolipasas

Muchas bacterias patógenas producen lipasas. En *A. hydrophila* se han encontrado diferentes lipasas, como la Ah65 lipasa/aciltransferasa y otras que muestran elevada homología entre ellas, H3, Apl1 y Lip, la segunda de las cuales presenta actividad fosfolipasa C (Chuang *et al.*, 1997; Pemberton *et al.*, 1997). En el serogrupo O:34 de *Aeromonas* spp. se han descrito las fosfolipasas A1 y C. La fosfolipasa C muestra

actividad lecitinasa y capacidad citotóxica, y se ha demostrado su papel como factor de virulencia (Merino *et al.*, 1999). Las *Aeromonas* spp. también producen glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasas (GCAT), que funcionan como lipasas y pueden provocar lisis en eritrocitos mediante la digestión de sus membranas plasmáticas (Pemberton *et al.*, 1997).

1.1.4.7.3 Toxinas asociadas al sistema de secreción de tipo III

El sistema de secreción de tipo III (T3SS) es un sistema de transporte de proteínas bacterianas, denominadas efectores, al citoplasma de células huésped (apartado 1.3). Hasta el momento, se ha descrito la presencia de un T3SS 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), tema que no se tratará de forma más extensiva en este apartado debido a que es el objeto de estudio de este trabajo.

Por otro lado, se han identificado cuatro proteínas efectoras de T3SS en *A. salmonicida*, AexT, AopP, AopO y AopH (Braun *et al.*, 2002; Dacanay *et al.*, 2006; Fehr *et al.*, 2006), y una en las cepas AH-3 y SSU de *A. hydrophila*, AexT y AexT-like (o AexU), respectivamente (Vilches *et al.*, 2007; Sha *et al.*, 2007; Sierra *et al.*, 2007). La proteína AexT es una toxina bifuncional homóloga de los efectores, también bifuncionales, ExoT/ExoS de *P. aeruginosa*, mostrando actividad ADP-ribosiltransferasa y GAP (del inglés, *GTPase activating protein*) (Fehr *et al.*, 2007). AopP es miembro de la familia YopJ, un grupo de proteínas efectoras de T3SS que interfiere con vías de señalización de proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK) y/o con el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Fehr *et al.*, 2006). Las funciones biológicas de AopO y AopH se desconocen; sin embargo, son homólogos de los efectores de *Yersinia enterocolitica* YopO y YopH, respectivamente.

1.2 Vías de secreción en bacterias Gram-negativas

Debido a la confusión creada en la literatura, es importante iniciar este apartado remarcando la definición de tres términos: translocación, secreción y exportación. El término translocación se refiere al transporte de proteínas a través de una membrana biológica. El término secreción define el transporte de una proteína desde el interior

hasta el exterior celular. El término exportación se refiere al transporte de una proteína desde el citoplasma hasta el periplasma en bacterias Gram-negativas (Desvaux *et al.*, 2004).

Las bacterias Gram-positivas presentan una única membrana plasmática, la membrana citoplasmática, envuelta por una gruesa capa de peptidoglicano que constituye la pared celular. En cambio, las bacterias Gram-negativas presentan un sistema de doble membrana que consiste en una membrana citoplasmática (o membrana interna) y una membrana externa, entre las que se encuentran el peptidoglicano y el espacio periplásmico. El transporte de proteínas a través de la membrana citoplasmática generalmente sigue rutas similares en ambos tipos de microorganismos. Sin embargo, una vez superada esta barrera, el destino de las proteínas translocadas diverge. En los microorganismos Gram-positivos, las proteínas son liberadas al espacio extracelular o bien incorporadas a la pared celular. En bacterias Gram-negativas, si estas proteínas van dirigidas a la superficie celular o el espacio extracelular, deberán cruzar una barrera adicional, la membrana externa (Henderson *et al.*, 2004). Para este fin, las bacterias Gram-negativas han desarrollado diversos sistemas de secreción.

A pesar del número, diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas (biogénesis de estructuras como *pili* o flagelos, adquisición de nutrientes, toxicidad, etc.), éstas utilizan un número limitado de mecanismos para salir al exterior: secreción de tipo I, II, III, IV, V (o autotransportadores) (figura 1.5), y la recientemente descrita 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 atiende a la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y a las reacciones que catalizan.

A su vez, 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 (Sec, *Secretion*) (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. Además, los sustratos de las vías Sec-dependientes pueden ser dirigidos hacia el aparato exportador mediante dos mecanismos diferentes: la vía SRP (*Signal Recognition Particle*), que permite la translocación co-traducciona de la preproteína mediante el

direccionamiento del complejo SRP-ribosoma hacia el receptor de membrana de SRP, FtsY, y después al aparato exportador; y la vía que utiliza la chaperona SecB, que mantiene a la preproteína en un estado competente para la translocación y la dirige hacia el translocón (figura 1.5) (Kim and Kendall, 2000). Recientemente, se ha descrito que la exportación de proteínas también se puede realizar mediante el sistema Tat, que debe su nombre al reconocimiento de una secuencia señal en la que existen dos argininas “gemelas” (*Twin Arginine Translocation*), y que permite transportar proteínas en su configuración nativa a través de la membrana interna (Palmer and Berks, 2003). En el caso de las vías Sec-independientes, los sustratos pueden salir al exterior celular sin necesidad de un intermediario periplasmático.

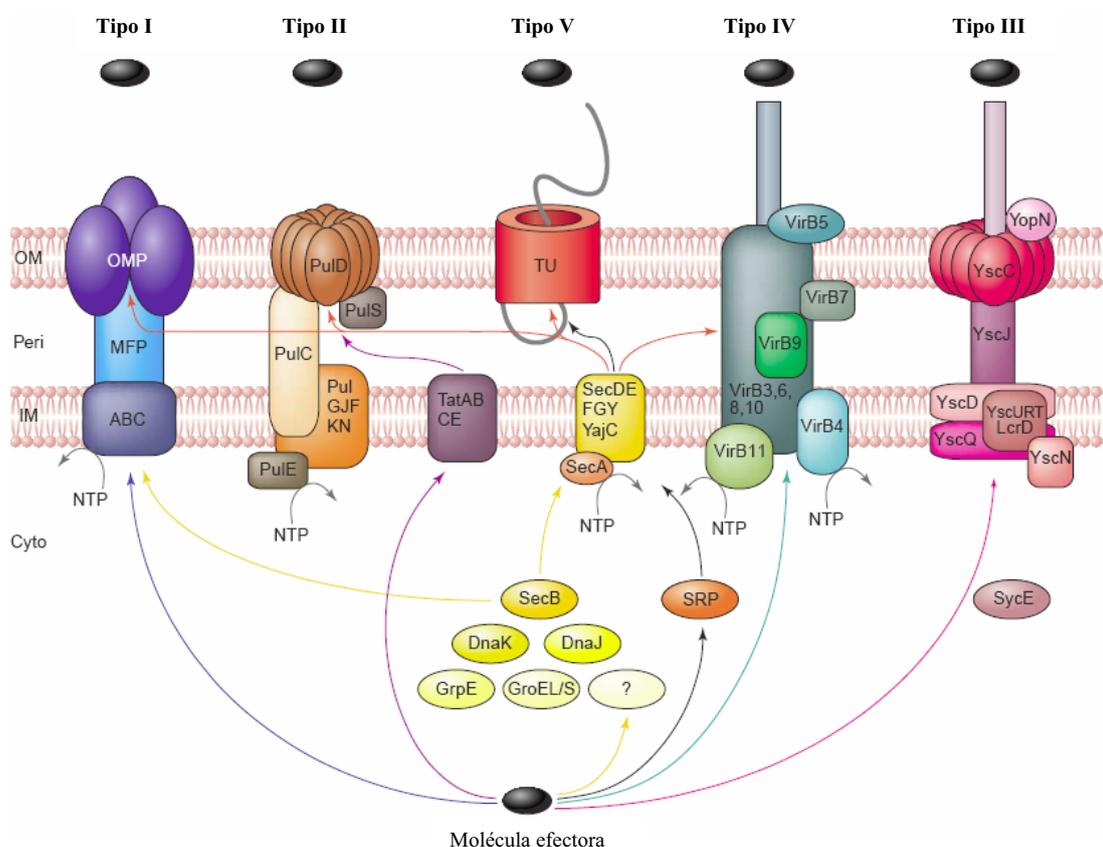


Figura 1.5 Representación esquemática de los diferentes sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas. Abreviaturas: ABC, ATP-binding cassette; Cyto, citoplasma; IM, membrana interna; MFP, proteína de fusión de membrana; OM, membrana externa; OMP, proteína de membrana externa; Peri, periplasma; TU, unidad translocadora. Figura adaptada de Desvaux, 2004.

1.2.1 Sistema de secreción de tipo I (T1SS)

Sus sustratos son frecuentemente exoenzimas de elevado peso molecular y toxinas. La secreción de α -hemolisina (HlyA) de *E. coli* es el ejemplo mejor estudiado de

secreción de tipo I (T1S), aunque otros miembros bien documentados en este grupo son la metaloproteasa de *Erwinia chrysanthemi*, la leucotoxina de *Pasteurella haemolytica*, y la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* (Henderson *et al.*, 2004).

El T1SS está formado por tres componentes diferentes, dos localizados en la membrana interna y específicos de la proteína a secretar, el transportador ABC (*ATP-binding cassette*) y la proteína de fusión de membrana, y uno general que forma un poro en la membrana externa (figura 1.5). En el caso de la secreción de α -hemolisina de *E. coli*, estos componentes están representados por las proteínas HlyB, HlyD y TolC, respectivamente. Estas tres proteínas son capaces de formar una estructura similar a un túnel que une temporalmente la membrana interna con la membrana externa, de manera que la hemolisina es transportada desde el citoplasma hasta el espacio extracelular de forma directa sin la formación de intermediarios periplásmicos (Gentschev *et al.*, 2002). Una vez se ha formado la unión entre los tres componentes del sistema, la hidrólisis de ATP por parte del transportador ABC provee la energía necesaria para el paso de las proteínas a través de las envueltas celulares hasta el medio extracelular (figura 1.6).

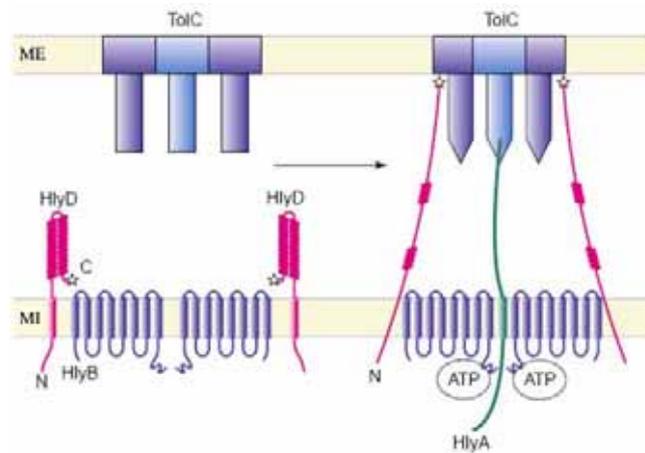


Figura 1.6 Modelo esquemático de la secreción de hemolisina. En respuesta a HlyA, el trímero HlyD interacciona con la proteína trimérica TolC para formar un canal de transporte periplásmico continuo. El dominio C-terminal de HlyD (asterisco) se encuentra en contacto con HlyB. Sólo se muestran dos moléculas de HlyD para simplificar. Abreviaturas: ME, membrana externa; MI, membrana interna. Figura adaptada de Gentschev, 2002.

Ésta es una vía Sec-independiente y sus sustratos generalmente presentan una señal de secreción en el extremo C-terminal que no es procesada. No obstante, en algunas bacterias se ha sugerido la exportación Sec-dependiente de algunos sustratos de secreción, como por ejemplo la dispersina de *E. coli* (Desvaux *et al.*, 2004).

1.2.2 Sistema de secreción de tipo II (T2SS)

Esta vía también se conoce con el nombre de sistema general de secreción (GSP, *General Secretion Pathway*) y rama terminal principal (MTB, *Main Terminal Branch*) del sistema general de secreción Sec-dependiente. Cabe destacar que no todos los sustratos de secreción de tipo II (T2S) se exportan vía el sistema Sec y que la T2S es sólo una de las vías que se puede seguir tras una exportación Sec-dependiente. Además, el nombre GSP también se utiliza para referirse al sistema de secreción Sec-dependiente (presente tanto en eucariotas como procariotas), que por su parte supone una nomenclatura confusa cuando hablamos de bacterias Gram-negativas. Todo esto ha llevado a una confusión en la terminología referente a éste y otros sistemas (Desvaux *et al.*, 2004), por lo que recientemente se ha propuesto rebautizar al T2SS como vía secretón-dependiente.

El T2SS es responsable del transporte de una amplia variedad de enzimas hidrolíticas y toxinas como la pululanasa (PulA) de *Klebsiella oxytoca* (figura 1.5), la toxina colérica de *Vibrio cholerae* o la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* entre otras. Además, la similitud genética y estructural entre el T2SS y las fimbrias de tipo IV sugiere la clasificación de la ruta de biogénesis de estas fimbrias como T2S (Henderson *et al.*, 2004). En el caso de *A. hydrophila*, se ha asociado el T2SS con la secreción de proteínas que poseen actividad aerolisina, amilasa, DNasa, GCAT (glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa) y proteasa (Cianciotto, 2005).

El transporte hacia el exterior de los sustratos del T2SS tiene lugar en dos etapas, que pueden ser separadas tanto genética como bioquímicamente. Generalmente la maquinaria Sec exporta el sustrato con péptido señal a través de la membrana interna (por lo tanto, es una vía Sec-dependiente), la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el espacio periplásmico. Seguidamente, un conjunto adicional de proteínas de membrana interna y externa, que forman el complejo multiproteico conocido con el nombre de secretón, dirigen el transporte a través de la membrana externa (Lee and Schneewind, 2001).

La señal de exportación de una proteína Sec-dependiente es la presencia de una secuencia señal N-terminal corta (aproximadamente 30 aminoácidos) conocida como péptido señal. Ésta, se subdivide en tres regiones: el dominio n, compuesto por

aminoácidos con carga positiva; el dominio h, en que predominan residuos aminoacídicos hidrofóbicos; y el dominio c, que presenta un lugar de reconocimiento de una peptidasa y frecuentemente contiene residuos de prolina y glicina. El péptido señal dirige la exportación de la proteína y es eliminado, mediante una peptidasa señal periplásmica, cuando la proteína exportada alcanza el periplasma (Frekkes and Driessen, 1999). En *E. coli*, la vía Sec comprende un número de proteínas de membrana interna (SecD-SecG, SecY), una ATPasa citoplasmática asociada a membrana (SecA) que proporciona la energía para la exportación, una chaperona (SecB) que se une a los sustratos de secreción y los dirige hacia el translocón Sec, una peptidasa señal periplásmica, y una serie de proteínas accesorias (figura 1.7) (Kim and Kendall, 2000). Existen evidencias de que, una vez en el periplasma, la proteína remanente adopta una

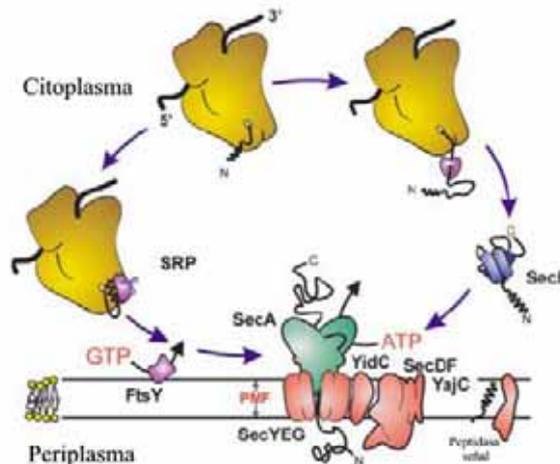


Figura 1.7 Representación esquemática de los componentes del sistema de exportación Sec. La preproteína puede ser dirigida al translocón mediante dos vías: SecB o SRP y FtsY. Figura adaptada de Keyzer, 2003.

conformación cuasi-nativa que es facilitada por la acción de ciertas chaperonas, como la isomerasa de puentes disulfuro DsbA. Esta etapa de plegamiento es necesaria para la translocación a través de la membrana externa (Henderson *et al.*, 2004).

Cabe destacar que, en ocasiones, el paso a través de la membrana interna tiene lugar a través del sistema de exportación Tat y no a través de la maquinaria Sec. Mientras que la maquinaria Sec sólo transporta sustratos sin estructura, el sistema Tat transporta sustratos que previamente han adoptado su conformación en el citoplasma bacteriano. Otra diferencia es que la energía utilizada para este transporte parece provenir de un gradiente de protones y es independiente de la hidrólisis de ATP. Por otro lado, los sustratos del aparato de exportación Tat también tienen una secuencia señal N-terminal, pero ésta presenta un motivo distintivo formado por dos argininas consecutivas: Ser/Thr-Arg-Arg-X-Phe-Leu-Lys (donde X es cualquier aminoácido polar). En *E. coli*, se han identificado cuatro genes, *tatA*, *tatB*, *tatC* y *tatD*, que codifican componentes de

este aparato, aunque parece ser que las proteínas TatA, TatB y TatC serían suficientes para su funcionamiento (figura 1.8) (Lee *et al.*, 2006).

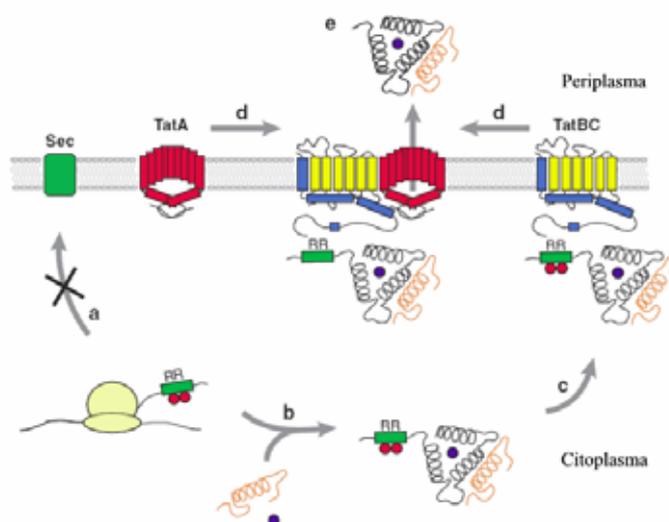


Figura 1.8 Representación esquemática del modelo de exportación mediante el sistema Tat. Tras la unión de la preproteína a cofactores y/o subunidades adicionales (b), ésta es dirigida al complejo receptor TatBC (c), y exportada a través del poro formado por TatA (d), para finalmente perder el péptido señal (e). Figura adaptada de Lee, 2006.

Como se ha mencionado anteriormente, el transporte a través de la membrana externa requiere de 12 a 15 proteínas adicionales, dependiendo de la especie, cuyo conjunto se conoce como secretón. Entre las proteínas que constituyen el secretón, sólo una, la proteína D, es una proteína integral de membrana externa y funcionaría formando el poro de translocación (figura 1.5). La proteína D pertenece a la familia de las secretinas y se han encontrado homólogos de ésta proteína en las vías de secreción de tipo III (Sandkvist, 2001). El resto de proteínas del aparato de secreción parecen estar asociadas a membrana interna y periplasma, con la excepción de la lipoproteína S que, cuando está presente, se encuentra vinculada a la cara periplásmica de la membrana externa. Las proteínas G-K presentan similitud con los *pili* de tipo IV y se ha descrito que podrían formar un pseudopilus, por lo que han sido denominadas pseudopilinas (Johnson *et al.*, 2006). Existen estudios que sugieren que la proteína E podría actuar como quinasa, proporcionando energía para promover la translocación y también el ensamblaje de las subunidades de tipo pilina, proteínas G-K (Henderson *et al.*, 2004).

1.2.3 Sistema de secreción de tipo III (T3SS)

Este sistema de transporte engloba dos subtipos: (i) el sistema de biogénesis flagelar y (ii) el sistema de transporte de proteínas bacterianas, denominadas efectores, al interior de células eucariotas (figura 1.9) (Plano *et al.*, 2001). El sistema de transporte de efectores será aquí abreviado como T3SS, y el sistema flagelar como FT3SS (del inglés *Flagellar Type III Secretion System*) (ver apartado 1.3). El T3SS fue identificado por primera vez en cepas patógenas de *Yersinia* spp. (Michiels *et al.*, 1990) y constituye una maquinaria de transporte de proteínas bacterianas, frecuentemente implicadas en patogenicidad, al interior de células eucariotas, hecho que implica su transporte tanto a través de las envueltas bacterianas como a través de la membrana plasmática y, en algunos casos, de la pared, de las células eucariotas.

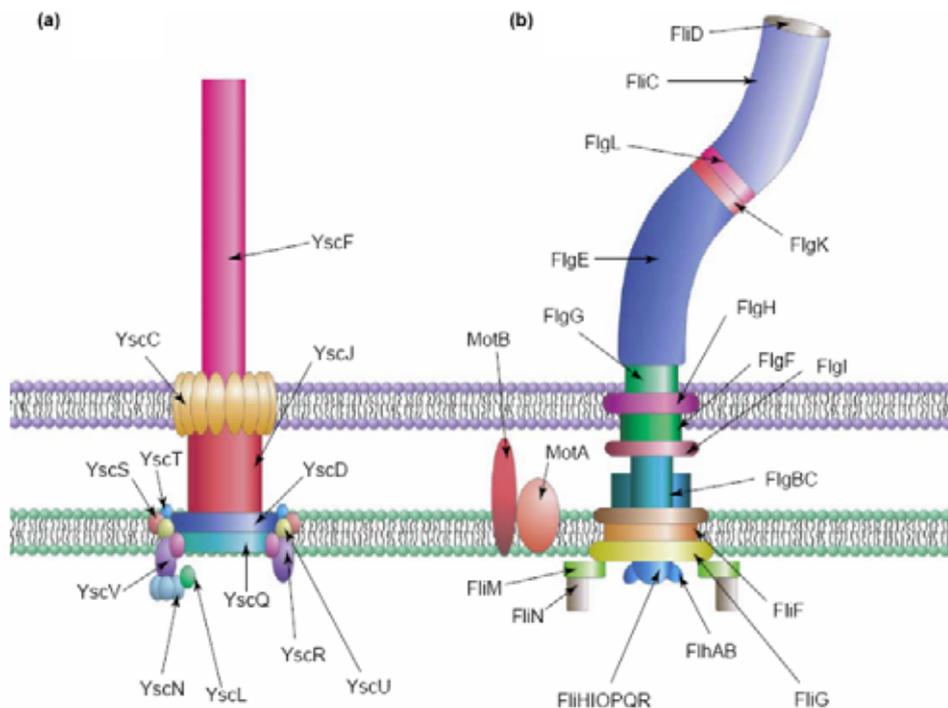


Figura 1.9 Sistemas de secreción de tipo III. (a) Sistema de secreción de tipo III no flagelar (T3SS), como ejemplo el sistema Ysc-Yop de *Yersinia* spp. YscJLNPRSTUV muestran homología con componentes flagelares. (b) El flagelo bacteriano. La exportación y el ensamblaje del gancho y el filamento se basan en un sistema de secreción de tipo III asociado al cuerpo basal (FT3SS). FliFHAIKPNQR y FlhAB muestran homología con componentes de T3SS. Figura adaptada de Desvaux, 2006.

El T3SS está formado por tres tipos de proteínas: componentes estructurales del sistema de inyección, sustratos de secreción (denominados efectores), y factores

reguladores de la expresión de las proteínas estructurales y efectoras. El aparato de inyección está formado por aproximadamente 20 proteínas diferentes que se ensamblan entre ellas formando una estructura en forma de aguja que permite la translocación de efectores, generalmente tras el contacto con la célula huésped (Galán and Colmer, 1999). Por este motivo, la secreción de tipo III (T3S) también se conoce como “vía dependiente de contacto”. La similitud del T3SS con una jeringa hipodérmica y su capacidad de inyectar proteínas directamente en el citoplasma de las células huésped han llevado a acuñar el término “inyectisoma” para referirse a este sistema (figura 1.9).

El T3SS es una vía Sec-independiente, aunque el ensamblaje del aparato de secreción requiere la maquinaria Sec, ya que varios de sus componentes presentan secuencias señal N-terminal características (Hueck, 1998). Existen varias hipótesis para explicar el mecanismo de reconocimiento de moléculas efectoras y su direccionamiento hacia el aparato de secreción. Una de ellas sugiere que la señal de secreción reside en el extremo 5' del ARNm, que dirigiría el complejo ribosoma-ARN hacia el aparato, permitiendo una unión temporal de los procesos de traducción y secreción (Anderson and Schneewind, 1997). Una segunda propuesta defiende que los 20 aminoácidos N-terminales, y no la secuencia 5' del ARNm, constituirían la señal de secreción que, con la acción complementaria de chaperonas específicas, permitirían su reconocimiento como sustratos de tipo III (Lloyd *et al.*, 2001). A pesar de las diferencias entre estas hipótesis, parece que la región que codifica los 20 primeros aminoácidos, ya sea en forma de ARNm o en forma peptídica, es esencial para la secreción (Hueck, 1998).

1.2.4 Sistema secreción de tipo IV (T4SS)

El sistema modelo del T4SS es el transporte de ADN oncogénico o ADN-T (ADN tumoral) al núcleo de células vegetales en *Agrobacterium tumefaciens*, aunque se han descrito otros sistemas de este tipo, como el sistema Ptl de *B. pertussis* (para el transporte de la toxina pertussis), el sistema Dot/Icm de *Legionella pneumophila*, y otros en *Brucella suis*, *Bartonella henselae*, *Coxiella* spp. y *Helicobacter pylori* (Henderson *et al.*, 2004). Se ha observado tanto exportación Sec-dependiente como Sec-independiente, en función de la especie bacteriana y/o de la molécula secretada.

Los T4SS se caracterizan por su extraordinaria versatilidad funcional, pudiendo transportar tanto proteínas como complejos proteína-ADN-monocadena a un amplio

rango de células receptoras: bacterias, hongos, células vegetales y células animales (Llosa and O'Callaghan, 2004). Los miembros de la familia del T4SS se clasifican en cuatro subgrupos, cada uno de los cuales está especializado en una función específica: translocación de moléculas efectoras directa o indirectamente al interior de células huésped, conjugación de ADN plasmídico y cromosómico, incorporación de ADN y transformación, y liberación de ADN al medio extracelular (Backert and Meyer, 2006). La secreción de tipo IV (T4S) contribuye en variedad de procesos importantes como el intercambio de material genético (incrementa la plasticidad del genoma), la transmisión de plásmidos conjugativos, la colonización bacteriana, y la inyección de factores de virulencia en el citoplasma de las células huésped.

Como ya se ha comentado, el sistema modelo de T4S es la maquinaria de transferencia de ADN-T de *A. tumefaciens*, que consiste en un complejo multiproteico que atraviesa las membranas bacterianas interna y externa, e introduce complejos nucleoproteicos oncogénicos en células vegetales, dando lugar a la formación de tumores. Las proteínas de tipo IV que median la transferencia del ADN-T son 12, VirB1-VirB11 y VirD4 (figura 1.10). Las proteínas VirB se pueden agrupar en tres clases: los putativos componentes del canal (VirB6-VirB10), los componentes energéticos (las nucleósido trifosfatasas (NTP) VirB4 y VirB11), y los componentes asociados al *pilus* (VirB2, y posiblemente VirB3 y VirB5). VirB1 es una transglicosilasa que realiza la lisis localizada de la pared de mureína en la zona de ensamblaje del sistema. Es importante destacar que la mayoría, aunque no todos los T4SS, presentan homólogos de estas proteínas, y un conjunto conservado de cinco proteínas está presente en todos ellos (VirB4, VirB7, VirB9, VirB10 y VirB11). Además del ADN-T, el T4SS transloca cuatro proteínas adicionales: VirE2, VirE3, VirF y VirD5. La señal de

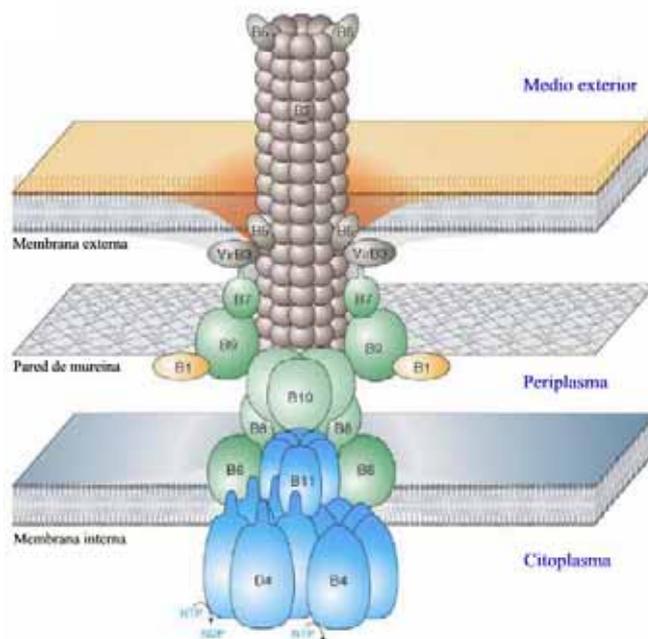


Figura 1.10 Modelo estructural del T4SS de *A. tumefaciens*. Figura adaptada de Backert and Meyer, 2006.

secreción de estas proteínas en *Agrobacterium* spp. es C-terminal, hidrofílica y con carga neta positiva (Backert and Meyer, 2006). Existen dos modelos que intentan explicar el proceso de translocación mediado por este sistema: el modelo del “canal”, en el que el *pilus* actuaría como canal a través del cual pasarían los sustratos de secreción, y el modelo del “pistón”, en el que el *pilus* actuaría como un pistón, impulsando los sustratos hacia el medio o el interior de células eucariotas (Cascales and Christie, 2003).

1.2.5 Sistema de secreción de tipo V (T5SS)

La secreción de tipo V (T5S) es probablemente la más sencilla y puede subdividirse en tres clases: tipo Va o AT-1 (sistema de autotransporte), tipo Vb o TPS (del inglés *Two-Partner Secretion*) y el tipo Vc o AT-2 (figura 1.11). Todas las proteínas secretadas vía T5S caracterizadas hasta la fecha han sido relacionadas con virulencia.

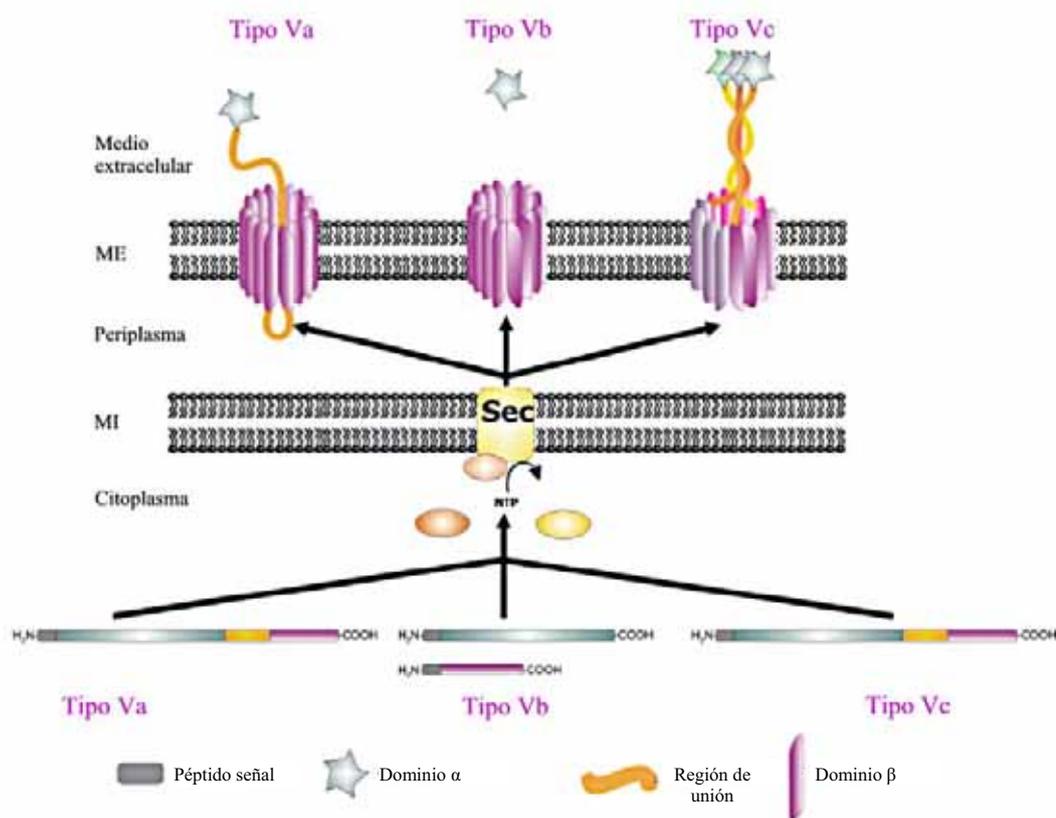


Figura 1.11 Esquema del sistema de secreción de tipo V. A la izquierda se representa el sistema de secreción de tipo Va, en el centro el tipo Vb y a la derecha el tipo Vc. Abreviaturas: ME, membrana externa; MI, membrana interna. Figura adaptada de Henderson, 2004.

1.2.5.1 Sistema de autotransporte o tipo Va

Pohlner y colaboradores, con su estudio de la relación entre el gen codificante de la proteasa de la inmunoglobulina A1 de *Neisseria gonorrhoeae* y el producto extracelular

del mismo, fueron los primeros en describir y proponer un modelo para la secreción de tipo V (Pohlner *et al.*, 1987). Desde esta primera descripción, se han identificado variedad de proteínas que siguen esta vía de secreción en bacterias Gram-negativas.

En todos los casos, la proteína autotransportadora presenta una estructura primaria diferenciada en tres dominios: el péptido señal, el dominio α , y la unidad de translocación o dominio β . El péptido señal (también denominado secuencia señal o péptido líder) se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína y permite el direccionamiento de la proteína hacia la membrana interna para su posterior exportación al periplasma. El dominio α (también conocido como dominio pasajero, dominio N-pasajero o dominio N) es el que confiere la función propia a las diversas proteínas autotransportadoras. El dominio β (dominio transportador, dominio autotransportador o dominio C) se sitúa en el extremo C-terminal de la proteína y está compuesto por una serie de láminas β antiparalelas que adoptan una estructura terciaria en forma de barril β cuando se encuentra embebido en la membrana externa, formando un poro que facilita la translocación del dominio α a través de ésta (figura 1.11) (Henderson *et al.*, 1998).

Transporte a través de la membrana interna

La región N-terminal de las proteínas autotransportadoras muestra las características de una secuencia señal Sec-dependiente, por lo que se ha propuesto que SecB actuaría como chaperona. No obstante, algunos autotransportadores presentan una secuencia señal excepcionalmente más larga. El análisis *in silico* de genomas bacterianos completos dentro de las Proteobacterias revela la presencia de al menos 80 proteínas que contienen una secuencia señal de este tipo, presentando además todas estas proteínas un peso molecular superior a 100 kDa. Estas secuencias señal atípicas presentan dos dominios n (n1 y n2) y dos dominios h (h1 y h2), además del dominio c. Los dominios n1 y h1 están altamente conservados, mientras que los dominios n2 y h2 son muy variables. La variabilidad de los dominios n2 y h2 es típica de las secuencias señal Sec-dependiente; sin embargo, el grado de conservación de los dominios n1 y h1 es frecuentemente indicativo de una función biológica especializada, sugiriendo que la extensión n1-h1 de la secuencia señal dirige la exportación de manera independiente al sistema Sec o que necesita proteínas accesorias al sistema Sec, como por ejemplo la SRP (Henderson *et al.*, 2004).

Transporte a través del periplasma

El estatus de las proteínas autotransportadoras en el periplasma permanece en controversia. No está claro si es aquí donde el dominio α se pliega y adquiere su estructura terciaria o es ya una vez en la superficie bacteriana cuando alcanza su conformación funcional (Oliver *et al.*, 2003). Estudios realizados por Veiga y colaboradores indican que el plegamiento de la proteína tendría lugar en el periplasma antes o al menos simultáneamente al paso de la misma a través de la membrana externa (Veiga *et al.*, 2001), aunque a su vez parece poco probable que una proteína de gran tamaño completamente plegada pueda salir al exterior por un poro de 2 nm (Henderson *et al.*, 2004).

Otra cuestión importante es cómo estas proteínas pueden permanecer en periplasma desplegadas o parcialmente plegadas y resistir a una degradación masiva por parte de proteasas periplasmáticas. Es probable que puedan formar un complejo con chaperona(s) periplasmática(s) o que existan en una configuración que las proteja de esta degradación, suposición que se basa en que algunos autotransportadores presentan dominios chaperona (Henderson *et al.*, 2004).

Transporte a través de la membrana externa

La arquitectura en forma de barril β se ha encontrado en todas las proteínas integrales de membrana externa cuya estructura ha sido resuelta, mientras que la estructura en hélice α sólo se ha descrito en proteínas de la membrana citoplasmática. De forma general, esta diferenciación se explica porque si las proteínas de membrana externa presentaran regiones ricas en hélices α , quedarían atrapadas a su paso a través de la membrana interna (Tamm *et al.*, 2001). Por analogía con el mecanismo de biogénesis de las porinas, el modelo actual de translocación de los autotransportadores a través de la membrana externa propone que éstos se insertarían espontáneamente en la membrana externa con una conformación en forma de barril β , favorecida biofísicamente por la interacción con el ambiente hidrofóbico de la membrana. La primera y la última de las láminas β formarían puentes de hidrógeno que cerrarían una estructura en forma de anillo, permitiendo el establecimiento de un poro (Henderson *et al.*, 2004). Seguidamente, el dominio α , aún unido al barril β , sería translocado a través de este poro.

Aún existe controversia sobre dónde se obtiene la energía para este proceso, ya que en el periplasma no ocurren reacciones de hidrólisis de ATP o GTP (guanosina trifosfato). Se ha sugerido que esta energía podría derivar del correcto plegamiento del dominio α una vez en la superficie bacteriana (Henderson *et al.*, 2004). Una vez en la superficie, el dominio α puede seguir diversos caminos: la poliproteína puede quedar intacta, con un dominio C-terminal anclado a la membrana y un dominio N-terminal que sobresale hacia el medio externo; el dominio α puede ser escindido y quedar en contacto con el dominio β mediante interacción no covalente; el dominio α puede ser escindido y liberado al medio externo. No está claro si el dominio α se escinde del dominio β mediante autoproteólisis o bien mediante una proteasa unida a membrana (Henderson *et al.*, 2004).

1.2.5.2 Sistema Vb

Las proteínas que utilizan el T5SS tipo Vb, de igual modo que las que utilizan el tipo Va, poseen un péptido señal que dirige su exportación a través del sistema Sec presente en la membrana citoplasmática. Una vez en el periplasma, el dominio α se inserta en el poro formado en la membrana externa por el dominio β , permitiendo su paso hasta la superficie bacteriana, donde es modificada proteolíticamente hasta alcanzar su función activa (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Sin embargo, en contraste con el sistema Va, el dominio α (o exoproteína) y el dominio β (o dominio transportador) se expresan como dos proteínas independientes, conocidas como miembros de las familias TpsA y TpsB, respectivamente (figura 1.11). Los genes que codifican ambas proteínas generalmente forman parte de un operón.

La topología del poro formado por el dominio β parece ser diferente a la del sistema Va y, además, la proteína TpsB parece estar involucrada en la maduración del dominio α . Se ha sugerido que el dominio α permanecería sin plegarse en el periplasma y que se plegaría progresivamente durante su translocación a través del dominio β . El sistema Vb implica el reconocimiento específico entre los dominios α y β . En este sentido, la proteína TpsA presenta el dominio TPS, próximo al extremo N-terminal y cuya función es la de interactuar específicamente con la proteína TpsB para iniciar la translocación a través de la membrana externa (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Una vez en la superficie bacteriana, la proteína TpsA puede quedar anclada a la membrana externa mediante enlaces no covalentes o ser liberada al espacio extracelular (Kostakioti *et al.*, 2005).

1.2.5.3 Sistema Vc

Recientemente, los miembros de la familia Oca (del inglés *Oligomeric Coiled-coil Adhesins*) han sido descritos como integrantes del sistema de secreción de tipo Vc, con la adhesina YadA producida por *Yersinia pestis* como prototipo (Nummelin *et al.*, 2004). YadA posee seis dominios, presentando el dominio N-terminal la característica secuencia señal para la exportación a través de la maquinaria Sec. A continuación, se produce una trimerización seguida de la formación de un poro y de la translocación del trímero hacia el exterior. La región C-terminal es la encargada de la formación del poro en la membrana externa (Hoiczyk *et al.*, 2000).

1.2.6 Sistema de secreción de tipo VI (T6SS)

Recientemente, se ha propuesto la existencia de un nuevo sistema de secreción, el sistema de secreción de tipo VI (T6SS) (Pukatzki *et al.*, 2006). Los T6SS parecen estar altamente conservados y se encuentran presentes en una o más copias en diversas especies Gram-negativas, entre las que se encuentran *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei*, y *Edwardsiella* spp.

Aunque aún no se conoce exactamente la estructura y la organización del aparato de secreción de tipo seis, probablemente se trata de un translocón formado por varios anillos proteicos y una aguja (Pukatzki *et al.*, 2007). Las proteínas secretadas por esta vía no parecen presentar una secuencia señal N-terminal. La secreción de Hcp (Haemolysin coregulated protein) o proteínas tipo Hcp parece ser la función central del T6SS en muchas especies (Pukatzki *et al.*, 2007). El gen *hcp* se localiza frecuentemente dentro de la agrupación génica de T6SS y adyacente al gen *vgrG*. La proximidad de ambos genes en diversos T6SS, sugiere que VgrG y Hcp podrían ser sustratos preferentes o componentes esenciales del aparato de T6SS. A modo de ejemplo, *V. cholerae* posee tres genes que codifican proteínas VgrG, *vgrG-1*, *vgrG-2*, y *vgrG-3*, y la mutación de *hcp* bloquea la secreción de estas tres proteínas. Por otro lado, la mutación de *vgrG-2* bloquea la secreción de Hcp, VgrG-1, y VgrG-3, y atenúa la citotoxicidad de *V. cholerae* en macrófagos. Por tanto, Hcp y VgrG-2 podrían contribuir a la función del

aparato de T6SS, aunque también parecen ser sustratos de transporte (Pukatzki *et al.*, 2006).

1.3 Sistema de secreción de tipo III (T3SS)

Muchas bacterias mantienen estrechas relaciones con organismos huésped, relaciones que pueden clasificarse como beneficiosas, neutrales o perjudiciales para sus huéspedes. El desarrollo de estas relaciones está en parte dictado por proteínas secretadas por las bacterias que interaccionan con dianas específicas de las células huésped, dando lugar a la modulación del comportamiento y de la respuesta de las mismas. Cabe destacar que, algunas bacterias modulan las características de sus células huésped no sólo mediante la secreción de proteínas en el medio extracelular, sino también mediante su translocación directa en el interior de las células huésped, siendo el sistema de secreción de tipo III uno de los mecanismos más extendidos para llevar a cabo esta translocación (Ghosh, 2004).

El término “secreción de tipo III” fue utilizado por primera vez por Salmond y Reeves en 1993 para describir uno de los mecanismos utilizados por las bacterias Gram-negativas para la secreción de proteínas (Salmond and Reeves, 1993). Anteriormente, se había demostrado que *Yersinia* spp. exportaba algunas proteínas sin necesidad del péptido señal N-terminal característico de la exportación Sec-dependiente (Michiels *et al.*, 1990). Desde entonces, el estudio de la secreción de tipo III ha crecido rápidamente, existiendo más de 1500 publicaciones sobre este tema listadas en la base de datos PubMed, hecho que ha incrementado los datos disponibles pero que también ha contribuido a la confusión en cuanto a la nomenclatura utilizada (Desvaux *et al.*, 2006). En este punto, existen tres temas a clarificar: (i) las abreviaturas, (ii) la relación y comparación de este sistema de secreción con el flagelo, y (iii) la secreción de tipo III en bacterias Gram-positivas.

(i) Las abreviaturas “TTSS” (del inglés *Type Three Secretion System*, sistema de secreción de tipo tres) y “TTS” (del inglés *Type Three Secretion*, secreción de tipo tres) han sido y siguen siendo ampliamente utilizadas en la literatura científica. Sin embargo, éstas abreviaturas son ambiguas, ya que pueden aplicarse tanto a la secreción de tipo II (inglés *Type Two Secretion*) como a la secreción de tipo III. Como alternativa, Desvaux

y colaboradores sugieren el uso de abreviaturas numéricas: “T3S” para “secreción de tipo III” y “T3SS” para “sistema de secreción de tipo III” (Desvaux *et al.*, 2006).

(ii) Los T3SS fueron inicialmente descritos como maquinarias bacterianas capaces de inyectar proteínas en el interior de células eucariotas. Sin embargo, algunos expertos en la biosíntesis flagelar rápidamente adoptaron este término para referirse a la secreción de flagelinas y otras proteínas relacionadas, describiendo así el “sistema de secreción de tipo III flagelar”. Este tema ha sido objeto de amplio debate, aunque actualmente los T3SS pueden clasificarse en dos grandes grupos: los asociados a la biosíntesis flagelar y los que median interacciones entre bacterias y células eucariotas, siendo estos últimos objeto de este estudio (Pallen *et al.*, 2005). Ambos sistemas presentan similitudes tanto estructurales como funcionales (figura 1.14). Además, estudios moleculares filogenéticos de varias proteínas conservadas evidencian que ambos T3SS comparten un ancestro común, siendo las dos subclases monofiléticas, es decir, cada una es descendiente de un ancestro común y cada una contiene su ancestro y todos los descendientes de este ancestro (Gophna *et al.*, 2003). Por tanto, hay autores que defienden que ambas subclases necesitan un nombre específico. El término “sistema de secreción de tipo III flagelar” se utiliza para la subclase flagelar, pero todavía no existe un término comúnmente aceptado para la subclase asociada a la translocación de proteínas en el interior de células eucariotas. Algunos autores han adoptado el término “sistema de secreción de tipo III asociado a virulencia”, aunque éste parece no ser adecuado si se tiene en cuenta que algunos microorganismos simbioses también lo presentan. Otros términos sugeridos son “sistema de secreción de tipo III inyectisómico” o “sistema de secreción de tipo III asociado a translocación”, por la capacidad de inyectar proteínas en el interior de células huésped, aunque ello implica una función que sólo ha podido ser atribuida a unos pocos sistemas bien caracterizados. Desvaux y colaboradores proponen el uso de “sistema de secreción de tipo III no flagelar”, con el inconveniente de que puede sugerir que estos sistemas son secundarios a los sistemas flagelares (Desvaux *et al.*, 2006). Una alternativa que indican los mismos autores es el uso de una clasificación alfanumérica: “sistema de secreción de tipo IIIa” (T3aSS) para referirse a los sistemas no flagelares y “sistema de secreción de tipo IIIb” (T3bSS) para referirse a los sistemas flagelares. Para simplificar la nomenclatura de estos sistemas, a partir de aquí se utilizará “sistema de secreción de tipo III” (T3SS) para referirse al sistema de secreción de tipo III no flagelar, y “sistema de secreción de

tipo III flagelar” (FT3SS, del inglés *Flagellar Type III Secretion System*) para referirse a este tipo de secreción en el caso del flagelo.

(iii) El T3SS originalmente se define como una categoría de la secreción de proteínas exclusiva de bacterias Gram-negativas. No obstante, y teniendo en cuenta lo discutido anteriormente, algunos autores defienden que el aparato de exportación flagelar de las bacterias Gram-positivas es un claro ejemplo de sistema de secreción de tipo III en estos organismos y que debe ser considerado como tal aunque pueda parecer extraño a primera vista (Desvaux *et al.*, 2006).

Aclarados estos tres puntos, los siguientes apartados de esta tesis se centrarán en el sistema de secreción de tipo III no flagelar.

El T3SS podría definirse como una vía de transporte Sec-independiente, hasta el momento descrita exclusivamente en bacterias Gram-negativas, responsable del transporte de proteínas bacterianas, denominadas efectores y muchas veces implicadas en patogenicidad, hasta el citoplasma de células eucariotas. Por lo tanto, los efectores deben atravesar tanto las cubiertas bacterianas: membrana interna, espacio periplásmico, pared de peptidoglicano y membrana externa; como las barreras presentes en las células huésped: membrana plasmática y, en algunos casos, pared celular vegetal (Ghosh, 2004). Sin embargo, los efectores también pueden ser secretados al medio extracelular bajo determinadas condiciones de laboratorio que frecuentemente simulan condiciones *in vivo*. Esto ha llevado a distinguir entre “secreción”, término generalmente utilizado para definir el transporte activo de proteínas a través de las envueltas bacterianas, y “translocación”, referida al transporte de proteínas hasta el interior de la célula huésped (Ghosh, 2004).

En general, el T3SS está formado por tres tipos de proteínas: componentes estructurales del aparato de transporte, efectores, y factores reguladores de la expresión de las proteínas estructurales y efectoras. Cabe destacar que mientras que el aparato de transporte del T3SS está conservado en microorganismos tan distantes como *Yersinia* y *Erwinia*, los efectores difieren considerablemente, mostrando cómo un único mecanismo bacteriano puede dar lugar a multitud de respuestas en las células huésped (Tampakaki *et al.*, 2004).

En la mayoría de casos, el T3SS contribuye a una relación patogénica entre bacteria y huésped. Se ha identificado en patógenos de animales, como *Aeromonas* spp., *Burkholderia* spp., *Bordetella* spp., *Citrobacter rodentium*, *Chlamydia* spp., *E. coli* enteropatógenas y enterohemorrágicas, *Edwardsiella* spp., *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., y *Yersinia* spp. En ciertas bacterias, como por ejemplo *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, *Yersinia pestis*, y *Y. enterocolitica*, incluso se han descrito dos T3SS, relacionados con diferentes fases de la infección. El T3SS también ha sido identificado en patógenos de plantas, como *Erwinia* spp., *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, y *Xanthomonas* spp. Sin embargo, la presencia de este sistema no se limita exclusivamente a patógenos, ciertas bacterias endosimbióticas también codifican un T3SS, como *Rhizobium* spp. y *Sodalis glossinidius* (Troisfontaines and Cornelis, 2005).

1.3.1 Estructura del aparato de secreción tipo III

La maquinaria molecular encargada del proceso de transporte en el T3SS, se denomina aparato de secreción de tipo III (T3SA), y está compuesta por aproximadamente 20-25 proteínas diferentes, la mitad de las cuales están conservadas en la mayoría de sistemas. La mayor parte de estas proteínas conservadas, también presentan similitud de secuencia con proteínas que forman parte del cuerpo basal del flagelo bacteriano (Aizawa, 2001) (tabla 3.5).

La purificación y la identificación de parte del T3SA de *Salmonella typhimurium*, por parte de Kubori y colaboradores, constituye un punto de referencia en el estudio de este sistema (Kubori *et al.*, 1998). Estos autores bautizaron a la estructura supramolecular observada al microscopio electrónico con el nombre de “complejo aguja” debido a la forma tan característica que presentaba (figura 1.12). Desde su primer aislamiento, el complejo aguja se ha conseguido purificar y visualizar, mediante microscopía electrónica, en otras especies (Blocker *et al.*, 2001; Tamano *et al.*, 2000; Sekiya *et al.*, 2001). El complejo aguja consiste en una estructura larga y hueca, en la que pueden distinguirse dos partes: un filamento rígido con estructura helicoidal (la aguja), y una base cilíndrica que ancla la

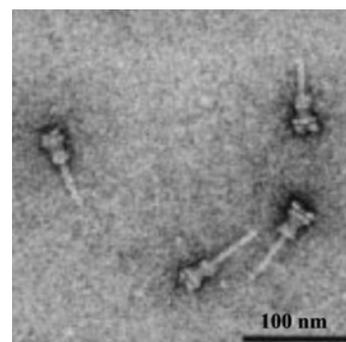


Figura 1.12 Micrografía electrónica del complejo aguja de *Shigella flexneri*. Blocker, 2001.

estructura a las membranas interna y externa (el cuerpo basal). Esta base está formada por dos complejos de anillos concéntricos embebidos en cada una de las membranas, estructura que recuerda al cuerpo basal del flagelo bacteriano (figura 1.13) (Yip and Strynadka, 2006).

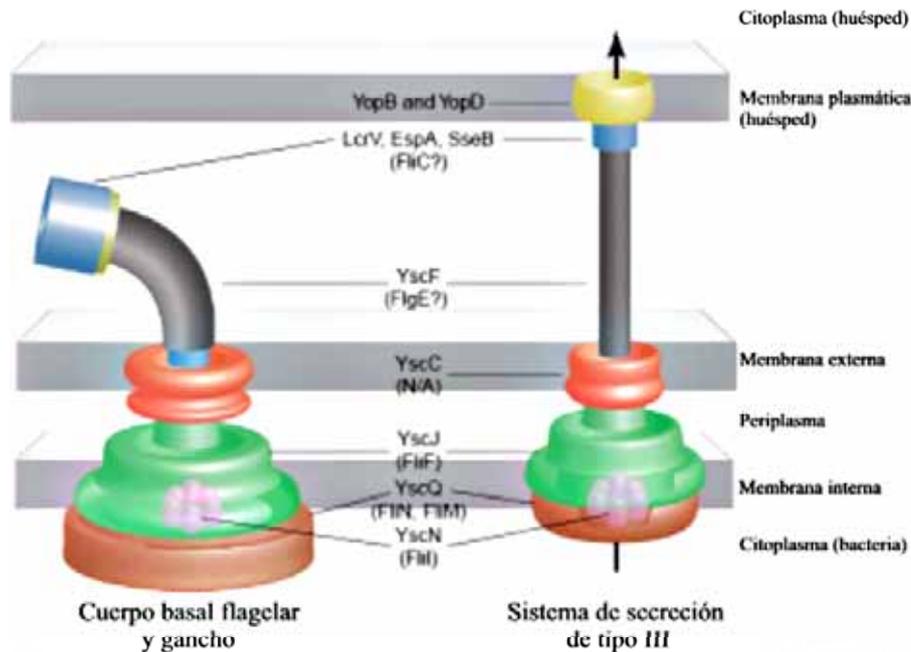


Figura 1.13 Esquema comparativo de las estructuras del aparato flagelar bacteriano y el T3SA. La morfología general de los dos complejos supramoleculares es muy similar: ambos consisten en estructuras anulares de membrana interna (verde y marrón) y externa (rojo), una ATPasa asociada a membrana (rosa), y estructuras extracelulares helicoidales (gris). Se muestran algunas proteínas, referidas con sus nombres en *Yersinia*, y sus putativos homólogos en el sistema flagelar en paréntesis. Figura adaptada de Yip and Strynadka, 2006.

Cabe destacar que también forman parte del T3SA algunas proteínas citoplasmáticas y los translocadores, proteínas secretadas vía tipo III que se anclan en la membrana de las células huésped; ambos componentes parecen no estar presentes en las preparaciones microscópicas.

Por razones históricas, los componentes que constituyen el T3SS tienen nombres diferentes, según la especie. Debido a que uno de los modelos más estudiados ha sido el de *Yersinia* spp., se utilizará la nomenclatura de ésta siempre que sea posible (para mayor claridad, anexo 7.1).

1.3.1.1 Estructuras presentes en la superficie bacteriana

La característica morfológica y funcional más prominente del T3SA es una estructura en forma de aguja, o en el caso de patógenos de plantas, una estructura en forma de *pilus*, que se proyecta desde la superficie bacteriana (figura 1.16). Pese a la similitud de estas estructuras con el filamento del flagelo bacteriano, ni la subunidad formadora de la aguja ni la subunidad formadora del *pilus* están relacionadas a nivel de secuencia con la subunidad formadora del filamento del flagelo (flagelina). No obstante, de la misma manera que el gancho y el filamento flagelar parecen servir de conducto para el transporte de proteínas durante su propio ensamblaje, se piensa que tanto las agujas como los *pili* del T3SS podrían funcionar como conductos para el transporte de proteínas desde la bacteria hasta la célula huésped (Ghosh, 2004).

Agujas

Las estructuras en forma de aguja se han visualizado mediante microscopía electrónica en los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* (Blocker *et al.*, 2001; Kubori *et al.*, 1998; Hoiczky and Blobel, 2001). Las agujas son rectas, aparentemente rígidas y huecas, recordando un conducto a través del cual las proteínas podrían ser translocadas hacia el interior de las células huésped. Estas estructuras son mucho más cortas que los filamentos de los flagelos. La longitud de la aguja es una característica que parece estar regulada, y es de aproximadamente 80 nm en *Salmonella* (Kubori *et al.*, 1998), 45.5 ± 3.3 nm en *Shigella* (Tamano *et al.*, 2000), y 58.0 ± 10 nm en *Yersinia* (Journet *et al.*, 2003); mientras que la longitud del filamento del flagelo suele ser de 10-15 μm . El número de agujas por bacteria varía de 10 a 100 unidades en *Salmonella* (Kubori *et al.*, 1998) y de 50 a 100 en *Yersinia* (Hoiczky and Blobel, 2001). Mientras que el diámetro externo de las agujas estudiadas es de 60-130 Å, el diámetro interno parece no superar 20 Å. Los dominios proteicos plegados presentan frecuentemente diámetros de 20 a 30 Å, sugiriendo que si las proteínas a transportar viajaran por el interior de la aguja, necesitarían estar parcialmente o completamente desplegadas (Ghosh, 2004).

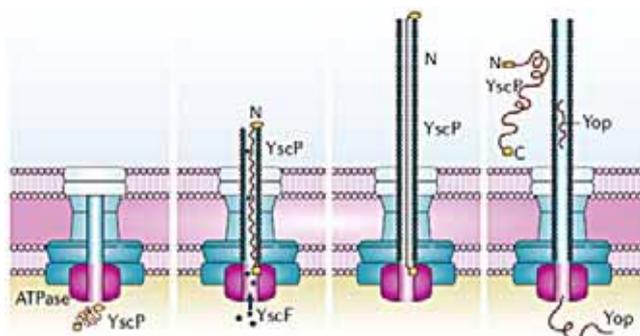
En *Yersinia* spp., el número de agujas parece ser dependiente del medio de crecimiento, y éstas se presentan dispersas de manera uniforme sobre la superficie, estando formadas por una proteína pequeña (9 kDa) denominada YscF, (Hoiczky and Blobel, 2001). También se ha determinado la estructura helicoidal de agujas aisladas en

Shigella (formadas por la proteína MxiH, perteneciente a la familia YscF) (Cordes *et al.*, 2003). Los parámetros helicoidales de esta aguja (5.6 unidades por vuelta, incremento axial de 4.2 Å por unidad, 24 Å de longitud por vuelta) son muy parecidos a los estimados en el gancho y filamento flagelares, hecho sorprendente si se tiene en cuenta que las proteínas de la familia YscF son mucho más pequeñas y no comparten similitud de secuencia con los componentes extracelulares del flagelo. Esto ha llevado a hipotetizar que la aguja podría alterar su estado helicoidal de manera similar al cambio conformacional que ocurre en el gancho flagelar durante las adaptaciones a los cambios de orientación del motor de rotación, y tales cambios estructurales podrían estar implicados en la detección del contacto con el huésped (Yip and Strynadka, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, de los análisis de microscopía electrónica se infiere que la longitud de la aguja parece estar controlada, ya que, hasta el momento, todas las estudiadas presentan una media aproximada de 60 nm. Esta observación ha llevado a los investigadores a realizarse dos preguntas: (i) ¿cómo puede la bacteria controlar la longitud de la aguja? y (ii) ¿por qué es necesario controlar esta longitud?. (i) Cornelis y colaboradores defienden que la proteína YscP en *Yersinia* está implicada en el control de la longitud del filamento aguja, describiendo una correlación lineal entre la cantidad de moléculas de YscP y la longitud de la aguja: 1,9 Å de longitud de aguja por cada molécula de YscP. Los autores de este estudio sugieren un modelo, denominado modelo de la regla molecular, en el que YscP se situaría, a nivel interno, desde la base del aparato de secreción hasta el extremo distal de la aguja en crecimiento, aumentando de tamaño ésta hasta que YscP fuera limitante (figura 1.14). Además, YscP es secretada, liberando así de la obstrucción al canal de secreción (Journet *et al.*, 2003). Sin embargo, la versión original de este modelo implica que el componente de la regla molecular, YscP, y las subunidades formadoras de la aguja, YscF, ocuparían el canal de secreción al mismo tiempo, hecho que parece cuestionable si se tiene en cuenta su estrecho diámetro (2-3 nm). En consecuencia, recientemente se ha propuesto una versión más dinámica del modelo de la regla molecular, en la que el componente de esta regla y las subunidades formadores de la aguja viajarían de manera secuencial, formándose más de una regla por cada aguja ensamblada (figura 1.14) (Cornelis, 2006). Cabe destacar que, el estudio de *invJ* y *spa32* en *S. typhimurium* SPI-1 y *S. flexneri*, respectivamente, putativos ortólogos de *yscP*, ha llevado a proponer un tercer modelo de control de la longitud de la aguja, en el que el ensamblaje de la varilla interna y de la aguja se darían

paralelamente, constituyendo la compleción de la varilla la señal de parada del crecimiento de la aguja (Marlovits *et al.*, 2006).

(a) Modelo de la regla molecular



(b) Modelo alternativo de la regla molecular

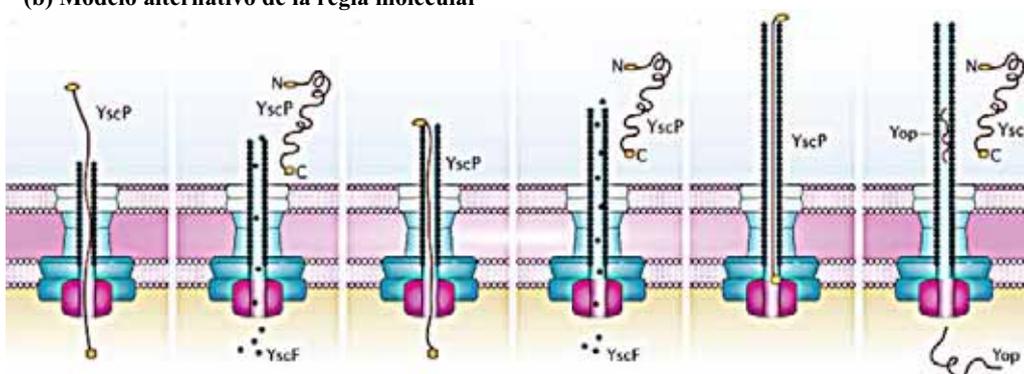


Figura 1.14 Teoría del control de la longitud de la aguja del T3SA de *Yersinia* spp. Figura adaptada de Cornelis, 2006.

(ii) Por otro lado, en *Yersinia* spp. se demostró que el incremento de la distancia entre la punta de la aguja y la célula huésped, ya fuera por la reducción de la longitud de la aguja o por el incremento del tamaño de la adhesina de superficie de *Yersinia*, YadA, evita la translocación (Mota *et al.*, 2005). Además, estudios previos en *Shigella* indicaban que el estado de glicosilación del LPS afectaba a la accesibilidad y función de la aguja del T3SA (West *et al.*, 2005). Todos estos datos sugieren que la longitud de la aguja refleja una adaptación a las características fisicoquímicas de la interfase bacteria-huésped, y apoyan la teoría de que la aguja podría estar involucrada en la detección de las células huésped (Yip and Strynadka, 2006).

Se ha observado que las agujas de varias especies se pueden asociar con estructuras adicionales que se unen al extremo distal de las mismas y parecen estar implicadas en mediar la formación del poro de translocación en la membrana eucariota y conectar la aguja al mismo (apartado 1.3.1.3). Recientemente, Mueller y colaboradores han

demostrado que la proteína LcrV, secretada mediante T3SS en *Yersinia* spp., forma un complejo en forma de campana en la punta de la aguja, y esta estructura es necesaria para la formación del poro de translocación (Mueller *et al.*, 2005).

Filamentos

En cepas patógenas de *E. coli* se ha descrito una variación de la aguja: un filamento largo que parece estar unido al extremo distal de la misma. La aguja de *E. coli* está compuesta por una proteína de la familia YscF, EscF (8 kDa), y el filamento por la proteína EspA (aproximadamente 20 kDa) (figura 1.15). Recientemente, se ha identificado una estructura similar en uno de los dos T3SS de *S. typhimurium*, formado por la proteína SseB (Chakravortti *et al.*, 2005).

Los filamentos formados por la proteína EspA, son tubos helicoidales con diámetros externo e interno de 120 Å y 25 Å respectivamente, y con unos parámetros helicoidales muy similares a los de la aguja (Yip and Strynadka, 2006). Pueden llegar a tener una longitud de hasta 700 nm, pero la mayoría se encuentra en el rango de los 40-140 nm. Probablemente, estas estructuras responden a la necesidad de los patógenos que las poseen de atravesar el grueso glicocáliz que presenta el epitelio intestinal hasta llegar a alcanzar los enterocitos (Ghosh, 2004).

Pili

Las bacterias fitopatógenas no presentan agujas ni filamentos, sino estructuras en forma de *pilus* denominadas *pilus* Hrp (del inglés *Hipersensitive Response and Pathogenesis*) (figura 1.16). Los *pili* Hrp presentan un diámetro externo similar al de las agujas, aproximadamente 80 Å; en cambio, su longitud de aproximadamente 2 µm es mucho mayor. Además, mientras que las agujas han sido descritas como estructuras rígidas, los *pili* parecen ser flexibles. Probablemente, la longitud de los *pili* Hrp sea debida a la necesidad de atravesar la pared celular vegetal (de grosor superior a 100 nm) antes de alcanzar la membrana citoplasmática de la célula eucariota. A diferencia de las agujas, dispersas alrededor de toda la superficie bacteriana, los *pili* Hrp de *R. solanacearum* parecen emanar de un polo de la célula (Van Gijsegem *et al.*, 2000).

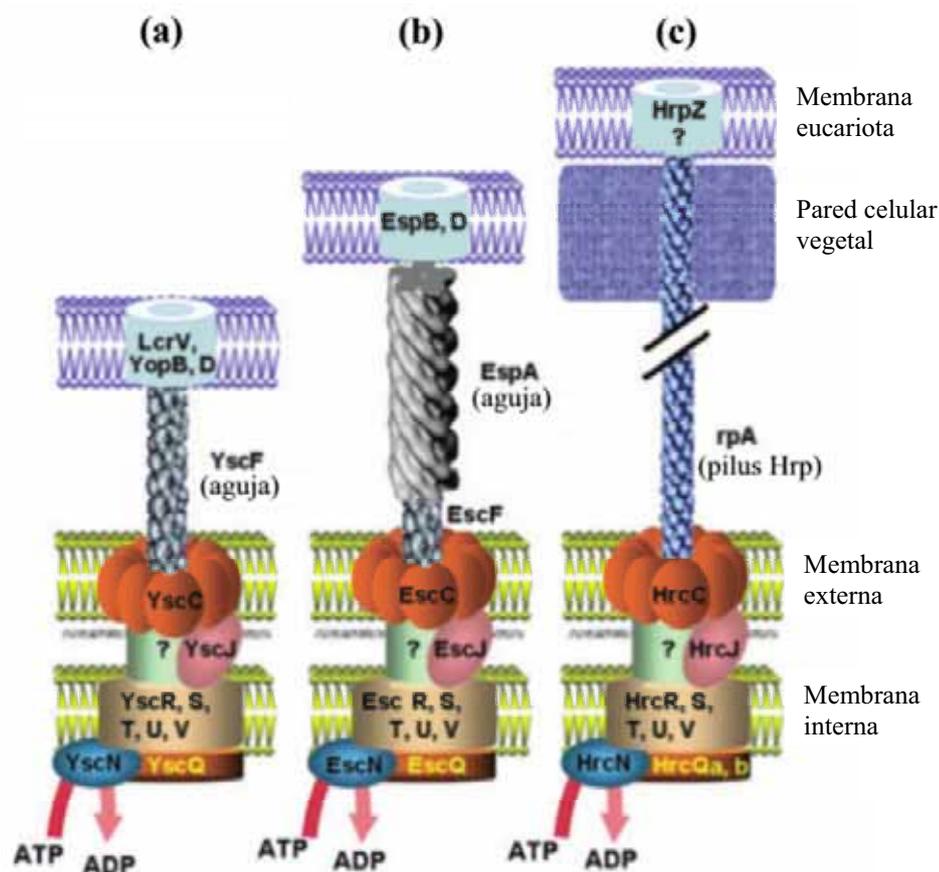


Figura 1.15 Representación esquemática del T3SS en el género *Yersinia* (a), *E. coli* (b) y *P. syringae* (c). Se muestran las proteínas de tipo III conservadas en la misma posición y color. El signo de interrogación indica que la estructura todavía no ha sido identificada. Figura adaptada de Tampakaki, 2004.

1.3.1.2 Estructuras embebidas en las membranas: el cuerpo basal

La aguja del T3SS parece anclarse en dos complejos de anillos concéntricos embebidos en cada una de las membranas bacterianas, el más grande situado en la membrana interna y el más pequeño en la membrana externa (figura 1.13). Este conjunto parece proveer de un camino continuo y directo a través de la membrana interna, el periplasma, la pared de peptidoglicano y la membrana externa (Ghosh, 2004).

Complejo de membrana externa

La más pequeña de las dos estructuras en forma de anillo del T3SA se localiza en la membrana externa y está formada por miembros de la familia proteica de las secretinas (figura 1.15). Los miembros de esta gran familia de proteínas se encuentran representados en muchas especies de bacterias Gram-negativas, y participan en diversos

procesos de transporte molecular que incluyen la secreción de tipo II, la secreción de tipo III, la biogénesis de *pili* de tipo IV y la liberación de fagos filamentosos (Thanassi and Hultgren, 2000).

Mediante microscopía electrónica, se ha estudiado la estructura y la capacidad de formación de canal de varias secretinas, entre ellas algunas de T3SS. Estos análisis indican que los monómeros de esta proteína se asocian en oligómeros de 12-14 subunidades, formando una estructura en forma de anillo con un canal central de 5-10 nm, que podría funcionar como canal de paso de proteínas plegadas a través de la membrana externa (Yip and Strynadka, 2006). Sin embargo, las secretinas del T3SS, conocidas como familia de proteínas YscC, parecen tener una función diferente: el anclaje y la estabilización de la aguja a las envueltas bacterianas.

Complejo de membrana interna

Este complejo oligomérico formado por múltiples copias de al menos dos proteínas distintas (PgrK y PgrH en *Salmonella*), se extiende a través de la membrana interna y parte del citoplasma y del periplasma, presentando similitudes genéticas, estructurales y funcionales con componentes del cuerpo basal del flagelo. Probablemente, este complejo actúa como plataforma inicial para la localización de diversos componentes estructurales durante el proceso de ensamblaje y como localización de la maquinaria de transporte de proteínas (Yip and Strynadka, 2006).

PgrK pertenece a la familia de proteínas periplásmicas YscJ (figura 1.15). Se ha predicho que estas proteínas podrían estar ancladas a la cara externa de la membrana interna gracias a la acetilación de su extremo N-terminal tras la escisión del péptido señal, y algunas veces también mediante un segmento transmembrana localizado en su extremo C-terminal (Yip *et al.*, 2005). PgrK presenta similitud de secuencia, a nivel del extremo N-terminal, con la proteína flagelar FliF, encargada de la formación del anillo MS en el flagelo (Canals, 2007). El anillo MS del flagelo contiene en su centro un número de proteínas integrales de membrana (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR) y citoplasmáticas (FliH y FliI). Todas estas proteínas, a excepción de FliO, tienen homólogos en el T3SS (Ghosh, 2004). De esta manera, se piensa que PgrK formaría anillos multiméricos especializados en reclutar otros putativos componentes de membrana interna, como YscR, YscS, YscT, YscU e YscV (Yip and Strynadka, 2006).

Sin embargo, estos componentes no se han identificado en las purificaciones de complejos aguja, probablemente debido a la falta de un procedimiento de aislamiento menos agresivo. Por otro lado, estos putativos componentes de membrana interna del T3SA podrían funcionar como receptores de reconocimiento de la señal de secreción de proteínas e interactuar con las mismas durante su transporte (Ghosh, 2004).

En contraste con PrgK, PrgH no está relacionada con proteínas flagelares ni se presenta altamente conservada en los diferentes T3SS. No obstante, la topología predicha de PrgH es similar a la predicha para YscD de *Yersinia*, con un dominio N-terminal pequeño y citoplasmático, una única región transmembrana, y un dominio periplasmático más grande (Ghosh, 2004).

Otros componentes

Los componentes mencionados anteriormente son proteínas estructurales responsables de la formación del canal molecular que los efectores utilizan para cruzar las diversas envueltas celulares durante el proceso de transporte. Pero el T3SA también está formado por otros componentes con funciones catalíticas y reguladoras que están localizados en el citoplasma o bien en la cara citoplasmática de la membrana interna. Algunos de estos componentes son la ATPasa y las chaperonas de tipo III.

Las chaperonas de tipo III son proteínas pequeñas y ácidas que unen, en el citoplasma, a proteínas de tipo III que necesitan ser transportadas, contribuyendo a dicho proceso (apartado 1.3.3.3). Por otro lado, la ATPasa de tipo III pertenece a la familia de proteínas YscN y se encuentra asociada a la cara interna de la membrana citoplasmática (figura 1.15), formando un complejo con otras proteínas como YscQ, YscL e YscK. Se ha sugerido que estas proteínas podrían proveer la energía necesaria para el proceso de translocación (Yip and Strynadka, 2006).

1.3.1.3 Translocadores

El mecanismo mediante el cual el T3SA es capaz de translocar las proteínas efectoras al interior de las células eucariotas es uno de los menos comprendidos, existiendo dos modelos distintos. Uno de los modelos propuestos indica que la propia aguja pincharía literalmente la membrana eucariota, haciendo un agujero a través del cual las proteínas efectoras llegarían al citoplasma eucariota (Hoiczyk and Blobel,

2001). El segundo defiende que el complejo aguja por sí solo no es capaz de inyectar proteínas y necesita una serie de proteínas accesorias que también son secretadas vía tipo III: los translocadores. Los translocadores son proteínas de tipo III cuya función parece ser la de insertarse en la membrana eucariota, formando un poro a través del cual los efectores serían transportados (Tardy *et al.*, 1999). De acuerdo con esta hipótesis, cepas deficientes en estos translocadores no son capaces de inyectar proteínas al interior de células eucariotas pero sí pueden formar el complejo aguja (Galán and Wolf-Watz, 2006).

1.3.2 Ensamblaje de la maquinaria de secreción

Como se ha comentado anteriormente, el complejo aguja está compuesto por una proyección en forma de aguja que sobresale varios nanómetros de la superficie bacteriana, y por un complejo de anillos, atravesados por una varilla interna, que anclan la estructura a la envueltas bacterianas. La varilla interna no es más que una subestructura cilíndrica que conecta la aguja a la cara basal del complejo de anillos (figura 1.16). A su vez, todo el complejo aguja es atravesado por un canal estrecho (aproximadamente 20 Å) que probablemente sirve como conducto para que las proteínas sean transportadas por esta vía de secreción (Galán and Wolf-Watz, 2006).



Figura 1.16 Diagrama de la sección longitudinal del complejo aguja. Adaptada de Galán and Wolf-Watz, 2006.

El ensamblaje del complejo aguja parece darse en diferentes pasos (figura 1.17): en primer lugar se montaría la estructura basal formada por los anillos internos y externos, seguidamente la varilla interna, y finalmente la aguja (Sukhan *et al.*, 2001). En *S. typhimurium* la estructura basal está compuesta por cantidades equimolares de tres proteínas: invG (de la familia de las secretinas), PrgH y PrgK (apartado 1.3.1.2). Se han encontrado homólogos de estos componentes en otros T3SS, lo que sugiere que la composición y el proceso de ensamblaje podrían estar conservados. Estas proteínas que forman la base del complejo son transportadas hasta su localización mediante el sistema Sec. En algunos T3SS, el ensamblaje de los anillos externos requiere una proteína accesoria de membrana externa que sirve a modo de chaperona, cuya función sería facilitar el plegamiento correcto y la formación del complejo multimérico (Daefler and

Russel, 1998). La determinación de la estructura atómica de EscJ (el ortólogo de PrgK en *E. coli* enteropatógenicas) indica que esta proteína podría formar un anillo multimérico que serviría como iniciador del ensamblaje del complejo aguja (Yip *et al.*, 2005).

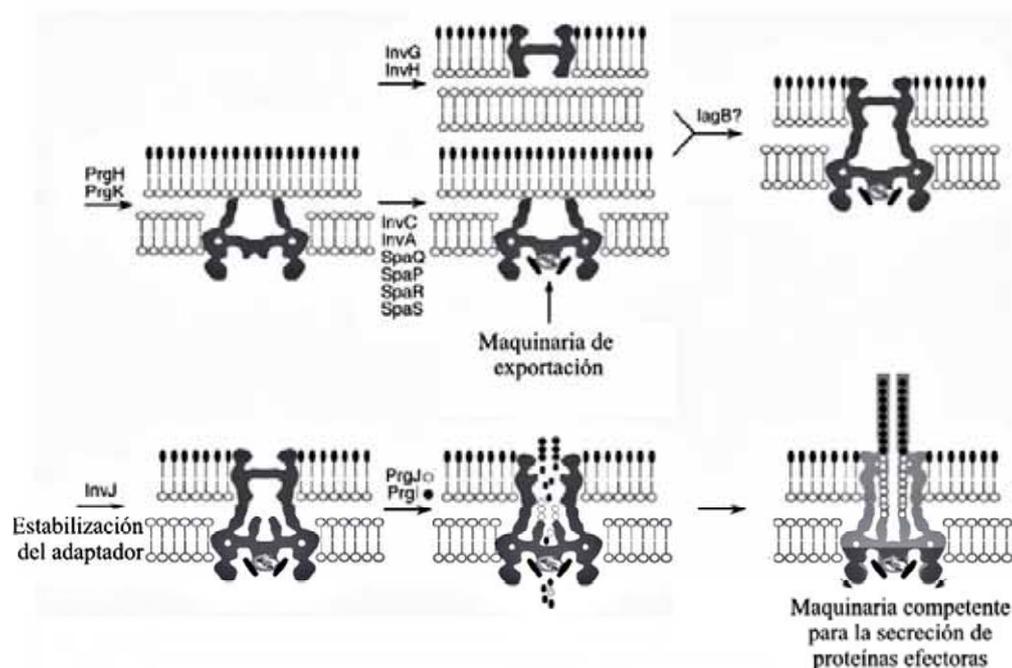


Figura 1.17 Modelo del proceso de ensamblaje del complejo aguja. La nomenclatura de las proteínas relevantes es de *S. typhimurium*. Adaptada de Galán and Wolf-Watz, 2006.

Es probable que el ensamblaje de la subestructura basal anterior (formada por PrgK, PrgH y InvG) lleve al reclutamiento de una serie de proteínas accesorias, altamente conservadas, en la membrana interna, y cuya función podría ser facilitar el paso de los sustratos de secreción a través de la membrana interna (figura 1.17). Por analogía con el aparato flagelar, se ha hipotetizado que podría existir un compartimento adicional, el anillo C, en la cara citoplasmática del complejo aguja (Galán and Wolf-Watz, 2006).

Una vez ensamblada la base, ésta empezaría a funcionar como una “máquina de secreción de tipo III” dedicada exclusivamente a la secreción de proteínas implicadas en la formación de la varilla interna y la aguja. En *S. typhimurium* estas proteínas son: PrgJ, componente putativo de la varilla interna; PrgI, subunidad de la aguja; e InvJ, proteína reguladora del ensamblaje (Marlovits *et al.*, 2004). La varilla interna se ancla a un adaptador localizado en la cara basal del complejo de anillos. Cepas mutantes en InvJ no poseen este adaptador ni tampoco la varilla interna, lo que indica que este adaptador podría ser necesario para su ensamblaje. Cabe destacar que no se ha detectado

un ortólogo claro del gen *prgJ* en otros T3SS, por lo que la identidad de la varilla en otros injectisomas se desconoce (Cornelis, 2006).

Tras finalizar el ensamblaje del complejo aguja, la maquinaria de secreción debe cambiar la especificidad por los sustratos de transporte para poder realizar la translocación de proteínas efectoras. La reprogramación de la maquinaria de secreción también se ha observado durante el ensamblaje del flagelo (Macnab, 2004), donde una vez el gancho llega a una longitud determinada, la maquinaria de secreción cambia la especificidad de sustrato para transportar las proteínas necesarias para el ensamblaje del filamento flagelar. El cambio de la especificidad de sustratos en los T3SS y los FT3SS está en parte regido por las proteínas InvJ e YscP, en el caso del T3SS de *Salmonella* spp. y *Yersinia* spp., respectivamente, y FliK, en el caso del gancho flagelar. La mutación de estas proteínas de T3SS y FT3SS da lugar a agujas y ganchos mucho más largos, respectivamente (Galán and Wolf-Watz, 2006). Aunque existen diferentes hipótesis, entre ellas la de la “regla molecular” formada por YscP (apartado 1.3.1.1), no se conoce exactamente cómo funciona el mecanismo por el que las maquinarias de secreción cambian la especificidad de sustrato. No obstante, se han observado diferencias conformacionales de la cara citoplasmática de la base entre el complejo aguja competente para el transporte de efectores, y el competente para la secreción de proteínas formadoras de la varilla y la aguja, respectivamente.

1.3.3 Efectores

Las proteínas bacterianas inyectadas en el interior de las células eucariotas mediante el T3SS (o efectores) tienen la función de interferir en y alterar diferentes procesos que tienen lugar en las mismas. En la actualidad, se conocen diversidad de efectores, descritos tanto en patógenos animales como vegetales, aunque para algunos sistemas de tipo III aún no se ha descrito ninguno.

Cabe destacar que, aunque varios de los componentes centrales del T3SA están conservados, las secuencias codificantes de efectores y el número de éstos que cada bacteria posee varían considerablemente (Büttner and Bonas, 2003). No obstante, y teniendo en cuenta que los diversos patógenos producen distintas patologías y muestran diferencias en la especificidad de huésped, muchos efectores tienen una función similar o tienen como diana proteínas similares (Tampakaki *et al.*, 2004). Además, el estudio de

mutantes en diversos efectores indica que, en muchos casos, efectores individuales contribuyen en poco a la virulencia bacteriana. El estudio de los efectores de tipo III de patógenos animales ha permitido identificar diferentes actividades enzimáticas: fosfotirosina fosfatasa, serina-treonina quinasa, inositol fosfato fosfatasa, ADP-ribosiltransferasa, adenilato ciclasa, activación de GTPasas (GAP, del inglés *GTPase Activating Protein*) y cisteína proteasa (Büttner and Bonas, 2003). Algunos de los efectores de tipo III son proteínas “híbridas” en cuanto a función, es decir, están compuestas por dominios con diferente actividad enzimática, como por ejemplo la exoenzima T de *Aeromonas salmonicida*, AexT. Este efector presenta el extremo C-terminal con actividad ADP-ribosiltransferasa y el N-terminal con actividad GAP, siendo la finalidad de estas funciones la desorganización del citoesqueleto de actina de la célula huésped (Braun *et al.*, 2002; Litvak and Selinger, 2007; Fehr *et al.*, 2007).

Toda esta diversidad de dianas y efectos producidos por los efectores de tipo III en las células animales parece hallarse dirigida a dos vías de acción definidas. La primera es la alteración de la dinámica del citoesqueleto. De hecho, para que la bacteria pueda entrar en la célula huésped se requiere la reorganización del citoesqueleto de actina, y varios sistemas de tipo III promueven la macropinocitosis en células no fagocíticas (*Shigella* y *Salmonella*) o bloquean la fagocitosis (*Yersinia* spp. y *P. aeruginosa*). Mientras que algunos efectores actúan directamente sobre componentes del citoesqueleto, otros interfieren en el control que ejercen las GTPasas pequeñas sobre la polimerización de actina (Cornelis and Van Gijsegem, 2000). La segunda es la modulación de la respuesta inflamatoria y la señalización celular, mediante el control de citoquinas, quemoquinas, MAPK y el factor transcripcional NF- κ B.

Tres temas importantes emergen de la caracterización funcional y atómica de los efectores estudiados hasta el momento. En primer lugar, a diferencia de otras toxinas bacterianas, que parecen ejercer su función mediante modificaciones covalentes no reversibles de sus proteínas diana, los efectores de tipo III parecen mimetizar proteínas eucariotas como estrategia para modular las funciones celulares. En segundo lugar, es muy difícil predecir la verdadera función de la mayoría de efectores de tipo III en base al análisis de su secuencia aminoacídica y/o su estructura atómica en ausencia de sus proteínas diana. De hecho, la mayor parte de efectores de tipo III no muestran similitud de secuencia con otras proteínas, a excepción de sus putativos ortólogos y parálogos.

Por último, a menudo la actividad de los diferentes efectores transportados por la misma maquinaria está cuidadosamente coordinada y regulada temporalmente. Por tanto, la comprensión del funcionamiento de un T3SS dado, requerirá el estudio de la función de todos o casi todos sus efectores (Galán and Wolf-Watz, 2006).

1.3.4 Señales de secreción

De las miles de proteínas bacterianas, tan sólo unas pocas son sustratos de secreción de tipo III (los efectores, los translocadores y algunas proteínas implicadas en la regulación del funcionamiento de estos sistemas). Por lo tanto, las maquinarias de secreción de tipo III deben ser capaces de seleccionar el número relativamente pequeño de sustratos destinados a viajar por esta vía (Ghosh, 2004). Además, como ya se ha mencionado, algunas bacterias poseen más de un T3SS, en ocasiones expresados simultáneamente. Esto implica que los mecanismos de reconocimiento de sustrato deben garantizar un nivel de especificidad capaz de asegurar que los sustratos adecuados son enviados a la maquinaria apropiada (Galán and Wolf-Watz, 2006). Por otro lado, el estrecho diámetro del canal que atraviesa el complejo aguja y sirve como conducto para la secreción implicaría que, una vez reconocidos los sustratos, éstos deberían ser desplegados antes de su transporte. Por último, existen evidencias de que las proteínas transportadas mediante el T3SS están sujetas a una jerarquía con un orden predeterminado (Pettersson *et al.*, 1996; Wulff-Strobel *et al.*, 2002).

Los sustratos de secreción de tipo III no presentan el péptido señal N-terminal característico de las proteínas exportadas por vías Sec-dependientes. Sin embargo, parecen presentar múltiples señales que les permiten ser reconocidos y transportados por la maquinaria de secreción y, hasta el momento, no se ha identificado una secuencia consenso (Galán and Collmer, 1999; Ghosh, 2004; He *et al.*, 2004). Entre las múltiples señales, por un lado, parece existir una putativa señal de secreción en el extremo N-terminal de estos sustratos, aunque permanece en controversia su composición molecular (proteína o ARNm). Por el otro, la translocación de muchos de estos sustratos no depende únicamente de esta putativa señal de secreción, sino también de la actividad de unas proteínas accesorias, las chaperonas específicas de tipo III (Ghosh, 2004). Probablemente, el uso de múltiples señales de secreción determine el momento de secreción de algunos de estos sustratos y contribuya a la elevada secreción de otros. De esta manera, podría ser probable que las proteínas destinadas a ser secretadas

inmediatamente después del contacto con la célula huésped, estuvieran preformadas y su secreción fuera dependiente de chaperona; mientras que aquellas secretadas en una fase más tardía, podrían utilizar la putativa secuencia señal de tipo III (He *et al.*, 2004).

1.3.4.1 Señal proteica

Los trabajos iniciales llevados a cabo en *Yersinia* spp. sugieren que los sustratos de secreción de la maquinaria de tipo III de este género, también denominados proteínas Yop (del inglés *Yersinia Outer Proteins*), poseen una señal de secreción de naturaleza proteica, no sujeta a escisión, en su extremo N-terminal (figura 1.18). Estos trabajos, demostraban que los primeros 15 y 17 residuos aminoacídicos eran suficientes para la secreción al medio de cultivo de proteínas de fusión de YopE y YopH respectivamente (Michiels and Cornelis, 1991; Sory *et al.*, 1995). Sin embargo, no se han encontrado similitudes a nivel de la región N-terminal entre YopE y YopH u otras proteínas Yop, hecho que lleva a preguntarse cómo secuencias aminoacídicas tan diferentes pueden servir como señal de secreción para un mismo sistema.

Estudios realizados por Lloyd y colaboradores, demostraron que mutaciones en YopE que alteraban la secuencia de la región 5' del ARNm, pero mantenían intacta la secuencia proteica, no abolían la secreción de tipo III (Lloyd *et al.*, 2001). Además, mediante sustitución de los aminoácidos 2-8 por una secuencia sintética de serinas e isoleucinas en YopE, demostraron que secuencias N-terminales anfipáticas, conteniendo 4 o 5 residuos de serina, eran secretadas más fácilmente que secuencias hidrofóbicas o hidrofílicas, sugiriendo una secuencia señal N-terminal proteica anfipática (Lloyd *et al.*, 2002).

1.3.4.2 Señal de ARNm

Anderson y Schneewind propusieron que la señal de secreción residía en la región 5' del ARNm de los sustratos de secreción. Estos autores demostraron que mutaciones en la pauta de lectura que alteran drásticamente los 15 primeros aminoácidos de las proteínas (manteniendo el resto de la secuencia intacta), sin introducir cambios sustanciales en la secuencia de ARNm, seguían permitiendo la secreción de las proteínas heterólogas YopE-neomicina fosfotransferasa (Npt) y YopN-Npt en el medio de cultivo (Anderson and Schneewind, 1997). Además, el análisis de las estructuras predichas de los ARNm de YopE y YopN revela la presencia de un bucle que esconde

el codón AUG de inicio de traducción, hecho que sugiere que la traducción de estas proteínas podría estar relacionada con la interacción del extremo 5' del ARNm con alguno de los componentes del aparato de secreción (figura 1.18) (Anderson and Schneewind, 1997).

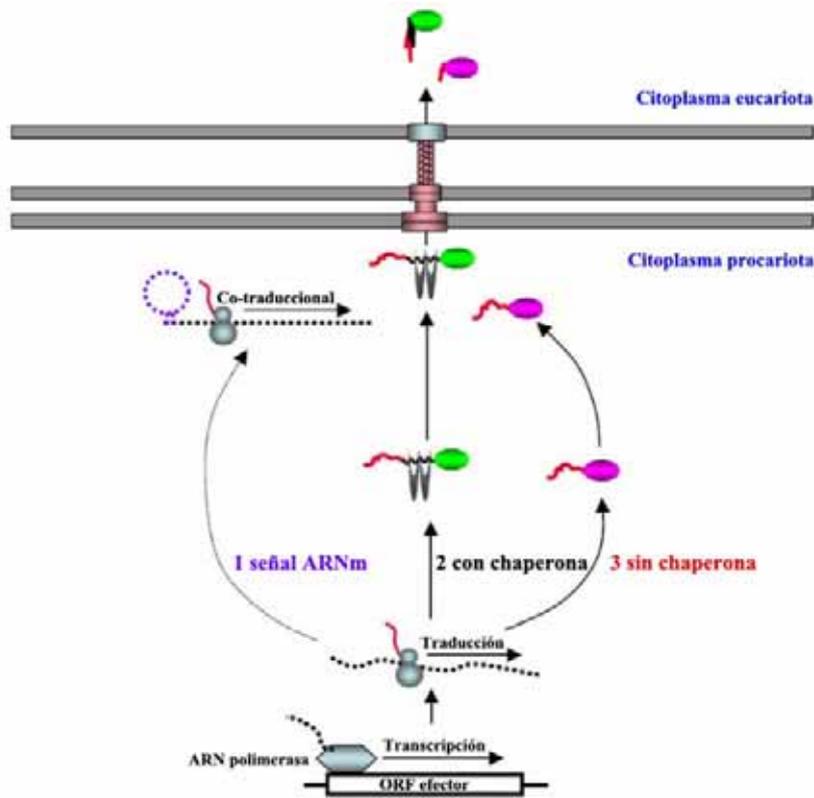


Figura 1.18 Diagrama de las putativas señales de secreción de tipo III: 1, señal de ARNm (probablemente una estructura secundaria, azul); 2, complejo chaperona-efector (el homodímero de chaperonas se indica mediante dos herraduras y el dominio de unión a chaperona con una línea negra ondulada); 3, señal peptídica N-terminal (línea roja ondulada). Figura adaptada de He, 2004.

1.3.4.3 Chaperonas de tipo III

Algunas proteínas podrían ser secretadas gracias a un mecanismo post-traduccional que implica la función de proteínas accesorias específicas, conocidas como chaperonas de tipo III. Aunque las chaperonas de tipo III no presentan similitud de secuencia primaria, comparten algunas características: son pequeñas (<170 aa), ácidas (pI < 5.5), forman dímeros y, a diferencia de otras chaperonas, no unen ni hidrolizan ATP (Feldman and Cornelis, 2003). En general, estas chaperonas se unen a un dominio de aproximadamente 50-100 aminoácidos de la proteína a secretar, localizado inmediatamente después de la secuencia señal (Woestyn *et al.*, 1996) y, en muchas ocasiones, están codificadas en regiones adyacentes a sus efectores. Aunque a menudo

una chaperona determinada es específica de una sola proteína, hay chaperonas que pueden unirse a diversas proteínas (Galán and Wolf-Watz, 2006). Se sugieren tres funciones para estas proteínas: (i) antiplegamiento, (ii) señal de secreción y (iii) estabilización de efectores (He *et al.*, 2004).

(i) Estudios de co-cristalización de chaperonas de tipo III unidas a sus sustratos demuestran que éstas mantienen el dominio de unión a chaperona de las proteínas a secretar con una conformación no globular que mantiene la estructura secundaria (Stebbins and Galán, 2001; Birtalan *et al.*, 2002; Lilic *et al.*, 2006). Esta observación ha llevado a proponer que su función sería proporcionar un estado no plegado a los sustratos de secreción antes de su transporte y evitar interacciones prematuras de dichos sustratos con componentes de la maquinaria de secreción (Galán and Wolf-Watz, 2006).

(ii) Se ha propuesto que las chaperonas de tipo III actuarían en el direccionamiento de las proteínas a secretar hacia el aparato de secreción. De acuerdo con esta hipótesis, la eliminación del dominio de unión a chaperona de algunos sustratos de secreción evita su transporte a través del T3SS. Incluso, se ha observado que algunas de estas proteínas deletionadas son direccionadas al sistema de exportación flagelar (Lee and Galán, 2004; Lilic *et al.*, 2006), resultados que indican que la secuencia señal N-terminal podría ser genérica, necesitando otras secuencias y/o proteínas accesorias para conferir especificidad. Dado el alto grado de similitud de las estructuras tridimensionales de diversas chaperonas, alguna característica estructural común a todas ellas podría servir como señal de reconocimiento (Lilic *et al.*, 2006). Por otro lado, además de reconocer la señal de secreción en los complejos chaperona-sustrato de secreción, la maquinaria de tipo III debería ser capaz de separar este complejo, ya que las chaperonas de tipo III no son secretadas. Estudios *in vitro* recientes demuestran que la ATPasa de tipo III, proteína altamente conservada, se une a los complejos chaperona-sustrato de secreción, produciendo la disociación de estos complejos y el desplegamiento de los sustratos de secreción (Akeda and Galán, 2005).

(iii) Algunas chaperonas son necesarias para la estabilización de los sustratos de secreción en el citoplasma bacteriano, encontrando una rápida degradación de diversos sustratos de secreción de tipo III en ausencia de su chaperona asociada, posiblemente debido a un plegamiento anormal de los mismos (He *et al.*, 2004).

1.3.5 Organización génica

Los genes que codifican los T3SS generalmente se encuentran agrupados: en algunas bacterias estas agrupaciones génicas se localizan en plásmidos, mientras que en otras se sitúan en el cromosoma. Por el contrario, los genes que codifican las proteínas efectoras suelen encontrarse dispersos en el genoma bacteriano. Sin embargo, en muchos casos, las agrupaciones génicas de los T3SS y los genes que codifican los efectores, están sujetos a una co-regulación a nivel transcripcional, hecho que sugiere que estos componentes han evolucionado de manera independiente, formando posteriormente una unidad funcional (Hueck, 1998).

En la mayoría de los casos, el contenido de G+C (guaninas + citosinas) de los T3SS se encuentra en el rango del 40-45% y es inferior al contenido de G+C del resto del genoma, hecho que apoya la teoría de la adquisición de estos sistemas mediante transferencia génica horizontal. Por otro lado, la mayoría de los genes de los diferentes T3SS codifican proteínas que tienen homólogos en otros T3SS. Además, en las agrupaciones génicas de tipo III existen bloques de genes que se encuentran conservados en cuanto al orden génico en los diferentes sistemas y la organización génica global se encuentra conservada en varios subgrupos (Hueck, 1998).

Análisis filogenéticos llevados a cabo con diferentes componentes del aparato de secreción de tipo III (o inyectisoma) dan lugar al mismo tipo de árbol filogenético, indicando que los genes que codifican estos aparatos han evolucionado como grandes bloques génicos intactos. Estos análisis han permitido identificar siete familias de inyectisomas (figura 1.19), en las que no sólo se conservan los genes, sino también la organización génica de los *loci*: (i) la familia Ysc (Ysc, Psc, Lsc, Asc, Vsc, Dsc, Bsc), (ii) la familia Inv-Mxi-Spa, (iii) la familia Ssa-Esc, (iv) la familia Hrc-Hrp 1, (v) la familia Hrc-Hrp 2, (vi) la familia de los Rhizobiales, y (vii) la familia de los Chlamydiales. Cabe destacar que estos árboles filogenéticos son completamente diferentes de los árboles basados en el ARNr 16S (indican la relación evolutiva entre las especies), hecho que sugiere que los T3SS se han adquirido mediante procesos de transferencia génica horizontal entre bacterias no relacionadas filogenéticamente (Troisfontaines and Cornelis, 2005).

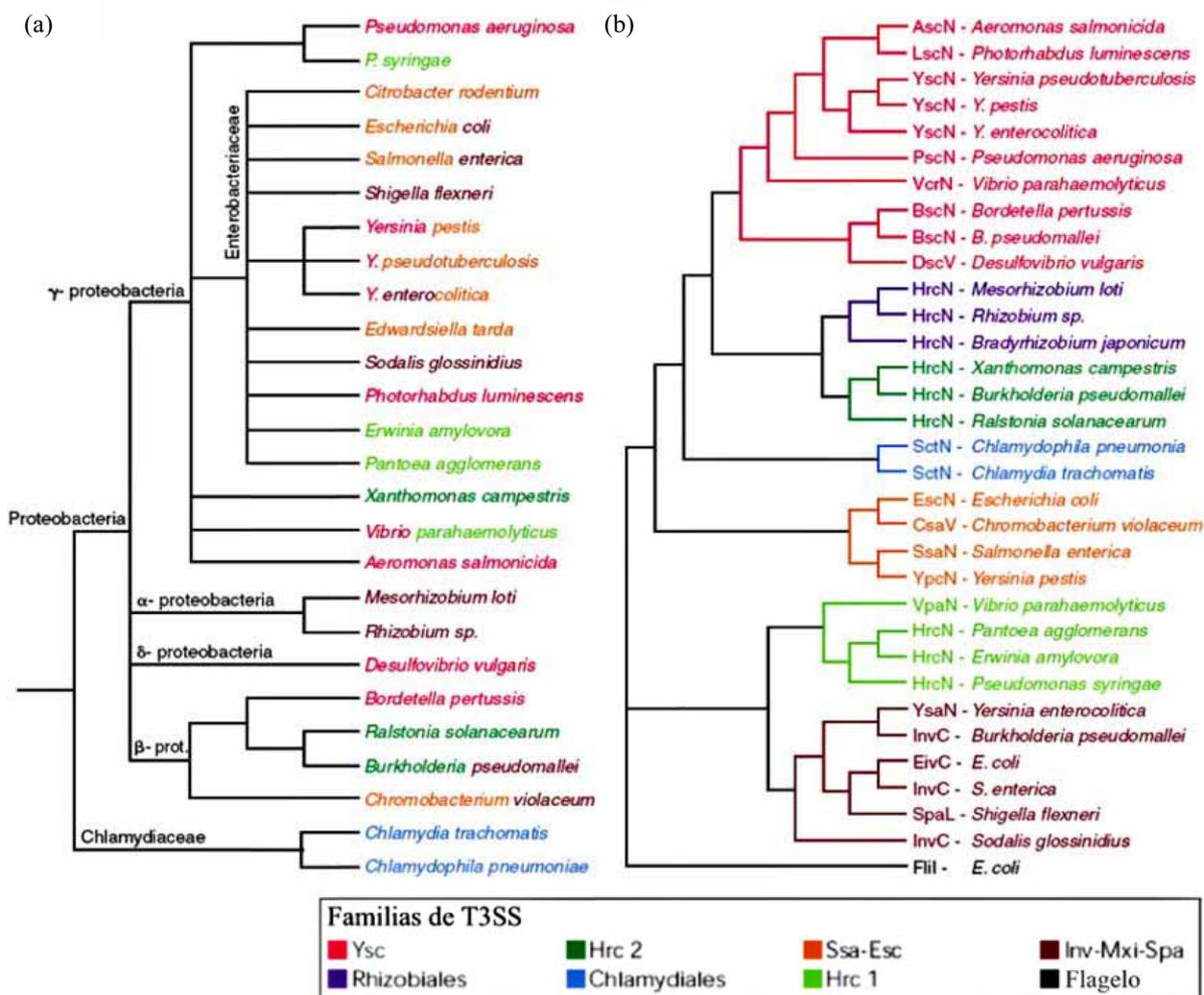


Figura 1.19 (a) Árbol basado en ARNr 16S. (b) Filograma de las ATPasas de los inyectisomas y FliI, la ATPasa del flagelo de *E. coli*. Las siete familias de T3SS se representan en siete colores diferentes; los mismos colores se utilizan en el árbol de ARNr para ilustrar la falta de correlación entre los dos árboles. Los nombres de colores mixtos indican la presencia de más de un inyectisoma de diferente familia en estas bacterias. Figura adaptada de Troisfontaines, 2005.

Dentro de las siete familias de inyectisomas mencionadas, una familia se limita al Filum Chlamydiae y otra al Orden Rhizobiales. Los inyectisomas presentes en la mayoría de patógenos animales pertenecen a una de tres familias: la familia Ysc, que incluye representantes como *Aeromonas* spp., *P. aeruginosa* y *Yersinia* spp., siendo este último el prototipo de esta familia; la familia Inv-Mxi-Spa, con los inyectisomas de *S. flexneri* y *S. typhimurium* SPI-1 como arquetipos; y la familia Ssa-Esc, donde se clasifican los inyectisomas de *E. coli* entropatógenicas (EPEC) y enterohemorrágicas (EHEC), y el de *S. typhimurium* SPI-2. Los inyectisomas presentes en patógenos de plantas pertenecen a una de dos familias: la familia Hrc-Hrp 1 y la familia Hrc-Hrp 2. En ocasiones, una misma bacteria codifica dos inyectisomas que, además, pueden

pertenecer a familias diferentes, cada uno con un papel diferencial en los diferentes estadios del proceso de infección, como por ejemplo *S. typhimurium* (Cornelis, 2006).

1.3.6 Regulación

El ensamblaje y funcionamiento del T3SS implica la producción de una gran cantidad de productos génicos, fenómeno que a su vez supone un elevado consumo energético, hecho que requiere un control riguroso de la expresión y la activación del sistema (He *et al.*, 2004, Galán and Wolf-Watz, 2006).

Existen diversos mecanismos para el control de la expresión génica del T3SS, que varían en función de los diferentes microorganismos que lo poseen. En general, la regulación de la expresión génica responde tanto a factores de transcripción específicos como a componentes de complejas redes de regulación que integran diversos factores ambientales: la temperatura, la osmolaridad, la presión de oxígeno, los niveles de calcio y hierro, el pH, la fase de crecimiento, la densidad celular, la disponibilidad de nutrientes, el contacto con la célula huésped y/o la detección del propio proceso de secreción. Actualmente, están incrementándose los estudios en temas de regulación, que incluyen: la co-regulación de la expresión y la actividad secretora del T3SS, el control global de la regulación por medio de la modulación de la biosíntesis de AMPc, la represión debida a diferentes tipos de estrés, la implicación de múltiples sistemas de regulación de dos componentes, y la relación inversa entre la expresión del T3SS y el comportamiento multicelular (He *et al.*, 2004, Yahr and Wolfgang, 2006).

Debido a la variabilidad en los mecanismos de regulación del T3SS, se tomará el modelo de *P. aeruginosa* como ejemplo de regulación de la expresión, ya que los T3SS de *Aeromonas* spp. y *P. aeruginosa* pertenecen a la misma familia en cuanto a la clasificación basada en similitudes genéticas (apartado 1.3.5). Como se ha descrito anteriormente, los genes que codifican los diversos componentes del T3SS se pueden agrupar en tres clases: los que codifican la maquinaria de secreción y translocación, los que codifican los reguladores, y los que codifican los efectores y sus chaperonas específicas. En *P. aeruginosa*, todos estos genes se encuentran bajo el control transcripcional directo de la proteína de tipo III ExsA, miembro de la familia de activadores transcripcionales AraC (Yahr and Wolfgang, 2006). La regulación transcripcional mediante proteínas de tipo AraC es una característica común en muchos

T3SS. Aunque los miembros prototipo de la familia AraC están regulados por pequeñas moléculas ligando, no se ha observado este tipo de regulación en el caso de las proteínas de tipo AraC de los T3SS. Sin embargo, muchas de ellas sí parecen estar reguladas mediante proteínas ligando, que podrían funcionar bien como co-activadores o bien como antiactivadores (Plano, 2004). Actualmente, no se conoce ningún co-activador de ExsA, pero sí varios antiactivadores, como la proteína ExsD, aunque no se sabe si su función es evitar la unión de ExsA al ADN o inhibir el reclutamiento de la ARN polimerasa.

La proteína ExsD forma parte de una cascada de señalización que parece constituir un mecanismo de regulación común de la regulación de la expresión génica y la activación del funcionamiento del T3SS, uniendo ambos procesos mediante un sistema de *feedback* positivo (McCaw *et al.*, 2002). En *P. aeruginosa* este mecanismo estaría mediado por cuatro proteínas: el activador

transcripcional ExsA, el antiactivador ExsD, el anti-antiactivador ExsC y el anti-anti-antiactivador ExsE. En el modelo de regulación mediado por estas cuatro proteínas, en condiciones desfavorables para la secreción (elevadas concentraciones de calcio *in vitro*), la proteína ExsE se acumularía en el citoplasma bacteriano, secuestrando a ExsC, dejando ésta libre a su vez a ExsD, que se uniría a ExsA, inhibiendo la transcripción (figura 1.20). En condiciones favorables para la secreción (bajas concentraciones de calcio *in vitro*), la apertura del canal de secreción conllevaría la liberación masiva de ExsE, de tal manera que ExsC quedaría libre, secuestrando a ExsD, hecho que liberaría a ExsA de su represión, permitiendo la activación de la transcripción (Yahr and Wolfgang, 2006).

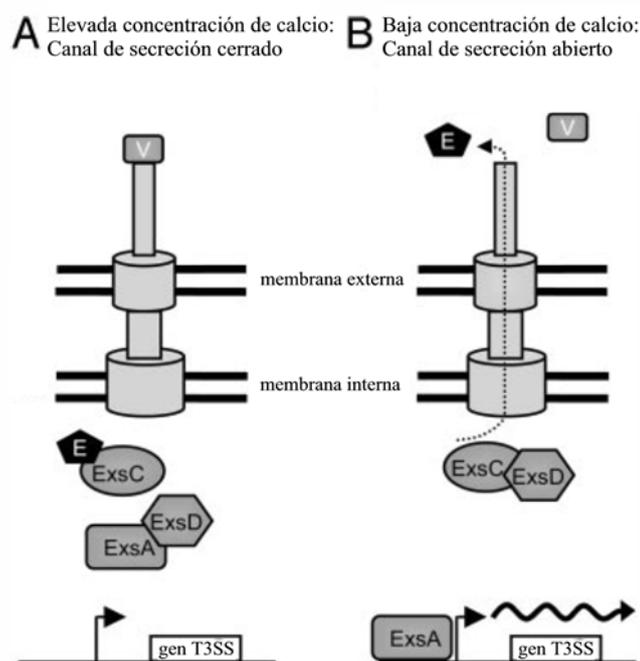


Figura 1.20 Modelo de inducción del regulón de T3SS. La expresión de los genes de T3SS se indica con una flecha ondulada. Abreviaturas: E, ExsE; V, PcrV. Figura adaptada de Rietsch, 2005.

Cabe destacar que la corregulación de la expresión génica y el proceso de secreción es una característica común de los diversos T3SS. Aunque los mecanismos de *feedback* implicados son diversos, podrían clasificarse en tres categorías: (i) la secreción de un regulador negativo en *Yersinia* spp. (Pettersson *et al.*, 1996), (ii) el secuestro de un co-activador en *S. typhimurium* y *Shigella flexneri* (Darwin and Miller, 2001; Mavris *et al.*, 2002), y (iii) el secuestro de un antiactivador en *P. aeruginosa*.

En cuanto a la regulación de la actividad secretora, aunque se ha conseguido activar el proceso de secreción *in vitro* con tratamientos específicos en algunas bacterias (por ejemplo, disminución de la concentración de calcio), la señal fisiológica debería derivar del contacto con la célula huésped, aunque la naturaleza de esta señal es todavía desconocida. Para explicar el funcionamiento de este mecanismo, existe una hipótesis que defiende que la aguja, componente externo del aparato de secreción, podría ser capaz de detectar el contacto con la célula huésped y, de alguna manera, transducir la señal a la cara citoplasmática del aparato para activar la secreción. Una vez en el citoplasma, el candidato encargado de transducir la señal de activación sería un complejo multiproteico que en *Yersinia* spp. está compuesto por las proteínas YopN, SycN, YscB y TyeA (Day and Plano, 1998; Schubot *et al.*, 2005), habiéndose encontrado homólogos de estas proteínas en otros T3SS. Este complejo parece esencial para evitar la secreción de tipo III en ausencia de las señales adecuadas, funcionando como una válvula interna que mantiene bloqueado el canal de secreción del T3SA. SycN y YscB son chaperonas de tipo III que interaccionan la una con la otra formando un heterodímero que une el extremo N-terminal de YopN. TyeA es una proteína citoplasmática que se une al extremo C-terminal de YopN, inhibiendo la secreción de ésta (Day *et al.*, 2003). Brevemente, se cree que la chaperona heterodimérica SycN/SycB dirigiría al complejo YopN/TyeA hacia el T3SS, iniciando su secreción. Sin embargo, en condiciones desfavorables para la secreción, este proceso no podría completarse, probablemente debido a un cambio conformacional de YopN, asociado con su desplegamiento y/o su secreción parcial, y permitiendo que el complejo YopN/TyeA interaccionara con una segunda zona del T3SA, bloqueándolo (figura 1.21). En condiciones favorables para la secreción, una señal desconocida permitiría el cambio de conformación de la cara citoplasmática del T3SA, resultando en la finalización de la interacción de éste con el complejo YopN/TyeA. Finalmente, la disociación del complejo YopN/TyeA permitiría el transporte de YopN, y en

consecuencia, otros sustratos de secreción, como ExsE y proteínas efectoras. De hecho, estudios realizados por Yahr y colaboradores en *P. aeruginosa*, han demostrado que proteínas quimeras de ExsE y CyaA (adenilato ciclasa) de *B. pertussis* se translocan al citoplasma de células eucariotas. Este hecho sugiere que el contacto con la célula huésped y la señal de baja concentración de calcio, mediante la reducción de los niveles intracelulares de la proteína ExsE, por medio la translocación y la secreción, respectivamente, activan la cascada reguladora ExsCEDA (Yahr and Wolfgang, 2006).

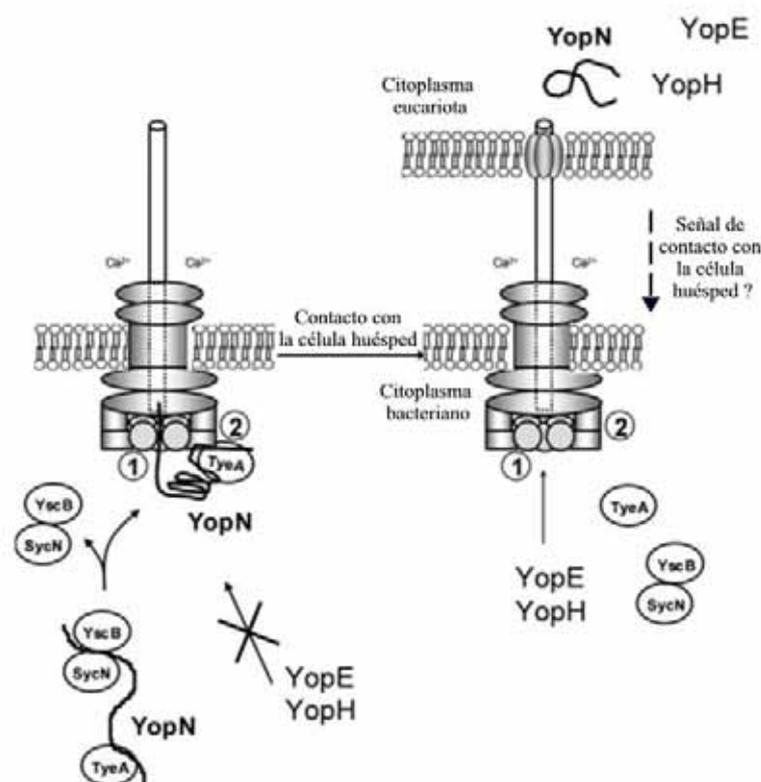
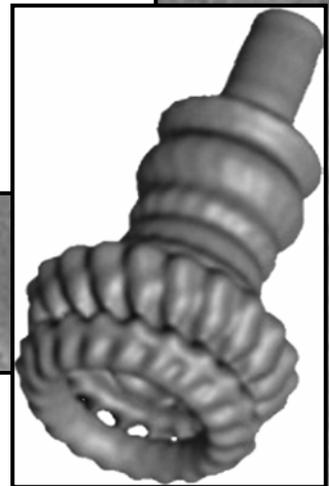


Figura 1.21 Modelo de regulación de la secreción del T3SS en *Yersinia* spp. YopE y YopH son efectores. Figura adaptada de Ferracci, 2005.

Finalmente, destacar que parece existir una segunda válvula interna para el control de la secreción del T3SA; en *Yersinia* spp., la proteína LcrG, cuya función reguladora parece estar controlada por su interacción con la proteína LcrV (apartado 1.3.1.1). Se ha propuesto un modelo en el que la afinidad entre estos dos componentes da lugar a cambios en la regulación del T3SA (Lawton *et al.*, 20002). De esta manera, en condiciones no permisivas para la secreción, LcrG forma un complejo con la cara citoplasmática del T3SA, momento en que los niveles de la proteína LcrV son bajos. Tras la inducción de la secreción, incrementa la producción de LcrV, que se asocia a LcrG, dando lugar a la finalización de la interacción de ésta con el T3SA.

Objetivos



La patogenicidad de *A. hydrophila* es multifactorial, incluyendo como determinantes de virulencia el antígeno O, la cápsula, la lámina S, exotoxinas (hemolisinas y enterotoxinas), y un repertorio de exoenzimas que digieren componentes celulares (proteasas, amilasas y lipasas), entre otros. Todos estos factores de patogenicidad están implicados en el proceso secuencial de colonización de un huésped. Por este motivo, con el fin de identificar nuevos putativos factores de virulencia, el primer objetivo fue identificar las diferencias genéticas entre cepas virulentas y avirulentas de *A. hydrophila* mediante la técnica de sustracción génica. Esto permitió detectar una serie de secuencias génicas, entre las cuales, se encontró una pauta de lectura abierta que presentaba similitud con un componente del sistema de secreción de tipo III (Yu *et al.*, 2005).

Estudios previos realizados por Burr y colaboradores en la especie *Aeromonas salmonicida*, habían descrito la presencia de un T3SS funcional, codificado en un plásmido termolábil, así como la translocación del efector AexT mediante este sistema (Burr *et al.*, 2002; Burr *et al.*, 2003; Stuber *et al.*, 2003). Sin embargo, los genes de tipo III secuenciados en esta especie no parecían suficientes para poder conformar un T3SS completo si se comparaban con los previamente descritos en *Yersinia* spp. o *P. aeruginosa*. Este hecho se confirmó en un estudio desarrollado por Chacón y colaboradores, en el que mediante experimentos de *dot blotting* y secuenciación, se demostró la existencia de genes de tipo III adicionales (*ascF-ascG*) a los descritos en *A. salmonicida* (Chacón *et al.*, 2004). Este hecho junto con la creciente importancia de este sistema en cepas patógenas de diferentes géneros bacterianos, nos llevó a plantearnos su estudio en cepas de *Aeromonas* mesófilas. Concretamente, se escogieron las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*. La cepa AH-1 se escogió por pertenecer al serotipo O:11, uno de los serotipos predominantemente asociados con septicemias en estudios clínicos; la cepa AH-3 se escogió por ser de serotipo O:34, frecuentemente asociado con casos de infecciones gastrointestinales (Merino *et al.*, 1993b).

De este modo, en primer lugar nos propusimos clonar y secuenciar los operones que codificaban el T3SS de ambas cepas de *A. hydrophila*, para seguidamente obtener mutantes en algunos de sus genes y poder determinar la implicación de este sistema de secreción en la virulencia de la especie. En relación a lo anterior, y con objeto de poder relacionar el T3SS con la patogenicidad del género, decidimos intentar establecer la prevalencia del T3SS en un grupo de cepas ambientales y clínicas de las especies de

Aeromonas mesófilas más frecuentemente implicadas en infecciones en humanos, *A. veronii*, *A. caviae*, y *A. hydrophila*.

Por otro lado, basándonos en los estudios de Braun y colaboradores (Braun *et al.*, 2002), en los que se había descrito la translocación del efector AexT mediante el T3SS de *A. salmonicida*, proteína que muestra similitud con efectores de tipo III de *P. aeruginosa* (ExoS y ExoT) y *Yersinia* spp. (YopE), nos propusimos determinar la presencia de algún efector similar en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*. La detección de este efector nos llevaría al estudio de su codistribución con T3SS en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas. Además, esto también nos permitiría poder estudiar la inducción del proceso de secreción de este sistema en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*.

Por último, se planteó la posibilidad de estudiar la regulación de la expresión génica tanto del T3SS como del efector AexT en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, así como su posible relación con otros genes implicados en la virulencia de la especie.

2. Material y Métodos



2.1 Cepas bacterianas

Tabla 2.1 Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo o fenotipo relevantes ¹	Procedencia
<i>Aeromonas</i> spp.		
AH-3	<i>Aeromonas hydrophila</i> O:34	Merino <i>et al.</i> , 1988
AH-405	Mutante espontáneo de AH-3 Rif ^r	Nogueras <i>et al.</i> , 2000
AH-3:: <i>ascV</i>	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>ascV</i> , Km ^r	Vilches <i>et al.</i> , 2004
AH-1089	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>aexT</i> , Km ^r	Vilches <i>et al.</i> , 2007
AH-1114	Mutante por delección derivado de AH-405 por doble recombinación del vector pDM4- <i>aopN</i>	Vilches <i>et al.</i> , 2007
AH-1009	Mutante por inserción de casete de kanamicina derivado de AH-405 por doble recombinación del vector pDM4- <i>axsA</i> , Km ^r	Este trabajo
AH-1206	Cepa derivada de AH-405 por recombinación en un punto del vector pCM- <i>promaopNaopD-gfp</i> , Cm ^r	Este trabajo
AH-1199	Cepa derivada de AH-405 por recombinación en un punto del vector pCM- <i>promaexT-gfp</i> , Cm ^r	Este trabajo
AH-3:: <i>phoP</i>	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>phoP</i> , Km ^r	Este trabajo
AH-3:: <i>ahyI</i>	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>ahyI</i> , Km ^r	Este trabajo
AH-3:: <i>ahyR</i>	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>ahyR</i> , Km ^r	Este trabajo
AH-3:: <i>aceA</i>	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>aceA</i> , Km ^r	Este trabajo
AH-3:: <i>dsbA</i>	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>dsbA</i> , Km ^r	Este trabajo
AH-5502	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>rpoN</i> , Km ^r	Canals <i>et al.</i> , 2006b
AH-3:: <i>flrA</i>	Mutante por inserción de casete de kanamicina derivado de AH-405 por doble recombinación del vector pDM4- <i>flrA</i> , Km ^r	Nuestro laboratorio
AH-4443	Mutante por inserción de casete de kanamicina derivado de AH-405 por doble recombinación del vector pDM4- <i>fliA</i> , Km ^r	Canals <i>et al.</i> , 2006a
AH-4442	Mutante por inserción de casete de kanamicina derivado de AH-405 por doble recombinación del vector pDM4- <i>flhA_p</i> , Km ^r	Canals <i>et al.</i> , 2006a
AH-2325	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>flgL</i> , Km ^r	Altarriba <i>et al.</i> , 2003
AH-1726	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>flmB</i> , Km ^r	Gryllos <i>et al.</i> , 2001
AH-3:: <i>lpxM</i>	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>lpxM</i> , Km ^r	Nuestro laboratorio
AH-3:: <i>wzy</i>	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>wzy</i> , Km ^r	Nuestro laboratorio

AH-3:: <i>waaL</i>	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto del vector pSF- <i>waaL</i> , Km ^r	Nuestro laboratorio
AH-1	<i>Aeromonas hydrophila</i> O:11	Merino <i>et al.</i> , 1993b
AH-1C	Mutante espontáneo de AH-1 Col ^r	Yu <i>et al.</i> , 2004
AH-1:: <i>aopB</i>	Mutante derivado de AH-1C por recombinación en un punto del vector pCM- <i>aopB</i> , Cm ^r	Yu <i>et al.</i> , 2004
AH-1:: <i>aopD</i>	Mutante derivado de AH-1C por recombinación en un punto del vector pCM- <i>aopD</i> , Cm ^r	Yu <i>et al.</i> , 2004
PPD134/91 ²	<i>Aeromonas hydrophila</i> O:18	AVA ³ , Singapur
PPD35/85	<i>Aeromonas hydrophila</i> O:7	AVA, Singapur
PPD64/90	<i>Aeromonas hydrophila</i> O:34	AVA, Singapur
ATCC7966 ^T	<i>Aeromonas hydrophila</i> O:1	ATCC ⁴
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>F</i> ⁻ <i>endA hsdR17</i> (<i>r_{k12}⁻ m_{k12}⁺</i>) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 80lacZ</i>	Hanahan, 1983
MC1061λpir	<i>thi thr1 leu6 proA2 his4 argE2 lacY1 galK2 ara14 xyl5 supE44 λpir</i>	Rubires <i>et al.</i> , 1997
XL1-Blue	<i>recA1 lacF^rZΔM15 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Tn10, Tc^r</i>	Stratagene
HB101	<i>pro leu thi lacY endoI recA^r, Str^r</i>	Ditta <i>et al.</i> , 1985
NovaBlue	<i>endA1 hsdR17</i> (<i>r_{k12}⁻ m_{k12}⁺</i>) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F [proA^r B^r lacF^rZΔM15 ::Tn10], Tc^r</i>	Novagen
BL21(DE3)	<i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁺</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PA103	<i>P. aeruginosa</i> O:11	Liu, 1973

¹ Abreviaturas de los antibióticos: Cm, cloranfenicol; Col, colistina; Km, kanamicina; Rif, rifampicina; Str, estreptomycin; Tc, tetraciclina.

² PPD, Departamento de Producción Primaria de Singapur (*Primary Production Department*), en la actualidad, AVA.

³ AVA, Autoridad Veterinaria y del Sector Agroalimentario de Singapur (*Agri-Food and Veterinary Authority*).

⁴ 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 ^r Tc ^r	Allen <i>et al.</i> , 1985
pLA-T3SS4	pLA2917 con parte de la agrupación génica del T3SS de AH-3 (<i>ascU-ascJ</i>), Tc ^r	Vilches <i>et al.</i> , 2004
pLA-T3SS8	pLA2917 con parte de la agrupación génica del T3SS de AH-3 (<i>ascV-ascL</i>), Tc ^r	Vilches <i>et al.</i> , 2004
pLA-AexT	pLA2917 con la región génica donde se sitúan los genes <i>aexT</i> y <i>sycD</i> de AH-3, Tc ^r	Vilches <i>et al.</i> , 2007
pLA-A1T3SS	pLA2917 con la mayor parte de la agrupación génica de T3SS de AH-1 (<i>ascUtruncado-ascL</i>), Tc ^r	Este trabajo
pGEM-T <i>easy</i>	Vector de clonaje, <i>lacZ</i> Amp ^r	Promega

pRK2073	Plásmido derivado de pRK2013 facilitador de la conjugación, <i>Spc^r</i>	Ditta <i>et al.</i> , 1985
pFS100	Plásmido suicida derivado de pGP704, <i>λpir</i> <i>Km^r</i>	Rubires <i>et al.</i> , 1997
pFS- <i>ascV</i>	pFS100 con un fragmento interno del gen <i>ascV</i> de AH-3, <i>Km^r</i>	Vilches <i>et al.</i> , 2004
pFS- <i>aexT</i>	pFS100 con un fragmento interno del gen <i>aexT</i> de AH-3, <i>Km^r</i>	Vilches <i>et al.</i> , 2007
pFS- <i>phoP</i>	pFS100 con un fragmento interno del gen <i>phoP</i> de AH-3, <i>Km^r</i>	Este trabajo
pFS- <i>ahyI</i>	pFS100 con un fragmento interno del gen <i>ahyI</i> de AH-3, <i>Km^r</i>	Este trabajo
pFS- <i>ahyR</i>	pFS100 con un fragmento interno del gen <i>ahyR</i> de AH-3, <i>Km^r</i>	Este trabajo
pFS- <i>aceA</i>	pFS100 con un fragmento interno del gen <i>aceA</i> de AH-3, <i>Km^r</i>	Este trabajo
pFS- <i>dsbA</i>	pFS100 con un fragmento interno del gen <i>dsbA</i> de AH-3, <i>Km^r</i>	Este trabajo
pCM100	Plásmido suicida derivado de pGP704, <i>λpir</i> <i>Cm^r</i>	Yu <i>et al.</i> , 2004
pCM- <i>aopB</i>	pCM100 con un fragmento interno del gen <i>aopB</i> de AH-1, <i>Cm^r</i>	Yu <i>et al.</i> , 2004
pCM- <i>aopD</i>	pCM100 con un fragmento interno del gen <i>aopD</i> de AH-1, <i>Cm^r</i>	Yu <i>et al.</i> , 2004
pCM-proma <i>aopNaopB-gfp</i>	pCM100 con la fusión promotor <i>aopN-aopB</i> de AH-3 y gen <i>gfp</i> , <i>Cm^r</i>	Este trabajo
pCM-proma <i>aexT-gfp</i>	pCM100 con la fusión promotor <i>aexT</i> de AH-3 y gen <i>gfp</i> , <i>Cm^r</i>	Este trabajo
pUC4-KIXX	<i>nptII</i> de Tn-5, <i>Km^r</i>	Pharmacia
pDM4	Plásmido suicida, <i>λpir</i> , genes <i>sacAB</i> , <i>Cm^r</i>	Milton <i>et al.</i> , 1996
pDM4- <i>aopN</i>	pDM4 con el gen <i>aopN</i> de AH-3 deleciónado en pauta, <i>Cm^r</i>	Vilches <i>et al.</i> , 2007
pDM4- <i>axsA:km</i>	pDM4 con el gen <i>axsA</i> de AH-3 disruptado mediante un casete de resistencia a <i>Km</i> , <i>Cm^r</i> <i>Km^r</i>	Este trabajo
pACYC184	Plásmido derivado del vector p15A1, <i>Cm^r</i> <i>Tc^r</i>	Chang <i>et al.</i> , 1978
pACYC- <i>aopN</i>	pACYC184 con la región codificante del gen <i>aopN</i> de AH-3, <i>Cm^r</i>	Vilches <i>et al.</i> , 2007
pET-30 Xa/LIC	Vector de expresión, <i>Km^r</i>	Novagen
pET-30- <i>aexT</i>	pET-30 Xa/LIC con la región codificante del gen <i>aexT</i> de AH-3	Vilches <i>et al.</i> , 2007
pAcGFP1	Vector de expresión, fusión <i>lacZ-agfp1</i> , <i>Amp^r</i>	Clontech
pAcGFP-proma <i>aopNaopB</i>	pAcGFP1 con la región promotora del operón <i>aopN-aopD</i> de AH-3, <i>Amp^r</i>	Este trabajo
pAcGFP-proma <i>aexT</i>	pAcGFP1 con la región promotora del gen <i>aexT</i> de AH-3, <i>Amp^r</i>	Este trabajo

¹ Abreviaturas de los antibióticos: Amp, ampicilina; Cm, cloranfenicol; Km, kanamicina; Spc, espectinomina; Tc, tetraciclina.

2.3 Cebadores

Los cebadores empleados para la amplificación de fragmentos de ADN por PCR se diseñaron utilizando los programas informáticos *GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin)* y *Primer3 (Version 0.3.0, Rozen and Skaletsky, 2000)*, y fueron sintetizados por Amersham Biosciences e Isogen Lifescience.

Tabla 2.3 Cebadores de vectores.

Nombre	5' Composición 3'	Temperatura de hibridación (°C)	Localización
pLA2917			
CSpLA	gactgggcggtttatgg	56	diana <i>Bg/II</i>
RpLA	ccatctgttcaatcatgca	58	diana <i>Bg/II</i>
pGEM-T easy			
SP6	tatttaggtgacactatag	50	Lugar de clonaje del vector
M13 for	tgtaaacgacggccagt	54	Lugar de clonaje del vector
pFS100 / pCM100			
pGPfor	acggatcccaagcttctt	50	diana <i>EcoRI</i>
pGPprev	agggatgtaacgcactgag	50	diana <i>EcoRI</i>
pET Xa/LIC			
T7promoter	taatacgaactactataggg	55	Lugar de clonaje del vector
T7terminator	gctagttattgctcagcgg	55	Lugar de clonaje del vector
pAcGFP1			
pAcGFPprev2	ctcctggatgtagccctca	52	Región codificante del gen <i>gfp</i>

Tabla 2.4 Cebadores provistos en algunos *kits* comerciales utilizados.

Nombre	5' Composición 3'	Temperatura de hibridación (°C)	Localización
GenomeWalker™ kit			
AP1	gtaatacgaactactatagggc	67	Adaptador <i>GenomeWalker™</i>
AP2	actatagggcagcgtggt	67	Adaptador <i>GenomeWalker™</i>
Kit de sustracción génica			
P1	ctaatacgaactactatagggc	66	Adaptadores 1 y 2R
NP1	tcgagcggcccccggcgaggt	68	Adaptador 1

NP2	agcgtggtcgcggccgaggt	68	Adaptador 2R
-----	----------------------	----	--------------

Tabla 2.5 Cebadores de *Aeromonas* spp.

Nombre	5' Composición 3' ¹	Temperatura de hibridación (°C)	Localización
Agrupación génica de T3SS			
<i>Aeromonas hydrophila</i> AH-1			
A1ascUrev	agcgggatgcagagataag	56	<i>ascU</i>
A1ascNfor	gggaagtccgggagtattat	56	<i>ascN</i>
A1aopNfor	agtggaaacgggtgatgag	58	<i>aopN</i>
AscV-F	gtaarcagatgagtatcgatgg	45	<i>ascV</i>
AscV-R	gagacscgggtgacgataat	45	<i>ascV</i>
A1acrRrev	ttctgcacagggtatgcac	58	<i>acrR</i>
A1acrRfor	gccaggttggtttcactc	58	<i>acrR</i>
aopB-F	<u>gtggatctt</u> gatcaattgaggaagacgg	58	<i>aopB</i>
aopD-R	<u>ggagatc</u> gggtaccaatatcaactaccag	58	<i>aopB</i>
A1aopDrev	gacgtggccctatcaactc	58	<i>aopD</i>
A1aopDfor	gaagagtacgggcaagaa	56	<i>aopD</i>
aopD-F	<u>gagatc</u> gattcgagcctgctgagcaa	58	<i>aopD</i>
aopD-R	<u>ggagatc</u> gcacttcattcttcttggcatt	58	<i>aopD</i>
A1hscYrev	tcaggetctcgtcatcaaa	56	<i>hscY</i>
A1hscYfor	actgacagccctcgaagag	58	<i>hscY</i>
A1ascWrev	cgcagctcagataccaatg	58	<i>ascW</i>
A1ascArev	gacgcagaatcgacatcag	58	<i>ascA</i>
A1axsAfor	ggttctccagccagtccta	58	<i>ascA</i>
A1ascDrev	aatcgctaatacgcgaacc	58	<i>ascD</i>
A1ascDfor	ggttcgctattagcgatt	54	<i>ascD</i>
A1ascLrev	gcactgcagttgagtctgg	54	<i>ascL</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> AH-3			
Sec-T	atggcaataagcagcggg	56	<i>ascT</i>
Sec-N2	tatcgaagctgatctgggg	58	<i>ascN</i>
PascNF1	<u>aactgcagg</u> aaataggctgggtgatgc	56	<i>ascN</i>
AopNF5	acat <u>catgc</u> atgtggtcgagggagagg	58	<i>ascN</i>
Sct-W	atgagcgacatgcacaag	59,4	<i>aopN</i>
BaopNA	<u>cgggatcc</u> gaatgccagcgaatagg	56	<i>aopN</i>
aopNB	<u>cccatccactaaact</u> taaacacgggatgcgacctctgc	56	<i>aopN</i>
aopNC	<u>tgtttaagtttagtggatggg</u> caagtagacgagctgtgg	56	<i>aopN</i>
BaopND	<u>cgggatcc</u> acgaagagcagcagctgat	56	<i>aopN</i>
BaopNR5	<u>cgggatcct</u> tgagctcttcggccatc	56	<i>aopN</i>
AopNR5	<u>cgggatcc</u> acagcacagcaacaggttc	58	<i>AcrI</i>

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

Sec-V3	tggtactcaccgataacgc	58	<i>ascV</i>
Sct-V	atggacgggtccatgaagtt	58	<i>ascV</i>
Acr-R	gcaaagggtaccagac	59,4	<i>acrR</i>
Sec-V5	acctgtgacccttgatcc	58	<i>acrR</i>
Aop-D	atctgcctgactatcaccc	58	<i>aopD</i>
Sec-B2	gatgtccttgctgtccag	56	<i>aopD</i>
Exs-C	ttgctgcgctctgtttg	58,2	<i>axsC</i>
Sec-Y	tgcgagactcttcaag	56	<i>axsC</i>
Sec-A2	tctgtgactcatggcctg	58	<i>axsB</i>
A3axsBfor	cagtagtgcaggccatgag	56	<i>axsB</i>
A3axsArev	ccgtacagcccctgaatac	56	<i>axsA</i>
Exs-A	ttcgataacctggcaggac	58,9	<i>axsA</i>
AxsAF1	cacgcagattcagttcag	56	<i>axsA</i>
AxsAR1	gatgcaaagggtgaaggac	56	<i>axsA</i>
Sec-C1	ccgagcgacaaatagtgtg	58	<i>ascC</i>
Sec-C2	gcgctctccatcatcgac	58	<i>ascC</i>
AH3-J1	ccacgtcggattcttcaac	58	<i>ascJ</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>			
ascVF1	atggacggcgccatgaagtt	56	<i>ascV</i>
ascVR1	tattcgccttcaacctccc	56	<i>ascV</i>
Región génica <i>aexT</i>			
<i>Aeromonas hydrophila</i> AH-3			
aexTF8	tcgcctcttgcaacaattc	56	<i>aexT</i>
aexTR8	ccacactgatgcaaccaca	56	<i>aexT</i>
aexTF10	cgctcagttgctcgtaatg	50	<i>aexT</i>
aexTR10	gcagctggctcatcgctc	50	<i>aexT</i>
BaexTF11	<u>cgggatcc</u> cctgtggtgcatcagttg	56	<i>sycE</i>
aexTF12	<u>ggattgagggtcgc</u> atgcagattcaagcaaacac	56	<i>aexT</i>
aexTR12	<u>agaggagagttagagcc</u> acacgcttacagatactgct	56	<i>aexT</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>			
aexT1F	cgtaggcatcaaagagtgg	54	<i>aexT</i>
aexT1R	gcagctggctcatcgctc	54	<i>aexT</i>
Genes <i>phoP/phoQ</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3			
phoP4F	cgacaagctgctcaatcac	56	<i>phoP</i>
phoP4R	tcacctctatggtgtggg	56	<i>phoP</i>
Genes <i>ahyI/ahyR</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3			
ahyIF2	cacgggcaaaacgttcac	56	<i>ahyI</i>
ahyIR1	acgagctttatcgctccg	56	<i>ahyI</i>
ahyRF1	atatgctggcctgtgatcc	56	<i>ahyR</i>
ahyRR3	aacgacctgctccagattg	56	<i>ahyR</i>

Gen <i>aceA</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3			
aceAF1	caagg ¹ catcaacgagctg	58	<i>aceA</i>
aceAR1	cgtgcaggtactt ¹ gtgctc	58	<i>aceA</i>
Gen <i>dsbA</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3			
dsbAF1	gatgatccccatggttcac	58	<i>dsbA</i>
dsbAR1	caccatgtactt ¹ gccgttg	58	<i>dsbA</i>

¹ Las regiones subrayadas corresponden a la zona de complementariedad de ambos cebadores. Las regiones subrayadas y en cursiva corresponden a dianas para enzimas de restricción: G¹GATCC (*Bam*HI), GAT¹ATC (*Eco*RV), C¹TGCAG (*Pst*I), G¹CATGC (*Sph*I). Las regiones encuadradas corresponden a zonas compatibles con los extremos del vector de expresión pET-30 Xa/LIC (apartado 2.6.5.1).

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. Además, los cultivos en medios líquidos se realizaron en agitación a 200 rpm.

Tabla 2.6 Composición de los medios de cultivo.

Medios de cultivo
LB (Scharlau Microbiology)
10 g peptona triptica de caseína, 5 g extracto de levadura, 10 g cloruro sódico, por litro.
Más 15 g de agar (Pronadisa) por litro para LB agar .
TSB (Pronadisa)
10 g peptona de caseína, 3 g peptona de soja, 5 g cloruro sódico, 2,5 g fosfato monopotásico, 2,5 g dextrosa.
Más 15g de agar por litro para TSA (Pronadisa).

2.4.2 Suplementos

Cuando fue necesario, se añadieron diferentes suplementos a los medios de cultivo mencionados. Como antibióticos se utilizaron: ampicilina (sal sódica, USB), 100 µg/ml; cloranfenicol (USB), 10-25 µg/ml; colistina (sulfato, AppliChem), 10 µg/ml; espectinomicina (diclorhidrato 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; ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA, AppliChem); cloruro de magnesio (Merck); sacarosa (BDH Anala®).

2.5 Técnicas de genética molecular

2.5.1 Aislamiento de ADN genómico

Para el aislamiento de ADN genómico se utilizaron dos métodos en función de la cantidad y la pureza requeridas. La obtención de gran cantidad de ADN genómico se realizó siguiendo el método descrito por Marmur (Marmur, 1961). Para la obtención de material de mayor pureza se utilizó el *kit* de Invitrogen para aislamiento de ADN total (*Easy-DNA kit, Genomic DNA Isolation*).

2.5.2 Aislamiento de ADN plasmídico

Para el aislamiento de ADN plasmídico se emplearon diferentes métodos según el número de copias del plásmido, la cepa portadora de dicho plásmido y la pureza requerida para los procedimientos posteriores. De este modo, la obtención de plásmidos de bajo número de copias se llevó a cabo según el método basado en la lisis alcalina de Birnboim (Birnboim, 1979) descrito por Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982) y modificado por Martínez y de la Cruz (1988). Para realizar extracciones de mayor pureza se utilizaron columnas de purificación de ADN plasmídico *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare) en el caso de plásmidos de medio a alto número de copias y *Qiagen Plasmid Midi-Prep Preparations* (Qiagen) para plásmidos de bajo número de copias o bien cuando se requería gran cantidad de plásmido. En ambos casos se siguieron las recomendaciones de la casa comercial.

2.5.3 Aislamiento de ARN

Para el aislamiento de ARN total se utilizó el *kit* de Qiagen *RNeasy® Protect Mini kit* y se siguió el protocolo indicado por la casa comercial.

El ARN obtenido se trató con *RNasa free DNasaI* (Invitrogen) 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.

2.5.4 Purificación de ADN mediante extracción fenólica

La fenolización del ADN permite extraer las proteínas que contaminan las preparaciones de ADN. Este método se utilizó cuando el ADN genómico se obtuvo por el método de Marmur o bien al obtener ADN plasmídico mediante lisis alcalina. Para ello, la muestra de ADN se resuspendió en tampón TE 1x y se añadió un volumen igual de una solución de fenol equilibrado a pH 7,9 (USB). Después de agitar suavemente para obtener un emulsionado, se centrifugó a 13000 x g durante 3 minutos para separar las dos fases. Se recogió la fase acuosa (superior) y se le adicionó un volumen igual de una mezcla 1:1 fenol:cloroformo (cloroformo:isoamilalcohol 24:1), se agitó y se centrifugó de igual manera que en el paso anterior. Finalmente, a la fase acuosa obtenida se le añadió un volumen de cloroformo (cloroformo:isoamilalcohol 24:1) y se repitió el mismo proceso de agitación y centrifugación. Una vez recuperada la última fase acuosa, se precipitó el ADN.

Tabla 2.7 Composición del tampón TE.

Tampón TE 1x
10 mM Tris-HCl pH 8 (AppliChem)
1mM EDTA ¹ pH 8 (Merck)

¹ EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

2.5.5 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.).

2.5.6 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 los cubetas de electroforesis fue TAE 1x. Para visualizar el ADN, se añadió bromuro de etidio (Amersham Biosciences) 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[®] VDS* de Pharmacia Biotech).

Tabla 2.8 Soluciones para la electroforesis de ADN.

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

2.5.7 Cuantificación del ADN

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

2.5.7.1 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.

2.5.7.2 Cuantificación espectrofotométrica

Cuando fue necesaria una cuantificación más precisa, se utilizó un espectrofotómetro, modelo *GeneQuant pro* de Amersham Biosciences, para realizar las medidas de absorbancia a 260 y 280 nm. La relación entre los valores resultantes de las lecturas a estas longitudes de onda da una idea de la pureza de la muestra de ADN:

- Si $DO_{260}/DO_{280} < 1,8$, indica que hay impurezas en la muestra y que la cuantificación no es precisa
- Si $DO_{260}/DO_{280} \geq 1,8$, indica que la muestra de ADN es pura y permite calcular la concentración, teniendo en cuenta que:

$$1 \text{ Unidad de } DO_{260} = 50 \mu\text{g ADN} / \text{ml}$$

2.5.8 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 el *kit Qiaex* (Qiagen), según recomendaciones del fabricante.

2.5.9 Reacciones enzimáticas con el ADN

2.5.9.1 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.

2.5.9.2 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.

2.5.9.3 Desfosforilación 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).

2.5.9.4 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*TM 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).

2.5.10 Construcción de una librería genómica

Se realizó una digestión parcial del ADN cromosómico de *A. hydrophila* AH-3 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 *BglII*. 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 *BglII* y desfosforilado. Posteriormente, se llevó a cabo el empaquetamiento

in vitro en el fago λ y la infección de la cepa *E. coli* DH5 α según el protocolo del *kit* de empaquetamiento (*Gigapack III Gold Packaging Extract* de Stratagene).

2.5.11 Sustracción génica

Para llevar a cabo los experimentos de sustracción génica, se utilizó el *kit* *PCR-SelectTM Bacterial Genome Subtraction* de Clontech, basado en el método de la hibridación supresiva-sustractiva (Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996). Este método permite detectar secuencias que están presentes en un genoma bacteriano y ausentes en otro. Aunque existen diferentes variaciones de este método, la teoría básica es la misma: el ADN genómico que contiene las secuencias de interés, *Tester*, y la muestra de referencia, *Driver*, se hibridan, generando una población heterogénea de moléculas de ADN, tanto monocadena como bicadena. Los fragmentos del ADN *tester* que no hibridan, contienen genes potencialmente presentes en el *tester* y no en el *driver*.

Los experimentos de sustracción génica se realizaron según las indicaciones de la casa comercial (figura 2.1). Brevemente, primero se realizó el aislamiento de ADN genómico de las dos cepas bacterianas a analizar. Seguidamente, se digirió con una enzima de restricción que generase extremos romos. Tras fenolizar y precipitar las muestras, el ADN *tester* se dividió en dos porciones, y cada una se ligó a uno de los dos adaptadores diferentes provistos por la casa comercial (1 y 2R respectivamente). Estos adaptadores presentan extremos 5' desfosforilados, por lo que sólo una cadena de cada adaptador se une al extremo 5' del ADN. A partir de aquí, se realizaron dos hibridaciones. En la primera, se añadió un exceso de *driver* a cada una de las ligaciones adaptador-*tester*, se desnaturalizaron por calor y se dejaron renaturalizar, generando de este modo 4 tipos de moléculas (figura 2.1): monocadenas *tester* (a), bicadenas *tester* (b), bicadenas *tester-driver* (c), monocadenas y bicadenas *driver* (d). Durante la segunda hibridación, las dos reacciones de hibridación anteriores se mezclaron sin desnaturalizarse, con el fin de que las monocadenas *tester* (tipo a) se reasociaran y formaran nuevos híbridos: bicadenas de secuencias únicas del *tester* con extremos diferentes, que corresponden a las secuencias de los adaptadores 1 y 2R (e). Nuevamente, se añadió ADN *driver* desnaturalizado, y sin desnaturalizar la mezcla de sustracción, para enriquecer la fracción de moléculas e.

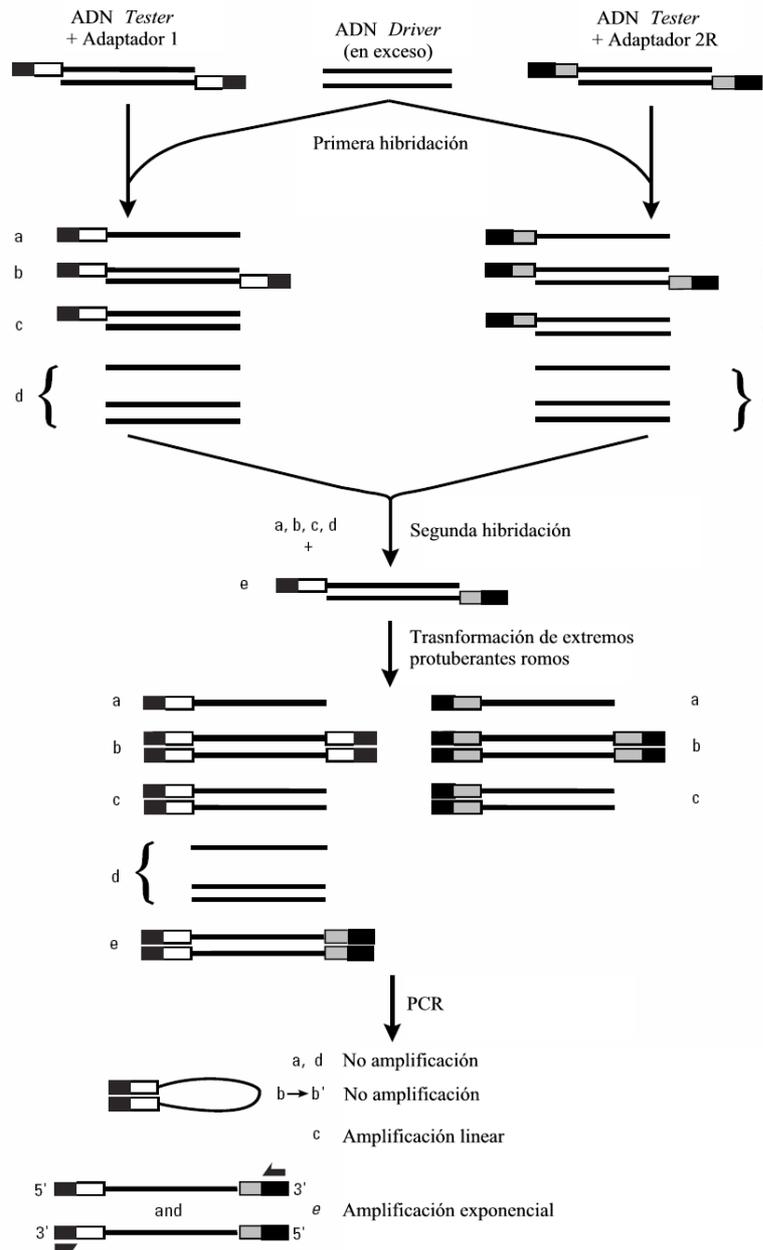


Figura 2.1 Esquema del protocolo de sustracción génica. Figura adaptada del manual *PCR-Select™ Bacterial Genome S*

Una vez obtenida la fracción de moléculas de tipo *e*, la población total de moléculas se utilizó como molde para una PCR con un solo tipo de cebador, P1, específico de una región de ambos adaptadores. Seguidamente, se realizó una PCR anidada a partir de la primera reacción de PCR, en la que se utilizaron dos nuevos cebadores, esta vez específicos de cada adaptador (NP1 del adaptador 1 y NP2R del adaptador 2R), ambos de localización interna respecto a la situación del cebador P1. Para la realización de estas amplificaciones se utilizó la ADN polimerasa *Advantage polymerase 2* de

Clontech, siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial para la obtención de la mezcla de reacción. Las condiciones de amplificación se detallan en la tabla 2.9.

Tabla 2.9 Condiciones de amplificación para la sustracción génica.

Programa de amplificación
Transformación de los extremos 5' protuberantes de los adaptadores en romos y generación del lugar de unión del cebador AP1 1 ciclo - 2 minutos a 72°C
PCR 1 (cebador P1) 25 ciclos - 30 segundos a 94°C - 30 segundos a 66°C - 90 segundos a 68°C
PCR anidada (cebadores NP1 y NP2R) 15 ciclos - 30 segundos a 94°C - 2 minutos a 68°C

Finalmente, las bandas de amplificación obtenidas se ligaron al vector pGEM-T *easy*, generándose una librería genética de sustracción, que se analizó mediante secuenciación.

2.5.12 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.

2.5.12.1 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 (129Ω)
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.

2.5.12.2 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.

2.5.13 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.

2.5.13.1 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

dietilpircarbonato (DEPC) de Gibco. Como molde, se utilizó tanto ADN purificado (apartados 2.5.1 y 2.5.2) como colonias lisadas mediante el *kit* de lisis *Colony Fast-ScreenTM 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 ¹ MgCl ₂	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 ²
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

¹ La concentración de MgCl₂ se optimizó en algunas ocasiones.

² 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 *AccuPrimeTM Taq* ADN polimerasa *High Fidelity* de Invitrogen y las siguientes condiciones:

Tabla 2.12 Condiciones de amplificación con *AccuPrimeTM 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>AccuPrimeTM</i> ¹	- 2 minutos a 94°C
0,5 µM cebador (cada uno)	35 ciclos
1 U <i>AccuPrimeTM Taq High Fidelity</i>	- 30 segundos a 94°C
Agua desionizada DEPC hasta 50 µl	- 30 segundos a Tm ²
	- 1 minuto / kb de ADN a amplificar a 68°C

¹ El tampón I *AccuPrimeTM* 10x lleva incorporado MgSO₄ 20 mM, quedando la concentración final a 2 mM. En caso de tener que optimizar la cantidad de MgSO₄, el *kit* presenta una solución a 50mM.

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

2.5.13.2 Amplificación de fragmentos de ADN mediante *Genome walking*

Con el fin de secuenciar regiones génicas desconocidas sin necesidad de su clonaje, se utilizó el *kit GenomeWalker™ Universal* (Clontech) siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial. Esta técnica permite localizar regiones de ADN adyacentes a una secuencia conocida (figura 2.2).

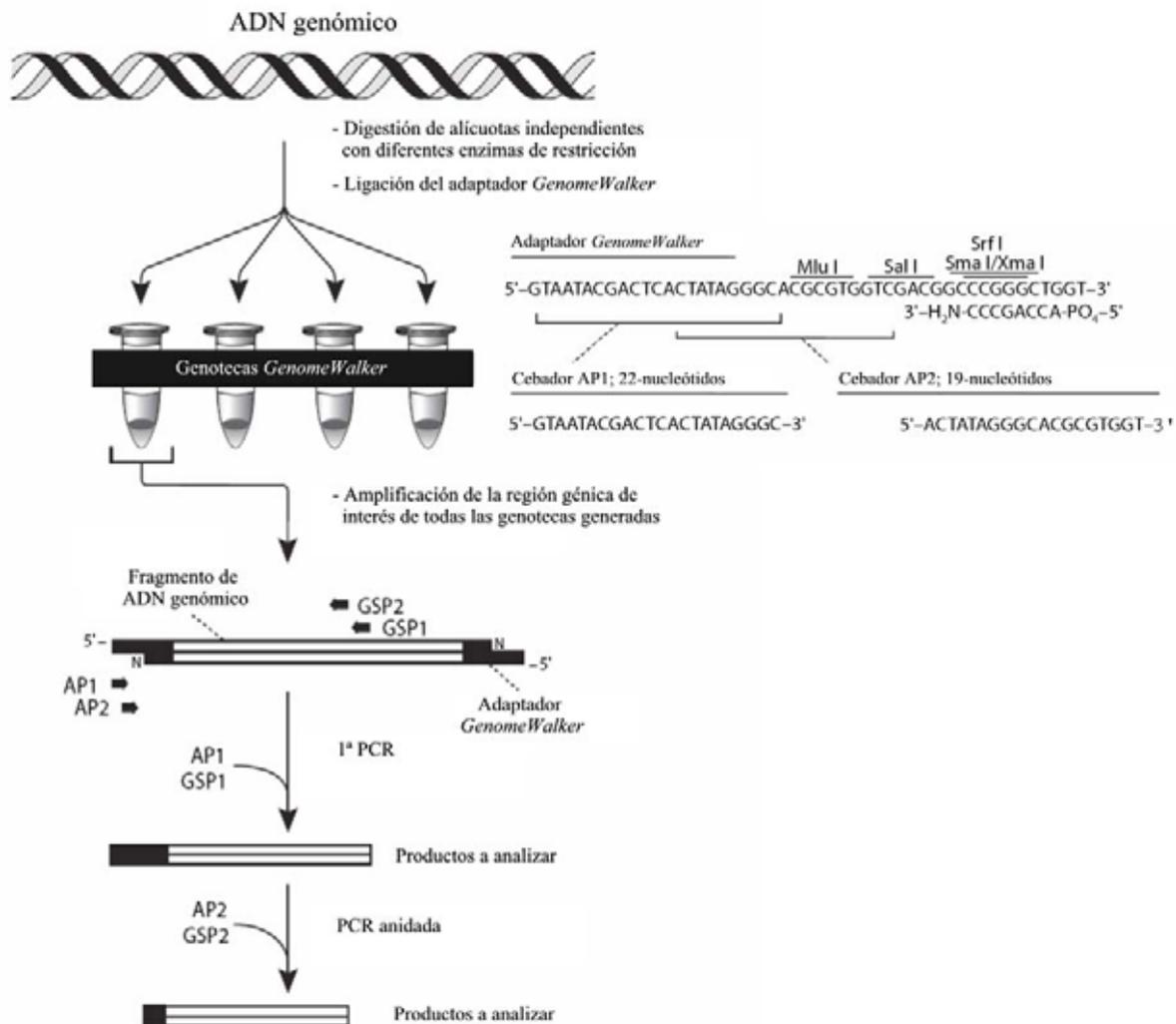


Figura 2.2 Esquema del protocolo *GenomeWalker™*. Figura adaptada del manual *GenomeWalker™ Universal kit* (Clontech).

Brevemente, en primer lugar se realiza el aislamiento de ADN genómico y su digestión con enzimas de restricción que generan extremos romos. En concreto, en este estudio se utilizaron las enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *ScaI* y *StuI*. Tras la fenolización y la precipitación del ADN, se procede a la ligación de los fragmentos generados en cada una de las digestiones de manera independiente con el adaptador *GenomeWalker™*,

generando las denominadas genotecas *GenomeWalkerTM*. Una vez obtenidas las genotecas *GenomeWalkerTM*, generalmente se llevan a cabo dos amplificaciones por cada una de ellas, utilizando cebadores específicos de los adaptadores y de la región génica de estudio respectivamente (figura 2.2). La primera PCR se realiza utilizando el cebador AP1 (del inglés *Adaptor Primer*), provisto en el *kit* y localizado en el adaptador, y un cebador específico de la región de ADN a estudiar, GSP1 (del inglés *Gene-Specific Primer*). Si no se obtienen bandas específicas de alta intensidad que poder analizar, se realiza una PCR anidada a partir de la primera reacción de PCR, en la que se utiliza un segundo cebador de localización en el adaptador *GenomeWalkerTM*, AP2, y otro cebador específico de la región génica de estudio, GSP2, ambos de localización interna respecto a la situación de los primeros cebadores utilizados. Para la realización de estas amplificaciones se utilizó la ADN polimerasa *Advantage polymerase 2* de Clontech, siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial para la obtención de la mezcla de reacción. Las condiciones de amplificación se detallan en la tabla 2.13.

Finalmente, las bandas de amplificación obtenidas se analizan mediante secuenciación, bien directa o bien previa ligación al vector pGEM-T *easy*.

Tabla 2.13 Condiciones de amplificación para *GenomeWalking*.

Programa de amplificación
7 ciclos
- 15 segundos a 94°C
- 4 minutos a 72°C
32 ciclos
- 15 segundos a 94°C
- 3 minutos a 67°C ¹
1 ciclo
- 10 minutos a 67°C

¹ Se recomienda una temperatura de hibridación/extensión de 67°C y, para ello, el diseño de cebadores GSP de 26-30 nucleótidos de longitud y contenido de G+C de 40-60%

2.5.13.3 Transcripción reversa (RT-PCR)

Para la realización de RT-PCR se utilizó ARN tratado con *DNasa I RNasa free* (Invitrogen) y se siguió exactamente el protocolo indicado en el *kit Thermoscript RT-PCR system* de Invitrogen.

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se utilizaron las mezclas de reacción y programas de temperaturas que se detallan en la tabla 2.14.

Tabla 2.14 Síntesis del ADNc.

Composición de la mezcla de reacción	Programación del termociclador
0,3 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 ¹	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)

¹DTT, ditioneitol.

Una décima parte del ADNc sintetizado se amplificó empleando la polimerasa termoestable *AccuPrimeTM Taq* ADN polimerasa *High Fidelity* de Invitrogen. Para condiciones de amplificación, tabla 2.12.

2.5.14 Secuenciación de fragmentos de ADN

Tabla 2.15 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> ¹	1 ciclo
	- 4 minutos a 96°C
25-500 ng de ADN molde	25 ciclos
	- 30 segundos a 96°C
3,2 pmol de cebador	- 15 segundos a T _m ²
Agua desionizada hasta 10 µl	- 4 minutos a 60°C

¹ Contiene ADN polimerasa termoestable, tampón, mezcla de dNTP y ddNTP.

² 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 CEQTM 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 2.15.

2.5.15 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, 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), para la predicción de regiones transmembrana se utilizó el programa *TMpred* y la base de datos TMbase (Hofmann and Stoffel, 1993), y para la predicción de la localización subcelular el programa *PSORTb v. 2.0* (Gardy *et al.*, 2005).

Número de acceso a las secuencias nucleotídicas. Las secuencias nucleotídicas referidas en este trabajo pueden encontrarse en *GenBank* bajo los números de acceso: AY394563, AY528667, AF288366.

2.5.16 Detección de fragmentos de ADN

2.5.16.1 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.

2.5.16.2 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 desnaturizante, 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 2.25).

Tabla 2.16 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			

2.5.16.3 *Dlot 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⁺ (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.

2.5.16.4 *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 µm de poro, Hybond-N⁺ (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 2.17 Composición del tampón TBE.

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

2.5.17 Técnicas de mutagénesis

2.5.17.1 Mutagénesis dirigida mediante recombinación en un punto

La obtención de mutantes por recombinación en un punto se realizó utilizando los vectores suicida pFS100 (Km^r) o pCM100 (Cm^r), según el protocolo descrito por Rubires (Rubires *et al.*, 1997) (figura 2.3). Este método se basa en clonar un fragmento interno de la región codificante del gen a mutar en el vector suicida, cuya replicación

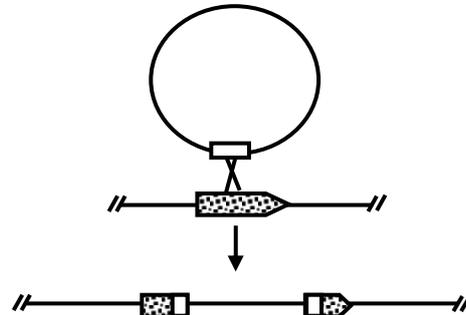


Fig. 2.3 Esquema del funcionamiento del sistema de recombinación en un punto.

depende de la proteína λ pir. Posteriormente, se transforma la construcción en la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir), la cual se utilizará para transferir el plásmido mediante conjugación a la cepa a mutar (apartado 2.5.12.2). 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 λ 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.

2.5.17.2 Mutagénesis dirigida mediante doble recombinación

Para generar mutaciones pero minimizando los posibles efectos polares que la mutación pudiera provocar en la expresión del resto de los genes de un mismo operón, se realizó mutagénesis dirigida mediante doble recombinación empleando dos sistemas diferentes: (i) la inserción de un determinante de resistencia a kanamicina (Km), cuyo promotor permitiera la expresión del resto de genes del operón, y (ii) la delección de un fragmento interno del gen a mutar que mantuviera la pauta de lectura.

2.5.17.2.1 Inserción de un determinante de resistencia a Km

Esta mutagénesis se basa en la inserción de un determinante de resistencia a Km, derivado del transposón Tn5 y extraído del vector pUC4-KIXX, en el gen a mutar. El

casete contiene un promotor que asegura la expresión de los genes situados en posición posterior al gen truncado cuando se inserta en la orientación correcta.

Brevemente, en primer lugar se obtiene el determinante de resistencia mediante su digestión con una enzima de restricción. Seguidamente, se procede a la inserción de dicho determinante en la región codificante del gen a mutar, asegurando que ambos poseen la misma dirección de transcripción. Estas construcciones se clonan en el vector suicida pDM4, y se transforman mediante electroporación a *E. coli* MC1061 (λ pir), seleccionando los transformantes por su resistencia a cloranfenicol (Cm), determinante de resistencia del vector, y Km, determinante insertado en la región

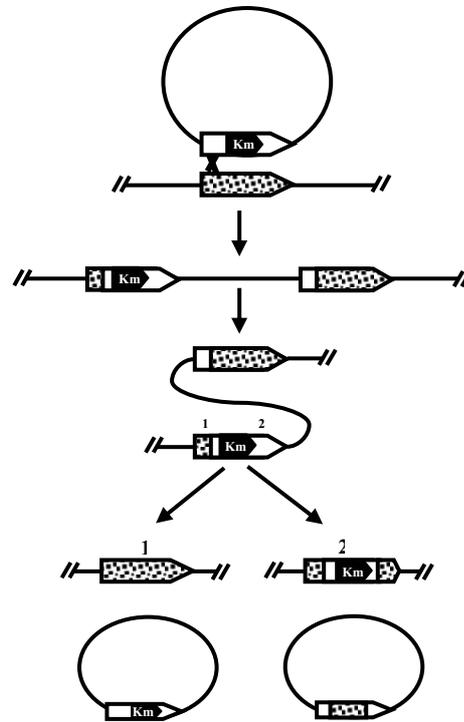


Figura 2.4 Esquema de la estrategia de mutagénesis mediante la inserción de un casete de resistencia a un antibiótico por doble recombinación.

codificante del gen a mutar. Posteriormente, los plásmidos recombinantes contenidos en *E. coli* MC1061 (λ pir) se transfieren mediante conjugación triparental a la cepa a mutar. Los transconjugantes se seleccionan por la resistencia específica de la cepa a mutar y las resistencias a Cm y Km. Dado que el plásmido no puede replicarse en cepas que carecen de la proteína λ pir, las colonias resistentes poseen integrado por recombinación homóloga en el gen a mutar dicho plásmido, presentando dos copias completas del gen, conteniendo una de ellas el determinante de resistencia a Km insertado. Finalmente, los transconjugantes seleccionados se hacen crecer en placas de TSA suplementadas con sacarosa 5-10%. Dado que el vector pDM4 contiene el gen *sacB*, letal para la bacteria cuando ésta crece en sacarosa, las células capaces de crecer en presencia de este disacárido, lo serán gracias a una segunda recombinación que permita la escisión del plásmido. Tras esta segunda recombinación, en el cromosoma bacteriano queda una única copia del gen que, gracias a la selección con Km en los crecimientos con sacarosa, en la mayoría de casos, es la que presenta insertado el casete de resistencia a este antibiótico. Los mutantes por inserción se confirman mediante PCR.

2.5.17.2.2 Delección en pauta de un fragmento interno del gen a mutar

Para este tipo de mutagénesis, se utilizó el sistema descrito por Milton y colaboradores (Milton *et al.*, 1996), que se basa en la generación de fragmentos delecionados en pauta del gen a mutar mediante la superposición de dos PCR. Esto requiere la amplificación de dos fragmentos que flanqueen la región a deleccionar, y que cada una de ellos contenga en el extremo adyacente a dicha región extremos complementarios, lo que se consigue con el diseño de cebadores específicos con extremos 5' complementarios.

En primer lugar, se diseñaron dos parejas de cebadores para sintetizar *in vitro* una copia delecionada del gen a mutar, que mantuviera la pauta de lectura. 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 este (figura 2.5). Además, los cebadores B y C fueron diseñados de

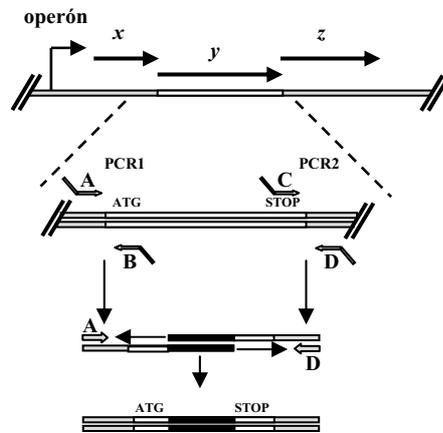


Figura 2.5 Diseño de construcciones delecionadas en pauta.

manera que en su extremo 5' presentaran 21-pb de secuencias complementarias carentes de señales de terminación. Se realizaron dos reacciones de PCR independientes con los cebadores A-B y C-D, respectivamente. Los productos amplificados fueron utilizados como molde en una tercera reacción de amplificación con los cebadores A y D. Seguidamente, esta construcción se clonaba en el plásmido pDM4 y se introducía en la cepa a mutar siguiendo el procedimiento indicado en el apartado anterior. Sin embargo, en este caso, después de la primera recombinación, se genera una copia delecionada del gen a mutar y una copia correcta; y tras la segunda recombinación, en el cromosoma bacteriano queda una única copia del gen. La delección generada se confirmó mediante PCR.

2.5.18 Estudio de la expresión génica mediante el uso del gen *reporter* *gfp*

Los sistemas de genes *reporter* representan una herramienta de gran utilidad para el estudio de la regulación de secuencias promotoras y de factores de transcripción. Las

secuencias reguladoras de interés se combinan con la construcción *reporter* requerida para proceder seguidamente a los ensayos de expresión. Si el sistema escogido es el adecuado, el nivel de expresión del gen *reporter* estará correlacionado con la actividad transcripcional (siempre y cuando no existan alteraciones del metabolismo de las células transformadas).

En este estudio, se utiliza como *reporter* el gen *acgfp1*, derivado del gen *gfp* (del inglés *Green Fluorescence Protein*) de la medusa *Aequorea coerulea*. La proteína GFP emite fluorescencia verde sin necesidad de ningún cofactor o de la actividad de una enzima, haciendo posible el estudio de la expresión génica *in vivo*. Por otro lado, una vez obtenidas las fusiones promotor de estudio-*gfp*, se integraron en el genoma bacteriano, mediante el sistema de recombinación en un punto utilizando el vector suicida pCM100 (apartado 2.5.17.1), para poder estudiar la expresión del gen de interés en una dosis similar a la existente en la cepa salvaje.

Brevemente, en primer lugar se procedió a la amplificación de la región promotora del gen a estudiar, incluyendo el sitio de unión a ribosoma (RBS, *Ribosome Binding Site*) y los primeros codones del gen. Los cebadores diseñados para dicha amplificación permitían establecer una fusión traduccional entre los primeros codones del gen de estudio y el gen *acgfp1*. El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM-T *easy*, se secuenció para corroborar la ausencia de errores de síntesis, y se subclonó en el vector pAcGFP1, generando entonces la fusión traduccional entre los primeros codones del gen cuyo promotor era analizado y el gen *acgfp1*. A continuación, la fusión promotor de estudio-*gfp* se clonó en el vector suicida pCM100 y se transformó en la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir), la cual se utilizó para transferir el plásmido mediante conjugación a la cepa a mutar (apartado 2.5.12.2). Dado que el plásmido no puede replicarse en ausencia de la proteína λ pir, las colonias resistentes al marcador del vector (Cm^{R}), presentan, en su mayoría, el plásmido integrado mediante recombinación homóloga. La recombinación en un punto genera la integración de la construcción promotor de estudio-*gfp* en el genoma bacteriano, manteniendo otra copia del promotor bajo la que se transcriben los genes propios tal y como sucede en la cepa salvaje.

Una vez obtenidas las cepas recombinantes, se procedió al estudio de la expresión de los promotores seleccionados. Para ello, se obtuvieron 5 ml de crecimiento en determinadas condiciones de cultivo para cada cepa, que se concentraron mediante centrifugación a

3500 rpm durante 10 minutos, realizando seguidamente dos lavados con PBS 1X (tabla 2.18), y se resuspendieron finalmente en 1 ml del mismo tampón. Tras igualar las medidas de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, se depositaron 200 µl de cada cepa en multiplacas de 96 pocillos de 0,35 ml de fondo plano (Iwaki). Las medidas de fluorescencia se realizaron mediante un espectrofluorímetro *Microplate Fluorescence Reader FL600* de BioTek, utilizando 475 nm de longitud de onda para la excitación, y 505 nm de longitud de onda para la detección de la emisión. Los datos se expresan en unidades de fluorescencia relativa (UFR), que se define como la fluorescencia del cultivo en relación a la DO_{600} en un momento dado.

2.6 Técnicas experimentales con proteínas

2.6.1 Obtención de proteínas bacterianas

2.6.1.1 Proteína celular total

Las proteínas celulares totales se obtuvieron a partir de crecimientos en fase estacionaria. 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 2.6.3). 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 2.18 Composición del tampón PBS.

Tampón PBS 1x
137 mM NaCl (Panreac)
1,4 mM KH_2PO_4 (Merck)
4,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (Merck)
2,7 mM KCl_2 (Merck)
Ajustar a pH 7,2

2.6.1.2 Proteína de membrana externa

La extracción de proteínas de membrana externa se llevó a cabo mediante el método de Filip *et al.*, 1973, basado en la solubilización de las membranas citoplasmáticas en presencia del detergente iónico lauril sarcosinato sódico (SLS).

Para ello, se obtuvieron crecimientos en fase estacionaria de las cepas a estudiar, que fueron lavados con Tris-Mg pH 7,3. Posteriormente, fueron lisados mediante sonicación de las muestras durante 4 intervalos de 1 minuto, y las células no lisadas fueron eliminadas mediante centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos. Las células lisadas, contenidas en el sobrenadante, fueron sometidas a un proceso de centrifugación a 10000 x g durante 30 minutos. Este paso permitió precipitar las membranas totales, que fueron resuspendidas en una mezcla a partes iguales de SLS 1,2% y Tris-Mg pH 7,3, e incubadas 20 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de solubilizar las proteínas de membrana citoplasmática. Seguidamente se centrifugaron a 10000 x g durante 30 minutos para obtener un precipitado que contenía las membranas externas y un sobrenadante que contenía las membranas internas. Finalmente, las membranas externas se resuspendieron en Tris-Mg pH 7,3 y se conservaron a -20 °C para su posterior análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 2.6.3).

Tabla 2.19 Composición Tris-Magnesio.

Tris-Mg
10 mM Tris (AppliChem)
5 mM MgCl ₂ ·6 H ₂ O (Merck)
Ajustar a pH 7,3

2.6.1.3 Proteína de membrana interna

La extracción de proteínas de membrana interna se realizó nuevamente en base al método de Filip *et al.*, 1973, tal y como se detalla en el apartado anterior, pero en este caso, tras la solubilización de las membranas internas con SLS y la posterior centrifugación, la fracción de interés fue el sobrenadante, que contenía las proteínas de membrana interna. Las muestras se conservaron a -20°C para su posterior análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 2.6.3).

2.6.1.4 Proteína de extractos crudos

Una vez más, se siguió el protocolo descrito en los dos apartados anteriores, pero, en este caso, tras la centrifugación de las células sonicadas, se recogió el sobrenadante. Las muestras se conservaron a -20°C para su posterior análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 2.6.3).

2.6.1.5 Proteína periplásmica

La obtención de proteínas periplásmicas se realizó en base al procedimiento de choque osmótico para la liberación del fluido periplásmico descrito por Koshland (Koshland and Botstein, 1980) con ligeras modificaciones.

Para ello, se partió de crecimientos de 1 ml en fase estacionaria, a los que se añadió 20 µl de Tris 1M pH 7,3 (AppliChem) y 20 µl NaCl 1M (Panreac), incubándose 10 minutos a 37°C en agitación. A continuación, se procedió a su centrifugación a 12000 rpm durante 2 minutos y, seguidamente, el precipitado (células) fue resuspendido en 50 µl Tris 33 mM y 50 µl de solución A, e incubado en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos, y el precipitado obtenido se resuspendió en 50 µl de agua desionizada a 4°C, que se mantuvo en agitación durante 45 segundos, tras los cuales se añadió 2 µl de MgSO₄ 1M (Merck) para continuar su agitación durante 15 segundos más. Finalmente se incubó a 0°C durante 10 minutos y se procedió a su centrifugación a 4°C durante 15 minutos para obtener la proteína periplásmica localizada en el sobrenadante, que fue conservado a -80°C. El análisis de las muestras se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 2.6.3).

Tabla 2.20 Composición solución A.

Solución A (obtención proteínas periplásmicas)
40% Sacarosa (BDH Anala®)
33 mM Tris pH 7,3 (AppliChem)
4 mM EDTA (Merck)

2.6.1.6 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 μm de diámetro de poro (Iwaki). A partir de aquí, se siguió uno de los siguientes métodos:

- Utilización del dispositivo de Millipore Amicon® Ultra-15 5k NMWL (del inglés *Nominal Molecular Weight Limit*), siguiendo el procedimiento indicado por la casa comercial. Las muestras se conservaron a -20°C para su posterior análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 2.6.3).
- Precipitación 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 resuspendió en tampón PBS 1x (tabla 2.18).

2.6.2 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 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_{595} 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.

2.6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida

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 2.6.2), 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 *BenchmarkTM 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 2.6.4). Todas las soluciones utilizadas se especifican a continuación.

Tabla 2.21 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 2.22 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)	

2.6.4 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana (*Western blotting*)

2.6.4.1 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 μ M 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 2.23 Composición del tampón de transferencia.

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

2.6.4.2 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 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 µl de solución 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y 44 µl 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 2.24 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 2.25 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 ₂ (Merck)			

2.6.5 Obtención de proteínas recombinantes

Para el clonaje, expresión, detección y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli* se utilizó el sistema de expresión pET de Novagen. Este sistema permite el clonaje de insertos bajo el control de la maquinaria de transcripción del bacteriófago T7 y, opcionalmente, bajo el control de señales de traducción. La expresión de la proteína de interés se produce gracias a la presencia de la T7 ARN polimerasa en las células hospedadoras. La T7 ARN polimerasa es tan activa y selectiva que la proteína recombinante puede llegar a suponer más del 50% de la proteína celular total. Además, los vectores pET permiten la expresión de proteínas recombinantes unidas a colas de 6

histidinas (His-Tag) en uno o ambos de sus extremos, que sirven como secuencias de purificación, mediante afinidad por el níquel, e inmunodetección específicas.

2.6.5.1 Clonaje de la región codificante de la proteína de interés

Concretamente, en este estudio se utilizó el vector pET-30 Xa/LIC. El método LIC (*Ligation-Independent Cloning*) permite el clonaje de insertos sin necesidad de realizar una reacción de ligación, gracias a la presencia de extremos 5' protuberantes de secuencia específica en el vector. El factor Xa permite la eliminación de secuencias N-terminales que no son propias de la proteína producida, como por ejemplo la His-Tag.

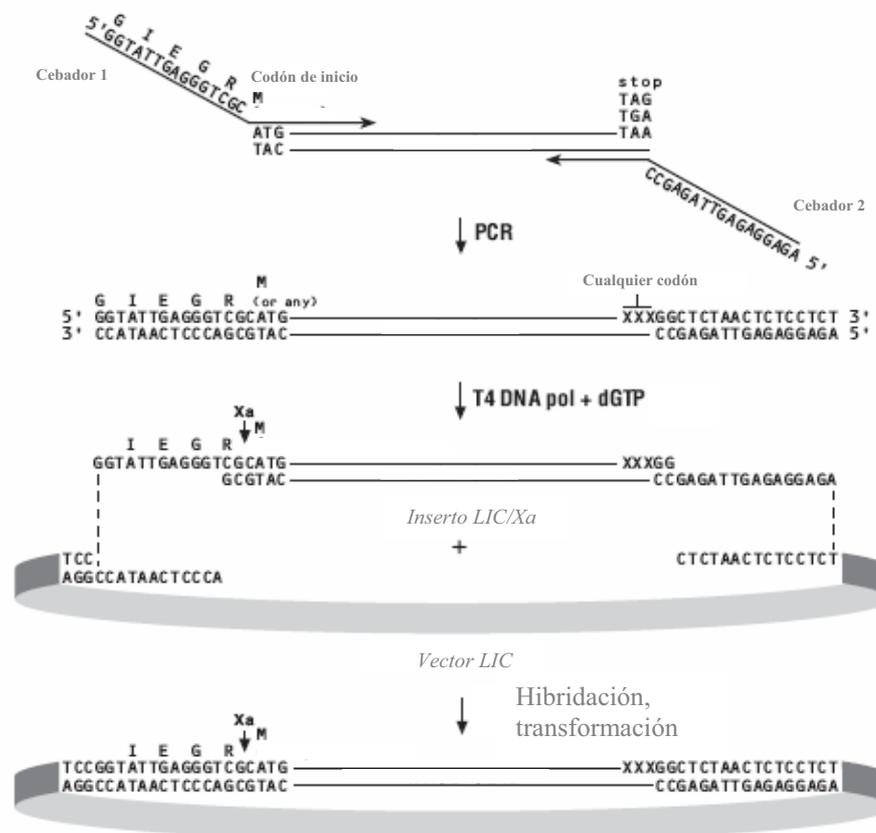


Figura 2.6 Esquema de la estrategia de clonaje con el vector pET-30 Xa/LIC.

Brevemente, en primer lugar se diseñan cebadores específicos para amplificar en pauta desde el codón de inicio la región codificante del gen de interés, a los que se les añade una secuencia en su extremo 5' complementaria a la secuencia específica de los extremos 5' protuberantes del vector pET-30 Xa/LIC (figura 2.6). Tras la amplificación con *AccuPrimeTM Taq* ADN polimerasa *High Fidelity* de Invitrogen (posee actividad correctora de errores exo 3'→5'), y con la finalidad de generar extremos 5'

protuberantes compatibles con los del vector, se realiza el tratamiento del inserto con la enzima T4 ADN polimerasa y dGTP, siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial. Seguidamente, se procede a la hibridación del vector y el inserto, y a la transformación de una cepa de *E. coli* que no permita la expresión del inserto clonado, en este caso la cepa NovaBlue. Una vez dentro de la célula, es donde tiene lugar la ligación de vector e inserto. Tras comprobar los transformantes mediante PCR con cebadores del vector (T7promoter y T7terminator), se procede al aislamiento del ADN plasmídico (apartado 2.5.2) y a su secuenciación para verificar el clonaje del inserto. Una vez comprobado que el ADN es correcto, se transforma la construcción a una cepa de expresión; en este trabajo se utilizó la cepa de *E. coli* BL21(DE3). Los transformantes se comprobaron mediante la PCR con los cebadores del vector (T7promoter y T7terminator).

2.6.5.2 Sobreexpresión y localización subcelular de proteínas recombinantes

La cepa BL21(DE3) de *E. coli* es lisógena del bacteriófago DE3, un derivado del bacteriófago λ que posee la región de inmunidad del fago 21 y un fragmento de ADN que posee el gen *lacI*, y el gen de la T7 ADN polimerasa bajo el control del promotor lacUV5, inducible por IPTG. Por lo tanto, una vez clonada la región codificante de la proteína de estudio y transformada a la cepa de *E. coli* BL21(DE3), la expresión del ADN diana se induce mediante la adición de IPTG al cultivo en crecimiento. De este modo, se inoculó el transformante seleccionado en 40 ml de LB y se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5-1. En este momento, el cultivo se dividió en dos y se añadió IPTG (USB) estéril a una concentración final de 1 mM a uno de los dos cultivos, incubándose ambos toda la noche a 20°C en agitación. Seguidamente, se procedió a la obtención de las diferentes fracciones subcelulares (proteína celular total, sobrenadante, periplasma, fracción citoplasmática soluble y fracción citoplasmática insoluble) según el protocolo suministrado por Novagen. Finalmente, se realizó el análisis de todas las fracciones subcelulares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado 2.6.3), para detectar la localización de la proteína de estudio. Tras detectar en qué fracción celular se encontraba la proteína, se procedía a la obtención de una mayor cantidad de la misma.

2.6.5.3 Purificación de proteínas recombinantes

Para llevar a cabo la purificación de la proteína recombinante, se utilizó una cromatografía de intercambio iónico con una resina cargada con níquel como fase estacionaria (Novagen). Las colas de histidina añadidas en el extremo de la proteína heteróloga presentan afinidad por el níquel, lo que permite su retención diferencial en la resina. Este procedimiento se llevó a cabo según las instrucciones de la casa comercial.

2.6.6 Ensayo de la actividad ADP-ribosiltransferasa

En primer lugar, se prepararon mezclas de nicotinamida [^{14}C]adenin dinucleótido ([^{14}C]NAD) 100 μM (GE Healthcare, actividad específica: 265 Ci/mol) y acetato sódico 0,2 M pH 6 en un volumen total de 20 μl . Como fuente de inducción, se utilizaron 5 μl de un lisado, obtenido mediante sonicación, de células EPC o HEP-2, y equivalente a 10^6 células aproximadamente. La reacción se inició mediante la adición de 0,5 μg de la proteína recombinante AexT-His o 50 μl de sobrenadante bacteriano, se incubó 1 hora a 37°C y se paró mediante la adición de 500 μl de ácido tricloroacético 10%. Las mezclas anteriores se depositaron en filtros de membrana GS de 0,22 μm de poro de Millipore mediante una bomba de vacío, se lavaron con TCA 10% y se dejaron secar. A continuación, se añadió líquido de centelleo (Perkin-Elmer) y se utilizó un contador de centelleo de líquidos modelo LS 6500 (Beckman Coulter). Como control negativo se utilizó mezcla de reacción sin toxina ni sobrenadante bacteriano. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (cpm).

2.7 Técnicas experimentales con células eucariotas

2.7.1 Cultivo de células eucariotas

En concreto, en este trabajo se utilizaron células EPC (epitelioma papiloso de carpa, *Cyprinus carpio*) y HEP-2 (células epiteliales humanas). El cultivo celular fue mantenido para realizar los ensayos de citotoxicidad y translocación tras la infección con las cepas de *A. hydrophila* de interés.

El crecimiento de las células eucariotas se realizó en flascos de 75 cm^2 en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con sales Hanks, HEPES 10 mM (pH 7,3),

glutamina 2 mM, NaHCO₃ 0,23%, suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) 10%, a 25°C y 5% (vol/vol) CO₂. Los subcultivos se realizaron mediante tratamiento de tripsina-EDTA y dilución 1:10 en medio fresco, como mínimo una vez por semana. Todos los reactivos para el cultivo celular fueron suministrados por Invitrogen.

2.7.2 Ensayo de citotoxicidad

El cultivo bacteriano se realizó en TSB, suplementado con el antibiótico necesario, a 30°C en agitación. El crecimiento se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos y se realizó un lavado en tampón PBS 1x (tabla 2.18), para finalmente ser resuspendido en el mismo tampón. Por otro lado, se obtuvieron las monocapas de células eucariotas en multiplacas de 24 pocillos (Falcon), con aproximadamente 5×10^5 células EPC en cada pocillo, que fueron infectadas con las células bacterianas resuspendidas en PBS. Los cambios morfológicos fueron observados durante un periodo de 6 horas. Las células fueron fotografiadas mediante un microscopio invertido de contraste de fases Axiovert 25CFL (Carl Zeiss), a X40 aumentos.

2.7.3 Ensayo de translocación

Para investigar la presencia de efectores bacterianos en el citoplasma eucariota tras un proceso de infección de dos horas, se siguió el procedimiento utilizado por Burr y colaboradores (Burr *et al.*, 2003) con ligeras modificaciones.

Tras la infección, todas las células (eucariotas y bacterianas) fueron recogidas rascando manualmente los pocillos con ayuda de una espátula, y se separaron del medio de infección (tampón PBS) mediante centrifugación a 1500 x g durante 15 minutos a 4°C. Tras realizar un lavado de las células con tampón PBS, se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de lisis Triton X-100 1%, incubándose 10 minutos en hielo para, a continuación, separar mediante centrifugación a 12000 x g las fracciones soluble e insoluble en Triton. La fracción soluble en Triton contiene proteínas citoplasmáticas y de membrana eucariotas, mientras que la fracción insoluble contiene células bacterianas, células eucariotas no lisadas y núcleos.

Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y *Western blot* (apartados 2.6.3 y 2.6.4).

Tabla 2.26 Composición del tampón de lisis Triton X-100.

Tampón Triton X-100 1%
1% Triton X-100 (Merck)
10 mM Tris pH 7,6 (AppliChem)
150 mM NaCl (Merck)
10% Glicerol (Panreac)
1 mM PMSF (Fluka)

2.7.4 Ensayos con células fagocíticas

2.7.4.1 Aislamiento de células fagocíticas

Para la obtención de células fagocíticas se utilizaron guramis azules (*Trichogaster trichopterus*) de aproximadamente 13 g, que se mantuvieron en tanques de agua a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los fagocitos se aislaron del riñón anterior de los peces mediante el método descrito por Secombes (Secombes, 1990).

Brevemente, en primer lugar se procedió a la extracción aséptica del riñón anterior del pez mediante incisión ventral, el cual se mezcló con 10 ml de MEM suplementado (apartado 2.7.1) al que se añadió 20 U/ml de heparina sódica (Sigma-Aldrich), y se filtró a través de mallas de nylon de 70 μm (70 μm *Nylon Cell Strainer Falcon*) de Becton Dickinson. Seguidamente, se prepararon soluciones de Percoll® (Sigma-Aldrich) al 34%, 42% y 51% en PBS 1x, y se obtuvo un gradiente discontinuo mediante la centrifugación conjunta a 10000 x g 15 minutos de 10 ml, 20 ml y 10 ml de cada una de las soluciones anteriores, respectivamente. A continuación, se añadió un máximo de 5 ml de suspensión celular a cada gradiente de densidad generado y se centrifugó a 4°C durante 40 minutos a 400 x g en un rotor oscilante, para recoger la interfase del 34-42%. Para eliminar el Percoll®, se realizaron 2-3 lavados de la suspensión celular con cinco volúmenes de PBS, centrifugando en cada paso a 200 x g durante 10 minutos, y finalmente las células se resuspendieron en medio Leibowitz L-15 (Sigma) suplementado con 5% FBS.

Las células fagocíticas purificadas fueron repartidas en multiplacas Falcon de 24 pocillos (aproximadamente 4×10^6 - 5×10^6 células/pocillo) y se incubaron durante 3 horas a 25°C y 5% CO_2 . Seguidamente, se lavaron dos veces con medio fresco para

eliminar las células no adheridas y se procedió a infectar la monocapa a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 con las células bacterianas resuspendidas en PBS 1x.

2.7.4.2 Observación microscópica de células fagocíticas infectadas

Si la finalidad tras la infección de los fagocitos era su observación al microscopio, se depositaron cubreobjetos de cristal en las multiplacas de 24 pocillos antes de repartir las células eucariotas, y se incubaron 3 horas 25°C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, se procedió a la infección de las monocapas (MOI = 10) durante 3 horas. Seguidamente, las monocapas se lavaron tres veces con PBS 1x, se tiñeron con Giemsa (Merck) durante 30 minutos y se realizaron tres lavados más con PBS 1x. Las células se observaron con un microscopio invertido de contraste de fases Axiovert 25CFL (Carl Zeiss), a X100 aumentos.

2.7.4.3 Ensayo de fagocitosis

Para valorar el porcentaje de fagocitosis, tras el tiempo de infección, se realizaron dos lavados con PBS 1x, y la monocapa se resuspendió en medio fresco (L-15 con 5% FBS) suplementado con 100 µg/ml de gentamicina con el fin de eliminar las células bacterianas que se encontraban libres en el medio. Tras 1,5 horas de incubación, se realizaron tres lavados de la monocapa con PBS 1x para eliminar la gentamicina, las células eucariotas fueron recogidas rascando manualmente los pocillos con ayuda de una espátula, y se separaron del medio mediante centrifugación a 1500 x g durante 15 minutos a 4°C. Seguidamente, se resuspendieron en 0,5 ml de una solución 1% de Triton X-100, incubándose 10 minutos en hielo para lisar las células eucariotas y permitir la liberación de las bacterias intracelulares. A continuación, se centrifugó 5 minutos a 12000 x g, y el pellet se resuspendió en 0,1 ml de medio TSB y se sembró en placas de TSA. El porcentaje de fagocitosis se calculó dividiendo el número de bacterias viables tras el tratamiento con gentamicina entre el número inicial de bacterias empleadas en la infección.

2.8 Técnicas experimentales con animales

2.8.1. Obtención de sueros inmunes

2.8.1.1 Inmunización de conejos

Para la obtención de anti-sueros se utilizaron conejos albinos New-Zealand, de 6 meses de edad y aproximadamente 1500 g de peso, que se mantuvieron en el estabulario de la Facultad de Biología de Universidad de Barcelona.

La inmunización se realizó mediante 2 dosis de antígeno separadas 15 días en el tiempo. En cada una de las dosis se administró de 50 a 100 µg de antígeno mediante inyecciones subcutáneas multifocales (aproximadamente 200 µl por punto). La muestra se diluyó en el mismo volumen (400-500 µl) de coadyuvante de Freund completo (Sigma) en la primera dosis e incompleto en la siguiente dosis.

2.8.1.2 Obtención de suero

Transcurridos 15 días desde la segunda dosis de inmunización, se extrajeron 5-9 ml de sangre con la finalidad de valorar la calidad de anticuerpos producidos. Las extracciones se realizaron a partir de la arteria o la vena lateral de la oreja mediante el sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson), utilizando palomillas 21G de 0,2 x 19 mm x 304,8 mm y tubos colectores SST de 9,5 ml. La sangre extraída se mantuvo a 37°C durante 30 minutos y, seguidamente, a 4°C durante toda la noche. A continuación, se centrifugó a 4000 x g durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante, correspondiente al suero, se guardó a -20°C.

2.8.2 Experimentos de dosis letal ₅₀

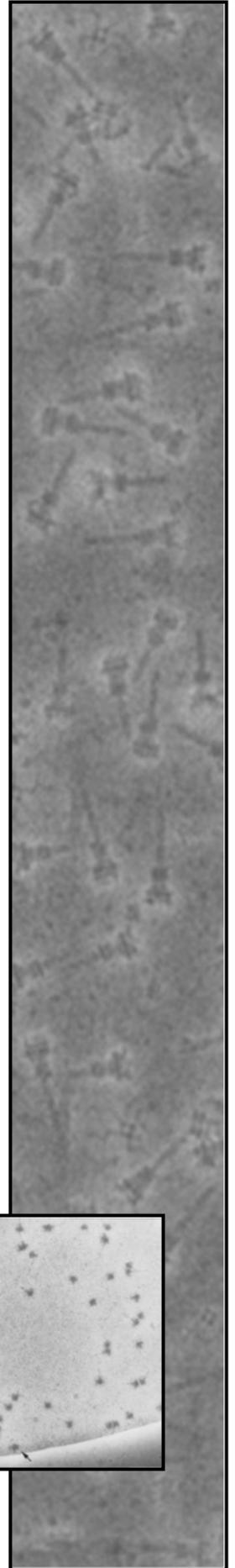
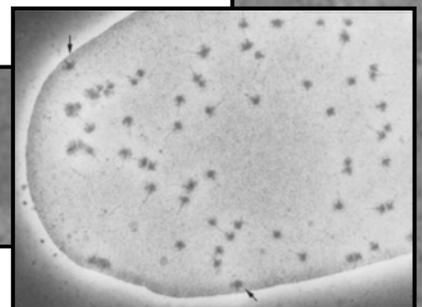
La dosis letal₅₀ (DL₅₀), cantidad mínima de bacterias necesaria para matar a la mitad de la población animal de estudio, fue calculada por el método de Reed (Reed, 1938). Como animales de experimentación se utilizaron ratones tipo Albino Suizo, truchas Arco iris y/o guramis azules, en grupos de 10 individuos (Merino *et al.*, 1999; Nogueras *et al.*, 2000). Cada experimento se realizó por triplicado.

La DL₅₀ en peces fue calculada utilizando truchas Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) o guramis azules (*Trichogaster trichopterus*). Las truchas Arco iris, de 12 a 20 g, se

mantenían en tanques de agua de 20 litros a una temperatura de $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Fueron inoculadas, mediante inyección intraperitoneal, con diferentes diluciones de suspensión bacteriana, comprendiendo entre 10^4 y 10^9 células viables en un volumen de 0,05 ml. Los guramis azules, de aproximadamente 13 g, se mantuvieron en tanques de agua de 20 litros a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Fueron inoculados, mediante inyección intramuscular, con diferentes diluciones de suspensión bacteriana, comprendiendo entre 10^4 y 10^9 células viables en un volumen de 0,1 ml. Durante dos semanas se realizó el recuento de los animales muertos.

La DL_{50} en ratones se calculó a partir de ratones hembra tipo Albino Suizo de 5-7 semanas. En esta ocasión se les administraron, mediante inyección intraperitoneal, diferentes diluciones de suspensión bacteriana, comprendiendo entre 10^4 y 10^9 células viables en un volumen de 0,25 ml. Se controló la mortalidad durante más de una semana.

3. Resultados



3.1 Identificación de genes potencialmente implicados en virulencia en *A. hydrophila* mediante sustracción génica

La sustracción génica o hibridación supresiva-sustractiva (SSH) es un método que permite identificar diferencias a nivel genético entre dos cepas bacterianas de la misma especie, una virulenta y otra no virulenta (Mahairas *et al.*, 1996) (apartado 2.5.11).

Con el fin de detectar genes implicados en la patogenicidad de *A. hydrophila*, se realizó SSH entre los ADN genómicos de las cepas PPD134/91 (*tester*, virulenta) y PPD35/85 (*driver*, no virulenta), utilizando la endonucleasa *RsaI* para la digestión previa de los mismos. De este modo, se obtuvo una librería de sustracción de 129 clones en *E. coli* XL1-Blue, que fueron denominados F#, siendo # el número del clon. Para comprobar el tamaño de los insertos contenidos en los clones de sustracción, se procedió a la extracción de sus respectivos ADN plasmídicos y a su digestión con la endonucleasa *RsaI*. Esto permitió determinar que, de un total de 129 clones, 14 no presentaban inserto, y los restantes 115 contenían en todos los casos insertos de tamaño inferior a 2000-pb, confirmándose por tanto como clones positivos.

Para ratificar que los fragmentos clonados eran específicos del *tester*, los ADN digeridos con *RsaI* de las cepas PPD134/91 y PPD35/85 se analizaron mediante *Southern blot*, utilizando como sondas dichos fragmentos. Las sondas empleadas se obtuvieron por amplificación del fragmento contenido en cada uno de los clones de sustracción con cebadores específicos del vector pGEM-T *easy*, SP6 y M13 for, utilizando nucleótidos marcados con digoxigenina. Con objeto de eliminar las regiones de ADN correspondientes al vector, las sondas purificadas se digirieron con la enzima de restricción *RsaI*. El análisis mediante *Southern blot* mostró que 69 clones del total de 115 (60%) hibridaban específicamente con el ADN *tester*. Los insertos que hibridaron tanto con el ADN *tester* como con el *driver* constituyen el grupo de falsos positivos, y son resultado de la ineficiencia de la SSH.

A continuación, se procedió a la secuenciación de los 69 fragmentos de sustracción, y a su análisis mediante la búsqueda de similitud de sus productos génicos en diferentes bases de datos. De los 69 fragmentos analizados, 48 no mostraron similitud significativa con ninguna de las entradas de las bases de datos; los 21 fragmentos restantes presentaron 16 pautas de lectura abierta (ORF, *open reading frame*) que mostraban similitud con proteínas de diferentes bacterias (tabla 3.1).

Con el fin de completar la librería de sustracción anterior, se realizaron dos experimentos de SSH adicionales, utilizando nuevamente la cepa PPD134/91 como *driver* y las cepas PPD35/85 o PPD64/90 como *tester*. En este caso, se escogió la endonucleasa *EcoRV* para realizar la digestión de los ADN genómicos, ya que al presentar una diana de restricción de 6-pb (frente a la diana de 4-pb de *RsaI*) permite generar fragmentos de restricción de tamaño superior. De este modo, se obtuvo una segunda librería de sustracción de 118 clones. Los clones obtenidos utilizando los *drivers* PPD64/90 y PPD35/85 se denominaron PA# y PB#, respectivamente, siendo # el número del clon. Para determinar la presencia de inserto en los clones, se procedió a la extracción de los ADN plasmídicos y a su digestión con la endonucleasa *EcoRI*. Del total de 118 clones, 21 no presentaron inserto, confirmándose por tanto 97 de los clones como positivos. Nuevamente, para ratificar que los fragmentos contenidos en los clones eran específicos del *tester*, los ADN genómicos de las cepas PPD134/91, PPD64/90 y PPD35/85 digeridos con *EcoRV* se analizaron mediante *Southern blot*, utilizando como sondas dichos fragmentos. El análisis mediante *Southern blot* mostró que 56 clones del total de 97 (58%) hibridaban específicamente con el ADN *tester*. Tras la secuenciación de estos 56 clones, se observó que sólo 14 de los fragmentos mostraban similitud significativa con proteínas de diferentes bacterias, constituyendo un total de 7 ORF, una de las cuales coincidía con una de las detectadas en el primer experimento de sustracción (tabla 3.1).

En total, se obtuvieron 22 fragmentos diferentes específicos de la cepa PPD134/91, que se acabaron de secuenciar mediante *genome walking* para completar las ORF localizadas inicialmente: 15 de ellos (F2/F3, F11, F20, F52, F61/F72/F88/F109, F89, F92, F93, F97/PB45, F99/F106, F108, PA91, PB28/PB35, PB60, PB80/PA26) codificaban 19 proteínas con homólogos en otras bacterias; los 7 restantes (F32, F34, F58, F85, F87, PA1/PA4/PB62, y PA6/PA98/PB38/PB78) presentaban ORF que no mostraban similitud con ninguna de las entradas de la base de datos *GenBank* (tabla 3.1).

Tabla 3.1 Resumen de los putativos genes de virulencia identificados en *A. hydrophila* PPD134/91.

Clon ¹	Tamaño (aa)	Número de acceso <i>GenBank</i>	Proteína homóloga	Identidad (%)
F2/F3	344	AF146597	Proteína de membrana externa OmpAI, <i>A. salmonicida</i>	78

F11	266	AY376445	Proteína VsdC, <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	52
	266		Proteína de T3SS, <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Atroseptica</i> SCRI 1043	62
F20	ND ²	AY374466	Proteína de biosíntesis de acinetobactina, <i>Acinetobacter baumannii</i>	40
F32	711	AY378288	Desconocida	
F34	54	AY452280	Desconocida	
F52	98	AF146598	Proteína HU alfa, <i>Serratia marcescens</i>	82
F58	103	AY378289	Desconocida	
F61/F72/F88/ F109	680	AF146608	Oligopeptidasa A OpdA, <i>Y. pestis</i>	64
F85	79	AY378290	Desconocida	
F87	606	AY378291	Desconocida	
F89	150	AY378292	Familia YaiI/YqxD, <i>Shewanella oneidensis</i>	64
F92	ND	AY378293	ORF parcial del componente I de la paraaminobenzoato sintasa, <i>V. vulnificus</i>	49
F93	102	AY378294	Putativa proteína exportada, <i>Y. pestis</i>	49
F92/PB45	316	AY378295	Proteína tipo retrotranscriptasa, <i>Pirellula</i> spp.	32
F99/F106	409	AF146029	Proteína de transporte transmembrana, <i>R. solanacearum</i>	27
F108	557	AF146599	Hemolisina HlyA, <i>A. hydrophila</i>	76
PA1/PA4/PB38/ PB62/PB78	263	AY378297	Desconocida	
PA6/PA98	190	AY378298	Desconocida	
PA91	207	AY378300	Putativo regulador transcripcional positivo BvgA, <i>B. pertussis</i>	44
	1252		Proteína de recepción de virulencia BvgS, <i>B. pertussis</i>	32
PB28/PB35	160	AY378301	Topoisomerasa, <i>P. aeruginosa</i>	57
			Proteína transmembrana, <i>R. solanacearum</i>	48
PB60	314	AY378302	Proteína de la familia GGDEF, <i>Caulobacter crescentus</i>	34
PB80/PB26	488	AY378303	Aerolisina AerA, <i>A. hydrophila</i>	84
	527		Arilsulfotransferasa, <i>Eubacterium rectale</i>	26

¹ “/” indica que los clones se solapan.

² ND, no determinado.

El fragmento F11 mostró similitud con una proteína de T3SS. Dado que recientemente se había descrito un T3SS funcional en *A. salmonicida*, y debido a la importancia de este sistema en la patogenicidad de otras bacterias, se decidió realizar un estudio más extensivo de este sistema en cepas de *Aeromonas* mesófilas. Concretamente, se escogieron las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, dada su incidencia en organismos tanto poiquilothermos como homeothermos, entre los cuales se halla la especie humana. Concretamente, la cepa AH-1 se escogió por pertenecer al serotipo O:11, uno de los predominantemente asociados con septicemias en estudios clínicos; la cepa AH-3 se escogió por ser de serotipo O:34, asociado frecuentemente con casos de infecciones gastrointestinales e infecciones de heridas (Merino *et al.*, 1993b).

3.2 Caracterización de la agrupación génica implicada en la formación del sistema de secreción de tipo III de *Aeromonas* mesófilas

3.2.1 Clonaje de la agrupación génica del T3SS de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*

3.2.1.1 Obtención de un fragmento génico de la agrupación

Algunos de los genes implicados en la formación del T3SS están altamente conservados en todos los sistemas descritos hasta el momento en diferentes especies bacterianas. Uno de estos es el gen *sctV* (nomenclatura unificadora propuesta por Hueck, 1998) o *ascV* (nomenclatura en *Aeromonas*; Burr *et al.*, 2002), también denominado *lcrD* en *Yersinia* spp. En base a la elevada similitud de secuencia entre los miembros de la familia LcrD, se procedió al alineamiento de las proteínas de esta familia de *A. salmonicida*, *P. aeruginosa*, y *Y. enterocolitica* (números de acceso *GenBank*: AJ458292, AAC454944, y AF102990, respectivamente), localizando dos regiones altamente conservadas tanto a nivel aminoacídico como nucleotídico. Se diseñaron dos cebadores degenerados, *ascV-F* y *ascV-R*, con el fin de amplificar un fragmento interno de dicho gen en *A. hydrophila* AH-1. Mediante PCR, se obtuvo un fragmento de 331-pb que presentaba una identidad del 92% con el gen *ascV* de *A. salmonicida*.

3.2.1.2 Secuenciación de la agrupación génica

La secuenciación de la agrupación génica de la mayor parte del T3SS de *A. hydrophila* AH-1 (genes *ascU-ascB*, figura 3.1) se llevó a cabo mediante el método conocido como *genome walking* (apartado 2.5.13.2), basado en una PCR que permite amplificar regiones de genoma contiguas a una de secuencia conocida. Básicamente, este procedimiento consiste en la digestión del ADN genómico con varios enzimas de restricción de manera independiente (en concreto, se utilizaron *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *ScaI* y *StuI*), y la posterior ligación de un adaptador a los extremos de los fragmentos generados, de manera que la secuencia del adaptador sirve de iniciador para una posterior PCR junto con un cebador específico de la región conocida.

El resto de genes (*ascC-ascL*) se secuenciaron a partir de un clon obtenido de una librería genómica de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*, clonada en pLA y mantenida en *E. coli* DH5 α . Brevemente, se obtuvo una sonda de ADN mediante amplificación, utilizando los cebadores *ascV-F* y *ascV-R*, ADN cromosómico de la cepa AH-1 y nucleótidos marcados con digoxigenina. Esta sonda se empleó para la hibridación de la librería genómica de la cepa AH-1, mediante *colony blot*, utilizando la cepa AH-1 como control positivo y la cepa DH5 α con el cósmido pLA2917 como control negativo. El revelado permitió detectar un clon, pLA-A1T3SS. Para confirmar el resultado se realizó una PCR con los cebadores empleados para la elaboración de la sonda, usando ADN plasmídico del clon encontrado, ADN purificado del vector de clonaje pLA2917 como control negativo y ADN genómico de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* como control positivo. Tanto en el clon como en la cepa parental, se amplificó una banda específica del tamaño esperado.

La secuenciación del clon 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 *ascV-F* y *ascV-R*. Los productos de las secuencias obtenidas a partir de los cebadores CSpLA y RpLA del clon pLA-A1T3SS presentaban similitud con el gen *ascU* de secreción de tipo III y el regulador transcripcional HexR, respectivamente.

De esta manera, se obtuvo la secuencia de la agrupación génica completa de T3SS de *A. hydrophila* AH-1 (número de acceso *GenBank*: AY394563, Anexo 7.2).

3.2.2 Clonaje de la agrupación génica del T3SS de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*

3.2.2.1 Obtención de una sonda específica

Con el fin de elaborar una sonda específica para el gen *ascV* de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, se diseñaron dos cebadores, *ascVF1* y *ascVR1*, a partir del gen *ascV* de *A. salmonicida* (número de acceso *GenBank*: AJ458292) de un modo similar a los diseñados para la cepa AH-1 de *A. hydrophila*. La amplificación de ADN genómico de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* con estos cebadores y nucleótidos marcados con digoxigenina (apartado 2.5.15.1) dio lugar a un fragmento de 710-pb que presentaba una identidad del 88% con el gen *ascV* de *A. salmonicida*.

3.2.2.2 Hibridación de la librería genómica de la cepa AH-3

La sonda para el gen *ascV* de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* se empleó para hibridar una librería genómica de esta misma cepa, clonada en el cósmido pLA2917 y mantenida en *E. coli* DH5 α (apartado 2.5.10). La hibridación se realizó mediante *colony blot*, utilizando la cepa AH-3 como control positivo y la cepa DH5 α con el cósmido pLA2917 como control negativo. El revelado permitió detectar dos clones positivos, pLA-T3SS4 y pLA-T3SS8.

Los clones positivos se confirmaron mediante PCR empleando los cebadores utilizados para la elaboración de la sonda y ADN plasmídico de cada uno de los clones positivos encontrados. En esta PCR también se empleó ADN purificado del vector de clonaje pLA2917 como control negativo y ADN genómico de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* como control positivo. Tanto los dos clones como la cepa parental, dieron lugar a una banda de amplificación específica del tamaño esperado.

3.2.2.3 Secuenciación de la agrupación génica

La secuenciación de cada uno de los clones, pLA-T3SS4 y pLA-T3SS8, se inició con los cebadores CSpLA y RpLA, complementarios a las secuencias que flanquean la diana *Bgl*II en el cósmido pLA2917, y con los cebadores *ascVF1* y *ascVR1*.

Los productos de las secuencias obtenidas a partir de los cebadores CSpLA y RpLA del clon pLA-T3SS4 presentaban similitud con el gen *ascJ*, implicado en la formación del T3SS, y una metaloproteasa, respectivamente. En el clon pLA-T3SS8 presentaban

similitud con el regulador transcripcional HexR y con el gen *ascV*, implicado en la formación del T3SS, respectivamente.

A partir de las secuencias obtenidas que presentaban similitud con genes de T3SS, se diseñaron nuevos cebadores para poder completar la secuenciación del inserto presente en cada clon. La secuenciación de ambos clones mostró que cada uno contenía parte de la agrupación génica de T3SS de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*: el clon pLA-T3SS4 contenía los genes *ascU-ascJ* y el clon pLA-T3SS8 los genes *ascV-ascL*, permitiendo la secuenciación de la agrupación génica completa (número de acceso *GenBank*: AY528667, Anexo 7.3) (figura 3.1).

3.2.3 Análisis de las secuencias de nucleótidos de las agrupaciones génicas del T3SS

Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos completas de las agrupaciones génicas implicadas en la formación del T3SS en las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, se procedió al análisis de las mismas. Se detectaron las posibles pautas de lectura abierta en función de la presencia de codones de inicio y de terminación, y se descartaron inicialmente todas las pautas de menos de 100-pb. De esta forma, se localizaron 36 ORF en ambas agrupaciones, organizadas tal y como se muestra en la figura 3.1. 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, implicados en la formación del T3SS.

Las veinte primeras ORF (desde *ascU* hasta *aopD*) codifican proteínas que muestran elevada similitud con proteínas previamente descritas en *A. salmonicida* (Burr *et al.*, 2002; Burr *et al.*, 2003; Stuber *et al.*, 2003). En consecuencia, estas ORF se denominaron como los genes descritos en *A. salmonicida* (Burr *et al.*, 2002). La nomenclatura para las restantes ORF, descritas por primera vez en *Aeromonas*, sigue la utilizada en *Pseudomonas aeruginosa*, sustituyendo la P de *Pseudomonas* por A de *Aeromonas*, así por ejemplo *pscD* en *Pseudomonas* corresponde a *ascD* en *Aeromonas* (figura 3.1). Como excepción, se presentan los genes *hscY*, *ascW*, *ascA* y *ascZ* de *A. hydrophila* AH-1, homólogos a *exsC*, *exsB*, *exsA* y *exsD* de *P. aeruginosa*, y que siguen la terminología utilizada en *Photobacterium luminescens* y *Yersinia* spp.

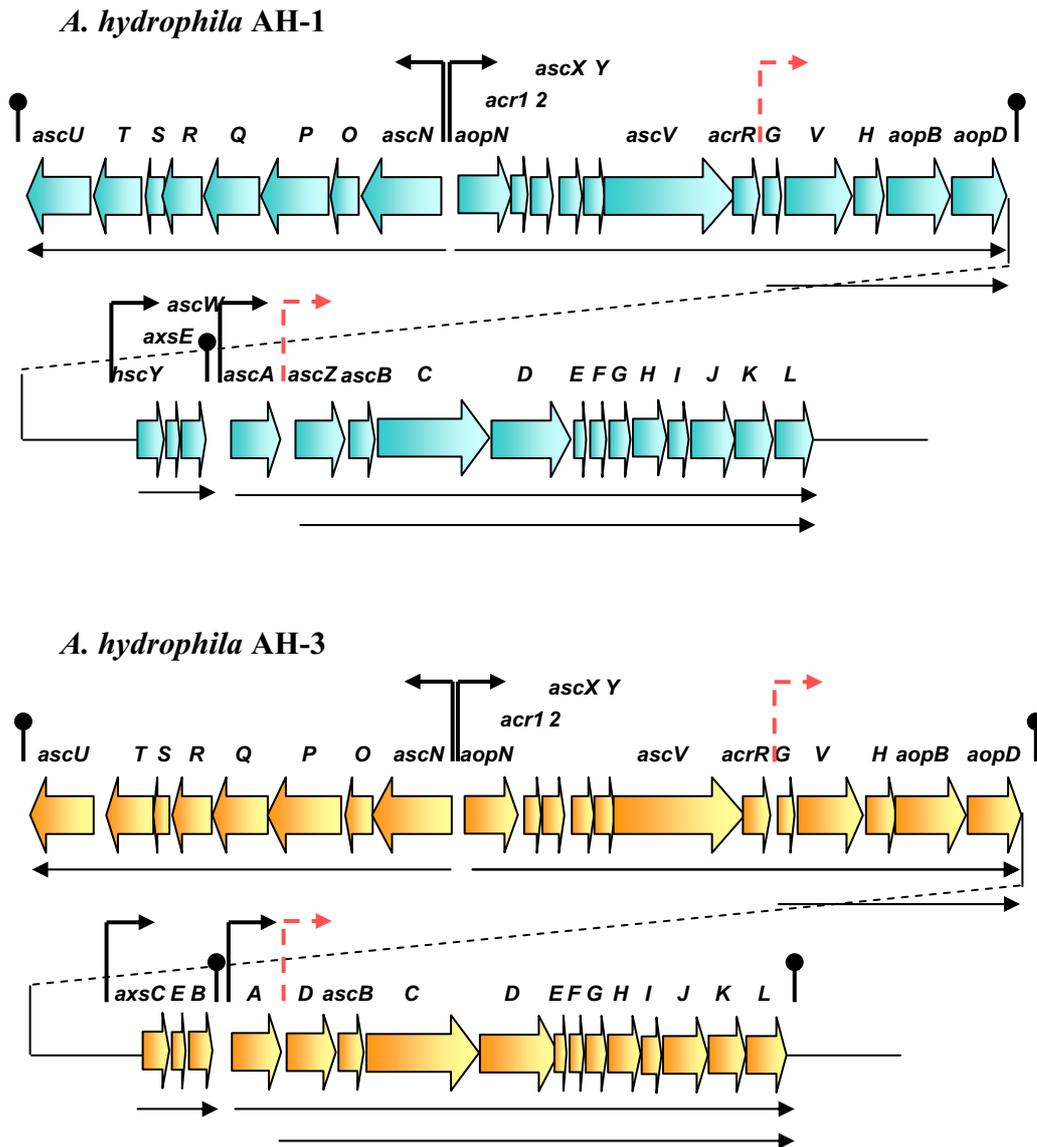


Figura 3.1 Esquema de la agrupación génica del sistema de secreción de tipo III de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3. Cada una de las flechas de bloque corresponde a una pauta de lectura abierta (ORF) e indica el sentido de transcripción. Los posibles promotores están marcados con flechas y los posibles terminadores con círculos. La flecha roja discontinua indica la localización de un putativo promotor dentro de una unidad transcripcional.

Seguidamente, se procedió a la predicción de promotores y terminadores rho-independientes putativos. En ambas secuencias se detectaron seis posibles promotores, situados en la región 5' de los genes *ascN*, *aopN*, *acrG*, *hscY/axsC*, *ascA/axsA* y *ascZ/axsD*; y tres terminadores rho-independientes putativos, localizados en la región 3' de los genes *ascU*, *aopD* y *ascW/axsB*. Tras el gen *ascL* de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* se localizó un cuarto putativo terminador rho-independiente, que no se detectó en la cepa AH-1, probablemente debido a la falta de secuencia. Además, también se procedió al análisis de las posibles cajas de unión al factor transcripcional

específico de T3SS, AxsA y AscA en *A. hydrophila* AH-3 y AH-1, respectivamente (TNAANA, apartado 3.2.3.14, ORF24), en los promotores predichos (dichas cajas se indican en los anexos 7.2 y 7.3). En base a las putativas secuencias promotoras y terminadoras localizadas, se determinaron seis posibles unidades transcripcionales: *ascN-ascU*, *aopN-aopD*, *acrG-aopD*, *hscY/axsC-ascW/axsB*, *ascA/axsA-ascL* y *ascZ/ascB-ascL* (figura 3.1). Cuatro de estas unidades transcripcionales fueron confirmadas mediante RT-PCR (apartado 3.2.4).

Las tablas 3.2 y 3.3 muestran las características de las diferentes ORF detectadas en las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*.

Tabla 3.2 Principales características de cada una de las 36 ORF así como su localización en la secuencia nucleotídica de la agrupación génica del T3SS de *A. hydrophila* AH-1 (Anexo 7.2).

ORF	proteína codificada	posición	G+C (%)	Tamaño (aa)	P.M. (kDa) ¹	pI ¹	GRAVY ¹
1	AscU	116-1174	74,2	352	39,63	8,85	0,035
2	AscT	1171-1959	73,4	262	28,51	8,50	1,074
3	AscS	1956-2276	74,5	105	11,33	4,86	0,884
4	AscR	2224-2877	79,4	217	24,19	5,38	0,722
5	AscQ	2874-3797	73,7	307	33,39	5,44	0,041
6	AscP	3794-4909	63,4	371	41,27	5,00	-0,779
7	AscO	4916-5377	68,8	153	18,55	5,89	-1,141
8	AscN	5374-6696	70,5	440	47,66	6,16	-0,098
9	AopN	6887-7765	69,3	292	32,33	5,65	-0,338
10	Acr1	7746-8027	63,8	93	10,59	4,27	-0,498
11	Acr2	8024-8395	59,7	123	14,01	6,13	0,002
12	AscX	8466-8840	64,0	124	13,98	5,10	-0,194
13	AscY	8837-9187	61,5	116	13,17	5,74	-0,300
14	AscV	9120-11282	75,3	720	79,16	5,98	0,294
15	AcrR	11279-11719	55,8	146	16,20	8,84	0,135
16	AcrG	11747-12046	63,0	99	10,96	9,30	-0,768
17	AcrV	12056-13159	54,6	367	41,29	6,43	-0,541
18	AcrH	13175-13672	69,9	165	18,35	4,87	-0,159
19	AopB	13653-14696	66,7	347	36,45	6,94	0,049

20	AopD	14709-15608	68,7	299	32,33	8,96	-0,544
21	HscY	15744-16187	57,4	147	16,91	4,82	-0,102
22	AxsE	16190-16423	66,7	77	8,63	11,70	-0,183
23	AscW	16420-16821	51,5	133	14,70	9,45	0,362
24	AscA	17160-17975	56,6	271	30,98	6,00	-0,107
25	AscZ	18094-18909	65,8	271	31,36	655	-0,371
26	AscB	18925-19350	56,3	141	16,02	5,44	-0,167
27	AscC	19323-21167	67,2	614	67,38	5,30	-0,193
28	AscD	21164-22465	65,7	433	48,13	5,98	-0,215
29	AscE	22428-22631	66,2	67	7,57	5,66	-0,542
30	AscF	22634-22897	60,2	87	9,62	6,54	-0,453
31	AscG	22900-23250	63,2	116	12,93	5,21	-0,075
32	AscH	23247-23801	58,4	184	20,66	6,16	-0,407
33	AscI	23801-24139	69,0	112	12,09	4,42	-0,235
34	AscJ	24146-24873	69,1	245	27,03	7,90	-0,067
35	AscK	24883-25509	62,2	208	22,88	5,80	0,083
36	AscL	25488-26123	66,5	211	23,96	5,09	-0,370

¹ El peso molecular (P.M.), el punto isoeléctrico (pI), y el promedio de hidrofobicidad de las proteínas están calculados utilizando el programa ProtParam de Expasy.

Tabla 3.3 Principales características de cada una de las 36 ORF así como su localización en la secuencia nucleotídica de la agrupación génica del T3SS de *A. hydrophila* AH-3 (Anexo 7.3).

ORF	proteína codificada	posición	G+C (%)	Tamaño (aa)	P.M. (kDa) ¹	pI ¹	GRAVY ¹
1	AscU	1699-640	60,1	352	39,36	8,51	0,0744
2	AscT	2727-1938	59,7	262	28,29	6,54	1,058
3	AscS	2990-2724	58,0	88	9,66	5,30	1,028
4	AscR	3645-2991	56,1	217	24,17	6,11	0,731
5	AscQ	4568-3641	63,3	308	33,45	4,92	0,0120
6	AscP	5791-4564	59,5	408	44,99	5,07	-0,8019
7	AscO	6259-5797	61,5	153	18,56	7,92	-1,275
8	AscN	7578-6255	64,2	440	47,80	6,17	-0,1231

9	AopN	7768-8646	64,5	292	32,03	5,54	-0,3246
10	Acr1	8627-8908	60,0	93	10,52	4,29	-0,267
11	Acr2	8904-9276	64,2	123	13,74	5,57	0,058
12	AscX	9355-9721	59,0	121	13,63	5,84	-0,495
13	AscY	9717-10068	62,3	116	12,90	5,23	-0,1482
14	AscV	10000-12166	59,5	721	79,26	6,09	0,246
15	AcrR	12162-12618	64,0	151	16,89	9,22	-0,065
16	AcrG	12657-12942	59,9	94	10,52	5,87	-0,538
17	AcrV	12951-14037	51,5	361	40,14	5,22	-0,416
18	AcrH	14046-14550	58,1	167	18,53	4,32	-0,302
19	AopB	14530-15703	57,0	390	40,24	9,17	0,210
20	AopD	15706-16606	53,0	299	32,17	6,21	-0,329
21	ExsC	16741-17185	54,2	147	16,72	4,59	-0,007
22	AxsE	17188-1741	57,7	77	8,72	11,27	-0,190
23	AxsB	17417-17819	51,5	133	14,86	9,22	0,3353
24	AxsA	18164-18980	53,2	271	30,82	6,18	-0,074
25	AxsD	19099-19915	61,0	271	31,53	5,57	-0,328
26	AscB	19930-20356	57,9	141	15,72	5,43	-0,060
27	AscC	20328-22185	60,3	618	67,83	5,07	-0,179
28	AscD	22181-23483	60,3	433	48,00	6,15	-0,242
29	AscE	23445-23649	59,8	67	7,48	4,93	-0,486
30	AscF	23652-23898	46,3	81	9,02	6,55	-0,470
31	AscG	23897-24251	61,0	117	12,94	5,04	-0,080
32	AscH	24247-24799	58,7	183	20,69	5,71	-0,495
33	AscI	24798-25137	57,5	112	12,04	4,48	-0,230
34	AscJ	25143-25884	56,8	246	27,00	7,01	-0,089
35	AscK	25880-26504	62,8	207	22,61	6,59	0,1830
36	AscL	26482-27148	57,2	221	24,71	5,20	-0,178

¹ El peso molecular (P.M.), el punto isoeléctrico (pI), y el promedio de hidrofobicidad de las proteínas están calculados utilizando el programa ProtParam de ExPASy.

A continuación, se describen las principales características de las putativas proteínas codificadas por las diferentes pautas de lectura abierta del T3SS de *A. hydrophila* AH-3 y AH-1, y se analiza la posible función de las mismas en base a estas características y a estudios realizados en proteínas homólogas. Principalmente, se ejemplificará cada una de las putativas funciones en base a la similitud de las proteínas descritas con las presentes en *Yersinia* spp., ya que es en este género donde el estudio de la función de las diferentes proteínas de la agrupación génica del T3SS se ha realizado de forma más exhaustiva y, por tanto, del que se dispone más información. El orden de explicación de cada una de las ORF responde a una mejor comprensión de la estructura y el funcionamiento del T3SS, y no a su situación dentro de la agrupación génica en *Aeromonas* spp. Por otro lado, en la tabla 3.4 se indican los porcentajes de identidad y similitud de las proteínas de T3SS de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3, y de las proteínas de tipo III de ambas cepas con sus homólogas en *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, y en otros géneros, como *Pseudomonas*, *Photobacterium* o *Yersinia*. La tabla 3.5 muestra las proteínas de T3SS que presentan homólogos con proteínas flagelares.

3.2.3.1 ORF34: Puente periplásmico del T3SA

El producto codificado por la ORF 34 se denominó AscJ y presenta similitud con la proteína YscJ de *Yersinia* spp.

Los miembros de la familia YscJ presentan una secuencia señal en el extremo N-terminal, lo que sugiere que probablemente son transportados a través de la membrana interna de manera sec-dependiente. La mayoría de estas proteínas presentan un motivo de unión a lípidos (Leu-Xaa-Gly-Cys) tras la secuencia señal; además, la proteína MxiJ de *S. flexneri*, miembro de esta familia, sufre modificaciones lipídicas (Allaoui *et al.*, 1992), indicando ambos hechos que son lipoproteínas (Hueck, 1998). Por lo tanto, el motivo lipídico situado en el extremo N-terminal de estas lipoproteínas podría estar implicado en su anclaje en la membrana externa. Estas proteínas también presentan una región hidrofóbica de 20-30 aminoácidos, seguida de algunos residuos básicos, en el extremo C-terminal, que podría constituir un dominio cuya función fuera la señalización de parada de su exportación, anclando la proteína a membrana interna. De esta manera, las proteínas de la familia YscJ podrían funcionar a modo de puente a través del espacio periplásmico, uniendo los canales proteicos de secreción de tipo III situados en las membranas interna y externa (Hueck, 1998). Recientemente, se ha resuelto la estructura de un miembro representativo de esta familia (la proteína EscJ codificada por EPEC),

estudio que ha llevado a proponer un modelo en que esta proteína formaría un anillo de 24 subunidades. Este anillo probablemente es la estructura análoga al anillo MS del flagelo bacteriano, compuesto por la proteína FliF (Crepin *et al.*, 2005). De hecho, FliF comparte un dominio con los miembros de la familia YscJ, dominio que se piensa está implicado en la interacción con otras proteínas de tipo III, presentando todas ellas equivalentes en el sistema flagelar (Hueck, 1998)

La proteína AscJ de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* presenta un dominio YscJ/FliF, dominio que se encuentra en proteínas relacionadas con la lipoproteína YscJ, donde cubre casi la totalidad de la secuencia, y en la proteína flagelar formadora del anillo MS, FliF, donde cubre el extremo N-terminal de la misma (figura 3.2). Por otro lado, AscJ también presenta el motivo de unión a lípidos característico de la familia YscJ, Leu-Ser-Gly-Cys en AH-3 y Leu-Gly-Gly-Cys en AH-1.

Figura 3.2 Dominio YscJ/FliF (negrita y fondo gris) de la proteína AscJ de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3; motivo de unión a lípidos de la familia YscJ (fondo negro).

AH-3 AscJ	1	V KRSMLMGVL CTSL LLSGC K VELYTGVSQK EGNEMLALLQ TEGISSDKQP
AH-1 AscJ	1	V KRSMLMGVL CTSM LLGGC K VELYTGVSQK EGNEMLALLR TEGISSDKQP
AH-3 AscJ	51	D KDGNIKLLV EESDVAQAIE TLKRKGYPRE SFSTLQDVFP KDGLISSPTE
AH-1 AscJ	51	D KDGNIKLLV EESDVAQAIE ALKRKGYPRE SFSTLQDVFP KDGLISSPTE
AH-3 AscJ	101	E RARLTYAKA Q EISNTLSEI DGVLVARVHV VLPEGNEGFN KKTSPASASV
AH-1 AscJ	101	E RARLNYAKA Q EISHTLSEI DGVLVARVHV VLPEGNEGIS KKPLPASASV
AH-3 AscJ	151	F IKHAADIQL DTYIPQIKQL VNNSIEGLAY DRISVVLVPS ADIRQMP LMA
AH-1 AscJ	151	F IKHAADIQL DSYIPQIKQL VNNSIEGLAY DRISVVLVPS ADIRQMP LVLS
AH-3 AscJ	201	R NTSLFSIEV SEGSKWRLGG LIALLLALVV TSNLAQYLWH RSRSRG
AH-1 AscJ	201	R NTSLFSIEV SESSKWRLAG LIALLLMLVV TTNLAQYMW H RSRSR-

3.2.3.2 ORF2, ORF3, ORF4 y ORF14: Componentes de membrana del aparato de exportación

Las proteínas codificadas por las ORF 2, 3, 4 y 14 se denominaron AscT, AscS, AscR y AscV. Los homólogos de estas proteínas en *Yersinia* spp. son YscT, YscS, YscR e YscV, respectivamente. La función de estas proteínas no se conoce, aunque probablemente se trata de proteínas de membrana interna con múltiples regiones transmembrana.

Se ha observado cierta similitud de las proteínas YscT, YscS, YscR e YscV con sus respectivas homólogas en las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, en base a la predicción de putativos dominios transmembrana. Se ha predicho que la proteína YscT podría estar formada por seis dominios transmembrana, con los extremos N- y C-

terminal en el espacio periplásmico; la proteína YscR podría estar constituida por tres dominios transmembrana, con el extremo N-terminal en el citoplasma; la proteína YscS tendría dos dominios transmembrana, situándose ambos extremos en el citoplasma; por último, la proteína YscV podría estar constituida por seis dominios transmembrana, estando situados ambos extremos en la cara citoplasmática (Ghosh, 2004). Los putativos dominios transmembrana de las proteínas AscT, AscR, AscS, y AscV de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* se muestran en la figura 3.3.

Figura 3.3 Predicción de dominios transmembrana (negrita y fondo gris) de las proteínas AscT (A), AscR (B), AscS (C) y AscV (D) de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3.

A

AH-3 AscT	1	MTLESLQAQM	LAYTLLLP	ISCFVMLP	VL	GKQMLGGAMI	RNGVVC	SLAL	
AH-1 AscT	1	MNLDSLQGM	LAYTLLLP	ISCFVMLP	VL	SKQMLGGAMI	RNGVIC	SLAL	
AH-3 AscT	51	YAYPMIA	DTL	PPSIGAMELA	LLVAKE	VLLG	LLIGFVAAIP	FWAIEA	SGFL
AH-1 AscT	51	FAYPMVANTL		PPTITALDLA	LLVAKE	VLLG	LLIGFVAAIP	FWAIEA	SGFL
AH-3 AscT	101	IDNQGAAMG	SLFNPSLGSQ	TSPTGLLLTQ	TLITLFFASG	AFLALLTALF			
AH-1 AscT	101	IDNQGAAMA	SIFNPSLASQ	TSPTGLLLTQ	TLITLFFASG	AFLALLSALF			
AH-3 AscT	151	QSYTSWPVAY	FFPTIGSQWV	SFFYQ	FSQM	LLLCTLLAAP	LLIAMFLAEF		
AH-1 AscT	151	QSYASW	PVAH	FFPTIGDRWV	SFFYSQ	FSQM	LLLCALLAAP	LLIAMFLAEF	
AH-3 AscT	201	GLALISRFAP	SINV	FVLAMP	IKSAVASLLL	VYIKLMDH	AYQQVLAVMD		
AH-1 AscT	201	GLALISRFAP	SINV	FVLAMP	IKSAVASLLL	VYIKLMDH	AYRQVLAVMD		
AH-3 AscT	251	PLRLLGPILG	AQ						
AH-1 AscT	251	PLRLLIPILE	AR						

B

AH-3 AscR	1	MIQLPDELNL	IVGLALLALL	PFIAMATSF	VKMAVVSLL	RNALGVQQIP		
AH-1 AscR	1	MIQLPDELNL	IVGLALLALL	PFIAMATSF	VKLAVVSLL	RNALGVQQIP		
AH-3 AscR	51	PN MAMYGLAI	ILSIYMAPV	GFATQDYLRQ	NEVSLAKSES	VEKFLDEGIA		
AH-1 AscR	51	PN MAMYGLAI	ILSIYMAPV	GFATQDYLRQ	NEVSLAKSES	VEKFLDEGMA		
AH-3 AscR	101	PYRAFLKKQI	KPREHAFFID	STKQLWPSKY	ADRLEPDSLL	ILLPAFTVSE		
AH-1 AscR	101	PYRTFLKKQI	KPREHAFFID	STKQLWPSKY	ADRLESLSLL	ILLPAFTVSE		
AH-3 AscR	151	LSRAFE IGFL	IYLPFIAIDL	IISNILLAMG	MMVSPMTIS	LPFKLLLFVL		
AH-1 AscR	151	LSRAFE IGFL	IYLPFIAIDL	IISNILLAMG	MMVSPMTIS	LPFKLLLFVL		
AH-3 AscR	201	LDGWARLTHG	LVISYGG					
AH-1 AscR	201	LDGWARLTHG	LVISYGG					

C

AH-3 AscS	1	-----	-----MSH	ADILH	FTSQ	LWLVILSMP	PVLVAAL	VGT
AH-1 AscS	1	MAGPVSPGTG	SSVTEANMSH	ADILH	FTSQ	LWLVILSMP	PVLVAAL	VGT
AH-3 AscS	34	LVSLQALQ	IQEQ	TLGFVA	KLIAVVITLF	ATTAWLGNEL	YSFADMVLYK	
AH-1 AscS	51	LVSLQALQ	IQEQ	TLGFVA	KLIAVVITLF	ATTAWLGNEL	YSFADMVLFK	
AH-3 AscS	84	VPQIQ						
AH-1 AscS	101	VPQIQ						

D

AH-3 AscV	1	MRPALPINNT	SNWKSARMNR	SLELLRRIGE	RKD	IMLAVLL	LAIVFMMVLP	
AH-1 AscV	1	MKPVLPIINTI	SNWKSARMNR	TLELLRRIGE	RKD	IMLAVLL	LAIVFMMVLP	
AH-3 AscV	51	LPPVALDILI	AINMTISVVL	LMMAVYINSP	LQSAFPAVL	LITTLFRLAL		
AH-1 AscV	51	LPPVALDILI	AINMTISVVL	LMMAVYINSP	LQSAFPAVL	LITTLFRLAL		
AH-3 AscV	101	SVSTTRMILL	QADAGQIVYT	FGNF	VVGGNL	VVGIVIFLII	TIVQFLVITK	
AH-1 AscV	101	SVSTTRMILL	QADAGQIVYT	FGNF	VVGGNL	VVGIVIFLII	TIVQFLVITK	

AH-3 AscV	151	GSERVAEVSA	RFSLDAMP GK	QMSIDGDMRA	GVIDVHEARD	RRGVIEKESQ
AH-1 AscV	151	GSERVAEVSA	RFSLDAMP GK	QMSIDGDMRA	GVIDVHEARE	RRSVIEKESQ
AH-3 AscV	201	MFGSMDGAMK	FVKGD AIAGL	IIIFVNILGG	VTIGVTQKGL	SAAEALQLYS
AH-1 AscV	201	MFGSMDGAMK	FVKGD AIAGL	IIIFVNILGG	VTIGVTQKGL	SAADALQLYS
AH-3 AscV	251	ILTVGD GMVS	QVPALLIAIT	AGIIVTRVSS	EESSDLGTDI	GAQVVAQPKA
AH-1 AscV	251	ILTVGD GMVS	QVPALLIAIT	AGIIVTRVSS	EESADLGSDI	GAQVVAQPKA
AH-3 AscV	301	LLIGGLLLVL	FGLIPGFPMI	TFFT LAAIVT	AGGYFIGLRQ	RKEQHSNSQD
AH-1 AscV	301	MLIGVLLVL	FGLIPGFPMV	TFFT LAAVVT	AGGYFIGLRQ	RNAQTSN-QD
AH-3 AscV	351	LPTVLAQGAG	APAARSKPKP	GGKPRGKLGE	KEEFAMTVPL	LIDVDAALQA
AH-1 AscV	350	LPTVLAQGAG	APAARSKPKA	GGKARSKLGE	KEEFAMTVPL	LIDVDAALQA
AH-3 AscV	401	DLEAIALNDE	LVRVRRALYL	DLGVFPFGIH	LRFNEMGPG	EYLIQLQEVV
AH-1 AscV	400	ELEAIALNDE	LVRVRRALYL	DLGVFPFGIH	LRFNEMGAG	EYLIQLQEVV
AH-3 AscV	451	VARGLLRPGH	QLVQENASQL	DLGIPYEEG	APLLPGQPTL	WVANEHQDRL
AH-1 AscV	450	VARGLLRPGY	LLVQENASQL	ELLGIPYEEG	TPLLPGQPTL	WVAKEHQERI
AH-3 AscV	501	EKSRLATLTT	GQVVTWHL SH	VLREYAEDFI	GIQETRYLLE	QMEGSYGELV
AH-1 AscV	500	EKMRLAALTP	DQVVTWHL SH	VLREYAEDFI	GIQETRYLLE	QMEGSYGELV
AH-3 AscV	551	KEAQRIIPLQ	RMTEILQRLV	GEDISIRNMR	AILEAMVEWG	QKEKDVVQLT
AH-1 AscV	550	KEAQRIIPLQ	RMTEILQRLV	GEDISIRNMR	AILEAMVEWG	QKEKDVVQLT
AH-3 AscV	601	EYIRSSLKRY	ICYKYANGNN	ILPAYLLDQQ	VEEQIRGGIR	QTSAGSYLAL
AH-1 AscV	600	EYIRSSLKRY	ICYKYANGNN	ILPAYLLDQQ	VEEQIRGGVR	QTSAGSYLAL
AH-3 AscV	651	DPTITQGFLD	QVRHTVGD LA	QMKNKPV LIV	SMDIRRYVRK	LIEGDYHALP
AH-1 AscV	650	DPTITQSFL E	QVRHTVGD LT	QMKNKPV LIV	SMDIRRYVRK	LIEGDYHALP
AH-3 AscV	701	VLSYQELTQQ	INIQPLGRVC	L		
AH-1 AscV	700	VLSYQELTQQ	INIQPLGRVG	L		

YscT, YscS e YscR son proteínas conservadas en los diferentes T3SS y también están relacionadas con las proteínas flagelares FliR, FliQ y FliP, respectivamente (Ghosh, 2004), proteínas de membrana interna que a su vez forman parte del complejo de exportación flagelar junto con otros componentes de membrana interna (FlhA, FlhB y FliO) y citoplasmáticos (FliH, FliI y FliJ) (Canals, 2007). Se ha demostrado, mediante experimentos de dos híbridos en levadura, que la proteína EscR de *E. coli* (equivalente a AscR) interacciona consigo misma, con la proteína EscS (equivalente a AscS), y con la proteína EscU (equivalente a AscU) (Creasey *et al.*, 2003).

YscV, proteína conservada también conocida como LcrD, es uno de los componentes del T3SS en los que se ha predicho un gran dominio citoplasmático que podría servir como posible lugar receptor para la interacción con sustratos de secreción. YscV presenta similitud a nivel de secuencia con la proteína flagelar de membrana interna FlhA. Se ha predicho que ambas proteínas estarían formadas por siete regiones transmembrana y un extremo N-terminal de localización citoplasmática. Sin embargo, esto implica un emplazamiento periplásmico del extremo C-terminal de estas proteínas, lo que contradice datos experimentales que sugieren una localización citoplasmática del extremo C-terminal de FlhA. Por lo tanto, es más probable un modelo que implique seis

u ocho dominios transmembrana (Ghosh, 2004). La proteína FlhA se asocia con otras proteínas flagelares como FliF, situada en el anillo MS, y con FlhB, proteína de membrana interna cuyo homólogo de T3SS es YscU (ORF1, apartado 3.2.3.3).

3.2.3.3 ORF1 y ORF6: Regulación de la especificidad de sustrato

Los productos codificados por la ORF1 y la ORF6, denominados AscU y AscP, son homólogos de YscU e YscP de *Yersinia* spp., respectivamente.

En *Yersinia* spp. se ha propuesto que YscU, proteína localizada en la membrana interna, podría servir como posible receptor y lugar de interacción de sustratos de transporte, debido a la predicción de un gran dominio citoplasmático en esta proteína (Ghosh, 2004). Además, YscU está relacionada con la proteína flagelar de membrana interna FlhB. De hecho, el cambio de la especificidad de sustrato en los sistemas de secreción de tipo III se demostró por primera vez en el FT3SS, mediado en parte por las proteínas FlhB y FliK. El flagelo consta de tres partes: el cuerpo basal, el gancho y el filamento. Durante la formación del flagelo, en primer lugar se produce el ensamblaje del cuerpo basal, seguidamente del gancho y, por último, del filamento. Por tanto, el complejo de exportación flagelar debe ser capaz de distinguir entre las subunidades formadoras del gancho y las del filamento. Mutaciones en la proteína FliK, relacionada con la familia YscP a nivel funcional, dan lugar a la formación de ganchos más largos de lo normal carentes de filamentos. Cuando en cepas mutadas en FliK se muta también la proteína FlhB, los flagelos recuperan el filamento. Se ha demostrado que FliK, las subunidades del gancho y las subunidades del filamento se unen al dominio citoplasmático de FlhB. Por tanto, tras la finalización del ensamblaje del gancho, y con el fin de promover la secreción de las subunidades formadoras del filamento, FliK podría cambiar la especificidad de sustrato del aparato de exportación flagelar mediante el cambio de conformación de FlhB (Edqvist *et al.*, 2003). De un modo similar, en el T3SS, la ausencia de YscP (ortólogo de FliK) conlleva un aumento de la secreción de YscF (subunidad formadora de la aguja) y una disminución marcada de la secreción de translocadores, YopB y YopD, y efectores. Este fenotipo desaparece cuando al mismo tiempo se muta el dominio citoplasmático de YscU, restableciéndose el nivel de secreción de efectores y reduciéndose la secreción de YscF. Estos resultados sugieren una posible colaboración entre YscU e YscP en la función del control de la elección de los sustratos de secreción (Edqvist *et al.*, 2003).

La predicción de la localización subcelular de la proteína AscU de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3 indica que probablemente se trata de una proteína de membrana citoplasmática que, de manera similar a su homóloga en *Yersinia* spp., podría estar constituida por cuatro dominios transmembrana, situándose un gran dominio C-terminal en el citoplasma, de forma que podría servir de lugar de interacción con sustratos de secreción (figura 3.4). Prácticamente la totalidad de esta proteína en ambas cepas (residuos 1 al 352) presenta el dominio típico de proteínas de la familia YscU y FlhB, posiblemente relacionado con la exportación de péptidos a través de la membrana interna. Las proteínas de la familia YscP presentan un dominio C-terminal conservado, mientras que son variables (longitud de secuencia, grado de conservación, etc.) a nivel de su extremo N-terminal. Las proteínas AscP de las cepas AH-1 y AH-3 parecen poseer el dominio C-terminal conservado de la familia YscP, y además gran parte de esta región muestra similitud con la familia de proteínas flagelares FliK (figura 3.4). De hecho, los componentes de esta familia, de igual manera que la familia YscP, presentan un mayor grado de conservación a nivel de su extremo C-terminal. Por otro lado, el alineamiento de las proteínas AscP de las cepas AH-1 y AH-3 muestra la elevada variabilidad del extremo N-terminal de estas proteínas (figura 3.4).

Figura 3.4 Dominios transmembrana (negrita y fondo gris) de la proteína AscU (A) y región similar a FliK (recuadro) y dominio conservado de la familia YscP (negrita y fondo gris) (B) de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3.

A

AH-3 AscU	1	MSGEKTEQPT	PKKLRDARQK	GQVVSKE	VV STAIILSLVG	MLIAMSDY YL
AH-1 AscU	1	MSGEKTELPT	PKKLRDARKK	GQVVSKE	VV STAIILSLIG	MLMAMSDY YL
AH-3 AscU	51	EHLGKMLLIP	ASHINLPFTE	ALNHVVENLM	Q EMAYLCIPI	LAVAVLVVLV
AH-1 AscU	51	EHLGKMLLIP	ESHLNLPFTQ	ALNHVLENLM	Q EMAYLCIPL	LGVSVLVVLI
AH-3 AscU	101	SHIA QYGFLL	SGESIKPDIK	HVNPVEGAKK	IFSIKSLMEF	VK SLLKVTLL
AH-1 AscU	101	SHFA QYGFLL	SGESIKPDIK	KINPVEGAKK	IFSIKSLMEF	VK SLLKVTLL
AH-3 AscU	151	SLLVWVTIEG	NLQAMLQ LPG	CGMSCVAPVL	GCMMGQLMAV	CAMGFVVI AI
AH-1 AscU	151	SLLVWITIEG	NLQALLQ LPG	CGMSCIPPVL	GCMLSQ LMAV	CAMGFVVI AI
AH-3 AscU	201	ADYAF EHYQH	IKQLKMSKDE	VKREYKEMEG	SPEIKSKRRQ	FHQELQSSNM
AH-1 AscU	201	ADYAF EHYQH	TKQLKMSKDE	VKREYKEMEG	SPEIKSKRRQ	FHQELQSSNM
AH-3 AscU	251	RADVCRSSVI	VANPTHIAIG	ILYERGETPL	PVVTLKFTDA	QALQVRKIAE
AH-1 AscU	251	RADVCRSSVI	VANPTHIAIG	IRYERGETPL	PVVTLKFTDA	QALQVRKIAE
AH-3 AscU	301	EEGIPVLQRI	PLARALYRDA	QINNYIPADQ	IEATAEVLRW	LEQWRQSEGP
AH-1 AscU	301	EEGIPVLQRI	PLARALYRDA	LINNYIPADQ	IEATAEVLRW	LEQWRQSEGP
AH-3 AscU	351	QR				
AH-1 AscU	351	QW				

B

AH-3 AscP	1	MNRILPIKGA	VTAPGDAPMA	EANRSQQQRF	EQAMRLEQEQ	KATYQHRANG
AH-1 AscP	1	-----	-----	-MNRLTAPRA	DTKIACEQHS	---LQRETNK
AH-3 AscP	51	QSKTQEPRLQ	QLLQTQEPQP	QQLLQTQQQK	KQAADTARQP	DISASHSQSK
AH-1 AscP	27	ADPAQQORFE	QALQLESASQ	KVRDQKRVLG	KQEQRDRSKP	DAPQSNKAA

AH-3	AscP	101	QLQTQPFITR	EASGLSAPAI	SEVTARDQKE	IESKKSQKML	DTQDKKLEDG
AH-1	AscP	77	NKEGE----L	AERKLTRPAP	HAKAPHDKQE	GSDWQESQLL	PAMPLQIHEG
AH-3	AscP	151	TRG-----V	ELPAPENSFL	APSSMVNTPT	PHLPLEGAGG	SAPESALATL
AH-1	AscP	123	MQAPTQQER	ETAQAEQSR	VPSDITSSPE	LLAAAEPETR	DGINENAADL
AH-3	AscP	195	PSLVKEQVPH	PKQEGHDSQQ	HDMQGTGITA	GAEVPLGAE	AALQQGGASL
AH-1	AscP	173	PQIAVSNIIIL	SRLQLSDSNK	LQEPG-----	-----EL	ATLPEVSERL
AH-3	AscP	245	PEDVEYVERK	ASDTVINELT	LTDEMPEAGD	QLIPPQVKTP	GDLQLARMAP
AH-1	AscP	210	QTEDESTELA	P--VASEEES	FAQENFAGSA	IRVPPLATTP	GDLLLARVTP
AH-3	AscP	295	AENNRELQGL	LERLAVDIYQ	ELGRPERPPL	LRLTLPALGE	LAIRINHHHG
AH-1	AscP	258	SFDHHELQGL	ISRLAVDMHL	ELGRLERPPL	LQLSLPALGE	LTIRIDRHQG
AH-3	AscP	345	EMQIEILATT	QGELLNQGR	SELIDRLQRL	HPGERVTLDL	FSQPDRDQGS
AH-1	AscP	308	MLQVEMLASE	QGSQLLNQGR	GELIDRLQRL	YPGERVAVDL	FTRGDSEQGS
AH-3	AscP	395	RQORSIYDEW	DADA			
AH-1	AscP	358	RQKRSIYDEW	DADA			

3.2.3.4 ORF28: Otra proteína de membrana interna

El producto codificado por la ORF28 fue denominado AscD y su equivalente en *Yersinia* spp. es YscD.

Probablemente, YscD sea otra proteína de membrana interna, afirmación que se basa en la predicción de la topología de la proteína, con un pequeño dominio N-terminal periplásmico, un sólo dominio transmembrana y un gran dominio C-terminal citoplasmático (Ghosh, 2004). La predicción de un dominio transmembrana en las proteínas homólogas en *A. hydrophila* AH-1 y AH-3, sugiere que estas proteínas presentan una topología similar a la predicha en la proteína YscD (figura 3.5).

Figura 3.5 Predicción de dominios transmembrana (negrita y fondo gris) de la proteína AscD de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3.

AH-3	AscD	1	MSWKCRVYRG	LNRGVEVPLP	EGRLVIGSDP	LKADLVLVDE	GMAAEHLVLL
AH-1	AscD	1	MSWKCRVYRG	LNHGVEVSLP	EGRLIIGADP	LQADLVLVDE	GMAPVHLTLM
AH-3	AscD	51	VSTEGITLQA	WADGITPTQD	GVALTAGDPL	RAGTRLEAGP	LLWSFCDSSR
AH-1	AscD	51	VTAEGIVLQE	WAEGVMTQD	GEVLAAGALL	KAATRLEAGP	LLWSFCDSSR
AH-3	AscD	101	VLPAQFDDSA	QVAAPRPHH	RAGRDT LLLG	GVCLTMMGV	LFLLA QGWQ
AH-1	AscD	101	SLPEQLEPLT	TVQTLRPPK	RAARAD VWVG	GLCLMLIIAV	LALLG HGWQ
AH-3	AscD	151	GSGEGDTARS	EQTLKRFLAA	PIYRQVVIGN	AEPALWLLSG	YVDENSSRLA
AH-1	AscD	151	GSENDAARQ	EQALKRFLVA	PAYQQVTLIN	DTHGIWQLAG	YVDENSTRLA
AH-3	AscD	201	LQQFLDGNFG	SYRLDLRTME	DLRQGAGFIL	QKLGYEQLKI	RNGEEPGWLK
AH-1	AscD	201	LQQYLEGNFG	NYRLDVRTME	DLRQGAGFIL	QKLGYERLQI	RNGKEPGWLR
AH-3	AscD	251	LSGEIQGDG	KWNSIESLLK	QEVPGLLGVE	NQVQIAGAYR	KRLDVLQEQ
AH-1	AscD	251	LSGEIDTQDP	KWSTLDTLR	QEVPGVLGIE	NQVQVAGAYR	KRLDVLQEQ
AH-3	AscD	301	GLTGTLRVRE	ASDRLELSGQ	LDEHQLVLFQ	QVHQQFRREF	GAYPALELIN
AH-1	AscD	301	GLAGLLRVAE	TSGRIEVSQ	LDSAQLAKFQ	LAQQQFKREF	GSHPVLELVN
AH-3	AscD	351	QTRTPRQDEL	EFDVRSVSFG	RVPYVILADN	QRYPVGGATT	SGVRVLAIRR
AH-1	AscD	351	QERIPRQDEL	EFEVRSVSFG	RIPYVTLADK	QRYPIGGATA	NGVRVLAIRR

AH-3 AscD 401 DAVVVSCKGKQ QYIVKLGVE RHDDQFGNAT VRR
 AH-1 AscD 401 DAVVVSCKGKQ QYIVKLGVE RHDDQFGNAT VRR

La función de YscD se ha predicho en base a su similitud con la proteína flagelar FliG. Tras la formación del anillo MS durante la biosíntesis flagelar, aparece una estructura en forma de campana, denominada anillo C, en la cara citoplasmática del cuerpo basal del flagelo. El anillo C está compuesto por las proteínas FliN, FliG y FliM. Estas tres proteínas se asocian con el anillo MS, constituido por la proteína FliF, y por tanto, con la membrana citoplasmática, donde FliG une a FliF con el complejo FliMN. De acuerdo con la interacción de FliF-FliG-FliMN en el sistema flagelar y con las similitudes entre FliF-YscJ (ORF34), FliG-YscD y FliN-YscQ (ORF5, apartado 3.2.3.5), se ha especulado que las proteínas homólogas a YscJ podrían interactuar con proteínas de las familias YscD e YscQ. No se ha encontrado ningún homólogo de FliM en el T3SS y, además, FliN e YscQ presentan similitud sólo a nivel de sus dominios C-terminales. Por otro lado, en algunos T3SS la función de YscQ la realizan dos proteínas diferentes, como por ejemplo HrcQ_A y HrcQ_B de *P. syringae*. Esto ha llevado a pensar que el dominio N-terminal de YscQ podría realizar una función similar a FliM (Hueck, 1998).

3.2.3.5 ORF5, ORF8, ORF35 y ORF36: Complejo ATPasa

El nombre de los productos de las ORF 5, 8, 35 y 36 es AscQ, AscN, AscK y AscL, siendo las proteínas correspondientes en *Yersinia* spp. YscQ, YscN, YscK e YscL. Las proteínas YscL, YscN e YscQ son miembros de familias de proteínas conservadas en los T3SS descritos. Cada una de estas proteínas también presenta similitud con componentes del sistema de exportación flagelar: YscL con FliH, YscN con FliI, e YscQ con FliM y FliN (Jackson and Plano, 2000).

Los miembros de la familia de proteínas YscN se han identificado como las ATPasas del T3SS, constituyendo uno de los componentes de tipo III más conservados. Además, la proteína YscN presenta similitud con FliI, ATPasa específica del flagelo, y con las subunidades α y β del componente F₁ de la ATPasa F₀F₁ bacteriana (Hueck, 1998). Aunque YscN es una proteína soluble, probablemente se localiza en la interfase entre el T3SS y el citoplasma bacteriano, gracias a la interacción con otros componentes del aparato de secreción. YscN pertenece a una clase de enzimas que despliegan proteínas de manera dependiente de ATP. Mediante estudios *in vitro* se ha demostrado

que, el equivalente de YscN en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, InvC, es suficiente para la disociación de complejos chaperona-efector, generando efectores competentes para la secreción y liberando las chaperonas de forma dependiente de ATP (Akeda and Galán, 2005).

YscL está relacionada con la proteína flagelar FliH, el regulador negativo de la ATPasa FliI. FliH forma un dímero que se une a FliI, generando un heterotrímero en citoplasma (Minamino *et al.*, 2001). Por similitud con este sistema, YscL podría tener un papel como regulador negativo de la actividad ATPásica de YscN, hecho que lleva a preguntarse si este efecto de regulación negativa sería continuo o si YscL estaría a su vez regulada. FliI presenta una actividad ATPásica superior en presencia de fosfolípidos; de igual manera, se ha propuesto que el efecto antagonista de los fosfolípidos e YscL sobre YscN podrían asegurar que la actividad ATPásica de esta última fuera máxima en la membrana (Blaylock *et al.*, 2006). Si esto es así, deberían existir mecanismos de regulación adicionales que sólo permitieran el consumo de ATP en el contexto de actividad del sistema secreción de tipo III. El anillo C, antecámara al canal de secreción situado en el citoplasma, podría ejercer esta función. Análisis bioinformáticos sugieren que YscQ es uno de los componentes estructurales de esta antecámara. Se ha propuesto que YscN e YscL podrían representar dos componentes de un complejo ATPasa-like en el que las proteínas YscK e YscQ también estarían implicadas, hipótesis basada en estudios de interacciones entre dichas proteínas mediante sistemas de dos y tres-híbridos (Jackson and Plano, 2000).

En las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, la proteína AscN, de igual manera que su homóloga en *Yersinia* spp., YscN, presenta dos dominios con similitud al componente F₁ de la ATPasa F₀F₁ bacteriana. Por otro lado, la proteína AscL muestra un dominio FliH, lo que indica que esta proteína podría tener algún papel como regulador de la actividad de AscN; la proteína AscK presenta el dominio típico de la familia de proteínas YscK; y la proteína YscQ presenta un dominio SpoA C-terminal, dominio en lámina β encontrado en el extremo C-terminal de las proteínas flagelares FliM y FliN, y las proteínas de T3SS pertenecientes a la familia YscQ (figura 3.6).

Figura 3.6 Dominios ATPasa de AscN (A), dominios FliH de AscL (B), dominio YscK de AscK (C), y dominio SpoA de AscQ (D) de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3. Todos los dominios se marcan en negrita y fondo gris.

A

AH-3	AscN	1	MNLSLDHIPG	QLRHAIDECR	LIQIRGRVTQ	VTGTLKAVV	PGVRIGELCH
AH-1	AscN	1	MNLSFDHIAG	QLRHAIDDAR	LIQIRGRVTQ	VTGTLKAVV	PGVRIGELCH
AH-3	AscN	51	LRNPDNTLSL	QAEVIGFAQH	QALLTPLGEM	FGISSNTEVS	PTG^{TMH}QVGV
AH-1	AscN	51	LRNPDNTLSL	QAEVIGFAQH	QALLTPLGEM	FGISSNTEVS	PTG^{AMH}QVGV
AH-3	AscN	101	GEHLLGQVLD	GLGNPFGGGH	LPEPAAWYPV	YRDAPPPMSR	KRITQPIS LG
AH-1	AscN	101	GEHLLGQVLD	GLGNPFAGGH	LPEPAAWYPV	YRDAPPPMSR	KRIAQPIS LG
AH-3	AscN	151	IRAIDGLLTC	GEGQRMGIFA	AAGGKSTLL	ASLIRSAEVD	VTVLALIGER
AH-1	AscN	151	IRAIDGLLTC	GEGQRMGIFA	AAGGKSTLL	ASLIRSAEVD	VTVLALIGER
AH-3	AscN	201	GREVREFIEA	DLGEEGLKKA	VLVATSDRP	AMERAKAGFV	ATSIAEYFRD
AH-1	AscN	201	GREVREFIEA	DLGEEGLKKA	VLVATSDRP	AMERAKAGFV	ATSIAEYFRD
AH-3	AscN	251	QGKRVLLMD	SVTRFARAQR	EIGLAAGEPP	TRRGYPVSF	AALPRLMERA
AH-1	AscN	251	QGKRVLLMD	SVTRFARAQR	EIGLAAGEPP	TRRGYPVSF	AALPRLMERA
AH-3	AscN	301	GQSDKGSITA	LYTVLVEGDD	MTEPVADETR	SILDGHIILS	RKLAAANHYP
AH-1	AscN	301	GQSDKGSITA	LYTVLVEGDD	MTEPVADETR	SILDGHIILS	RKLAAANHYP
AH-3	AscN	351	AIDVLRASR	VMNQIIEPEH	QAQAGRIRSW	LAKYEEVELL	LQIGEYQKGQ
AH-1	AscN	351	AIDVLRASR	VMNQIIEPEH	QAQAGRLRSW	LAKYEEVELL	LQIGEYQKGQ
AH-3	AscN	401	DKVADEAIAR	IEAIRQWLRQ	GTHEPSSLPE	ALTTLEALTR	
AH-1	AscN	401	DKVADEAIAR	IEAIRQWLKQ	GTHEPSSLPE	ALATLEALTR	

B

AH-3	AscL	1	MLPFVEIKSE	HLQLAPSQRI	LRSQDYQSYL	SAQELVEAAR	AQAADIVAEA
AH-1	AscL	1	MLPFVEIKSE	HLQLEPGQRI	LRSQDYQSYL	SAQALVEAAR	EQA AEIVQDA
AH-3	AscL	51	RAIYEEQKSL	GWQAGI DAAR	REQAVLIHQT	QLQCQGYRT	VEQQM SEVVLL
AH-1	AscL	51	RTVYEQQREL	GWQAGM EQAR	REQAVLIHQT	QLQCQGYRT	VEQQM SEVVLL
AH-3	AscL	101	QAVRKILHDY	DQVALTLKVV	REALALVSNQ	KQVTVRVHPE	QVQAVRDQIA
AH-1	AscL	101	QAVRKILHDY	DQVALTLKVV	REALSLVSNQ	KQVTVRVHPE	QVTAVRDQIA
AH-3	AscL	151	RVHKDFPEIG	YLEISADARL	DQGGCILETE	VGIIDASMDG	QLEALATAMA
AH-1	AscL	151	RVHKDFPEIG	YLDISADARL	DQGGCILETE	VGIIDASLDG	QLEALSRAIS
AH-3	AscL	201	AVLKKRSEQL	PREDNVMLAA	V		
AH-1	AscL	201	MTLE-RGDHS	AH-----	-		

C

AH-3	AscK	1	MT VGLTPYQL	RFCPASYLHE	AHLPSSWARV	PEILPEWRTL	PASNGALLEA
AH-1	AscK	1	MT VGLTPYQL	RFCPAAYLDD	GHPDPSRWRL	QDALPDWRH	PAVNEALLEE
AH-3	AscK	51	LTLGTGYEMP	AMLGGVALFP	QGELVQLLRR	LGAVLHGEAI	RHCLLAPALR
AH-1	AscK	51	LALDIAYESP	SSLGGLALFP	QSELASTLSH	LGAVLHGEAI	RHCLQGSTLR
AH-3	AscK	101	QVITLLGEEG	HRAVLSQLDL	LIGPWPAGWQ	QPLPTQLEEA	SLEVAGLQFW
AH-1	AscK	101	HIICLLGEEG	HRNLLSQIDL	LIGPWPAGWQ	QPLPLELNGS	YLEAAGLQFW
AH-3	AscK	151	LAAG-EGEPD	WARRLALRLA	PASLGPSWRL	TTDQLPLARA	LCLKIAKQVT
AH-1	AscK	151	LAAAGNVEPG	WARRLALRLP	PSSTVPSWHL	ANESLPLARA	LCLKIAKQVT
AH-3	AscK	200	PQCCHLLK				
AH-1	AscK	201	PQCCHLLK				

D

AH-3	AscQ	1	MTLITFPSAS	LAELTLQQT	SQYRQYFSWG	GGELALAIIGL	PPATLDRLO
AH-1	AscQ	1	MTSIAFTSAS	PAELTLQQR	SQCRHHYGWS	GGELILAIAS	QPASLEYRLO
AH-3	AscQ	51	LQWQGLSLTL	CCHGAELAHW	LAPDLQQAAL	FSLPESLQLA	LIERLGQPLG
AH-1	AscQ	51	LQWQGLSLPL	LCHGAELARW	LAPDLQQAAL	FSLPESLQLA	LIERLGQPLG

AH-3	AscQ	101	GLTCSALTRQ	QSGDKADDDPA	LQLLLQREGA	NLALWLSQPG	PLLTRLPPRP
AH-1	AscQ	101	NLSCSALAPI	ATNEAAGQPA	LQLLKREGA	TLAFWLAEPG	PLFGKLPTRP
AH-3	AscQ	151	QQRLLPLI	LSLQWEMGL	TMDELGALAI	GDVLLPPHP	QLGQQLTICV
AH-1	AscQ	151	SQRLTLPLT	LSLQWGAMRV	AISELETLSY	GDVLLPLPH	LLGQQLLCV
AH-3	AscQ	201	EGRPFAYCQP	HQQHLELTAM	HNATPADPFG	PTELEQLPIQ	VSFEVGRQTL
AH-1	AscQ	201	EGRPFAYCLP	HQQHLELTAM	HNAADDN-LD	ATQLDNLPIQ	VTFEVRQTL
AH-3	AscQ	251	DWHTLTSMQP	GALIDLGTPL	DGEVRIISNG	HSLGVGRIVE	IQGRIGVRIE
AH-1	AscQ	250	DWHSLLTLQP	GSLIDLGTPI	DGEVRIISNG	HQLGSGRIVE	IQGRIGVRIE
AH-3	AscQ	301	TLSGESQA				
AH-1	AscQ	300	SLKSESPS				

3.2.3.6 ORF27: La secretina del T3SS

El producto codificado por la ORF27 fue denominado AscC por su elevada similitud con la proteína YscC de *Yersinia* spp.

La proteína YscC de *Yersinia* spp. pertenece a la familia de las secretinas, proteínas de membrana externa implicadas en gran variedad de procesos de transporte molecular, como la secreción de tipo II, la secreción de tipo III, la biogénesis de *pili* de tipo IV o la liberación de fagos filamentosos (Thanassi and Hultgren, 2000). Se ha demostrado que YscC existe en forma de oligómero estable en la membrana externa. Además, ensayos de microscopía electrónica han permitido observar complejos de YscC purificados, los cuales presentan una estructura en forma de anillo de aproximadamente 20 nm con un poro central de 5 nm (Koster *et al.*, 1997). Probablemente, YscC sirve como canal de paso a través de la membrana externa para los sustratos del T3SS.

La proteína AscC de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3 presenta el dominio típico de la familia de las secretinas, y dos dominios más cortos, antes conocidos como dominios tipo NolW, que se encuentran frecuentemente y de manera repetida en las secretinas de T2SS y T3SS (figura 3.7). Además, la predicción de su localización subcelular indica que probablemente se trata de una proteína de membrana externa que es exportada vía Sec-dependiente.

Figura 3.7 Dominios tipo NolW (negrita y fondo gris) y dominio secretina (letras blancas y fondo gris oscuro) de la proteína AscC de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3.

AH-3	AscC	1	VETDDMAPLS	MQPLLHPLLW	FCLSVAIWSR	PVAAQELDWW	PMPYSYVAEG
AH-1	AscC	1	METDDMASVN	MQRLLHPLLW	LGMGMMWSR	PTLAQELDWL	PMPYSYVAEG
AH-3	AscC	51	ESLRDVLVNF	GANYEVSVVV	SDKVNDQVNG	QFEHDEPLAF	LQQLASLYNL
AH-1	AscC	51	ESLRDVLVNF	GANYEVSVVV	SDKVNDQVNG	QFEHDEPQAF	LQQLASLYNL
AH-3	AscC	101	VWYYDGNVLY	VFKNSEVESR	LINLEQTGAA	ELKQALQAG	IWEPRFGWRP
AH-1	AscC	101	VWYYDGNVLY	VFKNSEVQSR	LIKLAQTGAA	ELQQALQAG	IWEARFGWRP
AH-3	AscC	151	DADNRLVYVS	GPPRYLELIE	QTAVALEQQT	QLRSEKTGPL	AIEIFPLKYA
AH-1	AscC	151	DTDNRLVYVS	GPPRYLELVE	QTALALEQQS	QLRSEKTGPL	AIEIFPLKYA

AH-3 AscC	201	SATDRSIQYR	DTDVEAPGLA	TILARLLSDA	GVQMVNNEG	KKGAAVTSGQ
AH-1 AscC	201	SATDRSIQYR	DTDVEAPGVA	TILSRLLSDA	GVQMVNNEG-	TKGSTSHSGQ
AH-3 AscC	251	AIVQADPSLN	AVIVRDTPER	MAMYGKLIAA	LDKPAARIEV	ALSIIDINAE
AH-1 AscC	250	AIVQADPSLN	AVLVRDAPER	MAMYGKLIAA	LDKPSARIEV	ALSIIDINAE
AH-3 AscC	301	DLSQLGVDWR	VGIRTGSNQQ	VIIKTTGDRK	GIEGAAALGS	LVDSKGLDYL
AH-1 AscC	300	DLSQLGVDWR	VGIRTGSNQQ	VIIKTTGDRK	GIEGAAALGS	LVDSKGLDYL
AH-3 AscC	351	LARVNLENE	GNAQVISRPT	LLTQENTQAV	IDHSETYYVK	ISGERVAELQ
AH-1 AscC	350	LARVNLENE	GNAQVVS RPT	LLTQENTQAV	IDHSETYYVK	ISGERVAELK
AH-3 AscC	401	GITYGTMLRM	TPRVVQMWDK	PEISLSLHIE	DGSQKPNGTG	ADGLPTIQR
AH-1 AscC	400	GITYGTMLRM	TPRVIQLGDR	PEVSLSLHIE	DGNQKPNSSG	LDGIPTISRT
AH-3 AscC	451	VVDTIARVGH	GQSLDIGGIY	RDEMSENLSK	VPFLGDIPYL	GALFRSKDTQ
AH-1 AscC	450	VVDTIARVGH	GQSLDIGGIY	RDELSESLSK	VPFLGDIPYL	GALFRSKESQ
AH-3 AscC	501	TRRSVRLFII	EPRLIDGIA	HYLSLGNQD	LRARVLGVDE	ISNQSLSLGK
AH-1 AscC	500	TRRQVRLFII	EPRLIDGIA	HYLSLGHGQD	LRAGVLGVDE	ISNQSLSLGK
AH-3 AscC	551	VLGGAQCQPL	AAARDVQQLL	RQGGKSSSLT	QCRMNELGW	RLVEMNKDQK
AH-1 AscC	550	VLGGAQCQPL	AAAREVQQLM	RQGGKSSSLT	QCRMNELGW	RLVEMGKAQK
AH-3 AscC	601	CTPAASWCVQ	AGNEGATR			
AH-1 AscC	600	CTPALTWCVQ	AGEAR---			

3.2.3.7 ORF30: Unidad formadora de la aguja

La proteína codificada por la ORF 30 fue denominada YscF, dada su similitud con otras proteínas como PscF de *P. aeruginosa* o YscF de *Yersinia* spp.

Las estructuras en forma de aguja de *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* y *Pseudomonas* están compuestas básicamente por una única proteína (YscF, PgrI, MxiH, EscF y PscF, respectivamente) que polimeriza en forma de tubo, aunque no se puede descartar la presencia de otras proteínas minoritarias. El nivel de identidad de estas proteínas no es alto (20-30%), pero todas ellas son pequeñas (7-10 kDa), de carga neutra, y con una estructura mayoritariamente en hélice α (Davis and Meccas, 2007). Aunque existen proteínas homólogas a YscF en todos los T3SS de patógenos animales, ésta no se encuentra en fitopatógenos, ya que estos poseen una estructura en forma de *pilus* con características diferenciables respecto a la estructura en forma de aguja.

En el caso de la unidad formadora de la aguja de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, la proteína indentificada como YscF por similitud genética, se encuentra dentro del rango de tamaño de esta familia de proteínas (9,62 y 9,02 kDa, respectivamente), presentando un pI de aproximadamente 6,5.

3.2.3.8 ORF29 y ORF31: Complejo chaperona de la subunidad formadora de la aguja

El nombre de las proteínas codificadas por las ORF 29 y 31 es AscE y AscG, y sus equivalentes en *Yersinia* spp. se denominan YscE e YscG, respectivamente.

YscG es una proteína pequeña (13kDa) y ácida (pI 6.3), probablemente localizada en el citoplasma o en la periferia citoplasmática de la membrana interna, que posee muchas de las características típicamente asociadas a las chaperonas de tipo III, incluyendo la presencia potencial de una hélice α anfipática en la región C-terminal. No obstante, la similitud de YscG con otras chaperonas de tipo III es limitada a nivel de secuencia aminoacídica (Day *et al.*, 2000). Gracias al uso de sistema de dos-híbridos, se demostró que YscG reconoce y une específicamente a la proteína YscE, codificada por un gen cercano a *yscG*. Generalmente, las proteínas reconocidas por chaperonas de tipo III se secretan; sin embargo, YscE es una proteína citoplasmática o periférica de membrana interna y no es transportada al exterior celular. Se ha demostrado que la mutación de cualquiera de los dos genes, *yscG* o *yscE*, anula la secreción de efectores en *Yersinia* spp. Por otro lado, en *P. aeruginosa* se ha descrito que el componente de la aguja, PscF, es atrapado en el citoplasma por un complejo de dos pequeñas proteínas, PscG y PscE, componentes ortólogos a YscG e YscE (Quinaud *et al.*, 2005). De hecho, parece existir un proceso similar en *Yersinia* spp. (Cornelis, 2006). Por lo tanto, las proteínas YscG e YscE parecen estar implicadas en la formación de un complejo 1:1:1 con YscF, subunidad formadora de la aguja, actuando como chaperona que probablemente tendría la función de evitar una asociación prematura de subunidades YscF y ayudar a dirigir las hacia el canal de exportación (Cornelis, 2006).

La predicción de la localización subcelular de las proteínas AscG y AscE de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3 indica que probablemente se trata de proteínas citoplasmáticas. Además, son proteínas pequeñas (13 y 7,5 kDa, respectivamente) y ácidas (pI $\leq 5,5$), características típicas de las chaperonas de tipo III.

3.2.3.9 ORF7: Reconocimiento de sustratos de secreción

La proteína codificada por la ORF 7 se denominó AscO. Todavía no se conoce la posible función de YscO, su equivalente en *Yersinia* spp, ni tampoco de proteínas similares en otras bacterias. No obstante, estudios realizados en *Y. pestis* por Payne y colaboradores demostraron que la mutación de este componente anula la secreción de translocadores y efectores, y propusieron que YscO podría funcionar en el reconocimiento de sustratos de secreción (Payne and Straley, 1998). También describieron que YscO se podía encontrar en el citoplasma, en la periferia de la membrana interna, en condiciones desfavorables para la secreción; o en el medio externo, en condiciones favorables para la secreción. En base a estas observaciones,

estos autores sugieren que YscO podría formar parte de un componente móvil y dinámico del T3SS, cuya función estaría directamente relacionada con el paso de sustratos de secreción desde el citoplasma hasta la parte de la maquinaria de tipo III embebida en la membrana interna.

La predicción de la localización subcelular de la proteína AscO en *A. hydrophila* AH-1 y AH-3 indica que probablemente se trata de una proteína citoplasmática.

3.2.3.10 ORF9, ORF10, ORF11 y ORF26: Válvula AopN de regulación de la secreción

Los productos codificados por las ORF 9, 10, 11 y 26 fueron denominados AopN, Acr1, Acr2 y AscB, siendo las proteínas correspondientes en *Yersinia* spp. YopN, TyeA, SycN e YscB, respectivamente.

En *Yersinia* spp. la regulación de la secreción de tipo III depende de la expresión de la proteína de secreción YopN, y de las proteínas citoplasmáticas TyeA, SycN, YscB y LcrG (ORF 16, apartado 3.2.3.11). La mutación de cualquiera de los componentes anteriores, da lugar a un fenotipo de secreción constitutiva (Day *et al.*, 2003). SycN e YscB son chaperonas de tipo III que interaccionan la una con la otra formando un heterodímero que une el extremo N-terminal de YopN. El complejo SycN/YscB es necesario para una expresión estable de YopN y para su secreción eficiente (Day and Plano, 1998). TyeA es una proteína citoplasmática que se une al extremo C-terminal de YopN, inhibiendo la secreción de ésta (Day *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha resuelto la estructura cristalográfica de los complejos YopN/SycN/YscB y YopN/TyeA, respectivamente (Schubot *et al.*, 2005). Los autores de este estudio proponen que el dominio central de YopN actúa como regla molecular que extiende la estructura del complejo cuaternario de tal manera que permite que sus extremos, YopN/SycN/YscB y YopN/TyeA, interactúen con lugares de unión equidistantes en el T3SA. Esto permitiría el correcto emplazamiento de este complejo, constituyendo una válvula interna de bloqueo del T3SA. De esta manera, se cree que la chaperona heterodimérica SycN/YscB dirigiría al complejo YopN/TyeA hacia el T3SA, iniciando su secreción. Sin embargo, en condiciones desfavorables para la secreción, este proceso no podría completarse, probablemente debido a un cambio conformacional de YopN, asociado con su desplegamiento y/o su secreción parcial, y permitiendo que el complejo YopN/TyeA interaccionara con una segunda zona del T3SA, bloqueándolo.

En condiciones favorables para la secreción, una señal desconocida permitiría un cambio de conformación de la cara citoplasmática del T3SA, resultando en la finalización de la interacción de éste con complejo el YopN/TyeA. Finalmente, la disociación del complejo YopN/TyeA permitiría el transporte de YopN y, en consecuencia, de otros sustratos de secreción. De hecho, la proteína YopN es translocada al interior de la célula huésped, aunque no está claro si además de su función reguladora podría tener una función efectora (Cheng *et al.*, 2001, Ferracci *et al.*, 2005). Cabe destacar que, algunos estudios iniciales defienden que la función de YopN como válvula de bloqueo de la secreción se daría en la superficie extracelular del T3SA y no se la cara citoplasmática (Cheng and Schneewind, 2000).

La predicción de la localización subcelular de la proteína AopN de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* sitúa a este componente en la membrana externa, mientras que las proteínas Acr1, Acr2 y AscB probablemente se localicen en el citoplasma bacteriano. Además, tanto Acr1 como Acr2 y AscB son proteínas pequeñas (tamaño < 16 kDa) y acídicas (pI < 6) (tablas 3.2 y 3.3), características que definen a las chaperonas de tipo III. Por otro lado, en ambas cepas, la proteína AopN presenta una región central de aproximadamente 200 aminoácidos conservada en muchas de las proteínas de la familia YopN; la proteína Acr1 parece presentar un dominio TyeA, compuesto por dos hélices α paralelas, y siendo los aminoácidos hidrofóbicos de estas hélices los encargados de mediar la interacción con YopN; la proteína Acr2 no presenta ningún dominio típico; por último, la proteína AscB presenta un dominio CesT, típico en la familia de chaperonas de tipo III (figura 3.8).

Figura 3.8 Región central conservada de la proteína AopN (A), dominio TyeA de la proteína Acr1 (B), dominio CesT de AscB (C) de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3. Todos los dominios se muestran en negrita y fondo gris.

A

AH-3 AopN	1	MAIIQSNPYA	PVAQPESRGA	EVASRQAPLP	GGQFQGERVV	LASASQSLAD
AH-1 AopN	1	MAIIQSNPYL	SAAQPEGRAA	EEVSRQPALQ	RGQFQGERVV	LVPASQSLAD
AH-3 AopN	51	MA EELTFVFS	ERKELSLDKR	KLSDSHARIS	EIEALVGDYL	DKVPELERQQ
AH-1 AopN	51	AA EELTFAFS	ERAELSLSKR	KLSDSHARIS	EIEALVGEYL	DKVPELERQQ
AH-3 AopN	101	KIKEMVSHLG	SGRLANLSQL	LAYLESYSGE	VSEQFDALCQ	ARKALSGRPE
AH-1 AopN	101	KIKEMVSHLG	SGRLANLSQL	LAYLESYSGE	VSEQFEALYQ	ARTILAGRPE
AH-3 AopN	151	MQGTLALVEQ	ALAKLADEQG	SAIVLGARIS	GPAAEAARAG	VGGEQDLRDL
AH-1 AopN	151	MQGTLNLIEQ	ALAKLADEQG	TAIVLGARIT	GPAAEAARQG	VGSEQALRDL
AH-3 AopN	201	YRDAVQDYRA	LSTAWRDIHS	RF GNNGALEKV	TGFMMKALSA	DLDSQQRWLD
AH-1 AopN	201	YRDAVQDYRA	LSSAWRDIHH	RF GNNGSLEKV	TGFMMKALSA	DLDSQQRWLD
AH-3 AopN	251	PVKLERVMSD	MHKLRLLNLT	SAQVDELWQR	VKEGSAHGIR	AF
AH-1 AopN	251	PVKLERVMSD	MHKLRLLNLT	SAQVDELWQR	VKEGAAHGIR	AF

B

AH-3 Acr1	1	MAYGPSDLMG	DLIALVEKRW	ASVRDVEQVG	AAELSESERQ	QVLLYQELKR
AH-1 Acr1	1	MAYGPSDLMG	DLIALVEKRW	ATVRDVEQVG	SALELADTRQ	QVQLYQELKR
AH-3 Acr1	51	LIRLLPVLELF	SEEDQRONLL	LCCQGALDNA	IEREEDEL	ESG ESS
AH-1 Acr1	51	LIRLLPIELF	SEEEQRONLL	QCCQGALDNA	IEREEDEL	ESG DPS

C

AH-3 AscB	1	MQTLLNRLAA	TLGQGPVAD	AQGYHLRLD	GYPLFLTQRS	GELLSTPLA
AH-1 AscB	1	MQNLLNRLAE	KLGGQPFVAD	VQGYHLRLD	GYPLFLLPRH	NELLSTPLA
AH-3 AscB	51	SSGTNAAADT	DPVLLKRLQ	QVVAWGRHTP	HALVDELGN	LQLEARLALE
AH-1 AscB	51	SAVMSEKSL	DPALLKRLQ	QVVAWGRHAP	QALTDELGN	LQLEARLELD
AH-3 AscB	101	WLDEQLLAER	LSQHIALLEQ	LEPQLTEAAL	APQWRQMIWH	P
AH-1 AscB	101	GLDEHQLEVF	LSQHITLLER	LEPQLNEAAL	APEWRQMIWH	P

3.2.3.11 ORF15, ORF16, ORF17, ORF18, ORF19 Y ORF20: Válvula AcrG de regulación de la secreción y formación del complejo de translocación

Los productos codificados por las ORF 15, 16, 17, 18, 19 y 20, se denominaron AcrR, AcrG, AcrV, AcrH, AopB y AopD, siendo las proteínas equivalentes en *Yersinia* spp. LcrR, LcrG, LcrV, LcrH, YopB y YopD, respectivamente.

Tal y como sucede con el complejo YopN/TyeA, la proteína citoplasmática LcrG es un regulador negativo de la secreción, actuando como válvula de bloqueo en la cara citoplasmática del T3SA, función regulada a su vez por otra proteína, LcrV (Hueck, 1998). Lawton y colaboradores propusieron un modelo en el que la afinidad entre estos dos componentes daba lugar a cambios en la regulación del T3SA (Lawton *et al.*, 2002). De esta manera, en condiciones no permisivas para la secreción, LcrG forma un complejo con la cara citoplasmática del T3SA, momento en que los niveles de la proteína LcrV son bajos. Tras la inducción de la secreción, se incrementa la producción de LcrV, predominantemente en forma de homodímero. La elevada afinidad de LcrV por LcrG, da lugar a la disociación del homodímero LcrV y a la asociación de LcrV en forma de monómero a LcrG, formando complejos LcrV/LcrG. Probablemente, la formación de estos complejos produzca cambios conformacionales en la proteína LcrG, finalizando así la interacción entre ésta y el T3SA, y permitiendo su secreción, a la vez que el desbloqueo del canal de secreción.

La predicción de la localización subcelular de las proteínas AcrG y AcrV de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3 indica que probablemente se trata de una proteína citoplasmática y una proteína extracelular, respectivamente. Cabe destacar, que los componentes homólogos a AcrV en otras bacterias también son secretados.

En *Yersinia* spp., se ha propuesto que LcrR actuaría como regulador post-transcripcional de la expresión del gen LcrG, siendo así probable que la secreción constitutiva observada en el mutante en *lcrR* fuera resultado directo de la ausencia de LcrG (Barve and Straley, 1990).

En las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, mediante estudios *in silico* se ha determinado la posible regulación de la agrupación *acrGVH-aopBD* gracias a la localización de un putativo promotor en la región 5' de la misma. No obstante, mediante estudios de RT-PCR, se ha determinado que esta agrupación de genes también está controlada por el promotor situado a 5' del gen *aopN* (apartado 3.2.4). Por lo tanto, podría existir un doble control de la transcripción de la agrupación *acrGVH-aopBD*.

Por otro lado, en *Yersinia* spp., se han descrito tres translocadores: dos proteínas que contienen dominios hidrofóbicos, YopB y YopD, y una proteína hidrofílica, LcrV. YopB y YopD, aunque no LcrV, forman poros en la membrana de eritrocitos infectados con cepas *yopB⁺yopD⁺lcrV⁺* y *yopB⁺yopD⁺lcrV⁻*; sin embargo, tan sólo en el primer caso los poros formados son funcionales, hecho que sugiere que el correcto ensamblaje del poro formado por YopB y YopD en la membrana eucariota requiere la acción de LcrV, observándose un modelo similar en otras bacterias como *S. flexneri* y *P. aeruginosa* (Mota, 2006).

Recientemente, estudios realizados por Mueller y colaboradores, han permitido conocer la localización de la proteína LcrV en el T3SA, encontrándose ésta en el extremo distal de la aguja, tanto en condiciones permisivas como en condiciones no permisivas para la secreción (Mueller *et al.*, 2005). Se ha propuesto que LcrV podría mediar la inserción de la aguja en la membrana de las células eucariotas y ayudar a la formación del poro constituido por las proteínas YopB y YopD. En contraste con esta hipótesis, anteriormente se había sugerido que la aguja del T3SS podría insertarse en la membrana eucariota e inyectar efectores por sí sola, sin la necesidad de la formación de un complejo de translocación (Hoiczyk and Blobel, 2001).

Cabe destacar que se han realizado estudios de complementación de mutantes *lcrV* en *Y. enterocolitica* con algunos genes ortólogos, como *pcrV* de *P. aeruginosa* y *acrV* de *A. salmonicida*, demostrando que sus productos génicos tendrían una función similar a la descrita en *Yersinia* spp. (Mueller *et al.*, 2005). Además, a nivel funcional, el complejo formado por LcrV en la punta de la aguja del T3SA de *Yersinia*, recuerda al

filamento EspA presente en *E. coli* enteropatógenicas, cuya función es formar un puente físico entre la aguja y la membrana eucariota (Mota, 2006).

En las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, la predicción de la localización subcelular de las proteínas AopB y AopD indica que probablemente se trata de proteínas transmembrana. De hecho, la proteína AopD, de igual forma que sucede con otros miembros de la familia YopD, parece presentar un dominio transmembrana, y la proteína AopB tres (figura 3.9). Por otro lado, ambas proteínas presentan mayor variabilidad de secuencia que otros componentes previamente descritos.

Figura 3.9 Dominios transmembrana (negrita y fondo gris) de las proteína AopB (A) y AopD (B) de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3.

A

AH-3 AopB	1	MNPISNERSV	SPLGNIGEVA	GLTPVTQPRS	-ETRLDAATA	QASGPARKSG
AH-1 AopB	1	MHSISSERPL	S-IG--GMQP	PLVEDSKGSS	QATQVAAGDS	HRHVEKHGQG
AH-3 AopB	50	VSLNAPLAVS	NGQLGAEQFA	QVNKLIVTK	G---SVMATL	PHVSALVTAA
AH-1 AopB	48	VVLPQPMPGI	GQQMSPPKQQ	ELDQLRKTAQ	LGTANAARKLL	GSSTLLNKLA
AH-3 AopB	97	FTSPAAFEIE	LGRLTSDLEK	SQNKLKLEDI	KRARDLNEKK	IGENQEKIKE
AH-1 AopB	98	FASPEEFEIE	LSKMTSELEQ	TQKKLKLADL	ERIRAENLKK	IDENQTKMKE
AH-3 AopB	147	AEESAKEAKK	AGIFGK IFGW	LSAIASVVIG	AIMVATGVGA	VAGALMIAAG
AH-1 AopB	148	ASEAADKAKK	SGLASK IFGW	ISAIASMVIG	AILIATGVGA	AVGAMMIVGG
AH-3 AopB	197	VVGMVSMVQ	HAA DAGLISK	EVMEKLG PAL	MG IEIALAAL	SLVASFGSSI
AH-1 AopB	198	AVGVANMAIQ	QAA ADGRISP	ETMKVLGP IM	IAAEILVAIV	SIAVTFGASA
AH-3 AopB	247	GTLIS KVATK	IGGKAVDMAA	KMTAKVAELA	AQFTAKSTVE	ALKVTGAAAK
AH-1 AopB	247	-----	-----	-----	-----	----ASTAMK
AH-3 AopB	297	VLKAGTQATD	VLVDVSGGVT	KTVQSVKESA	SLNAQADLAL	NKSEMTQLQG
AH-1 AopB	254	AVKFATQAAD	LVVDIGTGTA	KAVDGGQLQAD	AQIKQANLLE	NRQVMTELQG
AH-3 AopB	347	VIDKLKEAIA	QMIEAFQQTM	EMIFQIINAR	GDMNNLARR	PAAI
AH-1 AopB	304	VMDKLKEVLS	QMTESFQQVM	EMIFQMITAK	GAMLNSLASR	PTAI

B

AH-3 AopD	1	MPTMINSDYA	NSVTQTVPLT	NVLSSDVQPV	RTQGTNHEAA	GTINSQMPGK
AH-1 AopD	1	MNNINPNNHI	PGNTYVAPAD	GQGVESKEGL	TGQGTAEHPG	HKTVHTAPQR
AH-3 AopD	51	TGVPVLRPRS	IPFDTKGVTQ	IVGQLESSMD	MMSLLFQIAR	QAREEGIQLR
AH-1 AopD	51	QALPELIGPR	QGLDSSLLSK	GGSELDNVLS	IMSLLFEMAR	KAREMGLLQR
AH-3 AopD	101	DIENKLVISH	QQAQVDEMNR	GAK LMIVMAV	VSGVMAGVSA	LMGGFSLAKS
AH-1 AopD	101	DMENQAVIAA	QKDQVSEMRH	GAN LMIAMAV	VSGVMTVASA	VMGGFSLSKS
AH-3 AopD	151	TKAIKQDKAL	NANIAGRQQD	LKQVGDIIKA	AGLEMGDAGQ	DLTARIKNDK
AH-1 AopD	151	AKAIKQDKAL	NANMAGREKD	LQKMADVKKK	TGQEMGDAGQ	ELMTRNQHDK
AH-3 AopD	201	AALQTLNKTF	DTNNSRQQIF	NTVIQSLGQA	GNSAVQVAQG	DSQADAKEDE
AH-1 AopD	201	AALKTLNKKF	EANNARQQLA	GTVLQGS AQM	GNSSTQVFQG	YSQANAKEDE
AH-3 AopD	251	VNASISQTEK	QKAEDYLSFM	QNLMN DLVKI	MQQYSQSQNQ	TLKAAFVGA
AH-1 AopD	251	VRSSIAQTQK	QKVEDLMNFN	NNFMKDV LQM	MQQYAQSHNQ	AMRAAFVGA

La proteína LcrH de *Yersinia* spp., también conocida como SycD, es una chaperona que se encarga de la estabilización y la secreción eficiente de los translocadores YopB y YopD. YopD posee dos dominios de unión a LcrH, situados en ambos extremos de la

proteína, sin embargo, no se ha detectado ningún dominio de unión a LcrH en la proteína YopB (Bröms *et al.*, 2005). Probablemente, la asociación de YopD con LcrH evita su degradación y/o asociación prematura con YopB y LcrV (Büttner and Bonas, 2002), a la vez que permite la neutralización de un componente tóxico para la célula bacteriana, YopD (Cornelis, 2006). Por otro lado, el complejo YopD/LcrH parece estar implicado en la regulación de la expresión génica, reprimiendo la síntesis de sustratos destinados a la secreción mediante un mecanismo post-transcripcional que implica su unión directa con determinadas regiones del ARNm (Anderson *et al.*, 2002), hecho que concuerda con el fenotipo de síntesis y acumulación de sustratos de secreción, en condiciones no permisivas, en los mutantes en *lcrH* y *yopD*. Esta observación es lógica si se tiene en cuenta que la liberación de la chaperona de los translocadores, LcrH, podría constituir un sistema de alarma para la bacteria, señalizando que el poro translocador se ha formado y que el inyectisoma es completamente funcional. Finalmente, Francis y colaboradores demostraron que LcrH se une a otra proteína, YscY (ORF13), probablemente tras la secreción de YscX (ORF12, apartado 3.2.3.12). Este hecho sugiere algún tipo de conexión entre la represión traduccional de los sustratos de secreción y su secreción. Es probable que, tras la inducción del T3SS, la secreción de YscX permita un incremento del *pool* de YscY libre en citoplasma y la consecuente asociación de ésta con LcrH, previniendo la formación del complejo LcrH/YopD y evitando así la represión traduccional que éste impone a los transcritos de los sustratos de secreción (Francis *et al.*, 2001).

La proteína AcrH de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* presenta las dos características típicas de las chaperonas de tipo III, ya que se trata de una proteína pequeña (tamaño < 19 kDa) y ácida (pI < 4,5) (tablas 3.2 y 3.3). La predicción de dominios en la misma, indica que en la cepa AH-1 esta proteína presenta una repetición tetratricopéptido, mientras que en la cepa AH-3 presenta dos (figura 3.10). Las repeticiones tetratricopéptido (TPR, del inglés *Tetratricopeptide Repeats*), son secuencias de aproximadamente 34 aminoácidos que a menudo se disponen en tándem, dando lugar a una estructura secundaria en forma de hélice α , y parecen estar relacionadas con la unión a otras proteínas (Pallen *et al.*, 2003). De hecho, parece ser que la alteración de estos dominios en la proteína homóloga en *Yersinia* spp., LcrH, afecta a su función (Edqvist *et al.*, 2006).

Figura 3.10 Motivos TPR (negrita y fondo gris) de la proteína AcrH de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3.

AH-3 AcrH	1	MQTDTTLTPE	YDAELEAFMA	DGGTLAMLQD	ISSDT LEQLY	SLAFGQYQAG
AH-1 AcrH	1	MEHD--MTQV	NEPAIEAFLQ	DGGTLAMLND	VSTDT LEQLY	TLGFNQYHAG
AH-3 AcrH	51	KWEDAHKIFQ	ALCMLDHYQP	RYFLGLGACR	QAMGEFETAV	QSYSFGAML
AH-1 AcrH	49	KHDEAHKIFQ	ALCVLDHYEA	RFFLGLGACR	QALGQFRLAI	DSYSYGAMMD
AH-3 AcrH	101	LKD PRFPFHA	AECRLQQGDL	NGAESGFHSA	HLLADADPLQ	ADLATSAKVM
AH-1 AcrH	99	LQEPFPFRA	AECLLQLGEL	EGAESGFHSA	QLLAAAKPEL	AELAARAGIM
AH-3 AcrH	151	LEAVAIRRDL	QDEPDQQ			
AH-1 AcrH	149	LEVVKTKKDM	EHAFDKQ			

3.2.3.12 ORF12 y ORF13: Formación de un T3SA competente

Los productos codificados por la ORF 12 y la ORF 13 se denominaron AscX y AscY, por su similitud con las proteínas de *Yersinia* spp. YscX e YscY, respectivamente.

YscX es un componente citoplasmático del T3SS de *Yersinia* spp. que parece ser secretado, aunque hasta el momento, no se ha descrito su función exacta. Existen hipótesis que defienden que la secreción de YscX podría contribuir a la activación del proceso de secreción por medio de la eliminación esencial de un componente del aparato, dando lugar a un T3SA funcional, o bien a través de la eliminación de un exceso de YscX en el citoplasma bacteriano. Estas teorías implican la existencia de una jerarquía en el proceso de secreción, en la que el transporte de YscX a través de la maquinaria de tipo III sería necesario para la secreción de otras proteínas (Day and Plano, 2000).

Por otro lado, YscY es una proteína citoplasmática similar en estructura y secuencia aminoacídica a otras chaperonas de tipo III de *Yersinia* spp. De hecho, YscY reconoce y se une específicamente a YscX, contribuyendo a su estabilidad en citoplasma; aunque, a diferencia de otras chaperonas de tipo III, YscY se une a YscX en forma de monómero y no de homodímero (Day and Plano, 2000). Cabe destacar que la mutagénesis de cualquiera de estos dos componentes, da lugar a la pérdida de la función secretora.

La proteína AscY de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* presenta las dos características típicas de las chaperonas de tipo III, ya que se trata de una proteína pequeña (tamaño < 13 kDa) y ácida (pI < 6) (tablas 3.2 y 3.3). La predicción de dominios en la misma indica que, tanto en la cepa AH-1 como en la cepa AH-3, esta proteína presenta una repetición tetratricopéptido (figura 3.11). La búsqueda de dominios de la proteína AscX ratificó la pertenencia de esta proteína a la familia YscX.

Figura 3.11 Motivo TPR (negrita y fondo gris) de la proteína AscY de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3.

AH-3 AscY	1	MTMVLSSQQQ	DALLLTGWLQ	LQYGHPRAC	VLLLALLLIH	PSHQQRRTL
AH-1 AscY	1	MTMTLSSQQQ	DLLLLTGWLH	LQYGHPRAR	TLLTALLQLH	PGHESGRRTL
AH-3 AscY	51	LVALLKQEGE	EAALAHVDQL	MLEREAD	GPL WLCRSRACQL	AGRLDEARFA
AH-1 AscY	51	LVALLKLRG	EEALAHVDHL	VSEGVTD	EAL WLCRSRACQL	AGRLDEARFA
AH-3 AscY	101	YQOYLELEEQ	NESTFP			
AH-1 AscY	101	YQOYLELEEQ	NESTHP			

3.2.3.13 ORF32: Putativo factor de virulencia

El producto codificado por la ORF 32 se denominó AscH y su equivalente en *Yersinia* se conoce como YscH o YopR.

Allaoui y colaboradores describieron que el mutante *yscH* de *Y. enterocolitica* secretaba todos sus efectores característicos a excepción de una proteína de 18 kDa denominada YopR, y demostraron que dicha proteína estaba codificada por el gen *yscH*. Además, este mutante presentaba una DL₅₀ diez veces superior a la de la cepa parental (Allaoui *et al.*, 1995b). YopR es probablemente uno de los factores de virulencia secretados por el T3SS de *Yersinia* spp. menos estudiados. Hasta el momento, no se ha descrito ninguna actividad enzimática, papel en regulación u otra función para esta proteína (Schubot *et al.*, 2005). No obstante, estudios *in vivo* realizados por Lee y colaboradores demostraron que YopR no es translocada al interior de células huésped sino secretada al medio extracelular. Esto, junto con la disminución de la virulencia del mutante *yopR*, les llevó a proponer que podría ser secretada al medio con el objetivo de desviar las defensas del huésped del sitio real de infección (Lee and Schneewind, 1999).

La predicción de la localización subcelular de AscH de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* indica que podría tratarse de proteínas citoplasmáticas. Además, ambas presentan un dominio YopR-*core* que cubre prácticamente la totalidad de la secuencia aminoacídica (figura 3.12).

Figura 3.12 Motivo YopR-*core* (negrita y fondo gris) de la proteína AscH de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*.

AH-3 AscH	1	MRIEGGEP--	-SGQPPTQPL	PPPEPIAQRQ	FDRLLTKAPE	PDLFERWQQG
AH-1 AscH	1	MKIEGSEHPP	RSGFADTEPL	PRQQ--IQHQ	FERLLAKADE	PTLFSRWQQG
AH-3 AscH	48	VPLDGLLANA	APSARRELLW	QVYQQGDKRQ	AEIGKQLFEP	VTNKLTERFG
AH-1 AscH	49	AGLETLLIGA	SPSAQRDLLW	QIHQQGGEHA	QAVGKRLFQP	VTDKLVAFHS
AH-3 AscH	98	GRQLPVVAAI	DQLELRALMR	EFDPLASRRE	AVLLDLLSKL	KGEQCVVPPG
AH-1 AscH	99	GRQLPVVAAI	DQPELRALMR	EFDPLSSRRE	TVLLNVMADI	KKAANGTQVD
AH-3 AscH	148	HEFLDALARR	ELMTLIPQNG	MVTNLMRHS	KLDLE	D
AH-1 AscH	149	LAYLEELARR	ELMTLIPLNG	VVNNLIRHS	KLDLE	A

3.2.3.14 ORF21, ORF22, ORF23, ORF24 y ORF25: Cascada de regulación transcripcional específica de T3SS

El nombre de las proteínas codificadas por las ORF 21, 22, 23, 24 y 25 es AxsC/HscY, AxsE/AxsE, AxsB/AscW, AxsA/AscA y AxsD/AscZ en las cepas AH-3/AH-1 de *A. hydrophila*, siendo éstas homólogas a las proteínas ExsC, ExsE, ExsB, ExsA y ExsD de *P. aeruginosa*.

La proteína ExsA es el activador transcripcional específico que controla la expresión de los diferentes operones de la agrupación génica del T3SS y también de los genes que codifican los diversos efectores en *P. aeruginosa*. La agrupación génica del T3SS y los genes que codifican los efectores presentan una localización génica diferente, y el control ejercido por ExsA constituye una vía de corregulación. ExsA es un miembro de la familia de activadores transcripcionales AraC y se une a la secuencia consenso TNAANA, situada aproximadamente a 50-pb del inicio de transcripción (Hovey and Frank, 1995).

La mayoría de las proteínas de tipo AraC de T3SS parecen estar reguladas por proteínas ligando. De esta manera, la proteína ExsD, mediante la formación de un heterodímero con ExsA, actúa como regulador negativo de la actividad de ésta, es decir, como antiactivador (Yahr y Wolfgang, 2006). No obstante, ExsD es capaz de formar un segundo heterodímero con otra proteína, ExsC, liberando así de su antiactivación a ExsA. Por lo tanto, la proteína ExsC se clasifica como un anti-antiactivador. Finalmente, ExsC presenta afinidad por una última proteína, ExsE, que funcionaría como anti-anti-antiactivador. En el modelo de regulación mediado por estas cuatro proteínas, en condiciones desfavorables para la secreción, la proteína ExsE se acumularía en el citoplasma bacteriano, secuestrando a ExsC, dejando ésta libre a su vez a ExsD, que se uniría a ExsA, inhibiendo la transcripción (figura 3.13). En condiciones favorables para la secreción, la apertura del canal de secreción conllevaría la liberación masiva de ExsE, de tal manera que ExsC quedaría libre, secuestrando a ExsD, hecho que liberaría a ExsA, permitiendo la activación de la transcripción (Yahr and Wolfgang, 2006). De esta manera, la cascada anterior constituye un mecanismo de corregulación de la expresión génica y la secreción del T3SS.

Finalmente, en *P. aeruginosa*, basándose en el uso de codones, se propuso que el gen *exsB* codificaba una proteína con un peso molecular de 15 kDa (Frank and Iglewski,

1991). Más tarde, Allaoui y colaboradores publicaron la secuencia de una lipoproteína de *Y. enterocolitica*, VirG (también conocida como YscW), que presentaba similitud con la secuencia de la putativa proteína ExsB. Además, mediante mutagénesis, demostraron que VirG estaba implicada en el proceso de secreción, encontrando una disminución del transporte de translocadores en mutantes de este gen (Allaoui *et al.*, 1995a). De hecho, se ha descrito que YscW es una lipoproteína que se sitúa en membrana externa, y permite la oligomerización y localización de la secretina de tipo III, YscC. Aunque estos datos podrían implicar una función similar para ExsB en *P. aeruginosa*, Goranson y colaboradores proponen que *exsB* no codifica una proteína e hipotetizan que el ARN de *exsB* podría mediar algún tipo de función reguladora, estabilizando el ARN de *exsA* o favoreciendo su traducción, probablemente mediante la formación de una estructura adecuada del ARN (Goranson *et al.*, 1997).

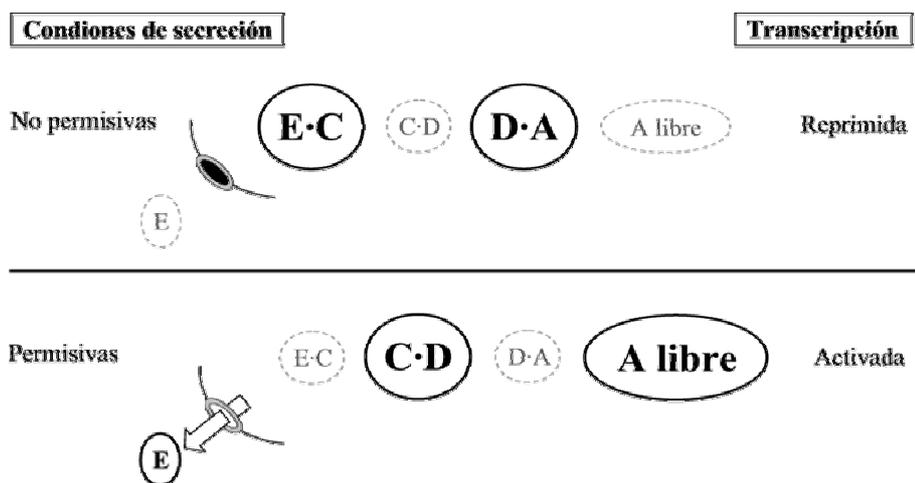


Figura 3.13 Esquema del modelo de corregulación de la expresión y la secreción del T3SS en *P. aeruginosa*.

La búsqueda de la secuencia consenso de unión a la proteína AxsA/AscA de *A. hydrophila* AH-3/AH-1 en las secuencias nucleotídicas de la agrupación génica del T3SS de ambas cepas, permitió localizar dicha secuencia en todos los putativos promotores, a excepción del predicho para la agrupación *acrG-aopD* (Anexos 7.2 y 7.3). Además, la predicción de motivos en dichas proteínas muestra un dominio de unión a ligando tipo AraC en el extremo N-terminal y dos motivos hélice-vuelta-hélice tipo AraC (HTH, del inglés *Helix-Turn-Helix*) en el extremo C-terminal (figura 3.14). Muchos reguladores transcripcionales bacterianos se unen al ADN mediante motivos HTH. Aunque las proteínas que presentan estos motivos varían en longitud de secuencia, el motivo HTH se localiza frecuentemente en el extremo C-terminal de la

proteína, tal y como sucede en el caso de la proteína AxsA/AscA. La longitud mínima del dominio de unión al ADN se extiende aproximadamente unos 100 residuos y comprende dos subdominios HTH: un motivo HTH clásico y otro motivo HTH, similar al clásico, pero con la inserción de un residuo en la vuelta.

Por otro lado, la predicción de motivos característicos en las restantes ORF mencionadas muestra que la proteína AxsC/HscY presenta un motivo CesT, típico de algunas chaperonas de tipo III, y que la proteína AxsB/AscW presenta un dominio YscW. No se encontraron dominios característicos en las proteínas AxsE/AxsE y AxsD/AscZ.

Figura 3.14 Dominio de unión a ligando y motivos HTH de la proteína AxsA/AscA (A), dominio CesT de AxsC/HscY (B), dominio YscW de AxsB/AscW (C) de *A. hydrophila* AH-3/AH-1. Todos los dominios, a excepción de HTH (fondo gris oscuro y letras blancas), se indican en negrita y fondo gris.

A

AH-3 AxsA	1	MNGITTA EGK	DMALL QWCMS	AFNVIEHP QE	GIYILLEGSI	TWQDCTDT YE
AH-1 AscA	1	MKGITTT EGK	DIAQL QWCMS	AFNVIEHT QE	GIYILLEGSM	TWQDCTDT YE
AH-3 AxsA	51	LTPNQL LFVR	RGNYAVCT AG	SPCRLLW LPL	SNSFLQ GFLO	RFGSLL SEVA
AH-1 AscA	51	LSANELM FVR	RGNYAVCT GE	APCHLLW LPL	SNF FLQGFLO	RFGSLL SDVP
AH-3 AxsA	101	RLEGM AP TL	PFHSS PL L TQ	CIQGLYGL ID	HEHPPAL AQ L	RTEELL FL LA
AH-1 AscA	101	RIDAM AP SL	PF CAS PL L T Q	CIQGLRGL TE	HE Y PPAL AQ L	RTEELL FL LA
AH-3 AxsA	151	FG EQ GP Q LMS	ILRQLSNR QV	ERL Q Q F MEKH	YLM E W K LSEF	SKE F GM L TT
AH-1 AscA	151	FG ES GP Q LMS	ILRQLSNR QV	ERL Q H F MEKH	YLM E W K LSEF	AK E FGM L TT
AH-3 AxsA	201	FKELFGSI Y G	VSPRAWIS ER	RIL F AH Q LL	NSPSSIV D IA	MEAGFSS Q SY
AH-1 AscA	201	FKELFGSI Y G	VSPRAWIS ER	RIL F AH Q LL	NSEMSIV D IA	MEAGFSS Q SY
AH-3 AxsA	251	FTQSYRRR F G	CTPSRAR H GT	D		
AH-1 AscA	251	FTQSYRRR F G	CTPSRAR H GK	D		

B

AH-3 AxsC	1	MDVTVI IN RL	LTEFATKY GL	PSLTLN Q EGV	AALCFDE Q LQ	LSLILV S ERD
AH-1 HscY	1	MDLTLT IN QL	FAEFATKY GL	PSLALN Q EGV	AALCFDD Q LK	LGLILV P ERD
AH-3 AxsC	51	QLVL Q AD V AE	LHQVGE G IFR	QLASFN R HWY	QFNLH F GFDE	ESLTV Q LYR Q
AH-1 HscY	51	HLVL Q VD V AE	LHQVGE G IFR	QLASFN R HWY	QFNLH F GFDD	ESLTV Q LYR Q
AH-3 AxsC	101	MTASRL T LAY	LEESL A S M LE	HA E FW Q ELLQ	PGTRDAG G SD	QVMG V RV
AH-1 HscY	101	MSAS Q LTLTA	LEESL A S M LE	HA E FW Q ELLQ	SRHEVEH G HE	EMRG V RV

C

AH-3 AxsB	1	MRGL L AL M LL	VTLAGCV T TP	ELKPSL Q Q L K	GEVHF P AAL P	RPATVE V AVL
AH-1 AscW	1	MRIWL L AL V LL	TALSGCV T TP	VFKPAL T Q V K	GEVRLAG R L P	F P ARVE V TVL
AH-3 AxsB	51	SVIEGR P LQ V	AATRYEV S ML	PL L FDL R LTP	LQLA E GEI Y V	RARLRF M D S T
AH-1 AscW	51	SVIDGR P LAV	AATEYDV T ML	PLVSEL R LTP	LQ M A E GD L YL	R T RLRF I G S S
AH-3 AxsB	101	V V Q A MS Q Q V	FKVF N GERI I	IQL Q PK H CYP	LC Q	
AH-1 AscW	101	AV Q ASH Q Q V	FKAF N PD G YV	INL Q V R TCYP	LC Q	

3.2.3.15 ORF33: Función desconocida

El nombre de la proteína codificada por la ORF 33 es AscI, e YscI es su ortóloga en *Yersinia* spp.

Hasta el momento, no se ha descrito la función de las proteínas de la familia YscI. Son proteínas hidrofílicas, lo que conlleva una probable localización citoplasmática (Hueck, 1998).

Tabla 3.4 Putativas proteínas del T3SS de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3 y sus homólogas en otras especies bacterianas.

Proteína	Función putativa	Localización	Proteína homóloga	(% I/S AH-3) (% I/S AH-1) ¹	% I/S AH-1/AH-3
AscU	Regulación de la secreción	Membrana interna	AscU <i>Aeromonas salmonicida</i> LscU <i>Photobacterium luminescens</i> YscU <i>Yersinia enterocolitica</i>	(94/98) (93/97) (76/88) (79/89) (68/72) (73/87)	92/97
AscT	Aparato de secreción de tipo III	Membrana interna	AscT <i>Aeromonas salmonicida</i> LscT <i>Photobacterium luminescens</i> PscT <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(91/94) (88/94) (75/86) (75/86) (73/88) (76/90)	90/95
AscS	Aparato de secreción de tipo III	Membrana interna	AscS <i>Aeromonas salmonicida</i> LscS <i>Photobacterium luminescens</i> YscS <i>Yersinia enterocolitica</i>	(96/98) (97/98) (82/90) (82/92) (77/89) (77/89)	98/100
AscR	Aparato de secreción de tipo III	Membrana interna	AscR <i>Aeromonas salmonicida</i> PscR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LscR <i>Photobacterium luminescens</i>	(99/99) (98/99) (87/96) (87/95) (87/95) (87/95)	97/99
AscQ	Complejo ATPasa	Citoplasma	AscQ <i>Aeromonas salmonicida</i> YscQ <i>Yersinia enterocolitica</i> LscQ <i>Photobacterium luminescens</i>	(85/89) (74/82) (48/64) (45/61) (51/62) (48/60)	73/81
AscP	Regulación de la secreción	Secretada	AscP <i>Aeromonas salmonicida</i> LscP <i>Photobacterium luminescens</i> PscP <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(79/90) (52/67) (46/64) (40/58) (36/56) (35/53)	35/50
AscO	Regulación de la secreción	Secretada	AscO <i>Aeromonas salmonicida</i> PscO <i>Pseudomonas aeruginosa</i> YscO <i>Yersinia enterocolitica</i>	(92/96) (81/87) (48/64) (46/60) (46/63) (48/63)	80/87
AscN	ATP sintasa	Citoplasma	AscN <i>Aeromonas salmonicida</i> LscN <i>Photobacterium luminescens</i> YscN <i>Yersinia enterocolitica</i>	(97/98) (97/97) (91/95) (91/95) (88/92) (88/91)	97/98
AopN	Regulación de la translocación	Citoplasma / Translocada	AopN <i>Aeromonas salmonicida</i> LopN <i>Photobacterium luminescens</i> PopN <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(93/95) (90/93) (64/77) (69/82) (59/74) (59/74)	88/91
Acr1	Chaperona	Citoplasma	Acr1 <i>Aeromonas salmonicida</i> LssA <i>Photobacterium luminescens</i> TyeA <i>Yersinia enterocolitica</i>	(93/95) (90/94) (70/86) (71/86) (51/70) (54/74)	88/96
Acr2	Chaperona	Citoplasma	Acr2 <i>Aeromonas salmonicida</i> LssN <i>Photobacterium luminescens</i> SycN <i>Yersinia enterocolitica</i>	(92/96) (81/89) (63/77) (63/78) (61/78) (60/75)	83/87
AscX	Aparato de secreción de tipo III	Secretada	AscX <i>Aeromonas salmonicida</i> LssB <i>Photobacterium luminescens</i> LscX <i>Yersinia enterocolitica</i>	(96/97) (80/89) (61/75) (61/74) (53/69) (70/80)	81/90
AscY	Chaperona	Citoplasma	AscY <i>Aeromonas salmonicida</i> YscY <i>Yersinia enterocolitica</i> LssC <i>Photobacterium luminescens</i>	(90/93) (79/84) (53/64) (53/65) (63/72) (63/70)	79/81
AscV	Aparato de secreción de tipo III	Membrana interna	AscV <i>Aeromonas salmonicida</i> LssD <i>Photobacterium luminescens</i> LcrD <i>Yersinia enterocolitica</i>	(97/98) (94/97) (86/91) (86/93) (82/91) (83/91)	94/96
AcrR	Putativo regulador post-transcripcional	Citoplasma	AcrR <i>Aeromonas salmonicida</i> LcrR <i>Yersinia enterocolitica</i> LssR <i>Photobacterium luminescens</i>	(84/89) (56/69) (56/68) (58/74) (55/66) (51/65)	53/66
AcrG	Regulación de la secreción	Citoplasma	AcrG <i>Aeromonas salmonicida</i> LcrG <i>Yersinia enterocolitica</i> PcrG <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(90/94) (43/56) (43/63) (47/63) (44/57) (43/56)	44/59
AcrV	Regulación de la secreción / Aparato translocación	Citoplasma / Extracelular	AcrV <i>Aeromonas salmonicida</i> LcrV <i>Yersinia enterocolitica</i> LssV <i>Photobacterium luminescens</i>	(76/83) (34/52) (38/54) (41/63) (38/50) (42/59)	38/60
AcrH	Chaperona	Citoplasma	AcrH <i>Aeromonas salmonicida</i> LssH <i>Photobacterium luminescens</i> SycD <i>Yersinia enterocolitica</i>	(93/95) (62/79) (71/84) (65/77) (59/78) (67/82)	62/79
AopB	Aparato de translocación	Membrana eucariota	AopB <i>Aeromonas salmonicida</i> YopB <i>Yersinia enterocolitica</i> LopB <i>Photobacterium luminescens</i>	(72/85) (41/57) (45/64) (40/58) (45/65) (43/60)	39/55
AopD	Regulador transcripcional / Aparato de translocación	Citoplasma / Membrana eucariota	AopD <i>Aeromonas salmonicida</i> LopD <i>Photobacterium luminescens</i> YopD <i>Yersinia pestis</i>	(61/74) (46/64) (45/64) (52/70) (43/62) (48/66)	55/74

AxsC/HscY	Regulación transcripcional, "anti-antiactivador"	Citoplasma	ExsC <i>Aeromonas salmonicida</i> LscY <i>Photorhabdus luminescens</i> ExsC <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(91/93) (78/85) (70/80) (67/810) (60/84) (58/81)	79/87
AxsE	Regulación transcripcional "anti-anti-antiactivador"	Citoplasma / Translocada	ExsE <i>Aeromonas salmonicida</i>	(85/89) (55/64)	55/64
AxB/AscW	Chaperona de AscC	¿Lipoproteína de membrana?	ExsB <i>Aeromonas salmonicida</i> LscW <i>Photorhabdus luminescens</i> VirG/YscW <i>Yersinia enterocolitica</i>	(85/90) (64/73) (43/65) (38/57) (38/60) (35/55)	64/78
AxA/ascA	Activación transcripcional	Citoplasma	ExsA <i>Aeromonas salmonicida</i> LscA <i>Photorhabdus luminescens</i> ExsA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(92/94) (89/94) (74/83) (76/83) (65/76) (64/77)	87/93
AxD/AscZ	Regulación transcripcional, "antiactivador axxA"	Citoplasma	ExsD <i>Aeromonas salmonicida</i> LscZ <i>Photorhabdus luminescens</i> ExsD <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(87/91) (69/81) (44/60) (42/56) (36/52) (34/53)	68/81
AscB	Chaperona	Citoplasma	AscB <i>Aeromonas salmonicida</i> LscB <i>Photorhabdus luminescens</i> YscB <i>Yersinia enterocolitica</i>	(87/91) (76/84) (56/68) (54/67) (44/60)(45/64)	76/80
AscC	Secretina	Membrana externa	AscC <i>Aeromonas salmonicida</i> YscC <i>Yersinia enterocolitica</i> LscC <i>Photorhabdus luminescens</i>	(94/96) (90/96) (73/85) (74/86) (69/81) (71/82)	89/95
AscD	Aparato de secreción de tipo III	Membrana interna	AscD <i>Aeromonas salmonicida</i> LscD <i>Photorhabdus luminescens</i> PscD <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(80/88) (74/84) (51/66) (50/67) (49/67) (48/67)	72/83
AscE	Aparato de secreción de tipo III	Citoplasma	AscE <i>Aeromonas salmonicida</i> PscE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> YscE <i>Yersinia enterocolitica</i>	(69/84) (73/86) (48/62) (45/62) (35/60) (40/60)	75/89
AscF	Aparato de secreción (aguja)	Secretada	AscF <i>Aeromonas salmonicida</i> PscF <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LscF <i>Photorhabdus luminescens</i>	(73/84) (75/81) (70/80) (73/85) (70/79) (75/83)	73/84
AscG	Chaperona	Citoplasma	AscG <i>Aeromonas salmonicida</i> YscG <i>Yersinia enterocolitica</i> LscG <i>Photorhabdus luminescens</i>	(84/89) (71/78) (56/67) (52/60) (53/62) (50/62)	76/84
AscH	Desconocida	Secretada	AscH <i>Aeromonas salmonicida</i> LscH <i>Photorhabdus luminescens</i> YscH/YopR <i>Yersinia enterocolitica</i>	(71/79) (58/73) (38/56) (38/52) (38/57) (72/61)	59/71
AscI	Desconocida	Citoplasma	AscI <i>Aeromonas salmonicida</i> PscI <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LscI <i>Photorhabdus luminescens</i>	(91/97) (84/91) (69/83) (66/82) (62/83) (58/80)	81/91
AscJ	Aparato de secreción de tipo III	Membrana externa	AscJ <i>Aeromonas salmonicida</i> PscJ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> YscJ <i>Yersinia enterocolitica</i>	(94/97) (90/95) (76/89) (77/89) (75/84) (76/84)	92/96
AscK	Complejo ATPasa	Citoplasma	AscK <i>Aeromonas salmonicida</i> LscK <i>Photorhabdus luminescens</i> YscK <i>Yersinia pestis</i>	(82/87) (70/75) (52/62) (49/64) (50/66) (48/61)	70/76
AscL	Complejo ATPasa (Regulador negativo AscN)	Citoplasma	AscL <i>Aeromonas salmonicida</i> LscL <i>Photorhabdus luminescens</i> YscL <i>Yersinia pestis</i>	(90/95) (84/90) (73/86) (75/87) (69/84) (70/87)	86/93

¹ % I/S, % identidad/similitud.

Tabla 3.5 Proteínas del T3SS (cuerpo basal) que comparten similitud a nivel de secuencia con proteínas del FT3SS (cuerpo basal).

FT3SS (<i>S. typhimurium</i>)	T3SS		
	<i>Yersinia</i> spp.	<i>A. hydrophila</i> AH-3 <i>A. hydrophila</i> AH-1	Estructura
FliF	YscJ	AscJ	Anillo MS Lipoproteína
FliI	YscN	AscN	ATPasa
FliN/FliM	YscQ	AscQ	Putativo anillo C

FliP	YscR	AscR	Estructura basal Proteína de membrana interna
FliR	YscT	AscT	Estructura basal Proteína de membrana interna
FliB	YscU	AscU	Estructura basal Proteína de membrana interna
FliA	YscV (LcrD)	AscV	Estructura basal Proteína de membrana interna
FliQ	YscS	AscS	Estructura basal Proteína de membrana interna

3.2.4 Unidades transcripcionales de las agrupaciones génicas del T3SS de *A. hydrophila* AH-1 y AH-3

Para confirmar las unidades transcripcionales independientes determinadas *in silico* de la agrupación génica del T3SS de las cepas AH-1 y AH-3 (figura 3.1), se realizaron ensayos de RT-PCR entre diferentes genes de dichas agrupaciones. Para ello, se aisló ARN total, libre de ADN, de ambas cepas y, mediante *random* RT, se sintetizó la primera cadena de ADNc para posteriormente, mediante PCR con cebadores específicos, comprobar las unidades transcripcionales predichas.

3.2.4.1 Unidades transcripcionales de la agrupación génica del T3SS de *A. hydrophila* AH-1

Para la amplificación del transcrito correspondiente a la región *ascN-ascU* se utilizó la pareja de cebadores A1ascUrev y A1ascNfor (5190-pb), localizados en los genes *ascU* y *ascN*, respectivamente. El transcrito de la agrupación *aopN-aopD* se amplificó empleando dos parejas de cebadores: A1aopNfor y A1acrRrev (3708-pb), localizados en *aopN* y *acrR*; y A1acrRfor y A1aopDrev (3252-pb), localizados en *acrR* y *aopD*. La unidad transcripcional formada por los genes *hscY-ascW* se amplificó con los oligonucleótidos A1hscYfor y A1ascWrev (586-pb), situados en *hscY* y *ascW*. Para la amplificación del transcrito correspondiente al conjunto *ascA-ascL*, se emplearon dos parejas de cebadores: A1ascAfor y A1ascDrev (4468-pb), situados en *ascA* y *ascD*; y A1ascDfor y A1ascLrev (3401-pb), localizados en *ascD* y *ascL*. Todas las amplificaciones anteriores fueron positivas, confirmando así que los grupos génicos mencionados se transcribían juntos.

No se obtuvo amplificación en las regiones comprendidas entre los genes *aopD-hscY* y *ascW-ascA*, utilizándose las parejas de oligonucleótidos A1aopDfor y A1hscYrev (782-pb), y A1hscYfor y A1ascArev (1586-pb), respectivamente. Estos resultados indican que dichos genes forman parte de unidades transcripcionales diferentes, confirmando así la hipótesis inicial. Las agrupaciones *ascN-ascU* y *aopN-aopD* poseen diferente sentido de transcripción y, en consecuencia, forman dos unidades transcripcionales distintas.

3.2.4.2 Unidades transcripcionales de la agrupación génica del T3SS de *A. hydrophila* AH-3

Para la amplificación de la región *ascN-ascU* se utilizó la pareja de cebadores Sec-T y Sec-N2 (4790-pb), situados en los genes *ascN* y *ascT*, respectivamente; para la agrupación *aopN-aopD* se emplearon tres parejas de cebadores: Sct-W y Sec-V3 (1775-pb), ubicados en los genes *aopN* y *ascV*; Sct-V y Acr-R (1773-pb), situados en *ascV* y *acrR*; y Sec-V5 y Aop-D (4260-pb), localizados en *acrR* y *aopD*. Para la amplificación de los transcritos comprendidos entre los genes *axsC-axsB*, se emplearon los oligonucleótidos Exs-C y Sec-A2 (913-pb), localizados en *axsC* y *axsB*, respectivamente; y para el conjunto *axsA-ascL*, las parejas Exs-A y Sec-C1 (3628-pb), situados en los genes *axsA* y *ascC*; y Sec-C2 y AH3-J1 (4121-pb), en los genes *ascC* y *ascJ*. Todas las amplificaciones anteriores resultaron positivas, confirmando que dichos grupos génicos se transcriben juntos.

No se obtuvo amplificación en las regiones comprendidas entre los genes *aopD-axsC* y *axsB-axsA*, utilizándose las parejas de oligonucleótidos Sec-B2 y Sec-Y (1124-pb), y A3axsBfor y A3axsArev (837-pb), respectivamente. Estos resultados indican que dichos genes forman parte de unidades transcripcionales diferentes, confirmando así la hipótesis inicial. Las agrupaciones *ascN-ascU* y *aopN-aopD* poseen diferente sentido de transcripción y, en consecuencia, forman dos unidades transcripcionales distintas.

3.2.5 Distribución de los genes del T3SS en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas

3.2.5.1 Obtención de sondas

Una vez obtenidas las secuencias completas de ADN de las agrupaciones génicas de los T3SS en las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, se procedió al análisis de la presencia y distribución de estos sistemas en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas.

Para ello, se prepararon, mediante PCR y utilizando ADN cromosómico de la cepa AH-3, dos sondas de ADN marcadas con digoxigenina, cada una de las cuales hibridaba en uno de los extremos de esta agrupación génica. La primera sonda, situada entre los genes *ascT* y *ascN*, se obtuvo con la pareja de cebadores Sec-T y SecN2 (4790-pb); para la segunda, situada entre *ascC* y *ascJ*, se utilizó la pareja de cebadores Sec-C2 y AH3-J1 (4141-pb).

3.2.5.2 Hibridación de ADN mediante *dot blot*

Las dos sondas anteriores, *ascT-ascN* y *ascC-ascJ*, así como la sonda *ascV* (apartado 3.2.2.1), se utilizaron en un ensayo de *dot blot* con ADN genómico de 182 cepas de *Aeromonas*, tanto clínicas como ambientales, pertenecientes a las especies *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* y *A. jandaei*. Como control positivo se utilizó ADN genómico de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*.

Todas las cepas de *Aeromonas* mesófilas positivas o negativas para una de las sondas también fueron positivas o negativas para el resto de sondas (tabla 3.6). Además, la presencia de genes de T3SS fue menos prevalente en cepas ambientales (con una media del 26% de cepas positivas) que en cepas clínicas (con una media de 56% de cepas positivas). Y, tal y como sucede con otros factores de patogenicidad presentes en cepas clínicas, la presencia del T3SS parece ser más frecuente en *A. veronii* y *A. hydrophila*, con un 80% de cepas positivas, que en *A. caviae*, con únicamente un 13% de cepas positivas.

Tabla 3.6 Distribución de los genes del T3SS en diferentes cepas de *Aeromonas* spp.

Especie	Origen cepa (No. de cepas)	No. (%) de cepas positivas		
		<i>ascN-ascT</i>	<i>ascV</i>	<i>ascC-ascJ</i>
<i>A. hydrophila</i>	Clínica (35)	28 (80)	28 (80)	28 (80)
	Ambiental (25)	4 (16)	4 (16)	4 (16)
<i>A. veronii</i>	Clínica (40)	32 (80)	32 (80)	32 (80)
	Ambiental (20)	9 (45)	9 (45)	9 (45)
<i>A. caviae</i>	Clínica (40)	5 (13)	5 (13)	5 (13)
	Ambiental (20)	4 (20)	4 (20)	4 (20)
<i>A. jandaei</i>	Clínica (2)	1 (50)	1 (50)	1 (50)

3.3 Análisis de la relación T3SS-virulencia en *A. hydrophila*

3.3.1 Construcción de mutantes en los genes *aopB* y *aopD* de *A. hydrophila* AH-1 mediante recombinación homóloga en un punto

Con el fin de determinar si el T3SS de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* era funcional, se construyeron los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD* en los genes *aopB* y *aopD* respectivamente (ORF 19 y 20, apartado 3.2.3.11), cuyos productos probablemente están implicados en la formación de un aparato de translocación, necesario para el correcto funcionamiento del sistema.

Para ello, se amplificaron fragmentos internos de los genes *aopB* y *aopD*, utilizando ADN cromosómico de la cepa AH-1 y las parejas de cebadores *aopB*-F y *aopB*-R (605-pb), y *aopD*-F y *aopD*-R (565-pb), respectivamente. Los productos amplificados se ligaron al vector de clonaje pGEM-T *easy*, y se transformaron a la cepa de *E. coli* XL1-Blue mediante electroporación, seleccionando los transformantes en placas de LB suplementadas con ampicilina, X-Gal e IPTG a una temperatura de incubación de 37°C. En ambos casos, la presencia de inserto en los plásmidos recombinantes se comprobó mediante su extracción y posterior digestión con la endonucleasa *EcoRV*, ya que únicamente los cebadores utilizados contenían esta diana.

A continuación, dichos insertos digeridos con *EcoRV* se ligaron al vector suicida pCM100, previamente digerido con la misma nucleasa y desfosforilado, transformándose mediante electroporación a la cepa de *E. coli* MC1061 (λ 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 extracción del plásmido y digestión con la endonucleasa *EcoRV*.

Finalmente, la obtención de los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD* se realizó mediante conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pCM-*aopB* o pCM-*aopD*, la cepa de *A. hydrophila* AH-1C como receptora 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 colistina y cloranfenicol.

La comprobación de la correcta inserción del vector pCM100 en los genes *aopB* y *aopD* en los transconjugantes seleccionados, se realizó mediante *Southern blot*, empleando ADN genómico digerido con la endonucleasa *EcoRV*, tanto de la cepa

salvaje como de los transconjugantes, y sondas específicas para los genes *aopB* o *aopD*, en función de los transconjugantes analizados. La elección de la diana *EcoRV* obedece a que se halla en el vector pCM100 pero no en los genes *aopB* y *aopD*, 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.

3.3.2 Complementación de los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD* con el cósmido pLA-A1T3SS

El cósmido pLA-A1T3SS mantenido en *E. coli* DH5 α , que contenía la mayor parte de la agrupación génica del T3SS de la cepa AH-1 (*ascU*truncado-*ascL*, figura 3.1), se transfirió a los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD* mediante conjugación triparental. Paralelamente, también se les transfirió el cósmido pLA2917. En ambos casos, se seleccionaron 10 transconjugantes capaces de crecer en placas de TSA suplementadas con tetraciclina y cloranfenicol.

Para comprobar la presencia de los cósmidos pLA2917 y pLA-A1T3SS, se aisló ADN plasmídico de los mismos. Además, el cósmido pLA-A1T3SS se empleó como molde en una PCR con los cebadores *ascV*-F y *ascV*-R, amplificando la banda correspondiente al fragmento del gen *ascV* en el caso de los candidatos positivos.

3.3.3 Caracterización fenotípica de los mutantes en *aopB* y *aopD*

3.3.3.1 Cálculo de la DL₅₀

Con el fin de determinar la implicación del T3SS en la virulencia de *A. hydrophila* AH-1, se procedió a la evaluación de la DL₅₀ de las cepas mutantes, AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*, dichas cepas conteniendo los plásmidos pLA-A1T3SS o pLA-2917, y la cepa parental, AH-1 o AH-1C, en gurami azul (apartado 2.8.2). Ambos mutantes presentaron una reducción de la virulencia, tal y como lo demuestra un aumento significativo (aproximadamente un logaritmo) de la DL₅₀ en gurami azul. Además, el cósmido pLA-A1T3SS fue capaz de complementar la mutación presente en AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*, dando lugar a la recuperación de los valores observados en la cepa parental.

Seguidamente, nuevos grupos de guramis azules fueron inoculados con una dosis de 10⁶ células viables (2-3 veces la DL₅₀ de la cepa parental) de las cepas anteriores, y se llevó a cabo el recuento de animales muertos durante una semana. La mayoría de los

peces inyectados con las cepas mutantes se recuperaron en 4 días; sin embargo, 8 de 10 peces inyectados con la cepa parental murieron en un período de 3 días (figura 3.15).

Tabla 3.7 DL_{50} en gurami azul de las cepas AH-1, AH-1C, los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*, y dichos mutantes conteniendo los cósmidos pLA-A1T3SS o pLA2917.

DL_{50} ¹	
gurami azul	
AH-1	$10^{5,6}$
AH-1C	$10^{5,7}$
AH-1:: <i>aopB</i>	$10^{6,6}$
AH-1:: <i>aopD</i>	$10^{6,4}$
AH-1:: <i>aopB</i> + pLA-A1T3SS	$10^{5,3}$
AH-1:: <i>aopD</i> + pLA-A1T3SS	$10^{5,4}$
AH-1:: <i>aopB</i> + pLA2917	$10^{6,5}$
AH-1:: <i>aopD</i> + pLA2917	$10^{6,6}$

¹ Los valores son el resultado de tres experimentos independientes (máxima desviación estándar < $10^{0,4}$).

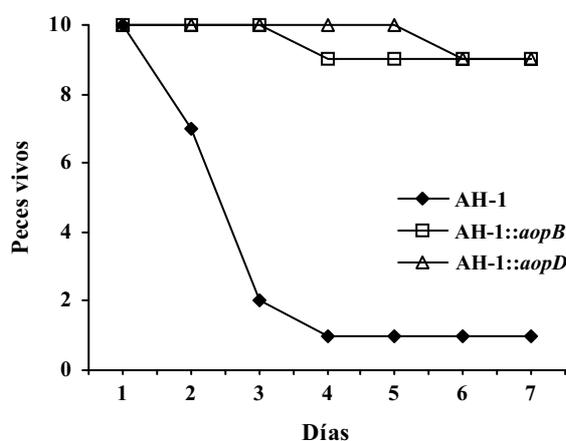


Figura 3.15 Monitorización de animales vivos durante una semana post-infección con las cepas AH-1, AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*. Los valores son el resultado de tres experimentos independientes ($p < 0,05$).

3.3.3.2 Ensayos de citotoxicidad

Con el fin de determinar la existencia de alguna relación entre el T3SS y la citotoxicidad de *A. hydrophila* AH-1, se procedió al estudio de posibles cambios morfológicos de monocapas de células EPC tras su infección con la cepa parental (AH-1 y AH-1C), los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*, y los mutantes complementados con el cósmido pLA-A1T3SS, a una multiplicidad de infección de 10 (apartado 2.7.2).

Las células infectadas con la cepa parental (AH-1 o AH-1C) sufrieron una serie de cambios citopáticos: progresivamente se desunieron las unas de las otras, se elongaron formando largos husos, se redondearon, y finalmente se desunieron del pocillo. Tras 2,5 horas de infección con la cepa salvaje, aproximadamente el 50% de las células eucariotas, aunque presentaban un aspecto redondeado, permanecían adheridas al pocillo (figura 3.16 A); mientras que el mismo tiempo post-infección con los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD* no daba lugar a cambios morfológicos significativos, presentando la monocapa un aspecto similar al del control negativo (células no infectadas) (figura 3.16 B). Las células EPC infectadas con los mutantes empezaron a mostrar cambios morfológicos 3 horas post-infección; y tras 5,5 horas, sólo un 50% permanecían unidas al pocillo. Los mutantes complementados presentaron un aspecto similar al de la cepa parental. En consecuencia, estos resultados sugieren que la mutación de los genes *aopB* y/o *aopD* da lugar a un retraso en el efecto citotóxico en células EPC en comparación con la cepa parental.

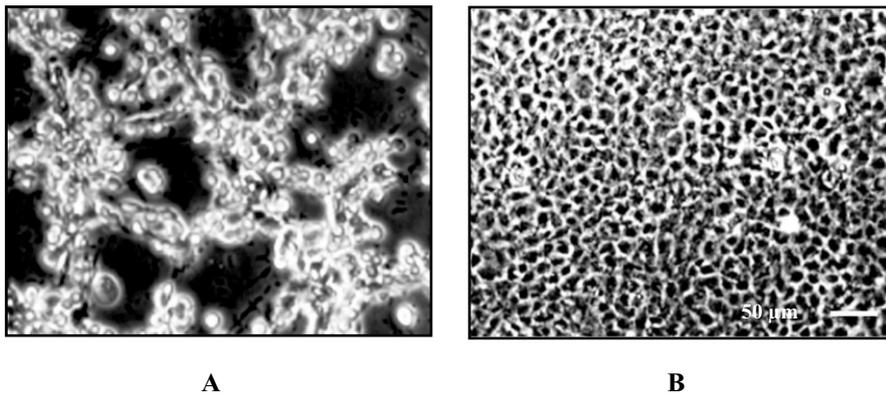


Figura 3.16 Micrografía de células EPC infectadas con *A. hydrophila* AH-1 (A) y el mutante AH-1::*aopB* (B), 2,5 horas post-infección.

3.3.3.3 Ensayos de fagocitosis

Se llevó a cabo el análisis microscópico de fagocitos infectados con las cepas AH-1, AH-1C, AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*, y dichos mutantes complementados. Transcurridas 3 horas de infección con las cepas AH-1, AH-1C o con los mutantes complementados, la mayor parte de las bacterias se encontraban fuera de los fagocitos; por el contrario, en el mismo tiempo tras la infección con los mutantes AH-1::*aopB* o AH-1::*aopD*, la mayoría de bacterias habían sido fagocitadas (figura 3.17). Estos resultados indican que la cepa salvaje podría evitar o inhibir la fagocitosis, capacidad que se pierde en el caso de las cepas mutantes.

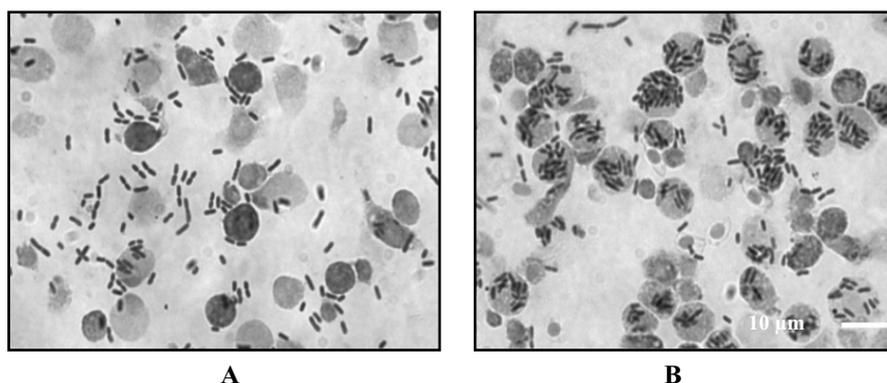


Figura 3.17 Micrografía de fagocitos de gurami azul infectados con *A. hydrophila* AH-1 (A) y el mutante AH-1::*aopB* (B), 3 horas post-infección.

Con el fin de analizar cuantitativamente la resistencia de la cepa parental y los mutantes a la fagocitosis, tras la infección de los fagocitos durante 3 horas con las cepas AH-1, AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*, y AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD* complementados con el cósmido pLA-A1T3SS, se procedió al tratamiento de las monocapas con gentamicina y al cálculo del porcentaje de fagocitosis (apartado 2.7.4.3).

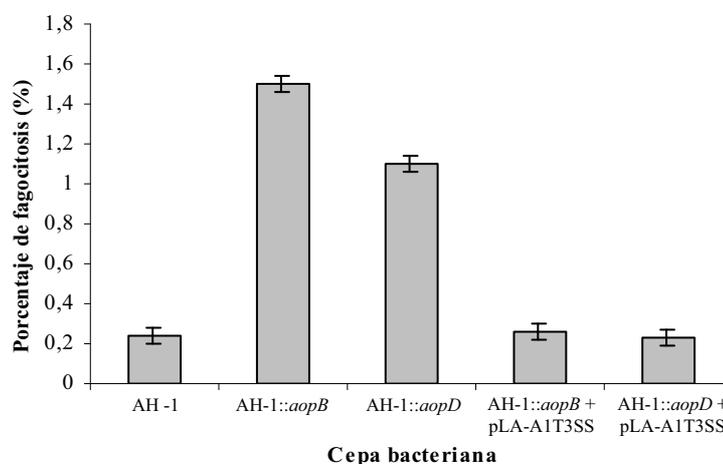


Figura 3.18 Ensayo de fagocitosis con las cepas AH-1, AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*, y AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD* complementadas. Los resultados se expresan como medias \pm desviación estándar de pocillos duplicados en experimentos por triplicado ($p < 0,05$).

La tasa de ingestión de los mutantes fue de 4 a 6 veces superior a la tasa de ingestión de la cepa salvaje (figura 3.18). La cepa AH-1 de *A. hydrophila* parece ser resistente a la fagocitosis, encontrando sólo un 0,24% de las células bacterianas dentro de los fagocitos, obteniendo el mismo resultado en el caso de las cepas mutantes complementadas con el cósmido pLA-A1T3SS. Sin embargo, la cantidad de células de ambos mutantes, AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*, encontradas en el interior de los fagocitos

fue superior, con un 1,5% y 1,1% de bacterias, respectivamente, lo que indica que estas mutaciones afectan a la capacidad antifagocítica de la cepa parental.

3.3.4 Construcción de un mutante en el gen *ascV* de *A. hydrophila* AH-3 mediante recombinación homóloga en un punto

Con objeto de determinar si el T3SS de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* también era funcional, se construyó el mutante AH-3::*ascV* en el gen *ascV*, del mismo modo que los mutantes obtenidos en la cepa AH-1. Las mutaciones obtenidas mediante recombinación homóloga en un punto tienen efecto polar sobre genes situados en la región 3' del gen mutado si éstos pertenecen al mismo operón. En consecuencia, el tipo de mutagénesis utilizado da lugar a la alteración de gran parte del operón *aopN-aopD*, afectando así a parte de las proteínas de membrana interna, a las válvulas de regulación del proceso de secreción y al complejo de translocación (ORF14-ORF20, apartados 3.2.3.2 Y 3.2.3.11).

Utilizando las parejas de cebadores AscVF1 y AscVR1, y ADN cromosómico de la cepa AH-3, se amplificó un fragmento interno (o truncado) de 710-pb del gen *ascV*. El producto amplificado se ligó al vector pGEM-T *easy*, y la ligación se transformó a la cepa de *E. coli* XL1-Blue 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 del plásmido recombinante en los transformantes se comprobó mediante su extracción y la posterior doble digestión con las endonucleasas *SalI* y *NcoI*.

A continuación, y con el fin de generar el vector pFS-*ascV*, el fragmento truncado del gen *ascV* se extrajo del vector pGEM-T *easy* mediante la digestión enzimática mencionada anteriormente, se transformaron sus extremos cohesivos a romos y se ligó al vector suicida pFS100, previamente digerido con la endonucleasa *EcoRI*, tratado con el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa y desfosforilado. La ligación se transfirió mediante electroporación a la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir), seleccionándose los transformantes en placas de LB suplementadas con kanamicina a una temperatura de 30°C. Los transformantes seleccionados se comprobaron mediante amplificación del inserto clonado utilizando los cebadores pGPfor y pGPprev del vector pSF100, adyacentes a la diana *EcoRI* del mismo.

Finalmente, para la obtención del mutante, se realizó conjugación triparental empleando como cepa dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pSF-*ascV*, la cepa de *A. hydrophila* AH-405 (AH-3 resistente a rifampicina) como receptora 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 kanamicina.

La comprobación de la correcta inserción del vector pFS100 en los transconjugantes seleccionados se realizó mediante *Southern blot*, tal y como se describe en el apartado 3.3.1. No obstante, en este caso se utilizó la endonucleasa *Hind*III para realizar la digestión de los ADN cromosómicos de la cepa salvaje y los mutantes, y como sonda el gen *ascV*.

3.3.5 Complementación del mutante AH-3::*ascV* con el cósmido pLA-T3SS4

El cósmido pLA-T3SS4 mantenido en *E. coli* DH5 α , que contenía parte de la agrupación génica del T3SS de la cepa AH-3 (*ascU-ascJ*, figura 3.1), se transfirió al mutante AH-3::*ascV* mediante conjugación triparental. Paralelamente, también se le transfirió el cósmido pLA2917. En ambos casos, se seleccionaron 10 transconjugantes capaces de crecer en placas de TSA suplementadas con tetraciclina y kanamicina.

Para comprobar la presencia de los cósmidos pLA2917 y pLA-T3SS4, se aisló ADN plasmídico de los mismos. Además, el cósmido pLA-T3SS4 se empleó como molde en una PCR con los cebadores AscVF1 y AscVR1, amplificando la banda correspondiente al fragmento del gen *ascV* en el caso de los candidatos positivos.

3.3.6 Caracterización fenotípica del mutante en *ascV*

3.3.6.1 Cálculo de la DL₅₀

Se procedió a la evaluación de la DL₅₀ del mutante AH-3::*ascV*, de dicho mutante conteniendo el cósmido pLA-T3SS4 o pLA2917, y de la cepa parental, AH-3 y AH-405, en trucha Arco iris (12 a 20g) y ratón hembra tipo Albino Suizo (5 a 7 semanas), según la metodología descrita en Material y Métodos.

El mutante AH-3::*ascV* presentó una reducción en la virulencia en ambos modelos animales, tal y como lo demuestra el aumento significativo del valor de DL₅₀ en relación con la cepa parental (tabla 3.8). El cósmido pLA-T3SS4 fue capaz de

complementar la mutación presente en AH-3::*ascV*, ya que daba lugar a la recuperación de los valores observados en la cepa parental.

Seguidamente, nuevos grupos de truchas Arco iris fueron inoculados con una dosis de 10^6 células viables de las cepas AH-3 y AH-3::*ascV*, y se llevó a cabo el recuento de animales muertos durante una semana. La mayoría de los peces inyectados con la cepa mutante se recuperaron en 5 días; sin embargo, 9 de 10 peces inyectados con la cepa parental murieron en un período de 3-4 días (figura 3.19).

Tabla 3.8 DL_{50} en trucha Arco iris y ratón Albino Suizo de *A. hydrophila* AH-3, el mutante AH-3::*ascV*, y dicho mutante conteniendo los cósmidos pLA-T3SS4 o pLA2917.

	DL_{50} ¹	
	Trucha Arco iris	Ratón Albino Suizo
AH-3	$10^{5,3}$	$10^{7,4}$
AH-405	$10^{5,4}$	$10^{7,6}$
AH-3:: <i>ascV</i>	$10^{6,7}$	$10^{8,5}$
AH-3:: <i>ascV</i> + pLA-T3SS4	$10^{5,5}$	$10^{7,5}$
AH-3:: <i>ascV</i> + pLA2917	$10^{6,9}$	$10^{8,4}$

¹ Los valores son el resultado de tres experimentos independientes (máxima desviación estándar $< 10^{0,4}$).

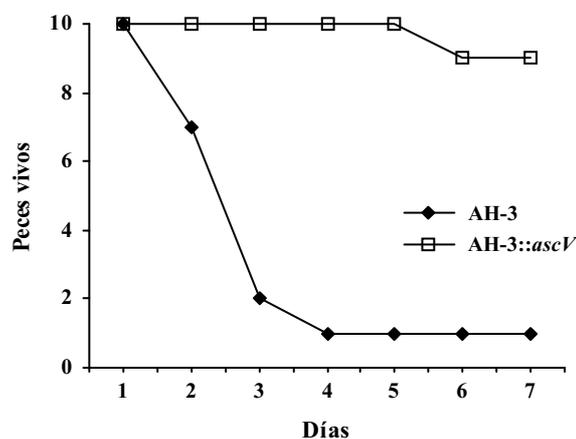


Figura 3.19 Monitorización de animales vivos durante una semana post-infección con las cepas AH-3 y AH-3::*ascV*. Los valores son el resultado de tres experimentos independientes ($p < 0,05$).

3.3.6.2 Ensayos de citotoxicidad

Con el fin de relacionar el funcionamiento del T3SS y la citotoxicidad en *A. hydrophila* AH-3, se analizaron los posibles cambios morfológicos de monocapas de

células eucariotas (EPC y HEp-2) tras la infección con la cepa parental (AH-3 y AH-405), el mutante AH-3::*ascV*, y el mutante AH-3::*ascV* conteniendo el cósmido pLA-T3SS4, a una multiplicidad de infección de 10. Estos estudios mostraron que tras 2 horas de infección con la cepa salvaje o con el mutante complementado, aproximadamente un 50% de las células eucariotas permanecían unidas al pocillo, aunque presentaban un aspecto redondeado. Por el contrario, el mismo tiempo post-infección con el mutante AH-3::*ascV*, no daba lugar a cambios morfológicos ni a desuniones, presentando similitud con el aspecto de las células observado en el control negativo de células no infectadas. Cabe destacar que, tras 4 horas de infección con el mutante AH-3::*ascV*, un porcentaje inferior al 50% de células eucariotas comenzaban a presentar cambios morfológicos. En consecuencia, estos resultados sugieren que el mutante AH-3::*ascV* muestra un retraso en el efecto citotóxico en células eucariotas en comparación con la cepa parental.

3.3.6.3 Ensayos de fagocitosis

Tras la infección de los fagocitos con las cepas AH-3, AH-3::*ascV* y AH-3::*ascV* complementada con el cósmido pLA-T3SS4 durante tres horas, se procedió al tratamiento de las monocapas con gentamicina y al cálculo del porcentaje de fagocitosis (apartado 2.7.4.3).

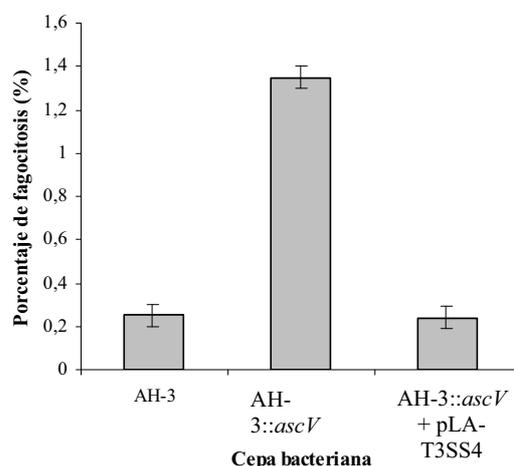


Figura 3.20 Ensayo de fagocitosis con las cepas AH-3, AH-3::*ascV*, y AH-3::*ascV* complementada. Los resultados se expresan como medias \pm desviación estándar de pocillos duplicados en experimentos por triplicado ($p < 0,05$).

La cepa salvaje, AH-3, así como el mutante AH-3::*ascV* complementado con el plásmido T3SS4, presentan una cierta resistencia a la fagocitosis, encontrando tan sólo un 0,23% y un 0,21% de las células bacterianas en el interior de los fagocitos,

respectivamente (figura 3.20). Sin embargo, 1,3% de las células de la cepa mutante AH-3::*ascV* fueron fagocitadas. Por lo tanto, el mutante AH-3::*ascV* mostró una tasa de ingestión cinco veces superior a la de la cepa parental, lo que indica que el T3SS podría tener una función antifagocítica.

3.4 Caracterización del efector AexT de *A. hydrophila* AH-3

3.4.1 Detección del efector AexT en *A. hydrophila* AH-3

Dado que Burr y colaboradores habían descrito en *A. salmonicida* la translocación del efector AexT (exoenzima T de *Aeromonas*) mediante el T3SS (Burr *et al.*, 2002; Burr *et al.*, 2003; Stuber *et al.*, 2003), nos propusimos determinar si la cepa AH-3 de *A. hydrophila* disponía de un efector de características similares.

Con este fin, se obtuvieron extractos crudos, proteína periplásmica y proteína de membrana externa (apartado 2.6.1), de las cepas AH-3 (positiva para T3SS) y ATCC7966^T (negativa para T3SS) crecidas en TSB suplementado con EGTA 10 mM y MgCl₂ 20 mM. Se escogieron estas condiciones debido a que en algunas bacterias como *Yersinia* y *Pseudomonas* se ha observado secreción de tipo III *in vitro* cuando su crecimiento se realiza en un medio rico con depleción de calcio (Ramamurthi and Schneewind, 2002). Además, los niveles de calcio también parecen estar implicados en la regulación positiva de la expresión de este sistema y de sus efectores (Yahr and Wolfgang, 2006). Estas muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y *Western blot*, utilizando suero policlonal de conejo anti-AexT de *A. salmonicida* cedido por Braun y colaboradores (Braun *et al.*, 2002).

Estos ensayos permitieron detectar una banda de aproximadamente 45 kDa, que reaccionaba con el suero anti-AexT de *A. salmonicida*, tan sólo en la fracción correspondiente a extractos crudos de la cepa AH-3 (figura 3.21). No se observó reacción positiva en ninguna de las fracciones correspondientes a la cepa ATCC7966^T. Estos resultados indicaban la existencia, en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, de una proteína similar al efector AexT de *A. salmonicida*, cuya localización subcelular parece exclusivamente citoplasmática. Debido a esta similitud se denominó a esta proteína AexT.

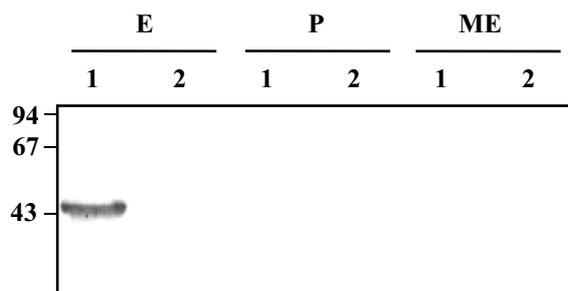


Figura 3.21 Estudio, mediante *Western blot* con suero anti-AexT de *A. salmonicida*, de diferentes fracciones subcelulares de las cepas de *A. hydrophila* AH-3 (1) y ATCC7966^T (2) en condiciones de depleción de calcio. E, extractos crudos; P, fracción periplasma; ME, fracción membranas externas.

3.4.2 Caracterización de la región génica codificante del gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3

3.4.2.1 Clonaje de la región génica codificante del gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3

Dado que la cepa AH-3 de *A. hydrophila* parecía presentar una proteína similar al efector AexT de *A. salmonicida*, se procedió al diseño de diferentes parejas de cebadores a partir de la secuencia de ADN del gen *aexT* de *A. salmonicida* (número de acceso *GenBank*: AF288366) con el objetivo de amplificar dicho gen en la cepa AH-3. Tras probar diferentes oligonucleótidos, los cebadores aexT1F y aexT1R permitieron amplificar una banda de 425-pb, que presentó un 80% de similitud con AexT de *A. salmonicida*, y un 69% y un 46% de similitud con los efectores ExoT de *P. aeruginosa* y YopE de *Y. enterocolitica*, respectivamente.

A continuación, el fragmento de 425-pb amplificado con los cebadores aexT1F y aexT1R en la cepa AH-3, correspondiente al gen *aexT*, se marcó con digoxigenina y se empleó como sonda para hibridar la librería genómica de *A. hydrophila* AH-3, clonada en pLA2917 y mantenida en *E. coli* DH5 α . La hibridación se realizó mediante *colony blot*, utilizando la cepa AH-3 como control positivo y la cepa DH5 α con el cósmido pLA2917 como control negativo. El revelado permitió detectar varios clones positivos. Para confirmar el resultado se analizó mediante PCR con los cebadores empleados para la elaboración de la sonda, ADN plasmídico de cada uno de los clones detectados, ADN purificado del vector de clonaje pLA2917 como control negativo y ADN genómico de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* como control positivo. Seleccionamos el clon pLA-AexT debido a que fue positivo en la hibridación, y en la amplificación con los cebadores aexT1F y aexT1R dio lugar a una banda específica del tamaño esperado.

3.4.2.2 Secuenciación de la región génica codificante del gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3

La secuenciación del clon pLA-AexT 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 *aexT*1F y *aexT*1R. Los productos de las secuencias obtenidas a partir de los cebadores CSpLA y RpLA del clon pLA-AexT presentaban similitud con la subunidad beta de la fenilalanil tRNA sintetasa y la proteína LivH, permeasa implicada en el transporte de aminoácidos aromáticos, respectivamente. A partir de las secuencias obtenidas con los cebadores propios del gen *aexT*, se diseñaron nuevos cebadores para poder completar la secuenciación de la región génica de interés (número de acceso *GenBank*: EF442031, Anexo 7.4).

Una vez obtenida la secuencia de nucleótidos completa (3500-pb), se procedió al análisis de la misma. Se detectaron las posibles pautas de lectura abierta en función de la presencia de codones de inicio y de terminación, y se descartaron inicialmente todas las pautas de menos de 100-pb. De este modo, se detectaron 4 ORF, dos de ellas completas (ORF1 y ORF2) y dos incompletas (ORF-D y ORF-U). Sus secuencias nucleotídicas fueron sometidas a diferentes bases de datos con la finalidad de compararlas y detectar aquellas que mostraran similitud con genes relacionados con el efector AexT.

Los productos génicos derivados de las ORF 1 y 2 mostraron similitud con la toxina AexT y su chaperona SycE, respectivamente, previamente descritas en *A. salmonicida* (Braun *et al.*, 2002; Burr *et al.*, 2003). En consecuencia, estas ORF se denominaron de igual forma que las proteínas codificadas por ellas. La ORF-U mostró un 32% de identidad y un 62% de similitud con una proteína hipotética de *Bacteroides*, mientras que la ORF-D presentó 76% y 77% de identidad y similitud respectivamente con la proteína AHA-0123 (familia de permeasas triptofano/tirosina) de *A. hydrophila* ATCC7966^T.

Seguidamente, se procedió a la predicción de putativos promotores y terminadores rho-independientes. Se detectaron tres posibles promotores situados en la región 5' de los genes *aexT* y *sycE*, y de la ORF-U; y dos putativos terminadores rho-independientes en la región 3' de los genes *aexT* y *sycE* (figura 3.22, Anexo 7.4). Además, en las

regiones promotoras de los genes *aexT* y *sycE* se localizaron putativas cajas de unión al factor transcripcional AxsA (ORF24, apartado 3.2.3.14) (Anexo 7.4).

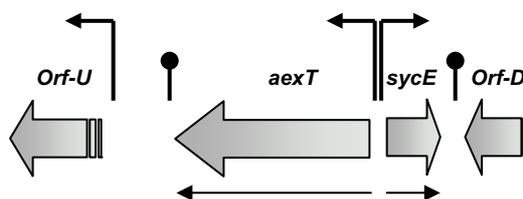


Figura 3.22 Esquema de la organización génica de la región codificante del gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3. Cada una de las flechas de bloque corresponde a una ORF e indica el sentido de transcripción. Los posibles promotores están marcados con flechas y los posibles terminadores con círculos.

La tabla 3.9 muestra las características de las ORF 1 y 2, mientras que la tabla 3.10 indica sus homólogos en diferentes bacterias.

Tabla 3.9 Principales características de las ORF 1 y 2, así como su localización en la secuencia nucleotídica en *A. hydrophila* AH-3 (Anexo 7.4).

ORF	proteína codificada	posición	G+C (%)	Tamaño (aa)	P.M. (kDa) ¹	pI ¹	GRAVY ¹
1	AexT	2355-1069	72,5	428	45	6,31	-0,238
2	SycE	2554-2910	72,3	118	13,2	5,33	-0,234

¹ El peso molecular (P.M.), el punto isoeléctrico (pI), y el promedio de hidrofobicidad de las proteínas están calculados utilizando el programa ProtParam de ExPASy.

Tabla 3.10 Putativas proteínas de la región génica codificante del efector AexT en *A. hydrophila* AH-3 y sus homólogos en otras bacterias.

ORF	Proteína	Función putativa	Localización	Proteína homóloga (identidad%/similitud%)
1	AexT	Efector de tipo III	Citoplasma bacteriano / Citoplasma eucariota	AexT-like <i>Aeromonas hydrophila</i> SSU (69/74) AexT-like <i>Aeromonas veronii</i> (66/72) AexT <i>Aeromonas veronii</i> (36/41) AexT <i>Aeromonas salmonicida</i> (35/40)
2	SycE	Chaperona asociada a AexT	Citoplasma bacteriano	SycE-like <i>Aeromonas salmonicida</i> (84/87) SycE-like <i>Aeromonas hydrophila</i> SSU (75/80) PA3842 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (94/98) SycE <i>Yersinia pestis</i> (42/55)

3.4.3 Estudio de la codistribución de la agrupación génica del T3SS y el gen *aexT* en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas

Con objeto de analizar la codistribución de la agrupación génica del T3SS y el gen *aexT*, se elaboró, mediante PCR empleando cromosómico de la cepa AH-3 y los cebadores *aexTF10* y *aexTR10* (2374-pb), una sonda marcada con digoxigenina para la totalidad de la región codificante del gen *aexT*. Esta sonda se empleó en ensayos de *dot*

blot con ADN genómico de 50 cepas de *Aeromonas* mesófilas, tanto positivas como negativas para la presencia de la agrupación génica del T3SS, previamente analizadas en el apartado 3.2.5.2.

Aproximadamente el 90% de las cepas positivas para la agrupación génica del T3SS, también lo fueron para el gen *aexT*. Por otro lado, la mayor parte de las cepas que carecían de los genes del T3SS tampoco presentaron reacción positiva para la sonda *aexT* (80%).

3.4.4 Obtención de suero contra la proteína AexT de *A. hydrophila* AH-3

Para continuar con el estudio de la proteína AexT de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, se procedió a la obtención de anticuerpos policlonales que permitieran su detección.

3.4.4.1 Obtención y purificación de la proteína recombinante AexT-His

La obtención y purificación de gran cantidad de proteína AexT se realizó mediante sobreexpresión de esta proteína en el sistema de expresión pET, tal y como se describe en el apartado 2.6.5. La región codificante del gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3 fue amplificada utilizando los cebadores *aexTF12* (contiene el codón de inicio de la traducción de la proteína) y *aexTR12* (1464-pb) para unirla al vector pET-30 Xa/LIC y generar una fusión traduccional entre una secuencia de histidinas del vector y la proteína AexT.

El plásmido recombinante pET-30-*aexT* se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y se procedió a la inducción de la expresión de la proteína de fusión. Seguidamente, se separaron las diferentes fracciones subcelulares, localizando la proteína AexT-His en la fracción citoplasmática insoluble. Finalmente, se purificó la cantidad necesaria de proteína mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel, tal y como se indica en el apartado 2.6.5.3.

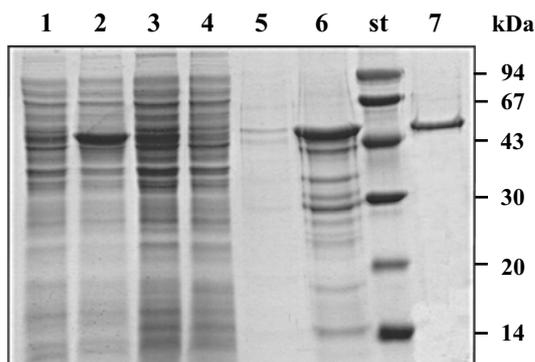


Figura 3.23 Análisis electroforético de fracciones subcelulares de crecimientos inducidos (I) y no inducidos (NI) de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo el plásmido pET-30-*aexT*. Proteína celular total NI (1), proteína celular total I (2), fracción citoplasmática soluble NI (3), fracción citoplasmática soluble I (4), fracción citoplasmática insoluble NI (5), fracción citoplasmática insoluble I (6), AexT-His purificada a partir de la fracción citoplasmática insoluble I (7).

3.3.4.2 Obtención de suero anti-AexT

La obtención de suero anti-AexT se realizó siguiendo los protocolos de inmunización de conejos y obtención de sueros indicados en el apartado 2.8.1. A continuación, se determinó, mediante un ensayo de *Western blot*, la dilución del suero más adecuada para la detección de la proteína AexT. Para ello, se utilizaron como muestras fracción citoplasmática insoluble de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo el vector pET-30-*aexT*, y proteína AexT purificada por resinas de níquel, y se probaron las diluciones 1/1000, 1/2000 y 1/5000 del suero. La dilución óptima de uso del suero obtenido para ensayos de *Western blot* fue 1/2000.

3.4.5 Análisis de la mutación en el gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3

3.4.5.1 Construcción del mutante *aexT* mediante recombinación en un punto

Empleando la metodología de recombinación en un punto descrita anteriormente (apartado 3.3.4), se construyó el mutante AH-1089 (AH-3::*aexT*) en el gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3 con el fin de determinar la implicación de su producto génico en la virulencia de la cepa, así como su relación con el T3SS.

Utilizando los cebadores *aexTF8* y *aexTR8*, y ADN cromosómico de la cepa AH-3, se amplificó un fragmento interno de 571-pb del gen *aexT*. El producto amplificado se clonó en el vector pGEM-T *easy*, se digirió con la endonucleasa *EcoRI*, y se subclonó en el vector suicida pFS100, generando la construcción pFS-*aexT*. Finalmente, para la obtención del mutante, se realizó conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pSF-*aexT*, la cepa de *A. hydrophila* AH-405 como receptora 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 kanamicina.

La comprobación de la correcta inserción por recombinación en un punto en el gen *aexT* se realizó mediante *Southern blot*, tal y como se describe en el apartado 3.3.1. No obstante, en este caso se utilizó la endonucleasa *EcoRI* para realizar la digestión de los ADN cromosómicos de la cepa salvaje y los mutantes, y como sonda el gen *aexT*.

3.4.5.2 Complementación del mutante AH-1089

El cósmido pLA-AexT mantenido en *E. coli* DH5 α , que contenía los genes *aexT* y *sycE*, se transfirió al mutante AH-1089 mediante conjugación triparental. También se le

transfirió el cósmido pLA2917 como control negativo de complementación. En ambos casos, se seleccionaron 10 transconjugantes capaces de crecer en placas de TSA suplementadas con tetraciclina y kanamicina, que fueron comprobados mediante aislamiento de ADN plasmídico de los mismos y, en el caso del cósmido pLA-AexT, también mediante PCR con los cebadores aexT1F y aexT1R, amplificando la banda correspondiente a un fragmento del gen *aexT* en los candidatos positivos.

3.4.5.3 Caracterización fenotípica del mutante AH-1089 (AH-3::*aexT*)

3.4.5.3.1 Inmunodetección de la proteína AexT en citoplasmas

Se obtuvieron extractos crudos de crecimientos en TSB suplementado con EGTA 10 mM y MgCl₂ 20 mM, y a una temperatura de incubación de 37°C, de: la cepa parental, AH-3, la cepa mutante, AH-3::*aexT*, y la cepa mutante que contenía el cósmido pLA-AexT o pLA2917. Dichas fracciones se analizaron mediante ensayos de *Western blot*, utilizando el suero anti-AexT de *A. hydrophila* AH-3.

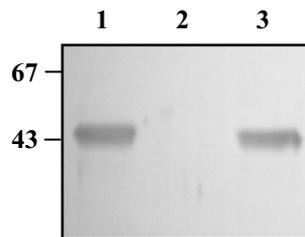


Figura 3.24 Análisis, mediante *Western blot* y suero anti-AexT de *A. hydrophila* AH-3, de extractos crudos de las cepas AH-3 (1), AH-3::*aexT* (2) y AH-3::*aexT* con el cósmido pLA-AexT (3).

El mutante AH-3::*aexT* fue incapaz de reaccionar con el suero anti-AexT. No obstante, en el mutante que contenía el cósmido pLA-AexT se inmunodetectó la banda correspondiente a la proteína AexT (figura 3.24). Cabe destacar que no se observó reacción positiva en el mutante que tan sólo contenía el cósmido pLA2917.

3.4.5.3.2 Cálculo de la DL₅₀

Se procedió a la evaluación de la DL₅₀ del mutante AH-3::*aexT*, del mismo mutante conteniendo el cósmido pLA-AexT o pLA-2917, y de la cepa parental, AH-3 y AH-405, en trucha Arco iris (12 a 20g) y ratón hembra tipo Albino Suizo (5 a 7 semanas).

El mutante AH-3::*aexT* y el mismo mutante conteniendo el cósmido pLA2917 mostraron una ligera reducción en la virulencia, tal y como lo demuestra un leve aumento del valor de DL₅₀ en relación con la cepa parental en ambos modelos animales.

La cepa AH-3::*aexT* complementada con el cósmido pLA-AexT presentó una recuperación del fenotipo salvaje (tabla 3.11).

Seguidamente, nuevos grupos de truchas Arco iris fueron inoculados con una dosis de 10^6 células viables de las cepas AH-3 y AH-3::*aexT*, y se llevó a cabo el recuento de animales muertos durante una semana. Se observó que 4 de cada 10 peces inyectados con la cepa mutante se recuperaron y sobrevivieron; sin embargo, 9 de 10 peces inyectados con la cepa parental murieron en un período de 3-4 días (figura 3.25).

Tabla 3.11 DL_{50} en trucha Arco iris y ratón Albino Suizo de *A. hydrophila* AH-3 y AH-405, el mutante AH-3::*aexT*, y el mutante AH-3::*aexT* conteniendo el vector pLA2917 o pLA-AexT.

	DL_{50} ¹	
	Trucha Arco iris	Ratón Albino Suizo
AH-3	$10^{5,3}$	$10^{7,4}$
AH-405	$10^{5,4}$	$10^{7,6}$
AH-3:: <i>aexT</i>	$10^{5,9}$	$10^{7,9}$
AH-3:: <i>aexT</i> + pLA-AexT	$10^{5,4}$	$10^{7,5}$
AH-3:: <i>aexT</i> + pLA2917	$10^{5,8}$	$10^{7,9}$

¹ Los valores son el resultado de tres experimentos independientes (máxima desviación estándar $< 10^{0,4}$).

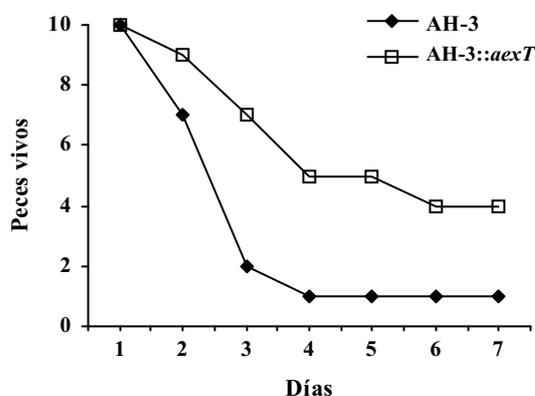


Figura 3.25 Monitorización de animales vivos durante una semana post-infección con las cepas AH-3 y AH-3::*aexT*. Los valores son el resultado de tres experimentos independientes ($p < 0,05$).

3.4.5.3.3 Ensayo de citotoxicidad

Se procedió al estudio de posibles cambios morfológicos de monocapas de células eucariotas (EPC y HEp-2) tras la infección con la cepa parental (AH-3 y AH-405), el mutante AH-3::*aexT*, y el mutante conteniendo el cósmido pLA2917 o complementado

con el cósmido pLA-AexT, a una multiplicidad de infección de 10 (apartado 2.7.2). Estos estudios mostraron que tras 2 horas post-infección con la cepa salvaje o con el mutante AH-3::*aexT* complementado con el cósmido pLA-AexT, aproximadamente un 50% de las células eucariotas, aunque presentaban un aspecto redondeado, permanecían adheridas al pocillo. Del mismo modo, las monocapas infectadas con el mutante AH-3::*aexT* o con el mutante que contenía el cósmido pLA2917, presentaban un aspecto similar a las infectadas con la cepa salvaje, aunque con 30-45 minutos de retraso.

3.4.5.3.4 Ensayo de fagocitosis

Tal y como se ha descrito anteriormente, tras la infección de los fagocitos con las cepas AH-3, AH-3::*aexT* y AH-3::*aexT* conteniendo el cósmido pLA-AexT o pLA2917 durante tres horas, se procedió al tratamiento de las monocapas con gentamicina y al cálculo del porcentaje de fagocitosis.

La tasa de ingestión del mutante en el gen *aexT* fue 2 veces superior a la tasa de ingestión de la cepa salvaje o de dicho mutante complementado con el cósmido pLA-AexT (figura 3.26): mientras que tan sólo un 0,23% de bacterias de la cepa salvaje y un 0,21% del mutante AH-3::*aexT* complementado con el cósmido pLA-AexT fueron fagocitadas, en el mutante AH-3::*aexT* este número se incrementó al 0,45%. El mutante con el cósmido pLA2917 presentó valores de fagocitosis similares a los obtenidos en el propio mutante.

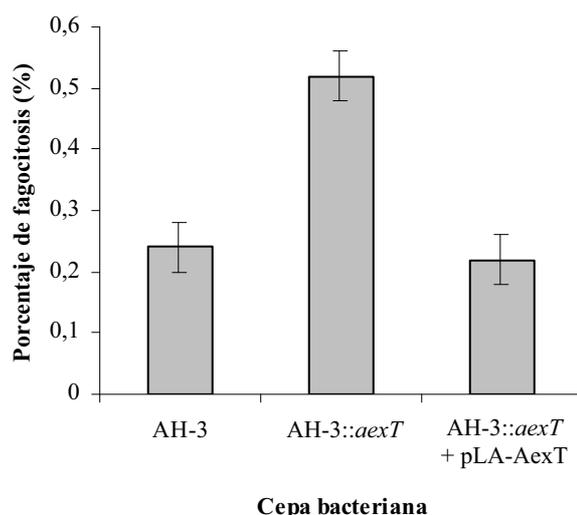


Figura 3.26 Ensayo de fagocitosis con las cepas AH-3, AH-3::*aexT*, y AH-3::*aexT* con el cósmico pLA-AexT. Los resultados se expresan como medias \pm desviación estándar de pocillos duplicados en experimentos por triplicado ($p < 0,05$).

3.4.6 Ensayo de la actividad ADP-ribosiltransferasa de la proteína AexT de *A. hydrophila* AH-3

La ADP-ribosilación mediada por toxinas implica la hidrólisis del sustrato nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) en nicotinamida y ADP-ribosa, seguida de la unión de ADP-ribosa a la(s) proteína(s) diana de la célula eucariota huésped, dando lugar a la alteración de procesos celulares vitales (Holbourn *et al.*, 2006). Para determinar la actividad ADP-ribosiltransferasa de la proteína AexT de *A. hydrophila* AH-3, se utilizó la proteína recombinante AexT-His (apartado 3.4.4.1), extractos crudos de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo el vector pET-30 y de la misma cepa conteniendo el plásmido pET-30-AexT, así como sobrenadantes concentrados de crecimientos de las cepas de *A. hydrophila* AH-3 y AH-3::*aexT*, y de la cepa de *P. aeruginosa* PA103 (positiva para el T3SS y el efector ExoT). Los extractos crudos de las cepas de *E. coli* se obtuvieron a partir de crecimientos en LB inducidos mediante IPTG. Los sobrenadantes se obtuvieron a partir de crecimientos en TSB suplementado con EGTA 10 mM y MgCl₂ 20 mM (condiciones de inducción del T3SS) o sin suplementar, a 37°C en agitación. Además, como sustrato de la proteína AexT se utilizó un lisado de células EPC o HEp-2.

La proteína recombinante AexT-His reveló actividad ADP-ribosiltransferasa: 1230 ± 110 cpm por 0,5 µg de proteína ensayada; en cambio, no se detectó actividad en el caso del uso 10 µg de albumina sérica bovina (control negativo). Además, los extractos libres de células de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo el plásmido pET-30-AexT dieron lugar a un incremento de 20 veces de la actividad ADP-ribosiltransferasa en comparación con los extractos de la misma cepa conteniendo sólo el vector (pET-30). Sobrenadantes concentrados procedentes de crecimientos de *A. hydrophila* AH-3 en condiciones de inducción del T3SS mostraron 10 veces más actividad que aquellos procedentes del mutante AH-3::*aexT* crecido en las mismas condiciones. El control positivo (la cepa PA103 de *P. aeruginosa*) crecida en condiciones de depleción de calcio mostró 8 veces más actividad enzimática que la misma cepa crecida en TSB.

3.5 Análisis de la expresión del T3SS y del efector AexT de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*

Con objeto de estudiar la regulación de la expresión génica del T3SS en *A. hydrophila* AH-3, se escogió una de las regiones promotoras de las cuatro unidades transcripcionales confirmadas anteriormente, concretamente la región reguladora de la agrupación génica *aopN-aopD* (apartado 3.2.4.2). Además, también se analizó la regulación de la expresión del efector AexT en la misma cepa, para poder así abordar la posible coregulación de sistema de secreción de tipo III y efector.

Para ello decidimos utilizar el gen *reporter gfp* (*green fluorescence protein*), obteniendo en primer lugar las construcciones de fusión promotor de estudio-*gfp* y procediendo seguidamente a la integración de las mismas en el cromosoma bacteriano (configuración *cis*) mediante recombinación en un punto empleando el vector suicida pCM100, lo que mantenía a los genes salvajes bajo el control de su promotor.

3.5.1 Obtención del recombinante para la fusión promotor *aopNaopD-gfp* (AH-1206)

Utilizando las parejas de cebadores PascNF1 y BaopNR5, y ADN cromosómico de la cepa AH-3, se amplificó el fragmento que contiene el promotor de la región *aopN-aopD* (789-pb). El producto amplificado se ligó al vector pGEM-T *easy*, y la ligación se transformó a la cepa de *E. coli* XL1-Blue 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 del plásmido recombinante en los transformantes se comprobó mediante su extracción y la posterior digestión doble con las endonucleasas *Bam*HI y *Pst*I, contenidas en los cebadores utilizados para la amplificación.

Tras asegurar, mediante secuenciación, que el fragmento clonado no presentaba errores, y con el fin de generar el vector pAcGFP-*promaopNaopD*, el fragmento que contiene el promotor se extrajo del vector pGEM-T *easy* mediante doble digestión enzimática con las endonucleasas *Bam*HI y *Pst*I, y se ligó al vector pAcGFP1, previamente digerido con las mismas endonucleasas, generando una fusión entre el promotor *apoN-aopD* y el gen *gfp*. La ligación se transfirió mediante electroporación a la cepa de *E. coli* XL1-Blue, seleccionándose los transformantes en placas de LB suplementadas con ampicilina a una temperatura de 37°C. Los transformantes

seleccionados se comprobaron mediante extracción del plásmido y doble digestión con las endonucleasas *Hind*III y *Spe*I, localizadas en las regiones de policlonaje del vector pAcGFP1. A continuación, para generar el vector pCM-promaop*NaopD-gfp*, el fragmento que contenía la fusión *promaopNaopD-gfp* se extrajo del vector pAcGFP1 mediante digestión doble con las endonucleasas *Hind*III y *Spe*I, transformándose sus extremos cohesivos a romos, y ligándose al vector suicida pCM100, previamente digerido con la endonucleasa *Eco*RV y desfosforilado. La ligación se transfirió mediante electroporación a la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir), seleccionándose los transformantes en placas de LB suplementadas con cloranfenicol a una temperatura de 30°C. Los transformantes seleccionados se comprobaron mediante PCR con los cebadores pGPfor y pGPprev, adyacentes a la diana *Eco*RV del vector pCM100 (1800-pb).

Finalmente, para la obtención de la cepa recombinante, se realizó conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pCM-promaop*NaopD-gfp*, la cepa de *A. hydrophila* AH-405 como receptora 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 comprobación de la correcta inserción de la construcción *promaopNaopB-gfp* se realizó mediante amplificación con un cebador externo *forward* y un cebador situado en la región codificante del gen *gfp*, pAcGFPprev2.

3.5.2 Obtención del recombinante para la fusión promotor *aexT-gfp* (AH-1199)

Utilizando las parejas de cebadores BaexTF11 y AexTR10, y ADN cromosómico de la cepa AH-3, se amplificó el fragmento que contiene el promotor del gen *aexT* (496-pb). El producto amplificado se digirió con las endonucleasas *Bam*HI (contenida en el cebador BaexTF11) y *Pst*I (contenida en el amplímero), y se ligó al vector pAcGFP1, previamente digerido con las mismas endonucleasas, para generar una fusión entre el promotor del gen *aexT* y el gen *gfp* del vector. La ligación se transformó a la cepa de *E. coli* XL1-Blue mediante electroporación, seleccionando los transformantes en placas de LB suplementadas con ampicilina a una temperatura de incubación de 37°C. La presencia del plásmido recombinante pAcFGP-proma*aexT* en los transformantes se comprobó mediante su extracción y la posterior digestión doble con las endonucleasas *Hind*III y *Spe*I, localizadas en las regiones de policlonaje del vector pAcGFP1; y se

aseguró, mediante secuenciación, que el fragmento clonado no presentaba errores. A continuación, y para generar el vector pCM-promaexT-gfp, el fragmento con la fusión promaexT-gfp se extrajo del vector pAcGFP1 mediante digestión doble con las endonucleasas *Hind*III y *Spe*I, se transformaron sus extremos cohesivos a romos, y se ligó al vector suicida pCM100, previamente digerido con la endonucleasa *Eco*RV y defosforilado. La ligación se transfirió mediante electroporación a la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir), seleccionándose los transformantes en placas de LB suplementadas con cloranfenicol a una temperatura de 30°C. Los transformantes seleccionados se comprobaron mediante PCR con los cebadores pGPfor y pGPprev del vector pCM100 (1500-pb).

Para la obtención de la cepa recombinante, se realizó conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pCM-promaexT-gfp, la cepa de *A. hydrophila* AH-405 como receptora 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 comprobación de la correcta inserción de la construcción promaexT-gfp se realizó mediante amplificación con un cebador externo *forward* y un cebador situado en la región codificante del gen *gfp*, pAcGFPprev2.

3.5.3 Condiciones de activación de la expresión

En bacterias como *Yersinia* spp. y *P. aeruginosa*, se han descrito variaciones en la expresión de genes de tipo III como respuesta a cambios en las condiciones de crecimiento *in vitro*, como por ejemplo la temperatura, la tensión de oxígeno, la disminución de iones Ca^{2+} en el medio, el incremento de $MgCl_2$ o concentraciones elevadas de NaCl (Hueck, 1998; Hornef *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2002; Rietsch and Mekalanos, 2006). Además, recientemente, Ebanks y colaboradores han demostrado que en *A. salmonicida* la expresión de genes de tipo III también está sujeta a alguno de los factores anteriores (Ebanks *et al.*, 2006).

Con el fin de estudiar si estas condiciones afectaban también a la expresión de los genes de tipo III de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, se obtuvieron crecimientos de las cepas AH-3 (control negativo), AH-1206 (recombinante para la fusión promotor *aopNaopD-gfp*) y AH-1199 (recombinante para la fusión promotor *aexT-gfp*) en TSB líquido suplementado con EGTA 10 mM, $MgCl_2$ 20 mM, NaCl 200 mM, todas las

combinaciones posibles de los compuestos anteriores, y TSB sin suplementar, inoculados en un volumen de 1/4 de la capacidad del recipiente, e incubados a 30°C en agitación toda la noche. Tras obtener los crecimientos, lavarlos con PBS 1x, y equiparar la DO_{600} de los mismos, se procedió a la medida de su fluorescencia. De aquí en adelante, todos los resultados de los subapartados dentro del apartado 3.5 se expresan como medias \pm desviación estándar de muestras por duplicado en experimentos por triplicado.

La figura 3.27 muestra la intensidad de fluorescencia emitida por las cepas AH-1206 y AH-1199 en las diferentes condiciones de cultivo ensayadas. Ambos promotores, promotor *aopN-aopD* y promotor *aexT*, tuvieron un comportamiento similar, aunque la cepa AH-1199 mostró una intensidad superior en todas las condiciones. La adición de $MgCl_2$ 20 mM al medio incrementó la expresión al doble; sin embargo, los crecimientos en presencia de NaCl 200 mM no presentaron diferencias marcadas de expresión en comparación con los crecimientos en TSB. La combinación de $MgCl_2$ 20 mM y NaCl 200 mM permitió un cierto incremento de la expresión en comparación con los crecimientos en presencia de sólo NaCl 200 mM, pero en ningún caso fue superior a la detectada en los crecimientos en TSB con $MgCl_2$ 20 mM. En todos los casos, la adición de EGTA 10 mM (quelante específico de iones Ca^{2+}) dio lugar a un incremento de la expresión de entre 3 y 10 veces. Las condiciones de máxima expresión se dieron en los crecimientos en TSB suplementados con $MgCl_2$ 20 mM y EGTA 10 mM.

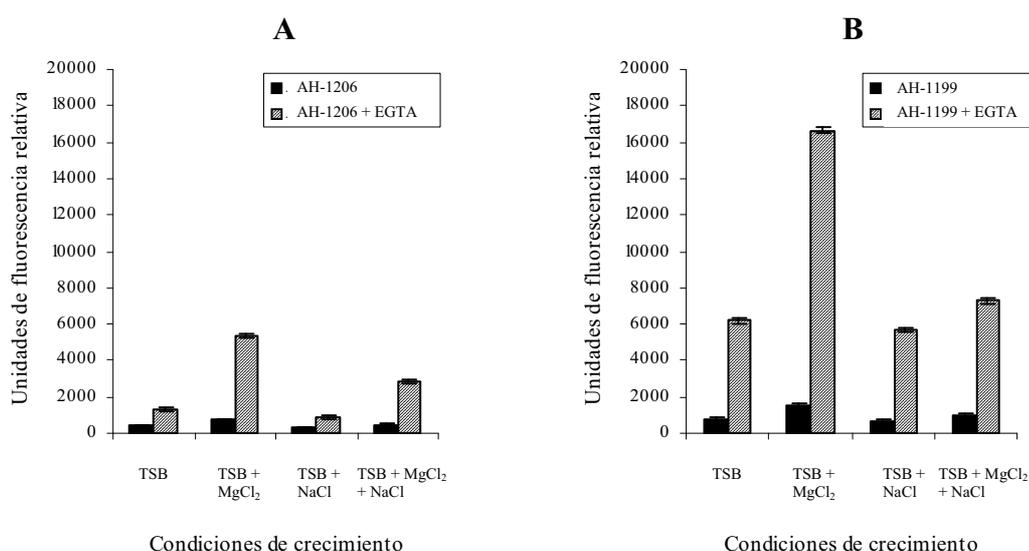


Figura 3.27 Gráfico de la influencia del NaCl, $MgCl_2$ y la combinación de los dos compuestos con EGTA, en la actividad de los promotores *aopN-aopD* (A) y *aexT* (B).

A continuación, se analizó la expresión de ambos promotores utilizando las condiciones anteriores y variando la temperatura. Para ello, se obtuvieron crecimientos de las cepas AH-3 (control negativo), AH-1206 (recombinante de la fusión promotor *aopNaopD-gfp*) y AH-1199 (recombinante de la fusión promotor *aexT-gfp*) en TSB suplementado con los compuestos mencionados anteriormente, inoculados en un volumen de 1/4 de la capacidad del recipiente, e incubados a 20°C y 37°C en agitación toda la noche. De igual manera, tras obtener los crecimientos, lavarlos con PBS 1x, y equiparar la DO₆₀₀ de los mismos, se procedió a la medida de su fluorescencia.

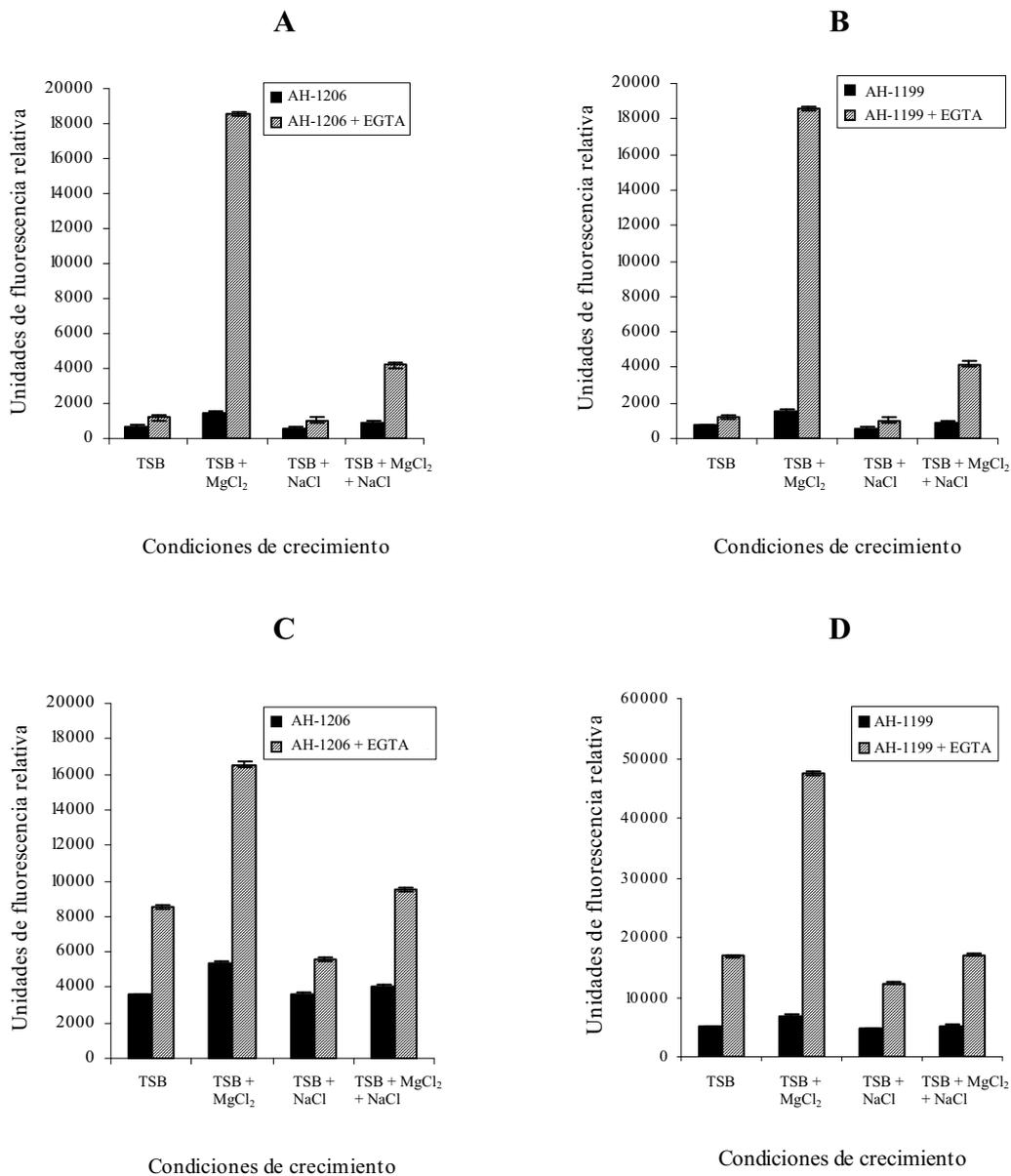


Figura 3.28 Gráfico de la influencia de la temperatura, 20°C (A y B) y 37°C (C y D), en combinación con los compuestos NaCl, MgCl₂ y EGTA, en la actividad de los promotores *aopN-aopD* (A y C) y *aexT* (B y D).

La figura 3.28 muestra la intensidad de fluorescencia emitida por las cepas AH-1206 y AH-1199 en función de las condiciones de crecimiento ensayadas. Nuevamente, ambos promotores, promotor *aopN-aopD* y promotor *aexT*, tuvieron un comportamiento similar, volviendo a mostrar una intensidad superior en todas las condiciones la cepa AH-1199; la adición de MgCl_2 20 mM dió lugar a incrementos marcados de expresión, y las condiciones óptimas (máxima expresión) se dieron en los crecimientos en TSB suplementados con MgCl_2 20 mM y EGTA 10 mM.

En cuanto a la temperatura, los crecimientos a 20°C no mostraron grandes diferencias con respecto a los crecimientos a 30°C. A 37°C, se produjo un incremento de la expresión, con respecto a la observada a 30°C, de 6-10 veces en los crecimientos en presencia de iones Ca^{2+} , y de 3-5 veces en los crecimientos con baja concentración de iones Ca^{2+} . En ambos casos, el incremento se mostró algo superior en la cepa AH-1199 (recombinante de la fusión promotor *aexT-gfp*).

Por último, decidimos estudiar si la tensión de oxígeno podía ser un factor importante en la expresión de los promotores de genes de tipo III. Para ello, y dado que los análisis anteriores habían indicado como condiciones de máxima expresión el TSB suplementado con MgCl_2 20 mM y EGTA 10 mM, se inocularon las cepas cepas AH-3 (control negativo), AH-1206 (recombinante de la fusión promotor *aopNaopD-gfp*) y AH-1199 (recombinante de la fusión promotor *aexT-gfp*) en TSB y TSB suplementado con MgCl_2 20 mM y EGTA 10 mM, y se ensayaron condiciones de anaerobiosis, microaerofilia y aerobiosis, incubándolos a 37°C toda la noche.

La figura 3.29 muestra la intensidad de fluorescencia emitida por las cepas AH-1206 y AH-1199 en función de las condiciones de crecimiento ensayadas. En general, la quelación de iones Ca^{2+} del medio supuso un incremento de la expresión en todas las condiciones ensayadas, desde 3 veces superior en el caso de condiciones de anaerobiosis de la cepa AH-1206, hasta 8 veces en el caso de la cepa AH-1199 en condiciones de aerobiosis. No obstante, la adición de EGTA supuso un mayor incremento de la expresión del promotor *aexT*. Las condiciones óptimas (máxima expresión) se dieron en crecimientos en bajas concentraciones de calcio en aerobiosis.

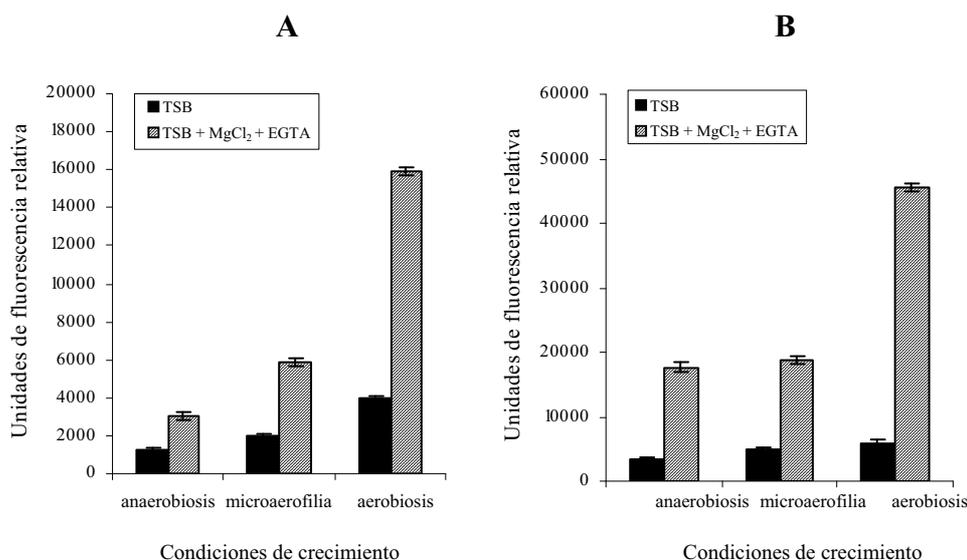


Figura 3.29 Gráfico de la influencia de la tensión de oxígeno en la actividad de los promotores *aopN-aopD* (A) y *aexT* (B).

3.5.4 Efecto de diferentes proteínas bacterianas en la expresión de genes de tipo III en *A. hydrophila* AH-3

En los siguientes subapartados, a mutantes kanamicina resistentes para diferentes proteínas de estudio, se les transfirió mediante conjugación triparental las fusiones promotor *apoNaopD-gfp* o promotor *aexT-gfp* (apartados 3.5.1 y 3.5.2, respectivamente). Los transconjugantes se seleccionaron por su resistencia a kanamicina y cloranfenicol, y se comprobaron tal y como se ha descrito en los apartados 3.5.1 y 3.5.2. Para analizar la expresión de las fusiones inseridas en dichos mutantes se realizaron crecimientos en TSB y TSB suplementado con MgCl₂ 20 mM y EGTA 10 mM, que se incubaron a 37°C toda la noche con agitación. Tras obtener los crecimientos, lavarlos con PBS 1x, y equiparar la DO₆₀₀ de los mismos, se procedió a la medida de su fluorescencia mediante un espectrofluorímetro (ver apartado 2.5.18). En los siguientes subapartados, salvo excepción, tan sólo se indican los resultados obtenidos en los crecimientos en TSB suplementado con MgCl₂ 20 mM y EGTA 10 mM, por presentar los valores de expresión en TSB una tendencia similar aún siendo siempre notablemente inferiores.

3.5.4.1 Componentes del T3SS

Se construyó el mutante AH-1009 (AH-3::*axsA*) en el gen *axsA* (ORF24, apartado 3.2.3.14), cuyo producto génico se ha descrito como activador transcripcional específico de la agrupación génica del T3SS y de genes que codifican efectores en otras especies bacterianas. Además, también se incluyó en este estudio el mutante AH-1114 (AH-3::*aopN*, apartado 3.6.1) en el gen *aopN* (ORF9, apartado 3.2.3.10), cuyo producto parece estar implicado en la regulación de la secreción en diferentes especies bacterianas, de manera que la mutación de dicho gen da lugar a una secreción constitutiva de efectores.

La obtención del mutante AH-3::*axsA* se realizó mediante inserción de un determinante de resistencia a kanamicina en la región codificante del gen *axsA* (apartado 2.5.17.2.1). En primer lugar, se amplificó un fragmento de ADN que contuviera la región codificante del gen *axsA*, utilizando ADN cromosómico de la cepa AH-3 y la pareja de cebadores *axsAF1* y *axsAR1* (1349-pb). El producto amplificado se ligó al vector pGEM-T *easy*, y la ligación se transformó a la cepa de *E. coli* XL1-Blue 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 del plásmido recombinante en los transformantes se comprobó mediante su extracción y la posterior digestión con la endonucleasa *PstI*. Una vez seleccionado, dicho plásmido fue extraído y linealizado con la endonucleasa *BamHI*, localizada en la región codificante del gen *axsA*. Paralelamente, se procedió a la obtención del determinante de resistencia a kanamicina mediante digestión del vector pUC4-KIXX con la enzima de restricción *BamHI*. Seguidamente, se ligó el casete de kanamicina con extremos *BamHI* al plásmido linealizado con la misma endonucleasa, y la ligación se transformó a la cepa de *E. coli* XL1-Blue mediante electroporación, seleccionando los transformantes en placas de LB suplementadas con ampicilina y kanamicina a una temperatura de incubación de 37°C. Con el fin de comprobar que el casete de resistencia a kanamicina se hubiera clonado en la misma dirección de transcripción que la región codificante del gen *axsA*, se realizó extracción de ADN plasmídico y digestión con la endonucleasa *SphI*.

A continuación, para generar el vector pDM4-*axsA:km*, la construcción *axsA:km* se extrajo del vector pGEM-T *easy* mediante doble digestión enzimática con las endonucleasas *ApaI* y *SpeI*, se ligó al vector suicida pDM4 previamente digerido con las

mismas endonucleasas, y la ligación se transfirió mediante electroporación a la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir), seleccionándose los transformantes en placas de LB suplementadas con kanamicina y cloranfenicol a una temperatura de 30°C. Los transformantes seleccionados se comprobaron mediante PCR con los cebadores axSAF1 y axSAR1.

La introducción del plásmido pDM4-*axsA:km* en la cepa AH-3 de *A. hydrophila* se realizó mediante conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pDM4-*axsA:km*, la cepa de *A. hydrophila* AH-405 como receptora 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, kanamicina y cloranfenicol. La comprobación de la correcta inserción del plásmido por recombinación en un punto se realizó mediante PCR con los cebadores axSAF1 y axSAR1, dando lugar los candidatos positivos a dos bandas de amplificación, una correspondiente a la copia salvaje del gen (1349-pb) y la otra correspondiente a la copia del gen con el casete de resistencia a kanamicina inserido (3149-pb). Con el fin de provocar una segunda recombinación que permitiera la escisión del plásmido pDM4 y de la copia salvaje del gen del genoma, a partir del transconjugante seleccionado, se realizó un banco de diluciones, que se sembró en placas de TSA suplementadas con sacarosa 10% y kanamicina, y se incubó a una temperatura de 30°C, seleccionándose los candidatos sensibles a cloranfenicol. Los candidatos obtenidos se analizaron mediante PCR con los cebadores axSAF1 y axSAR1, seleccionando como mutantes aquellos que presentaban la banda de amplificación de 3149-pb, correspondiente al gen que contenía inserido el casete de kanamicina.

La figura 3.30 muestra la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en los mutantes AH-3::*axsA* y AH-3::*aopN*, y en la cepa parental. La mutación del gen *axsA* provocó un descenso de expresión de 3 y 8 veces de los promotores *aopNaopD-gfp* y *aexT-gfp*, respectivamente, indicando que, tal y como sucede en otras especies bacterianas, este gen parece ejercer un efecto de regulación positiva sobre los genes de tipo III en *A. hydrophila* AH-3. Por otro lado, la mutación del gen *aopN*, en condiciones de depleción de iones Ca^{2+} , dio lugar a los mismos valores de expresión, de ambos promotores, que la cepa parental. No obstante, en TSB, mostró un incremento de 3 y 8 veces en la expresión de los promotores *aopNaopD-gfp* y *aexT-gfp*, respectivamente, siendo además estos valores equiparables a los obtenidos en presencia de EGTA. Estos

resultados están de acuerdo con la posible función de AopN como válvula de control de la secreción del aparato de tipo III.

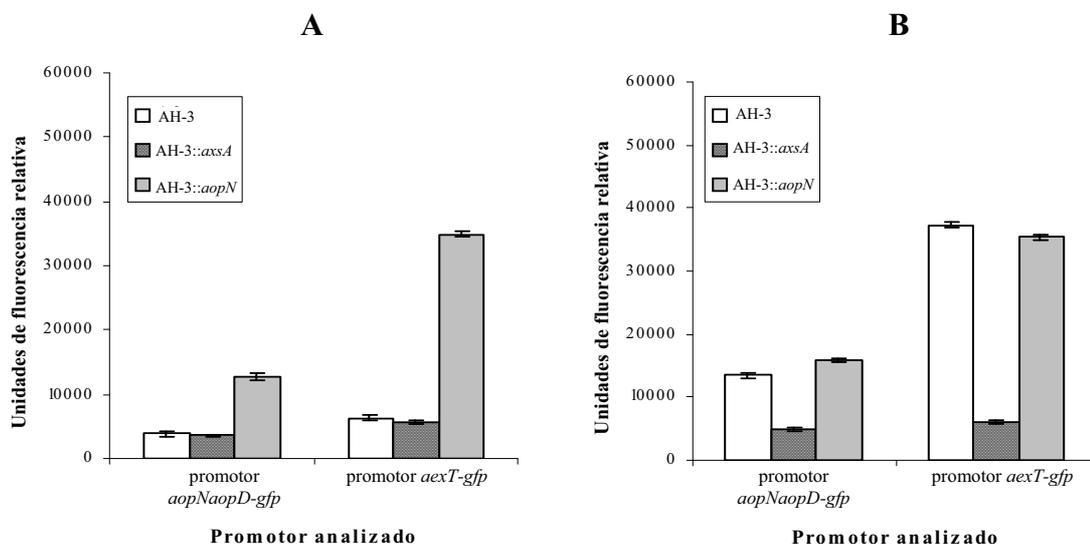


Figura 3.30 Gráfico de la influencia de los genes *axsA* y *aopN* en la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en TSB (A) y TSB suplementado con MgCl₂ 20 mM y EGTA 10 mM (B).

3.5.4.2 Sistema de dos componentes PhoP/PhoQ

PhoP/PhoQ es un sistema regulador de dos componentes, el sensor de membrana externa PhoQ y el regulador transcripcional citoplasmático PhoP, que media la adaptación a condiciones de limitación de Mg²⁺, regulando numerosas actividades en diversas especies Gram-negativas, entre ellas la virulencia (Groisman, 2001). En *Salmonella* spp. se ha relacionado la expresión de ambos de sus T3SS, codificados en SPI-1 y SPI-2 respectivamente, con la actividad del regulador PhoP (Aguirre *et al.*, 2006).

Los genes que codifican las proteínas PhoP y PhoQ, *phoP* y *phoQ*, conforman el operón *phoP* en ese orden, y por eso decidimos realizar mutagénesis mediante el sistema de recombinación en un punto con el vector pFS100 del primero de los genes. Utilizando los cebadores específicos de la cepa AH-3 *phoP4F* y *phoP4R*, y ADN cromosómico de la cepa AH-3, se amplificó un fragmento interno 532-pb del gen *phoP*. El amplímero se clonó en el vector pGEM-T *easy*, se digirió con la endonucleasa *EcoRI*, y se subclonó en el vector suicida pFS100, generando la construcción pFS-*phoP*. El mutante AH-3::*phoP* se obtuvo mediante conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pSF-*phoP*, la cepa de *A.*

hydrophila AH-405 como receptora, y la cepa de *E. coli* HB101 con el vector pRK2073 como facilitadora de la conjugación. Los recombinantes se seleccionaron en presencia de kanamicina, y se comprobaron tal y como se ha descrito en apartados anteriores.

La figura 3.31 muestra la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en la cepa AH-3::*phoP* en comparación con la cepa parental. La mutación del gen *phoP* provocó un incremento leve (aproximadamente un 10%) en la expresión de ambos promotores, indicando que este gen podría ejercer un efecto de regulación negativa, bien directo o indirecto, sobre los genes de tipo III.

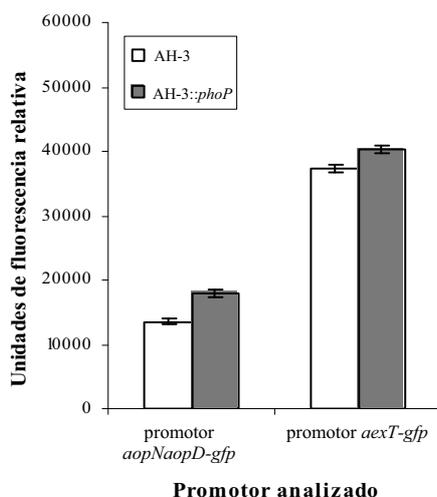


Figura 3.31 Gráfico de la influencia del gen *phoP* en la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT*.

3.5.4.3 Sistema AhyI/AhyR

Las proteínas AhyI y AhyR pertenecen a las familias LuxI y LuxR, respectivamente. Las proteínas LuxI/LuxR están implicadas en un mecanismo de comunicación celular que se conoce con el nombre de *quorum sensing* (Swift *et al.*, 1997). El *quorum sensing* permite a las bacterias determinar la densidad de población celular mediante la comunicación entre células, mecanismo que se da gracias a la capacidad bacteriana de responder a un compuesto químico similar a una hormona, constituyendo la respuesta un cambio en la expresión génica (Reading and Sperandio, 2006). En muchas bacterias Gram-negativas, la molécula señal de *quorum sensing* es un miembro de la familia acil homoserina lactona (AHL). En general, la proteína LuxI es la encargada de la síntesis de la molécula señal, mientras que la proteína LuxR es el regulador transcripcional capaz de unirse a esta molécula señal.

Se mutaron los genes que codifican las proteínas AhyI y AhyR, *ahyI* y *ahyR*, mediante el sistema de recombinación en un punto con el vector pFS100. Para ello, se utilizó ADN cromosómico de la cepa AH-3 y las parejas de cebadores *ahyIF2* y *ahyIR1* (213-pb), y *ahyRF1* y *ahyRR3* (541-pb), respectivamente. Ambos amplímeros se clonaron en el vector pGEM-T *easy*, construcciones que se digirieron con la endonucleasa *EcoRI*, para posteriormente subclonar los fragmentos génicos truncados en el vector suicida pFS100, generando las construcciones pFS-*ahyI* y pFS-*ahyR*. Los mutantes AH-3::*ahyI* y AH-3::*ahyR* se obtuvieron mediante conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pSF-*ahyI* o pSF-*ahyR*, la cepa de *A. hydrophila* AH-405 como receptora, y la cepa de *E. coli* HB101 con el vector pRK2073 como facilitadora de la conjugación. Los recombinantes se seleccionaron en presencia de kanamicina y se comprobaron tal y como se ha descrito en apartados anteriores.

La figura 3.32 muestra la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en las cepas AH-3::*ahyI* y AH-3::*ahyR* en comparación con la cepa parental. La mutación de ambos genes dio lugar a un incremento de entre el 20 y el 30% en la expresión de ambos promotores, indicando una regulación negativa del sistema de *quorum sensing* en la expresión de genes de tipo III.

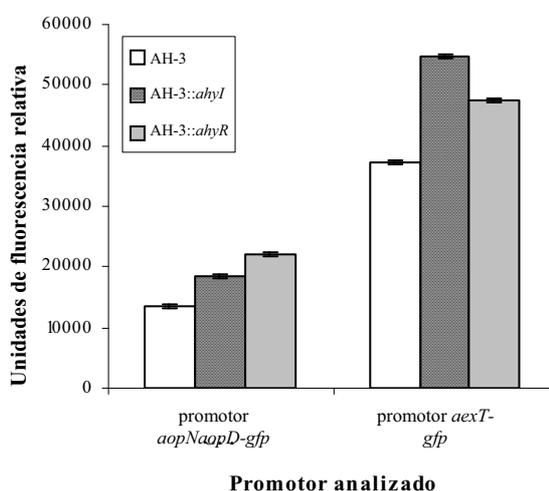


Figura 3.32 Gráfico de la influencia de los genes *ahyI/ahyR* en la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT*.

3.5.4.4 Subunidad AceA de la enzima piruvato deshidrogenasa

El complejo piruvato deshidrogenasa (PDHc) convierte piruvato a acetil-CoA mediante la combinación de la acción de tres enzimas: piruvato

deshidrogenasa/descarboxilasa (E1), acetiltransferasa (E2) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3) (de Kok *et al.*, 1998). Estudios previos indicaban una posible relación del PDHc con la expresión de genes de tipo III (Dacheux *et al.*, 2002).

Del estudio de la organización génica de los genes que codifican el complejo PDH en diversas bacterias Gram-negativas, se infiere que, en general, estos genes se organizan en operones con el siguiente orden: gen codificante de la subunidad E1, gen codificante de la subunidad E2 y gen codificante de la subunidad E3, aunque, en ocasiones, éste último puede presentar una localización genómica diferente (de Kok *et al.*, 1998). La nomenclatura de estos genes varía en función de la especie y, en este estudio, se denominarán *aceA*, *aceB* y *aceC*, respectivamente.

Se mutó el gen *aceA* de *A. hydrophila* AH-3 mediante recombinación en un punto con el vector pFS100. Utilizando los cebadores *aceAF1* y *aceAR1*, y ADN cromosómico de la cepa AH-3, se amplificó un fragmento interno de 542-pb del gen *aceA*. El amplímero se clonó en el vector pGEM-T *easy*, se digirió con la endonucleasa *EcoRI*, y se subclonó en el vector suicida pFS100, generando la construcción pFS-*aceA*. El mutante AH-3::*aceA* se obtuvo mediante conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pSF-*aceA*, la cepa de *A. hydrophila* AH-405 como receptora, y la cepa de *E. coli* HB101 con el vector pRK2073 como facilitadora de la conjugación. Los recombinantes se seleccionaron en presencia de kanamicina y se comprobaron tal y como se ha descrito en apartados anteriores.

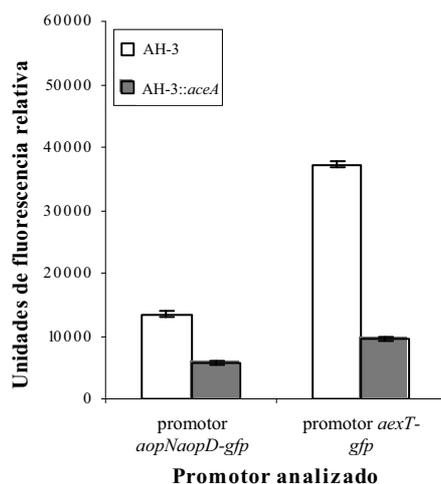


Figura 3.33 Gráfico de la influencia del gen *aceA* en la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT*.

La figura 3.33 muestra la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en la cepa AH-3::*aceA* en comparación con la cepa parental. La mutación del gen *aceA* provocó la disminución de la expresión del promotor *aopNaopD* en un 50%, y la del promotor *aexT* en un 70%, indicando que el complejo PDHc parece ser necesario para la expresión de los genes de tipo III.

3.5.4.5 Proteína periplásmica DsbA

La formación de puentes disulfuro es un paso esencial en el plegamiento y, por tanto, el correcto funcionamiento de muchas proteínas secretadas y de membrana. En *E. coli*, la formación de puentes disulfuro es catalizada por las proteínas Dsb. DsbA es una pequeña proteína periplásmica que presenta un motivo Cys-X-X-Cys en su sitio activo que interactúa con sustratos reducidos, catalizando la oxidación de sus residuos de cisteína a puentes disulfuro (Miki *et al.*, 2004). En muchas especies bacterianas, DsbA está implicada en la patogenicidad, ya que participa en el plegamiento de determinantes de virulencia. De hecho, la función de DsbA parece ser necesaria para el correcto funcionamiento del T3SS de *Y. pestis* (Jackson and Plano, 1999), *S. flexneri* (Watarai *et al.*, 1995), *P. aeruginosa* (Ha *et al.*, 2003) y *S. enterica* serovar Typhimurium (Ellermeier and Slauch, 2004; Miki *et al.*, 2004).

Se realizó mutagénesis del gen *dsbA* de *A. hydrophila* AH-3 mediante recombinación en un punto con el vector pFS100. Utilizando los cebadores dsbAF1 y dsbAR1, y ADN cromosómico de la cepa AH-3, se amplificó un fragmento interno de 502-pb del gen *dsbA*. El amplímero se clonó en el vector pGEM-T *easy*, se digirió con la endonucleasa *EcoRI*, y se subclonó en el vector suicida pFS100, generando la construcción pFS-*dsbA*. El mutante AH-3::*dsbA* se obtuvo mediante conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pSF-*dsbA*, la cepa AH-405 como receptora, y la cepa de *E. coli* HB101 con el vector pRK2073 como facilitadora de la conjugación. Los recombinantes se seleccionaron en presencia de kanamicina y se comprobaron tal y como se ha descrito en apartados anteriores.

La figura 3.34 muestra la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en la cepa AH-3::*dsbA* en comparación con la cepa parental. La mutación del gen *dsbA* provocó un cierto aumento (10-20%) de la expresión de ambos promotores, indicando que, en el

caso de *A. hydrophila* AH-3, la actividad de esta proteína parece ejercer un efecto negativo sobre la expresión de los genes de tipo III.

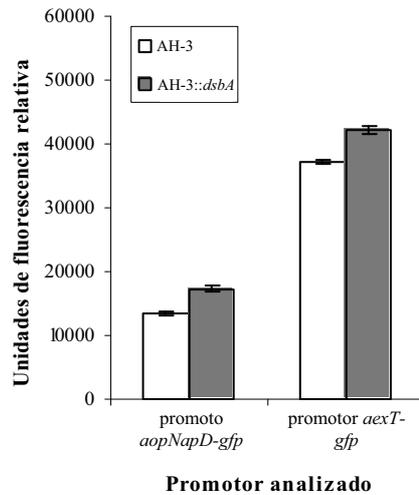


Figura 3.34 Gráfico de la influencia del gen *dsbA* en la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT*.

3.5.4.6 Genes implicados en la biosíntesis del flagelo polar

La cepa AH-3 de *A. hydrophila* AH-3 es móvil gracias a la producción de un flagelo polar de manera constitutiva y de múltiples flagelos laterales cuando crece en superficies. Ambos sistemas de flagelación están codificados por agrupaciones génicas independientes, formadas por más de 30 genes cada una. La ultraestructura del cuerpo basal del flagelo bacteriano y la maquinaria de secreción de tipo III son muy similares, lo que hace suponer que ambos sistemas podrían estar relacionados en cuanto a funcionamiento y/o control (Blocker *et al.*, 2003). De hecho, se ha descrito una regulación cruzada de estos sistemas en *P. aeruginosa* (Soscia *et al.*, 2007), *Y. enterocolitica* (Bleves *et al.*, 2002), y *S. enterica* serovar Typhi (Eichelber and Galán, 2000).

Con el fin de estudiar si podría existir algún tipo de coordinación entre el ensamblaje y funcionamiento del flagelo y el T3SS en *A. hydrophila* AH-3, se analizó la actividad de los promotores *aopN-aopD-gfp* y *aexT-gfp* en mutantes en algunos genes implicados en la biosíntesis y/o correcto ensamblaje del flagelo polar: *rpoN* (AH-5502), *flrA*, *fliA* (AH-4443), *flhA_P* (AH-4442), *flgL* (AH-2325), y *flmB* (AH-1726). En *A. hydrophila* AH-3, los genes que codifican el sistema de flagelación polar están controlados por una cascada de regulación en la que están implicadas las proteínas RpoN, FlrA y FliA. La proteína RpoN, o factor σ^{54} de la ARN polimerasa, es necesaria

para iniciar la biosíntesis tanto de la flagelación polar como de la lateral en *A. hydrophila* AH-3 (Canals, 2007); la proteína FlrA presenta similitud con la proteína FlrA de *V. cholerae* y junto con la ARN polimerasa unida al factor σ^{54} , es responsable de la transcripción de los genes de clase II del sistema de flagelación polar, que incluyen componentes del anillo MS y del complejo conmutador, y los reguladores FlrB, FlrC y FliA (σ^{28}); la proteína FliA, o factor σ^{28} específico para la flagelación polar, regula la expresión de genes de clase IV, entre ellos los que codifican las flagelinas, y su mutación causa la pérdida del filamento del flagelo polar (Canals, 2007). Por otro lado, FlhA_P forma parte del complejo de exportación del FT3SS, y es homólogo al componente de T3SS AscV. FlgL es una de las proteínas asociadas al gancho (HAP, *Hook-Associated Protein*) que funcionan como adaptadores estructurales entre el gancho y el filamento, causando su mutación la pérdida de filamento. FlmB es una proteína implicada en la glicosilación de los flagelos polar y lateral, y su mutación también provoca la pérdida del filamento de ambos flagelos.

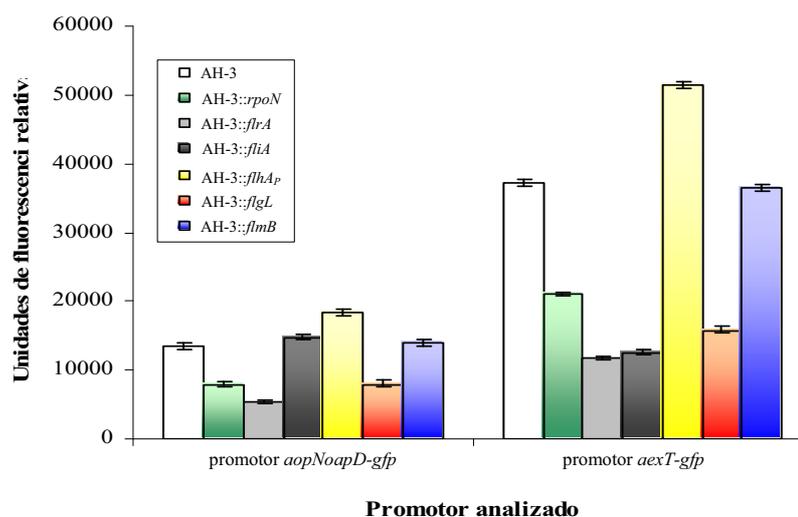


Figura 3.35 Gráfico de la influencia de los genes, implicados en la biosíntesis del flagelo, *rpoN*, *flrA*, *fliA*, *flhA_P*, *flgL* y *flmB*, en la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT*.

La figura 3.35 muestra la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en las cepas AH-3::*rpoN*, AH-3::*flrA*, AH-3::*fliA*, AH-3::*flhA_P*, AH-3::*flgL* y AH-3::*flmB* en comparación con la cepa parental. La mutación de los genes *rpoN*, *flrA* o *flgL* dio lugar a una disminución de la expresión de ambos promotores (aproximadamente 40%, 60%, y 45%, respectivamente) mientras que la mutación del gen *flhA_P* produjo el efecto contrario (aumento del 30% aproximadamente). Por otro lado, FliA parece ejercer un efecto de regulación positiva únicamente en el caso del promotor de *aexT*, ya que su

mutación no mostró cambios en la expresión del promotor *aopN-aopD* pero sí en el promotor *aexT* (disminución del 66%); FlmB no produjo cambios de expresión en ninguno de los promotores.

3.5.4.7 Genes implicados en la biosíntesis del lipopolisacárido

El LPS es un complejo glucolipídico que constituye el componente mayoritario de la capa externa de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, y tiene un importante papel inmunogénico y estructural, además de mediar la interacción entre la superficie bacteriana y el ambiente. En base a su compleja estructura química, se ha dividido en tres regiones: el lípido A, el núcleo y el antígeno O (figura 1.3). Debido a que el contacto célula bacteriana-célula eucariota parece ser clave para una secreción de tipo III efectiva, recientemente se han publicado estudios que relacionan cambios en la estructura del LPS con el correcto funcionamiento del T3SS (West *et al.*, 2005; Augustin *et al.*, 2007).

Con objeto de estudiar si cambios en la estructura del LPS podían afectar a la expresión del T3SS en *A. hydrophila* AH-3, se analizó la actividad de los promotores *aopN-aopD-gfp* y *aexT-gfp* en mutantes en algunos genes implicados en la biosíntesis del LPS: *lpxM*, *wzy* y *waaL* (nuestro laboratorio). Estudios realizados en *E. coli* indican que el gen *lpxM* codifica una aciltransferasa encargada de la transferencia de miristato a la molécula de Kdo₂-IV_A, último intermediario antes de la compleción de la biosíntesis del lípido A (Raetz and Whitfield, 2002). La polimerasa del antígeno O, Wzy, forma parte del sistema dependiente de la polimerasa Wzy de polimerización y translocación del antígeno O. Esta proteína, situada en la membrana citoplasmática, realiza la transferencia del polímero de antígeno O en formación desde su transportador UndPP (undecaprenil pirofosfato) al extremo no reductor de la nueva unidad de repetición ligada al UndPP, reacción que se lleva a cabo en el periplasma bacteriano (Raetz and Whitfield, 2002). El gen *waaL* codifica la ligasa, situada en membrana interna, que une el antígeno O al núcleo-lípido A.

La figura 3.36 muestra la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en las cepas AH-3::*lpxM*, AH-3::*wzy* y AH-3::*waaL* en comparación con la cepa parental. La mutación de los genes *wzy* o *waaL* dio lugar a un incremento de la expresión de ambos promotores de un 25%, mientras que la mutación del gen *lpxM* provocó una disminución de la expresión de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* (aproximadamente

un 50% y un 20%, respectivamente), indicando que, en *A. hydrophila* AH-3, cambios en la estructura del LPS parecen afectar a la expresión de genes de T3SS.

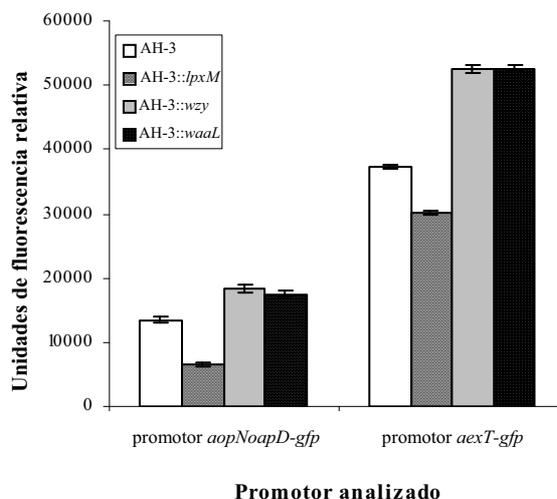


Figura 3.36 Gráfico de la influencia de los genes, implicados en la biosíntesis del LPS, *lpxM*, *wzy* y *waaL*, en la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT*.

3.6 Inducción del T3SS de *A. hydrophila* AH-3

3.6.1 Construcción de un mutante en el gen *aopN* mediante doble recombinación

Con objeto de estudiar la inducción de la actividad del T3SS en *A. hydrophila* AH-3, se construyó el mutante AH-1114 (AH-3::*aopN*) en el gen *aopN*, cuyo producto parece estar implicado en la regulación de la secreción en diferentes especies bacterianas (ORF9, apartado 3.2.3.10).

La obtención de este mutante se realizó mediante delección en pauta del gen *aopN* de *A. hydrophila* AH-3 (apartado 2.5.17.2.2). Para ello, las regiones de ADN que flanquean el gen *aopN* se amplificaron utilizando las parejas de cebadores BaopNA y aopNB (719-pb), y aopNC y BaopND (602-pb), de manera independiente. Los amplicones obtenidos se utilizaron como molde para una nueva reacción de PCR, utilizando los cebados BaopNA y BaopND (1342-pb). Debido a que los cebadores BaopNA y BaopND contienen una diana para la endonucleasa *Bam*HI, el producto de amplificación fue digerido con dicha enzima de restricción, y ligado al vector pDM4, previamente digerido con la endonucleasa *Bgl*II y desfosforilado. La ligación se transformó a la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir), seleccionando a los transformantes en placas de LB cloranfenicol a una temperatura de incubación de 30°C.

La introducción del plásmido pDM4-*aopN* en la cepa AH-3 de *A. hydrophila* se realizó mediante conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* MC1061 (λ pir) que contenía el vector pDM4-*aopN*, la cepa de *A. hydrophila* AH-405 como receptora y la cepa de *E. coli* HB101 con el vector pRK2073 como facilitadora. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con rifampicina y cloranfenicol. La comprobación de la correcta inserción del plásmido por recombinación en un punto se realizó mediante PCR con los cebadores BaopNA y BaopND, dando lugar los candidatos positivos a dos bandas de amplificación, una correspondiente al gen deletado (1342-pb) y la otra correspondiente al gen salvaje (2061-pb). Con el fin de provocar una segunda recombinación que permitiera la escisión del plásmido pDM4 y de la copia salvaje del gen del genoma, se realizó un banco de diluciones a partir del transconjugante seleccionado, que se sembró en placas TSA suplementadas con sacarosa 10% e incubó a una temperatura de 30°C, seleccionando posteriormente los candidatos sensibles a Cm. Los candidatos seleccionados se analizaron mediante PCR con los cebadores BaopNA y BaopND, seleccionando como mutantes aquellos que presentaban la banda de amplificación de 1342-pb correspondiente al gen deletado.

3.6.2 Complementación del mutante AH-1114

Con el fin de complementar el mutante AH-1114 mediante la introducción exclusivamente del gen *aopN*, se procedió al clonaje de dicho gen en el vector pACYC184.

Para amplificar la región requerida del gen, se utilizaron los cebadores *aopNF5* y *aopNR5* (1300-pb), y la banda de amplificación se clonó en el vector pGEM-T *easy*. Seguidamente, se realizó doble digestión con las endonucleasas *Bam*HI y *Sph*I (contenidas en los cebadores *AopNR5* y *AopNF5*, respectivamente), y la banda obtenida se subclonó en el vector pACYC184 previamente digerido con dichas endonucleasas, de tal manera que la región codificante del gen *aopN* quedaba orientada con respecto al promotor del casete de resistencia a tetraciclina del vector, permitiendo así su expresión. La ligación anterior se introdujo mediante electroporación a la cepa de *E. coli* DH5 α , seleccionando los transformantes en placas de LB cloranfenicol a una temperatura de 37°C. Los transformantes se comprobaron mediante aislamiento del plásmido y posterior doble digestión *Bam*HI y *Sph*I. A continuación, se realizó conjugación triparental empleando como dadora la cepa de *E. coli* DH5 α que contenía

el vector pACYC-*aopN*, la cepa de *A. hydrophila* AH-405 como receptora 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, comprobándose mediante extracción del plásmido y posterior doble digestión *Bam*HI y *Sph*I.

3.6.3 Inducción del T3SS por depleción de calcio

El objetivo biológico del T3SS es translocar proteínas efectoras del citoplasma bacteriano al interior de la célula huésped. No obstante, como se ha comentado anteriormente, en algunas bacterias, como *Yersinia* spp. y *P. aeruginosa*, se ha observado secreción de tipo III *in vitro* cuando su crecimiento se realiza en un medio rico con depleción de calcio (Ramamurthi and Schneewind, 2002). Dada la similitud del T3SS de *A. hydrophila* con los de *Y. enterocolitica* y *P. aeruginosa* (apartado 4.2.1), decidimos estudiar si en *A. hydrophila* AH-3 también se daba una secreción diferencial en función de la concentración de iones Ca^{2+} en el medio, tomando como indicador la presencia de la proteína AexT en sobrenadantes.

Para ello, se realizaron cultivos de las cepas de *A. hydrophila* AH-3, AH-1089 (AH-3::*aexT*) y AH-1089 + pLA-AexT, AH-3::*ascV* y AH-3::*ascV* + pLA-T3SS4, y AH-1114 (AH-3::*aopN*) y AH-1114 complementada, en TSB suplementado con EGTA 10 mM y MgCl_2 20 mM ($-\text{Ca}^{2+}$) o sin suplementar ($+\text{Ca}^{2+}$), incubándose a 37°C con aireación. Los sobrenadantes de dichos crecimientos fueron purificados y concentrados (apartado 2.6.1.6), y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y *Western blot*, utilizando el suero anti-AexT de *A. hydrophila* AH-3.

Tal y como muestra la figura 3.37 A, se observó una banda de reacción positiva con el suero anti-AexT en el sobrenadante procedente de la cepa salvaje, AH-3, crecida en condiciones de depleción de calcio. En las mismas condiciones (baja concentración de calcio), no se observó reacción positiva con el citado suero en los mutantes AH-3::*aexT* y AH-3::*ascV*, recuperando ambos el fenotipo salvaje al ser complementados con los cósmidos pLA-AexT y pLA-T3SS4, respectivamente. Cabe destacar, que la proteína no se detectó en ninguno de los sobrenadantes procedentes de crecimientos en TSB.

El mutante AH-3::*aopN* fue capaz de secretar la proteína AexT tanto en condiciones de depleción como de no depleción de calcio, TSB a 37°C (figura 3.37 B), recuperando el fenotipo salvaje al ser complementado con el plásmido pACYC-*aopN*. Dicho mutante

no presentó variaciones en su comportamiento al contener el plásmido pACYC184. La figura 3.37 C muestra la existencia de diferencias en el patrón de proteínas secretadas al exterior por la cepa AH-3 de *A. hydrophila* en función de la concentración de calcio en el medio de crecimiento. El mutante AH-3::*aopN* en presencia de calcio presentó un patrón similar al de la cepa AH-3 en condiciones de depleción de calcio.

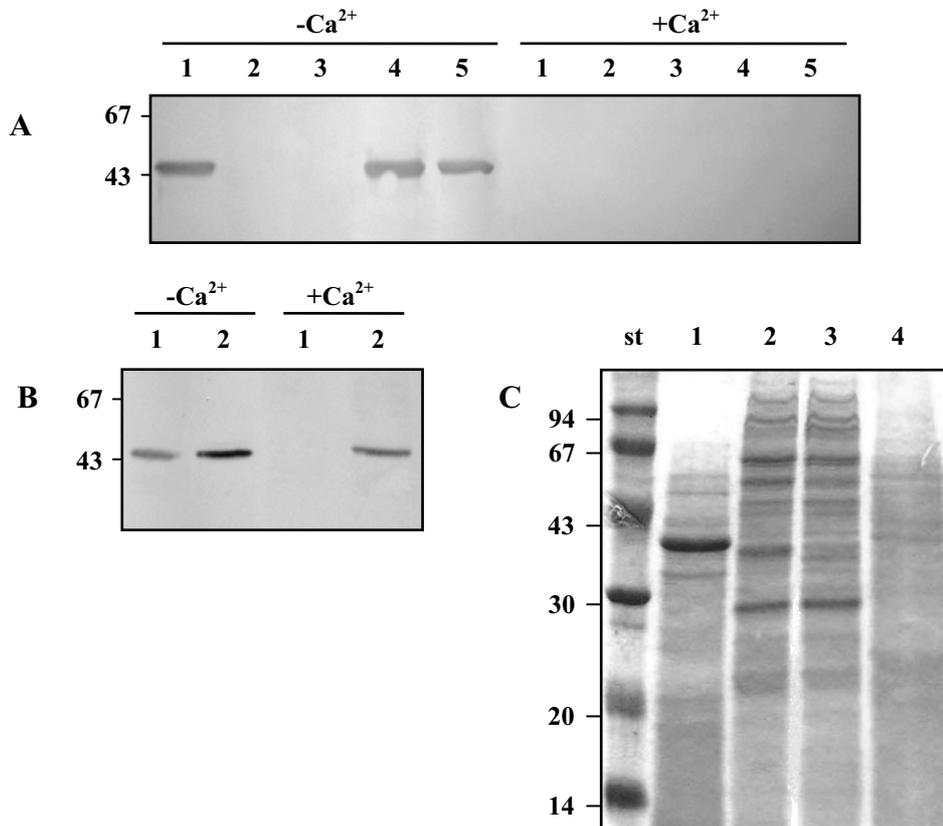


Figura 3.37 Sobrenadantes de cultivos bacterianos analizados mediante SDS-PAGE (C) y *Western blot* utilizando antisuero anti-AexT de *A. hydrophila* AH-3 (A y B). Carril 1, AH-3; carril 2, AH-3::*aexT*; carril 3, AH-3::*ascV*; carril 4, AH-*aexT* + pLA-AexT; carril 5, AH-3::*ascV* + pLA-T3SS4 (A). Carril 1, AH-3; carril 2, AH-3::*aopN* (B). Carriles 1 y 2, AH-3 en condiciones de +Ca²⁺ y -Ca²⁺ respectivamente; carriles 3, AH-3::*aopN* en condiciones de +Ca²⁺; carril 4, AH-3::*aopN* + pACYC-*aopN* en condiciones de +Ca²⁺ (C).

3.6.4 Inducción del T3SS por contacto con células eucariotas

Uno de los mecanismos de regulación de la secreción de tipo III es el contacto de la bacteria con la célula huésped. Se ha descrito que dicho contacto es necesario para la activación *in vivo* del T3SA. Con el fin de investigar la presencia de la exoenzima T (AexT) en la fracción citoplasmática de células eucariotas tras la infección con *A. hydrophila*, se realizaron ensayos de translocación con la cepa salvaje AH-3, los mutantes AH-3::*aexT* y AH-3::*ascV*, y dichos mutantes complementados con los

cósmidos pLA-AexT y pLA-T3SS4, respectivamente. Las fracciones soluble (TS) e insoluble (TI) en Triton obtenidas, fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y *Western blot*, utilizando el suero anti-AexT de *A. hydrophila* AH-3.

Como puede observarse en la figura 3.38 A, se detectó la proteína AexT en la fracción soluble en Triton (proteínas citoplasmáticas y de membrana eucariotas) de *A. hydrophila* AH-3, pero no en la misma fracción de los mutantes AH-3::*aexT* y AH3::*ascV*. Dichos mutantes complementados con los respectivos genes salvajes sí que presentaron reacción positiva contra la proteína AexT en sus fracciones Triton-solubles, mientras que los mismos mutantes conteniendo sólo el cósmido pLA2917 no presentaron reacción positiva. La proteína AexT de *A. hydrophila* AH-3 se presentó en la fracción insoluble en Triton (células bacterianas, células eucariotas no lisadas y núcleos) de todas las cepas, con excepción del mutante AH-3::*aexT*. No se observaron diferencias en los resultados de los ensayos de translocación con el uso de células EPC o HEp-2.

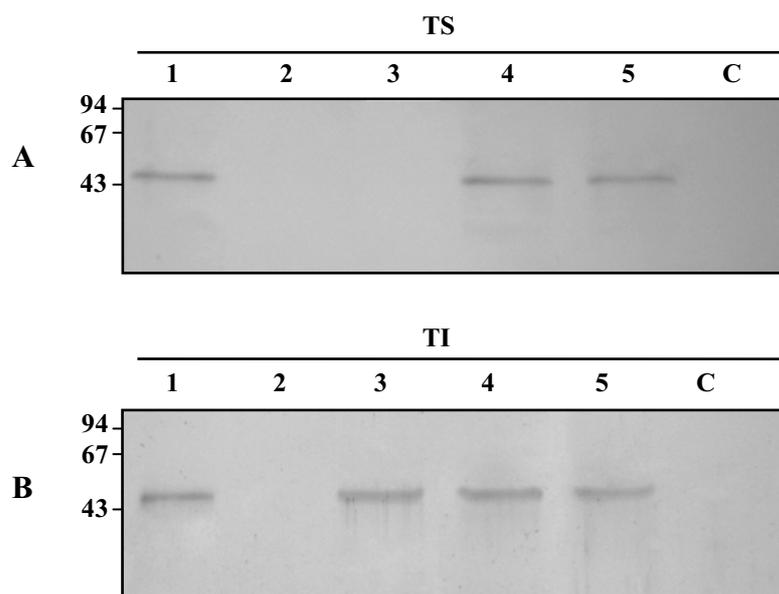


Figura 3.38 Ensayo de translocación de AexT de *A. hydrophila* AH-3 y detección mediante *Western blot* con suero anti-AexT de *A. hydrophila* AH-3. TS, fracción tritón-soluble (A); TI, fracción tritón-insoluble (B). Carril 1, AH-3; carril 2, AH-3::*aexT*; carril 3, AH-3::*ascV*; carril 4, AH-3::*aexT* + pLA-AexT; carril 5, AH-3::*ascV* + pLA-T3SS4; carril C, control de células EPC.

4. Discusión



4.1 Identificación, mediante sustracción génica, de genes potencialmente implicados en virulencia en *A. hydrophila*

El panorama ideal para la comprensión de la patogenicidad de un organismo sería la identificación y el análisis de todos sus genes implicados en virulencia. Actualmente, existen diferentes procedimientos para detectar genes potencialmente implicados en la patogenicidad de un microorganismo, como por ejemplo la hibridación sustractiva-supresiva, ya que es un método que permite identificar diferencias a nivel genético entre dos cepas bacterianas (Mahairas *et al.*, 1996). Con el fin de detectar genes implicados en la patogenicidad de *A. hydrophila*, se realizaron tres experimentos de SSH entre los ADN genómicos de las cepas PPD134/91 (virulenta), y PPD35/85 y PPD64/90 (no virulentas). De este modo, se obtuvieron 22 fragmentos diferentes y específicos de la cepa PPD134/91: 15 de ellos (F2/F3, F11, F20, F52, F61/F72/F88/F109, F89, F92, F93, F97/PB45, F99/F106, F108, PA91, PB28/PB35, PB60, PB80/PA26) codificaban 19 proteínas con homólogos en otras bacterias, y los 7 restantes (F32, F34, F58, F85, F87, PA1/PA4/PB62, y PA6/PA98/PB38/PB78) presentaban ORF que no mostraron similitud significativa con ninguna de las entradas de la base de datos *GenBank*, pudiendo representar nuevos determinantes de virulencia (tabla 3.1).

De las 19 ORF que presentaron similitud con proteínas previamente descritas en otras bacterias, 12 lo hicieron con factores asociados a virulencia, entre los cuales se encontraban dos previamente descritos en el género *Aeromonas*, la hemolisina (HlyA, F108) y la aerolisina (AerA, PA26/PB80). Los diez genes restantes identificados constituyen factores de virulencia descritos por primera vez en *A. hydrophila*, y muestran elevada similitud con proteínas implicadas en la virulencia de otros patógenos: el homólogo de una proteína tipo histona (HU, F52), la oligopeptidasa A (OpdA, F88/F109/F61/F72), una proteína de membrana externa (OmpAI, F2/F3), VsdC y un homólogo de una proteína de secreción de tipo III (F11), una proteína de biosíntesis de acetobactina (F20), el sistema de regulación de dos componentes BvgA/BvgS (PA91), una arilsulfotransferasa (PB80/PB26), y una proteína de la familia GGDEF (PB60).

La proteína VsdC es esencial para la virulencia de *Salmonella enterica* serovar Dublin (Krause *et al.*, 1991). La proteína homóloga de VsdC en *A. hydrophila* contiene un dominio VIP2, que pertenece a la familia de toxinas ADP-ribosilantes de actina. La

presencia de una proteína homóloga a una proteína de secreción de tipo III junto con el hecho de que este sistema de secreción había sido previamente descrito en la especie psicrófila *A. salmonicida* (Burr *et al.*, 2002; Burr *et al.*, 2003; Stuber *et al.*, 2003), indicaban la posible presencia del T3SS en *A. hydrophila*. La creciente importancia de este sistema en los últimos años, nos llevó a su localización y estudio en *A. hydrophila* (apartados posteriores). La proteína de biosíntesis de acinetobactina está implicada en la adquisición de hierro y parece tener un papel importante en la patogénesis de *Acinetobacter baumannii* (Mihara *et al.*, 2004). En *Bordetella pertussis*, el sistema de dos componentes BvgA/BvgS controla la expresión de diversos genes implicados en virulencia, como por ejemplo los que codifican los *pili* (Mooi *et al.*, 1987) o la adenilato ciclasa (Glaser *et al.*, 1988). Se ha sugerido que la arilsulfotransferasa es un factor de virulencia de la familia de bacterias orales *Campylobacter-Wolinella*, estando ampliamente distribuido en especies de *Campylobacter* (Wyss, 1989; Yao and Guerry, 1996). Por último, las proteínas con dominios GGDEF, así denominadas originalmente debido a un patrón de residuos conservados, y con actividad diguanilato ciclasa, se han relacionado con la formación de “biofilms” en géneros como *Vibrio*, *Salmonella* o *Yersinia*, con motilidad en *P. aeruginosa*, y con la expresión de genes de virulencia en *Vibrio cholerae* (Rahman *et al.*, 2007).

Las 7 proteínas restantes mostraron elevada similitud con proteínas todavía no asociadas a virulencia: una topoisomerasa (PB28/PB35), la familia de proteínas YaiI/YqxD (F89), la *para*-aminobenzoato sintasa (F92), una putativa proteína exportada (F93), una proteína transmembrana de transporte (F99/F106), una segunda proteína transmembrana (PB28/PB35), y una proteína tipo transcriptasa reversa (F97).

4.2 Caracterización de la agrupación génica del sistema de secreción de tipo III de *Aeromonas* mesófilas

4.2.1 Análisis de la secuencia de nucleótidos del T3SS de *Aeromonas* spp.

La elevada similitud de una de las ORF localizadas en uno de los fragmentos de sustracción con una proteína de secreción de tipo III, sugería que la especie mesófila *A. hydrophila* podía presentar los genes necesarios para codificar este factor de

patogenicidad. Además, estudios previos desarrollados por Burr y colaboradores, habían descrito la presencia de un T3SS funcional codificado en un plásmido termolábil en la especie *A. salmonicida* (Burr *et al.*, 2002; Stuber *et al.*, 2003); sin embargo, los genes de tipo III secuenciados en esta especie no eran suficientes para dar lugar a un T3SS completo si se comparaba con los T3SS descritos con anterioridad en otros géneros como *Yersinia* y *Pseudomonas*. Dada la importancia de este sistema en la patogenicidad de otras especies bacterianas (Lee, 1997; Hueck, 1998), se decidió realizar un estudio más detallado de este sistema en cepas de *Aeromonas* mesófilas. Concretamente, se escogieron las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* por pertenecer a los serotipos O:11 y O:34 respectivamente, dos de los cuatro serotipos (O:11, O:16, O:18, O:34) que predominantemente se encuentran asociados a casos de gastroenteritis y septicemia en estudios clínicos (Merino *et al.*, 1993b).

Varios de los componentes del T3SS se encuentran altamente conservados a nivel de secuencia aminoacídica en diferentes especies bacterianas. Un ejemplo lo constituye la familia LcrD, formada por componentes presentes en todos los T3SS conocidos, y con una similitud de secuencia entre miembros individuales que varía entre el 36 y el 66% (Hueck, 1998). En base a la elevada similitud de secuencia entre los miembros de esta familia, se procedió al alineamiento de dichos genes y proteínas de las especies *A. salmonicida*, *P. aeruginosa* y *Y. enterocolitica* (números de acceso *GenBank*: AJ458292, AAC454944 y AF102990, respectivamente), para localizar así las regiones más conservadas tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico, y proceder al diseño de cebadores que permitieran amplificar este gen en las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*. En ambos casos se obtuvo un resultado positivo, determinándose la secuencia completa de la agrupación génica del T3SS en las dos cepas. Concretamente, la secuencia de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* constituye el primer T3SS completo descrito en el género *Aeromonas* (Vilches *et al.*, 2004), completándose posteriormente la secuencia de dicha agrupación en la especie *A. salmonicida* (Burr *et al.*, 2005).

La organización genética de los diferentes sistemas de secreción de tipo III descritos hasta el momento comparte una serie de características: (i) los genes que codifican estos sistemas están agrupados, (ii) muchos de los genes de cada uno de estos sistemas codifican proteínas que tienen homólogos en otros T3SS, (iii) existen bloques de genes que se encuentran conservados en cuanto al orden génico en diferentes sistemas, y (iv)

la organización genética global de las agrupaciones de T3SS se encuentra conservada en varios subgrupos (Hueck, 1998; Troisfontaines and Cornelis, 2005).

Aunque los genes que codifican los T3SS se encuentran agrupados, el orden génico dentro de estas agrupaciones es parcialmente variable entre sistemas individuales. No obstante, dos bloques de genes parecen estar conservados en orden en muchos de estos sistemas. En *Yersinia* spp., el primer grupo lo forma el conjunto *yscN-yscU*, mientras que el segundo bloque se corresponde con los genes *yscI-yscL* (Hueck, 1998). En los T3SS de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, también se encuentran estos dos bloques génicos conservados: *ascN-ascU* y *ascI-ascL* (figura 4.1).

Inicialmente, la comparación de la organización genética global entre diferentes T3SS mostraba varios subgrupos que presentaban similitud en bloques génicos más grandes. Estos subgrupos eran cinco: (i) *Shigella flexneri* y *Salmonella typhimurium* SPI-1, (ii) *Yersinia* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*, (iii) *Erwinia amylovora* y *Pseudomonas syringae*, (iv) *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris*, y (v) *Salmonella typhimurium* SPI-2 y *Escherichia coli* enteropatógenas (EPEC) y enterohemorrágicas (EHEC) (Cornelis and Van Gijsegem, 2000). El T3SS de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* es prácticamente idéntico en organización genética al de *P. aeruginosa*, y muy parecido al de *Yersinia* spp. De hecho, esta segunda parece diferir básicamente en una inversión génica de los bloques *yopN-yopD* e *yscN-yscU* respecto al bloque *virG-lcrQ* (figura 4.1). Por lo tanto, de acuerdo con estas observaciones, el T3SS de *A. hydrophila* debería incluirse en el subgrupo dos de la clasificación anterior. Recientemente, se ha descrito que los análisis filogenéticos llevados a cabo con diferentes componentes del aparato de secreción de tipo III dan lugar al mismo tipo de árbol filogenético, apoyando la teoría de que los genes que codifican estos aparatos han evolucionado como grandes bloques génicos intactos (Troisfontaines and Cornelis, 2005). Estos análisis han permitido reorganizar la agrupación anterior e incrementar el número de familias de T3SS a siete (figura 1.19), familias en las que se conservan los genes y la organización genética de los *loci*: (i) la familia Ysc (Ysc, Psc, Lsc, Asc, Vsc, Dsc, Bsc), (ii) la familia Inv-Mxi-Spa, (iii) la familia Ssa-Esc, (iv) la familia Hrc-Hrp 1, (v) la familia Hrc-Hrp 2, (vi) la familia de los Rhizobiales, y (vii) la familia de los Chlamidiales. De igual manera que en el caso anterior, el T3SS de *A. hydrophila* (Asc) forma parte de la familia Ysc, formada por los inicialmente incluidos *Yersinia* spp.

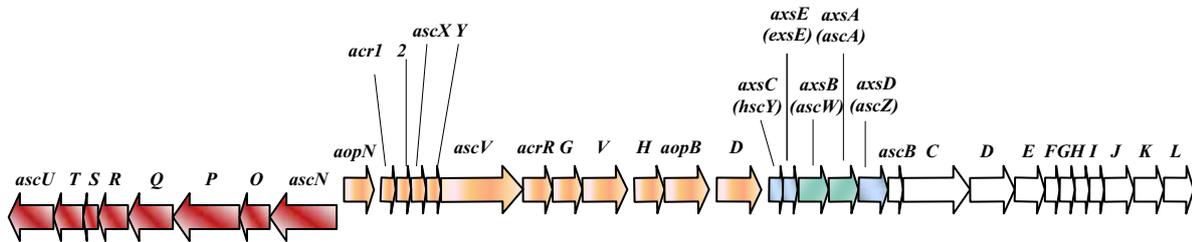
(Ysc) y *P. aeruginosa* (Psc), y por otros como *Photobacterium luminescens* (Lsc), *Vibrio parahaemolyticus* (Vsc), *Desulfovibrio vulgaris* (Dsc), y *Bordetella* spp. (Bsc).

Las agrupaciones génicas responsables de la biosíntesis del T3SS de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* están constituidas por treinta y seis genes. Tanto en el caso de la cepa AH-1 como en el de la cepa AH-3, estos genes están probablemente distribuidos en seis unidades transcripcionales: *ascN-ascU*, *aopN-aopD*, *acrG-aopD*, *hscY/axsC-ascW/axsB*, *ascA/axsA-ascL*, y *ascZ/axsD-ascL* (figura 3.1). En el caso de *Yersinia* spp., se ha descrito que la región génica que codifica el T3SS está organizada como mínimo en siete unidades transcripcionales: *lcrG-yopD*, *yopN-lcrR*, *yscN-yscU*, *virG*, *virF*, *yscA-yscL* y *lcrQ*; mientras que en *P. aeruginosa* esta región probablemente esté organizada en cinco unidades transcripcionales: *pscN-pscU*, *popN-pcrR*, *pcrG-popD*, *exsC-exsA* y *exsD-pscL* (Hueck, 1998). Este hecho sugiere la transcripción siempre conjunta de determinados genes de tipo III en el subgrupo dos y, nuevamente, el gran parecido en cuanto a la organización de las unidades transcripcionales de tipo III entre *P. aeruginosa* y *A. hydrophila*. Cabe destacar que, el análisis de la secuencia de los promotores mencionados para las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* mostró que prácticamente todos ellos (a excepción del putativamente situado en la región 5' del gen *acrG*) poseen la secuencia consenso de unión al factor transcripcional ExsA (TNAAAANA, anexos 7.2 y 7.3) descrita en *P. aeruginosa* (Hoovey and Frank, 1995). La proteína ExsA es el activador transcripcional específico que controla la expresión de los diferentes operones de la agrupación génica de T3SS y también de los genes que codifican los diversos efectores en *P. aeruginosa*. ExsA es un miembro de la familia de activadores transcripcionales AraC y se une a la secuencia consenso TNAAAANA, situada aproximadamente a 50-pb del inicio de transcripción (Hovey and Frank, 1995).

Se ha propuesto que las bacterias patógenas Gram-negativas probablemente hayan adquirido el T3SS a través de algún mecanismo de transferencia génica horizontal. Esta hipótesis se basa en la observación de que dichos sistemas generalmente están codificados en plásmidos o en islas de patogenicidad presentes únicamente en cepas patógenas. Estas islas a menudo presentan un contenido de G+C inferior al contenido cromosómico del organismo (Galán and Colmer, 1999). El análisis del contenido de G+C de la región de ADN implicada en la biosíntesis de los componentes necesarios para la formación del T3SS de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* mostró un

porcentaje de G+C de 63% y 58,3%, respectivamente, aproximadamente dentro del rango del contenido genómico de G+C de las cepas mesófilas del género (57-64%).

Aeromonas hydrophila AH-3 (AH-1)



Yersinia pestis



Pseudomonas aeruginosa

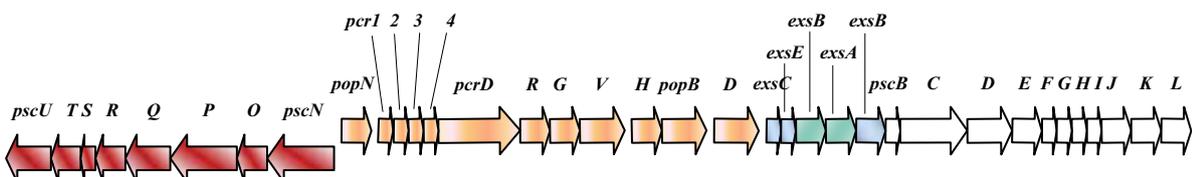


Figura 4.1 Diagrama de la organización genética del T3SS de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, *Y. pestis* y *P. aeruginosa*. El código de color representa la homología de las proteínas entre estas bacterias.

4.2.2 Distribución de los genes del T3SS en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas

El análisis de la distribución de los genes del T3SS en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas con las sondas *ascT-ascN*, *ascC-ascJ*, y *ascV*, que cubren la totalidad de la región génica implicada en la biosíntesis del T3SS, mostró que todas las cepas positivas o negativas para una de las sondas también fueron positivas o negativas para el resto de sondas (tabla 3.6), sugiriendo que las cepas de *Aeromonas* mesófilas que poseen genes de secreción de tipo III presentan un T3SS completo.

La presencia del T3SS fue menos prevalente en cepas ambientales (26% de cepas positivas) que en cepas clínicas (56% de cepas positivas). Además, tal y como sucede con otros factores de patogenicidad, en las cepas clínicas el T3SS es más frecuente en *A. veronii* y *A. hydrophila*, presente en el 80% de los casos, que en *A. caviae*, presente únicamente en un 13% de las cepas. De manera similar, en *P. aeruginosa* se ha demostrado una presencia ubicua del T3SS, tanto en aislados clínicos como en aislados ambientales (Feltman *et al.*, 2001). Estos resultados parecen indicar que, aunque la mayoría de las cepas virulentas disponen de T3SS, la presencia de éste podría no hallarse correlacionada con la virulencia, tal y como ocurre en el género *Rhizobium*, en que este sistema desempeñaría un papel en la relación simbiótica entre la bacteria y su huésped. No obstante, el T3SS en cepas de *Aeromonas* no patógenas podría no ser funcional, tal y como sucede en cepas no patógenas de *Yersinia enterocolitica* (Pierson and Falkow, 1990).

4.3 Análisis de la relación T3SS-virulencia en *A. hydrophila* AH-1 y AH-3

Con el fin de determinar si el T3SS de la cepa AH-1 de *A. hydrophila* era funcional, se construyeron los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD* en los genes *aopB* y *aopD*, respectivamente. Por similitud con otros T3SS más ampliamente estudiados, como el de *Yersinia* spp., los productos de estos genes podrían estar implicados en la formación del poro de translocación en la membrana de la célula eucariota, necesario para la inyección de efectores en su interior y, por lo tanto, para el correcto funcionamiento del sistema (apartado 3.2.3.11, ORF19 y 20).

Para realizar la mutagénesis se utilizó el sistema de recombinación en un punto mediante el vector suicida pCM100, ya que los genes *aopB* y *aopD* se localizan en las posiciones penúltima e última de un operón, lo que implica la no alteración de la expresión de otros genes. Para su caracterización fenotípica, se realizaron estudios de dosis letal₅₀, y ensayos de citotoxicidad y fagocitosis.

De manera similar a lo que sucede en *Yersinia* spp., donde la interrupción de los genes *yopB* y/o *yopD* reduce la virulencia en ratón (Hartland *et al.*, 1994; Hartland *et al.*, 1996), el valor de DL₅₀ en gurami azul de los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD* ($10^{6.6}$ y $10^{6.4}$, respectivamente) fue aproximadamente un logaritmo superior al obtenido en la cepa parental ($10^{5.6}$). Además, cuando los peces fueron inoculados con la misma dosis (10^6), el 80% de los inoculados con la cepa salvaje había muerto en 3 días, mientras que la mayoría de peces a los que se les inyectó alguna de las cepas mutantes se recuperaron en 4 días, sugiriendo estos resultados que el T3SS parece tener un papel importante en la patogenicidad de la cepa AH-1 de *A. hydrophila*.

En cuanto a los ensayos de citotoxicidad, mientras que las monocapas de células EPC infectadas con la cepa parental presentaron aproximadamente un 50% de las células desadheridas a las 2,5 h post-infección, aquellas infectadas con alguna de las dos cepas mutantes no empezaron a mostrar cambios morfológicos hasta las 3 h post-infección, alcanzando una desorganización del 50% 5,5 h tras la infección (figura 3.16). Por lo tanto, la mutación de *aopB* y *aopD* dio lugar a un retraso en los cambios citotóxicos producidos en células EPC, indicando que, además del T3SS, existen otros factores que median la citotoxicidad en *A. hydrophila* AH-1. De hecho, se ha descrito que algunos factores de virulencia del género, como la hemolisina (Wong *et al.*, 1998) y la serin proteasa (Rodríguez *et al.*, 1992), están implicados en la citotoxicidad en diferentes tipos de líneas celulares, lo que explica el retraso del efecto citotóxico en los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*.

Los fagocitos constituyen una de las primeras barreras de defensa en cualquier huésped y, durante un proceso de establecimiento de la infección, los microorganismos patógenos deben ser capaces de evitar o superar la muerte mediada por macrófagos. El análisis microscópico de fagocitos infectados con las cepas parental o mutantes en los genes *aopB* o *aopD*, indicó que la cepa salvaje (AH-1) es capaz de evitar o inhibir la fagocitosis, mientras de los mutantes no pudieron evitar su ingestión (figura 3.17).

Concretamente, el ensayo de internalización mostró que la tasa de ingestión de los mutantes fue de 4 a 6 veces superior (1,1% y 1,5% de bacterias en el interior de los fagocitos, respectivamente) que en la cepa parental (0,24% de bacterias en el interior de los fagocitos).

La transferencia del cósmido pLA-A1T3SS, conteniendo la mayor parte de la agrupación génica del T3SS de la cepa AH-1 (*ascUtruncado-ascL*, figura 3.1), a los mutantes AH-1::*aopB* y AH-1::*aopD*, permitió su complementación, restaurando los valores de dosis letal₅₀, los niveles de citotoxicidad y las tasas de fagocitosis a los de la cepa parental.

Estudios previos habían demostrado que YopB y YopD tenían un papel esencial en la citotoxicidad y en la capacidad antifagocítica de *Y. enterocolitica*. Como ya se ha comentado, se piensa que estas proteínas, también denominadas translocadores, tienen la función de formar un poro en la membrana de la célula huésped con el fin de inyectar efectores, como por ejemplo YopE y YopH, cuya función principal sería la desorganización del citoesqueleto de actina, dando así lugar al efecto citotóxico y la acción antifagocítica descrita (Hartland *et al.*, 1994; Hartland *et al.*, 1996). Dados los resultados de los ensayos de cultivo celular mencionados, es posible que las proteínas AopB y AopD funcionen de una manera similar a sus homólogas en *Yersinia* spp., formando un aparato de translocación capaz de transportar efectores al interior de células huésped.

Del mismo modo que en la cepa AH-1, se construyó el mutante AH-3::*ascV* en el gen *ascV* con el objetivo de determinar si el T3SS de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* también era funcional. Para ello, se utilizó el sistema de recombinación en un punto mediante el vector suicida pFS100. La mutagénesis mediante este sistema da lugar a mutaciones que tienen un efecto polar en genes situados en la región 3' del gen seleccionado si pertenecen al mismo operón. Debido a esto, el tipo de mutagénesis utilizado en este caso probablemente da lugar a la alteración de gran parte del operón *aopN-aopD*, afectando así a parte de las proteínas de membrana interna, a las válvulas de regulación del proceso de secreción y al complejo de translocación (apartados 3.2.3.2, ORF14, y 3.2.3.10, ORF15-ORF20). Para la caracterización fenotípica del mutante AH-3::*ascV* se procedió al cálculo de los valores de dosis letal₅₀, y al análisis de la citotoxicidad y la capacidad antifagocítica.

El mutante AH-3::*ascV* mostró un aumento significativo, superior a la unidad logarítmica, del valor de DL₅₀ en trucha arco iris (10^{6,7}) y ratón (10^{8,5}) en relación con la cepa parental (10^{5,3} y 10^{7,4}, respectivamente), revertiéndose el efecto tras la introducción del cósmido pLA-T3SS4 en el mutante. Además, cuando se realizaron experimentos de dosis única (10⁶) en trucha Arco iris, el 90% de los peces inyectados con la cepa parental murieron en un período de 3-4 días, mientras que la mayoría de peces inoculados con la cepa mutante se recuperaron en 5 días (figura 3.19). Estos resultados indican una marcada reducción de la virulencia debida a la ausencia de un T3SS funcional en la cepa AH-3::*ascV* de *A. hydrophila*. El análisis posterior de la DL₅₀ de un mutante en el gen *ascV* en *A. salmonicida* dio lugar al mismo tipo de resultados (Burr *et al.*, 2005).

Por otro lado, los ensayos de citotoxicidad mostraron un retraso de más de dos horas del efecto citotóxico del mutante AH-3::*ascV* en células EPC en comparación con la cepa salvaje. Así, tras 2 h post-infección con la cepa salvaje, aproximadamente un 50% de las células eucariotas permanecían unidas al pocillo, presentando un aspecto redondeado. El mismo tiempo post-infección con el mutante, no daba lugar a cambios morfológicos en comparación con el control negativo de células EPC no infectadas, y únicamente empezaban a observarse cambios a 4 horas post-infección (<50%). La complementación del mutante AH-3::*ascV* con el cósmido pLA-TTS4, que contiene los genes *ascU-ascJ* de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, proporcionó la recuperación del fenotipo de la cepa salvaje AH-3, restaurando tanto los valores de DL₅₀ como el efecto citotóxico. De manera similar, la mutación del gen *ascV* de *A. salmonicida*, tras 6 h de infección, no da lugar a cambios morfológicos en células RTG-2 (del inglés, *Rainbow Trout Gonad Cells*) (Burr *et al.*, 2002).

El ensayo de internalización mostró que la tasa de ingestión del mutante AH-3::*ascV* fue aproximadamente 5 veces superior (1,3% de bacterias en el interior de los fagocitos) que la de la cepa parental (0,23% de bacterias en el interior de los fagocitos), presentándose una recuperación del fenotipo salvaje tras la complementación con el cósmido pLA-T3SS4. Esto indica una posible función antifagocítica del T3SS.

4.4 Caracterización del efector AexT de *A. hydrophila* AH-3

4.4.1 Análisis de la secuencia de la región génica codificante del gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3

Dado que experimentos de *Western blot* realizados con fracciones subcelulares de la cepa AH-3 de *A. hydrophila* y suero anti-AexT de *A. salmonicida* nos permitieron localizar una proteína de aproximadamente 45 kDa (figura 3.21), se procedió al diseño de diferentes parejas de cebadores a partir de la secuencia de ADN del gen *aexT* de *A. salmonicida* (número de acceso *GenBank*: AF288366) con el objetivo de amplificar dicho gen a partir de la cepa AH-3. El resultado positivo obtenido con una de las parejas de cebadores y la subsiguiente secuenciación de dicho fragmento nos permitió obtener la región génica que comprende los genes *aexT* (efector) y *sycE* (chaperona específica de AexT) de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*.

El análisis de dicha secuencia nucleotídica permitió la detección de dos posibles secuencias promotoras, en la región 5' de los genes *aexT* y *sycE*, respectivamente, así como dos putativos terminadores rho-independientes en la región 3' de ambos genes. Además, en ambas regiones promotoras se detectó la presencia de la secuencia consenso de unión al factor transcripcional AxsA (anexo 7.4), lo que sugiere una posible corregulación de T3SS y efector en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*.

La proteína AexT de *A. hydrophila* AH-3 mostró cierta similitud (40%) con la toxina de T3SS, previamente descrita, AexT de *A. salmonicida* (Braun *et al.*, 2002), y por este motivo se mantuvo el mismo nombre. No obstante, el gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3 sólo muestra similitud con el gen *aexT* de *A. salmonicida* en la primera mitad de la secuencia nucleotídica, mientras que la segunda mitad de ambos genes es completamente diferente. De la misma manera, cuando se comparan las secuencias aminoacídicas, la proteína AexT de *A. hydrophila* AH-3 sólo muestra similitud con la proteína AexT de *A. salmonicida* a nivel del extremo N-terminal (aproximadamente, los residuos aminoacídicos 1-250), mientras que el extremo C-terminal (desde el residuo 250 hasta el final) se podría definir como una región diferencial, no mostrando similitud (figura 4.2 A). Dicha baja similitud entre genes justifica los resultados previamente publicados por Braun y colaboradores, que

indicaban que *aexT* se encontraba en cepas de *A. salmonicida* pero no en cepas de *Aeromonas* mesófilas (Braun *et al.*, 2002).

Recientemente, se han introducido en la base de datos *GenBank* dos nuevas secuencias de proteínas similares a AexT, procedentes de cepas de *Aeromonas* mesófilas, que los autores han denominado *AexT-like* (ABH06556 y ABJ98888). Estas dos proteínas muestran mayor similitud con la proteína AexT de *A. hydrophila* AH-3, tanto a nivel amino- como carboxi-terminal. Sin embargo, ambas proteínas son más grandes (512 residuos aminoácidos) que la proteína de *A. hydrophila* AH-3 (428 residuos aminoácidos, tabla 3.9). La región que podría definirse como diferencial entre las proteínas AexT de *A. salmonicida* y *A. hydrophila* AH-3, parece en cambio presentar conservación en la región aminoácida 245-399 de las proteínas AexT de AH-3, y *AexT-like* de *A. hydrophila* SSU y *A. veronii*, mostrando el mayor grado de similitud en los residuos 287 al 331 (figura 4.2 A). Todas las proteínas AexT y *AexT-like* descritas hasta el momento presentan en su extremo N-terminal un dominio YopE con actividad Rho GAP, característico de proteínas secretadas por el T3SS, donde se localiza el motivo consenso GXXR (X equivale a cualquier aminoácido) (figura 4.2 B). Por el contrario, el dominio de la superfamilia de proteínas ADP-ribosiladoras y el lugar activo de dos ácidos glutámicos EXE típico de muchas toxinas ADP-ribosiltransferasas, localizados en el extremo C-terminal de la proteína AexT de *A. salmonicida*, no se observan en la proteína AexT de *A. hydrophila* AH-3, ni en las proteínas *AexT-like* descritas en otras *Aeromonas* mesófilas (figura 4.2 B). No obstante, la proteína AexT de *A. hydrophila* AH-3 presenta actividad ADP-ribosiltransferasa. Estudios recientes demuestran que el motivo glutamina/glutamato QXE también es responsable de la actividad ADP-ribosiltransferasa de algunas proteínas (Holbourn *et al.*, 2006). De hecho, se ha localizado un dominio QXE (Q410/E412) en la región C-terminal de la proteína AexT de *A. hydrophila* AH-3.

Figura 4.2 Comparación de las secuencias aminoácidas de las proteínas AexT de *A. hydrophila* AH-3 (A.h. AH-3), *AexT-like* de *A. hydrophila* SSU (A.h. SSU, **ABH06556**), *AexT-like* de *A. veronii* (A.v., **ABJ98888**), y AexT de *A. salmonicida* (A.S. A449) (A). Localización en la secuencia aminoácida de: el dominio YopE (caja gris) y el motivo consenso GXXR (recuadro), el dominio ADP-ribosilador (caja negra), y el lugar activo de dos ácidos glutámicos GDEQEILYNK o una glutamina y un ácido glutámico QXE (negrita) típico de muchas toxinas ADP-ribosiltransferasas (B).

A

A. h. AH-3	1	MQIQANTG GM	QAVAHHTDAT	TGVGRMGQLD	VRQIATGQDA	ILLGNRSEPO
A. h. SSU	1	MQIQ THTS SL	QAVA QHNDAT	AEVGR LGQLE	ARQVATSQDA	IQ LGNRSEPO

A.v.	1	MQIQANTVGT	QAVAHHSDAT	TGVGQMGQLE	ARQVATGQDA	ILLGNRSEPO	
A.s.	A449	MQIQANTVGT	QAVAHHSDAT	TGVGRMGQME	ARQVATGQDA	ILLGSRSEPO	
A.h.	AH-3	51	KGQGLLSRLG	AQLARPFVAI	KEWIGNLLGA	DKSAAAPKAO	QTPNLSLAEQ
A.h.	SSU	51	KGQGLLSRLG	AQLARPFVAL	KEWIGNLLGA	RSEAPAHSAF	PADSLSLADQ
A.v.	51	KGQGQLSRSE	SRPARVLAAI	KEWIGNLLGS	GKSAAAPKVO	TAT--SPEDL	
A.s.	A449	51	KGQGLLSRLG	AQLARPFVAI	KEWISNLLGT	DKRAAAPKAO	TAVSP--EDL
A.h.	AH-3	101	KRLLLQQALP	FTLSGLDKAS	ELNSINAEQL	GQDHARLATG	NGALRSLATS
A.h.	SSU	101	KRLLLQKALP	FTLGGLDKAN	ELNNIDAQQL	GQEHARLATG	NGALRSLATS
A.v.	99	QRLMKQAAFG	SSLGGFAKAD	VLNNIAAEQL	GKDHAATLATG	NGPLRSLCTA	
A.s.	A449	99	QRLMKQAAFG	SSLGGFAKAD	VLNNITGEQL	GKDHASLATG	NGPLRSLCTA
A.h.	AH-3	151	LIGTRDGSMSR	QESQTLAAGL	LEHPIAGIPL	QQWGTVGSKV	TELVASATPE
A.h.	SSU	151	LNGIKDGSMSR	QESQTLAAGL	LERPIAGIPL	QQWGTVGGKV	TELIANATPE
A.v.	149	LQAVVVGSEQ	PQLRELAAGL	LARPIAGIPL	QQWGTVGGKV	TELLASATPE	
A.s.	A449	149	LQAVVIGSQO	PQLRELATGL	LARPIAGIPL	QQWGSVGGKV	TELLTSAPPE
A.h.	AH-3	201	LLQEAMSQLH	AVMAEVADLQ	RAVKAEVAGE	PAQ-AQS---	-----GEAR
A.h.	SSU	201	QLQEAMSQLH	AVMAEVADLQ	RAVKAEVAGE	FLP-AVTSAE	VVAAPHGEAK
A.v.	199	LLQEAMSQLH	TAMGEVADLQ	RAVKAELIAGE	PAQSATTKAD	AAPVQSGESK	
A.s.	A449	199	LLKEAMSQLH	TAMGEVADLQ	RAVKAEVAGE	PARSATTAIAA	VAPLQSGESE
A.h.	AH-3	241	G---VAREQV	AVARQTPATG	YKLALDLISH	QASYLLRDQT	STAVTLSSSD
A.h.	SSU	250	P---AARETV	AMARQTEVTG	YKQALELISY	QASYLLRDQA	STEVTLSSDD
A.v.	249	G---AAREQV	AMARQTPATG	YKLALDLISY	QASYLLRDQT	STEVTLSSSD	
A.s.	A449	249	VNVEPADKAL	AEGLOEQFG-	-LEAEQYLGE	QPHGTYSDAE	VMALGTYT--
A.h.	AH-3	288	LNALHQHIAD	GSINGSHMAK	LQTRGDLQTL	RTLALSLSASG	SDAKGSSLGH
A.h.	SSU	297	LNALHQHIAD	GSINGSHMAK	LQTRGDLQIL	RTLALSLSASG	SDANGASLGN
A.v.	296	LNALHQHIAD	GSINSSHMAK	LQTRGDLQTL	RTLALSLSASG	SDAKGSSLGH	
A.s.	A449	294	-NGEYQHLLNR	SLRQEKQLDA	GQALIDQGMS	TAFEKSTPTE	QLIKTFRGTI
A.h.	AH-3	338	ALDSLASSRP	NQRLVLGGLM	QFAGQTDQTW	ANHTAGKP-E	DRLDAGARLR
A.h.	SSU	347	ALDSLASSRP	NQRLVLGGLM	QFAGQTDQAW	ADQTAGKP-E	DRLDAGARLR
A.v.	346	ALDSLASSRP	NQRLVLGGLM	QFAGQTEQAW	VDHTALKPRE	ERLDAGARLR	
A.s.	A449	344	GGDAFNEVAE	GQ--VGHVVA	YLSTSRDPKV	ATNFGGSG--	SISTIFGRSG
A.h.	AH-3	387	FDTGHMKAEL	DR----LGDS	EAQQVLQQLE	GAFGDRAKAI	CDFAVA-----
A.h.	SSU	396	FDTGHMKAEL	AR----LDDS	AARQVLQQLE	GDFGDRAKAV	CDFAVAQVST
A.v.	396	FDTGHMKAEL	GR----LGDS	EARQVLQQLE	GAFGDRAKAI	CDFAVAQVSG	
A.s.	A449	390	IDVSDISVVG	DEQEILYNKE	TDMRVLLSAK	DERGVTRRVL	EEASLGEQSG
A.h.	AH-3	428	-----	-----	-----	-----	-----
A.h.	SSU	442	FADSESSPEA	VLVSRLTRMG	NLVGSLTDEL	KVRLQLPESA	RGEPTMIDSV
A.v.	442	FADSESSPEA	VLVSRLTRMG	NLVGSLTDAL	KERLQLPESA	RGEPTMIDSV	
A.s.	A449	440	HSKG-----	-----	-----LLDGL	DLARGA--GG	ADKPEQEQDIR
A.h.	AH-3	428	-----	-----	-----	-----	-----
A.h.	SSU	492	SQLTPELELAA	LAHIGVGADY	L		
A.v.	492	SQLTPELELAA	LAHIGVDESY	L			
A.s.	A449	467	LKMRGLDLA-	-----	-----	-----	-----

B

A.h.	AH-3	1	MQIQANTGGM	QAVAHHTDAT	TGVGRMGQLD	VRQIATGQDA	ILLGNRSEPO
A.h.	SSU	1	MQIQHTSGL	QAVAQHNDAT	AEVGRLGQLE	ARQVATSQDA	LQLGNRSEPO
A.v.	1	MQIQANTVGT	QAVAHHSDAT	TGVGQMGQLE	ARQVATGQDA	ILLGNRSEPO	
A.s.	A449	1	MQIQANTVGT	QAVAHHSDAT	TGVGRMGQME	ARQVATGQDA	ILLGSRSEPO
A.h.	AH-3	51	KGQGLLSRLG	AQLARPFVAI	KEWIGNLLGA	DKSAAAPKAO	QTPNLSLAEQ
A.h.	SSU	51	KGQGLLSRLG	AQLARPFVAL	KEWIGNLLGA	RSEAPAHSAF	PADSLSLADQ
A.v.	51	KGQGQLSRSE	SRPARVLAAI	KEWIGNLLGS	GKSAAAPKVO	TAT--SPEDL	
A.s.	A449	51	KGQGLLSRLG	AQLARPFVAI	KEWISNLLGT	DKRAAAPKAO	TAVSP--EDL
A.h.	AH-3	101	KRLLLQQALP	FTLSGLDKAS	ELNSINAEQL	GQDHARLATG	NGALRSLATS
A.h.	SSU	101	KRLLLQKALP	FTLGGLDKAN	ELNNIDAQQL	GQEHARLATG	NGALRSLATS
A.v.	99	QRLMKQAAFG	SSLGGFAKAD	VLNNIAAEQL	GKDHAATLATG	NGPLRSLCTA	
A.s.	A449	99	QRLMKQAAFG	SSLGGFAKAD	VLNNITGEQL	GKDHASLATG	NGPLRSLCTA
A.h.	AH-3	151	LIGTRDGSMSR	QESQTLAAGL	LEHPIAGIPL	QQWGTVGSKV	TELVASATPE
A.h.	SSU	151	LNGIKDGSMSR	QESQTLAAGL	LERPIAGIPL	QQWGTVGGKV	TELIANATPE
A.v.	149	LQAVVVGSEQ	PQLRELAAGL	LARPIAGIPL	QQWGTVGGKV	TELLASATPE	
A.s.	A449	149	LQAVVIGSQO	PQLRELATGL	LARPIAGIPL	QQWGSVGGKV	TELLTSAPPE

A. h.	AH-3	201	LLQEAMSQLH	AVMAEVADLQ	RAVKAEVAGE	PAQ-AQS---	-----GEAR
A. h.	SSU	201	QLQEAMSQLH	AVMAEVADLQ	RAVKAEVAGE	PLP-AVTSAE	VVAAPHGEAK
A. v.		199	LLQEAMSQLH	TAMGEVADLQ	RAVKAELIAGE	PAQSATTKAD	AAPVQSGESK
A. s.	A449	199	LLKEAMSQLH	TAMGEVADLQ	RAVKAEVAGE	PARSATTA	VAPLQSGESE
A. h.	AH-3	241	G---VAREQV	AVARQTPATG	YKLALDLISH	QASYLLRDQT	STAVTLSSSD
A. h.	SSU	250	P---AARETV	AMARQTEVTG	YKQALELISY	QASYLLRDQA	STEVTLSSDD
A. v.		249	G---AAREQV	AMARQTPATG	YKLALDLISY	QASYLLRDQT	STEVTLSSSD
A. s.	A449	249	VNVEPADKAL	AEGLQEQFG-	-LEAEQYLGE	QPHGTYSDAE	VMALGLVT--
A. h.	AH-3	288	LNALHQHIAD	GSINGSHMAK	LQTRGDLQTL	RTLALSLASG	SDAKGSSLGH
A. h.	SSU	297	LNALHQHIAD	GSINGSHMAK	LQTRGDLQIL	RTLALSLASG	SDANGASLGN
A. v.		296	LNALHQHIAD	GSINSSHMAK	LQTRGDLQTL	RTLALSLASG	SDAKGSSLGH
A. s.	A449	294	-NGEYQHNR	SLRQEKQLDA	QALIDQMS	TAFEKSTPTE	QLIKTFRGTH
A. h.	AH-3	338	ALDSLASSRP	NQRLVLGGGLM	QFAGQTDQTW	ANHTAGKP-E	DRLDAGARLR
A. h.	SSU	347	ALDSLASARP	NQRLVLGGGLM	QFAGQTDQAW	ADQTAGKP-E	DRLDAGARLR
A. v.		346	ALDSLASVRP	NQRLVLGGGLM	QFAGQTEQAW	VDHTALKPRE	ERLDAGARLR
A. s.	A449	344	GGDAFNEVAE	GQ--VGHDVA	YLSTSRDPKV	ATNFGGSG--	SISTIFGRSG
A. h.	AH-3	387	FDTGHMKAEL	DR----LGDS	EAQQVLQOLE	GAFGDRAKAI	CDFAVA----
A. h.	SSU	396	FDTGHMKAEL	AR----LDDS	AARQVLQOLE	GDFGDRAKAV	CDFAVAQVST
A. v.		396	FDTGHMQAEL	GR----LGDS	EARQVLQOLE	GAFGDRAIRAI	CDFAVAQVSG
A. s.	A449	390	IDVSDISVEG	DEQEILYNKE	TDMRVLLSAK	DERGVTRRVL	EEASLGEQSG
A. h.	AH-3	428	-----	-----	-----	-----	-----
A. h.	SSU	442	FADSESSPEA	VLVSRLTRMG	NLVGSLTDEL	KVRLQLPESA	RGEPTMIDSV
A. v.		442	FADSESSPEA	VLVSRLTRMG	NLVGSLTDAL	KERLQLPESA	RGEPTMIDSV
A. s.	A449	440	HSKG-----	-----	-----LLDGL	DLARGA--GG	ADKPQEQDIR
A. h.	AH-3	428	-----	-----	-	-	-
A. h.	SSU	492	SQLTPLELAA	LAHIGVGADY	L	L	L
A. v.		492	SQLTPLELAA	LAHIGVDESY	L	L	L
A. s.	A449	467	LKMRGLDLA-	-----	-	-	-

4.4.2 Estudio de la codistribución de la agrupación génica de T3SS y el gen *aexT* en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas

La mayoría de cepas positivas que presentan la agrupación génica de T3SS (90%), también parecen presentar el gen *aexT*. De la misma manera, la mayor parte de las cepas que carecen de los genes de T3SS, tampoco parecen presentar el gen *aexT* (80%). Por lo tanto, en el género *Aeromonas*, existe una cierta tendencia a la coexistencia de los genes de la agrupación de T3SS y del efector AexT en el mismo genoma.

4.4.3 Mutagénesis del gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3

Se construyó el mutante AH-1089 (AH-3::*aexT*) en el gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3 con el fin de determinar la implicación de dicha proteína en la virulencia de la cepa, además de su relación con el T3SS. Para realizar la mutagénesis se utilizó el sistema de recombinación en un punto mediante el vector suicida pFS100, ya que el gen *aexT* forma parte de un operón monocistrónico.

Para la caracterización fenotípica del mutante se realizaron ensayos de dosis letal₅₀ en trucha Arco iris y ratón Albino Suizo, citotoxicidad e internalización. Los resultados obtenidos indican que la mutación del gen *aexT* de *A. hydrophila* AH-3 da lugar a una ligera reducción de la capacidad patogénica en comparación con la cepa salvaje. Sin embargo, el mutante en el T3SS de *A. hydrophila* AH-3 (gen *ascV*) muestra una clara reducción de la virulencia, analizada mediante los mismos ensayos (apartado 4.2.3). Probablemente, la leve disminución de la virulencia del mutante AH-3::*aexT* en comparación con la marcada reducción observada en el mutante de T3SS, sea debida a la posible existencia de otros efectores en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*. De hecho, recientemente, además del efector AexT, se han identificado tres efectores más en *A. salmonicida*: AopP, AopH y AopO, todos de localización plasmídica (Dacanay *et al.*, 2006; Fehr *et al.*, 2006).

4.5 Análisis de la expresión del T3SS y del efector AexT de la cepa AH-3 de *A. hydrophila*

4.5.1 Condiciones de activación de la expresión

La expresión de los genes de tipo III responde a condiciones ambientales que frecuentemente se corresponden con las condiciones que las bacterias encuentran durante el proceso de infección de un huésped. En general, la transcripción de los genes de T3SS está controlada por componentes de diversas vías de regulación que integran variedad de señales ambientales, probablemente para restringir el gasto de energía que supone dicha expresión al lugar y el momento adecuados. Además, la expresión de los genes de tipo III parece estar controlada por alguno o varios componentes del huésped, activándose tras el contacto de la bacteria con la célula huésped (Hueck, 1998). El control de la expresión de los genes de tipo III gracias a la integración de diversas vías de regulación, en última instancia, se da mediante la regulación de la actividad de un activador transcripcional, generalmente perteneciente a la familia AraC (apartado 1.3.6). La simulación *in vitro* de la combinación de señales necesarias para la expresión de estos genes es uno de los temas centrales en la investigación del funcionamiento de este sistema (Francis *et al.*, 2002).

Con el objetivo de estudiar la regulación génica de la expresión del T3SS en *A. hydrophila* AH-3, se escogió una de las regiones promotoras de las cuatro unidades transcripcionales del T3SS confirmadas en este estudio, concretamente la región reguladora de la agrupación génica *aopN-aopD* (apartado 3.2.4.2). Además, también se decidió analizar la regulación de la expresión del efector AexT en la misma cepa, para poder así abordar la posible corregulación de sistema y efector.

En primer lugar, cabe destacar que ambos promotores, promotor *aopN-aopD* y promotor *aexT*, tuvieron un comportamiento similar, mostrando, en general, una actividad superior al promotor del gen *aexT*. En cuanto a la composición del medio, la adición de MgCl₂ 20 mM dio lugar a incrementos marcados de expresión, y las condiciones óptimas (máxima expresión) se dieron en los crecimientos en TSB suplementados con MgCl₂ 20 mM y EGTA 10 mM. Por otro lado, la adición de NaCl 200 mM no supuso un incremento de la expresión en ninguno de los casos. En referencia a las condiciones de incubación, la temperatura de 37°C con la máxima aireación fueron las condiciones en que se detectó una mayor actividad de los promotores. Recientemente, estudios realizados por Ebanks y colaboradores indican que, en la cepa A229 de *A. salmonicida*, también se da una mayor expresión de la agrupación génica del T3SS y del efector AexT cuando la temperatura incrementa de 16°C a 28°C; sin embargo, en esta cepa, la adición de 190 a 380 mM de NaCl permite un aumento de la expresión tanto de sistema como de efector, mientras que la quelación de iones Ca²⁺ mediante la adición de EGTA 5 mM no parece afectar (Ebanks *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha descrito que la baja concentración de iones Ca²⁺ tampoco favorece la expresión del efector AexT-like en la cepa SSU de *A. hydrophila* (Sha *et al.*, 2007), pero en cambio sí induce la expresión del efector AexT de la cepa JF2267 de *A. salmonicida* (Burr *et al.*, 2003). Todos estos datos parecen indicar que existen diferencias a nivel de regulación génica entre los diferentes T3SS descritos en *Aeromonas* spp, incluso a nivel intraespecífico.

Normalmente, la mayoría de bacterias patógenas reside en el medio ambiente. Sin embargo, tras el contacto con el huésped animal, estas bacterias frecuentemente se encuentran con un incremento en su temperatura de crecimiento (hasta los 37°C en el caso de mamíferos). De hecho, el incremento de temperatura se ha descrito como factor de inducción de la expresión de los genes de T3SS en diversas especies bacterianas,

como *Shigella* spp., *Yersinia* spp. y *E. coli* enteropatógenicas (Francis *et al.*, 2002), e incluso *A. salmonicida* (Ebanks *et al.*, 2006). Concretamente, estudios realizados en *Shigella* spp. indican que la proteína tipo histona H-NS ejerce un control negativo, dependiente de temperatura, en la expresión de los genes de T3SS. De esta forma, la proteína H-NS sólo se puede unir, y por tanto reprimir, al promotor de *virF*, regulador primario, a temperaturas por debajo de 32°C; con el incremento de temperatura, se produce un cambio en la estructura del ADN del promotor de *virF* que hace que sea insensible a los efectos represores de H-NS (Falconi *et al.*, 1998). Así pues, Falconi y colaboradores proponen que los microorganismos patógenos han desarrollado mecanismos de modulación de la arquitectura del ADN como estrategia para regular la expresión de genes implicados en virulencia en respuesta a estímulos ambientales (Falconi *et al.*, 2001). De este modo, se ha descrito la implicación que tienen diversas señales (temperatura, osmolaridad, pH y tensión de oxígeno) en los cambios a nivel de la estructura local del ADN, siendo los cambios en estos estímulos ambientales a los que un patógeno debe hacer frente durante el proceso de infección de un animal.

La concentración de cationes divalentes también puede actuar como señal extracelular para la regulación de la expresión de genes de virulencia. De este modo, la concentración de cationes Mg^{2+} en el medio se ha descrito como una señal reguladora de la expresión del T3SS en algunas bacterias, como es el caso de *Salmonella typhimurium*. Este patógeno emplea dos T3SS diferentes, codificados en SPI-1 y SPI-2, para la invasión inicial y la supervivencia intracelular dentro de las vacuolas macrofágicas, respectivamente, regulados a su vez de manera inversa en función de la cantidad de magnesio en el medio. De este modo, con mayores concentraciones de magnesio se daría la expresión del T3SS SPI-1, mientras que la deficiencia de dicho catión comportaría la represión del primero y la activación del T3SS SPI-2 (Falconi *et al.*, 2002). Por otro lado, la quelación de cationes Ca^{2+} del medio ha sido ampliamente referida como sistema de activación *in vitro* de la secreción del T3SS de varias especies, destacando *Yersinia* spp. y *P. aeruginosa*. El descubrimiento de este hecho fue el resultado de largos años de investigación de un fenómeno específico de *Yersinia* denominado “respuesta a baja concentración de calcio” (LCR, del inglés *Low Calcium Response*). La LCR se caracteriza por el hecho de que el T3SS de *Yersinia* sólo se expresa en condiciones de 37°C en ausencia de concentraciones milimolares de Ca^{2+} (Hueck, 1998). La elevada concentración de iones Ca^{2+} inhibe la secreción de efectores

vía T3SS; esta inhibición de la secreción mediada por el calcio conlleva una represión de la transcripción de los genes de tipo III mediante un mecanismo de *feedback* negativo. De manera similar, la expresión de genes de tipo III en *P. aeruginosa* es positiva en condiciones de baja concentración de calcio, mediante la activación de una cascada de regulación que resulta en la finalización de la represión de la proteína ExsA, el regulador transcripcional principal del regulón de T3SS (Frank and Iglewski, 1991; Frank, 1997). No obstante, la expresión debida a la quelación de iones Ca^{2+} depende de la presencia de un T3SS funcional. La mutación de componentes que inactivan la maquinaria de secreción de tipo III da lugar a la pérdida de la capacidad de inducir la expresión de efectores bajo condiciones de baja concentración de Ca^{2+} (Frank and Iglewski, 1991). La actividad de ExsA está controlada por su interacción con otra proteína, ExsD. Cuando ExsD está unida a ExsA, no se da transcripción del regulón de T3SS. A su vez, la interacción ExsD-ExsA está controlada por un tercer componente, ExsC, proteína que es capaz de unir fuertemente a ExsD, liberando así a la proteína ExsA de la acción represora de ésta. La actividad de ExsC está controlada por una proteína sustrato de secreción, ExsE. Cuando disminuye la concentración de iones Ca^{2+} en el medio, la proteína ExsE es secretada y ExsC queda libre para interaccionar con ExsD, que a su vez libera ExsA, lo que resulta en la inducción del regulón de T3SS (figura 1.20) (Rietsch, 2005).

4.5.2 Efecto de diferentes proteínas bacterianas en la expresión de genes de tipo III en *A. hydrophila* AH-3

4.5.2.1 Componentes del T3SS

La proteína ExsA de *P. aeruginosa*, homóloga de AxsA de *A. hydrophila* AH-3, actúa como activador transcripcional específico del T3SS, controlando la expresión de los diferentes operones de la agrupación génica de este sistema y también de los genes que codifican los diversos efectores en *P. aeruginosa* (Yahr and Wolfgang, 2006).

En *A. hydrophila* AH-3, la mutación del gen *axsA* dio lugar a un marcado descenso de la expresión de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en comparación con la cepa parental, lo que se relaciona con una regulación positiva del T3SS y de sus efectores por parte de la proteína AxsA. Por otro lado, la búsqueda de la secuencia consenso de unión a la proteína AxsA en las secuencias nucleotídicas de la agrupación génica del T3SS y

del efector AexT de la cepa AH-3, permitió localizar dicha secuencia en todos los putativos promotores, a excepción de los predichos para la agrupación *acrG-aopD* (Anexos 7.3 y 7.4). Además, la predicción de dominios en dicha proteína muestra un motivo de unión a ligando tipo AraC en el extremo N-terminal y dos motivos HTH tipo AraC en el extremo C-terminal (figura 3.14). Todo lo anterior indica que, del mismo modo que sucede en *P. aeruginosa*, la proteína AxsA parece actuar como regulador transcripcional específico de la agrupación génica de T3SS y del gen que codifica el efector AexT en la cepa AH-3 de *A. hydrophila*. Debido a que la agrupación génica del T3SS y el gen *aexT* presentan una localización génica diferente, el control ejercido por AxsA constituye una vía de correulación.

Por otro lado, en *Yersinia* spp., la proteína YopN parece constituir una válvula en el aparato de secreción de tipo III que tiene la función de regular la actividad secretora del sistema, de manera que, la mutación del gen *yopN* da lugar a un fenotipo de secreción constitutiva (apartado 3.2.3.10, ORF9). En *A. hydrophila* AH-3, el mutante AH-3::*aopN* presentó niveles de expresión de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en condiciones de no depleción de calcio similares a los de la cepa parental en condiciones de depleción de calcio. Dicho mutante, además, también presentó un fenotipo de secreción constitutiva. Esto indica que la proteína AopN de *A. hydrophila* AH-3 podría actuar de un modo similar a la proteína YopN, regulando la secreción del T3SS. Así, la ausencia de AopN podría dar lugar a una apertura del canal de secreción y, en consecuencia, a la activación del mecanismo de *feedback* positivo que resulta en la liberación, y por lo tanto, la activación del activador transcripcional AxsA.

4.5.2.2 Sistema de dos componentes PhoP/PhoQ

PhoP/PhoQ es un sistema regulador de dos componentes que media la adaptación a condiciones de limitación de Mg^{2+} , regulando numerosas actividades en diversas especies Gram-negativas. Consiste en un sensor localizado en la membrana externa, PhoQ, y un regulador citoplasmático, PhoP. Este sistema fue identificado por primera vez en *S. enterica* serovar Typhimurium debido al control que ejercía en la expresión de un ácido fosfato; de ahí el nombre *pho* del locus *phoP*, nomenclatura típica de los loci implicados en el metabolismo del fosfato. Sin embargo, el sistema PhoP/PhoQ responde a los niveles de magnesio y calcio del medio, y no se debe confundir con otros sistemas reguladores de dos componentes implicados en la adaptación a condiciones limitantes

de fosfato, como por ejemplo PhoB/PhoR o PhoP/PhoR de *E. coli* y *Bacillus subtilis*, respectivamente (Groisman, 2001).

El sistema PhoP/PhoQ constituye el primer ejemplo de un sistema regulador que utiliza el Mg^{2+} extracelular como señal primaria. El crecimiento a concentraciones micromolares de Mg^{2+} promueve la transcripción de genes activados por PhoP, mientras que el crecimiento en concentraciones milimolares reprime la expresión de dichos genes. Además del Mg^{2+} , el Ca^{2+} , y el Mn^{2+} , pueden reprimir los genes dependientes de PhoP (Groisman, 2001). Este sistema funciona de manera que, cuando existen concentraciones milimolares de Mg^{2+} , el sensor PhoQ desfosforila a PhoP, evitando el control transcripcional posterior que ésta ejerce.

En *A. hydrophila* AH-3, la mutación del gen *phoP* provocó un ligero incremento de la expresión de ambos promotores, indicando que este gen podría ejercer un efecto de regulación negativa directo, a través del regulador transcripcional PhoP, o indirecto, mediante alguna proteína cuya expresión se viera alterada debido a la acción de PhoP, sobre los genes de tipo III. Cabe destacar que los crecimientos para el análisis de la expresión se realizaron en presencia de concentraciones milimolares de $MgCl_2$, condiciones en que, en el caso de la cepa parental, la proteína PhoP debería de estar desfosforilada. Si, como los resultados parecen indicar, PhoP ejerce un control negativo sobre la expresión del T3SS y el efector AexT, la disminución de cationes Mg^{2+} del medio debería incrementar las diferencias de expresión entre la cepa parental y el mutante AH3::*phoP*.

En *Salmonella* spp. se ha demostrado que la mayoría de genes del T3SS codificados en SPI-1 se encuentran reprimidos en condiciones de activación del sistema PhoP/PhoQ, mientras que la expresión del T3SS codificado en SPI-2 necesita de la activación de este sistema (Aguirre *et al.*, 2006). Se ha propuesto que cuando la bacteria se encuentra fuera de la célula, ambiente en que la concentración de Mg^{2+} es superior, se transcribirían los genes del T3SS codificado en SPI-1, favoreciendo de esta manera la entrada dentro de la célula huésped (Groisman, 2001).

4.5.2.3 Sistema AhyI/AhyR

Las bacterias determinan la densidad de población celular mediante la comunicación entre células, mecanismo que se da gracias a la capacidad bacteriana de

responder a un compuesto químico similar a una hormona, y que se conoce con el nombre *quorum sensing*. El *quorum sensing* controla la expresión génica en respuesta a una población bacteriana en expansión (Reading and Sperandio, 2006). En muchas bacterias Gram-negativas, la molécula señal de *quorum sensing* es un miembro de la familia acil homoresin lactona (AHL). La acumulación de esta molécula por encima de una concentración umbral a través de la actividad de una proteína generadora de señal, indica que la población ha alcanzado un tamaño mínimo, y esto da lugar a la regulación de genes diana mediante la acción de un regulador transcripcional miembro de la familia LuxR. Las proteínas de la familia LuxR presentan dos dominios, un dominio N-terminal implicado en la unión de AHL, y un dominio C-terminal que presenta un motivo de unión a ADN. En general, las proteínas generadoras de señal responsables de la síntesis de AHL pertenecen a la familia LuxI, aunque se han descrito otras proteínas encargadas de la síntesis de autoinductores, como LuxM, DST o LuxS. El sistema LuxI/LuxR de *quorum sensing* fue descrito por primera vez en la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri* (Eberhard, 1972). En *A. hydrophila* se han descrito las proteínas AhyR y AhyI, pertenecientes a las familias LuxR y LuxI, respectivamente (Swift *et al.*, 1997).

En *A. hydrophila* AH-3, los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en las cepas AH-3::*ahyI* y AH-3::*ahyR* presentaron un incremento de actividad en comparación con la cepa parental, lo que indica una regulación negativa del T3SS y sus efectores por parte del sistema de *quorum sensing*. Sin embargo, en *A. salmonicida* A449, el incremento de la densidad celular no parece afectar a la expresión del T3SS ni de AexT a una temperatura de crecimiento de 17°C (Ebanks *et al.*, 2006). Recientemente, se han publicado una serie de estudios que indican una regulación del T3SS por parte del sistema de *quorum sensing* en diversas bacterias. En *E. coli*, elevadas concentraciones de autoinductores en el medio de cultivo activan los genes codificantes del T3SS y de proteínas efectoras (Sperandio *et al.*, 1999). Sperandio y colaboradores sugieren que, en lugar de detectar sus propias moléculas señalizadoras, este patógeno podría activar su T3SS mediante la detección de autoinductores sintetizados por *E. coli* comensales del intestino grueso. Por otro lado, en *Vibrio harveyi* y *Vibrio paraheomolyticus*, se ha demostrado que el sistema de *quorum sensing* regula negativamente la expresión de los genes de tipo III *vopD*, *vopN*, y *vopB* (homólogos de *aopD*, *aopN*, y *aopB*, respectivamente) (Henke and Bassler, 2004). En *P. aeruginosa*, se han identificado dos

sistemas de *quorum sensing*: LasI/LasR y RhII/RhlR, siendo ambos homólogos del sistema LuxI/LuxR. Mientras que LasI sintetiza *N*-(butanoil)-L-homoserin lactona, RhII produce *N*-(3-oxododecanoil)-L-homoserin lactona. La mutación de *rhlI* o *rhlR* da lugar a un incremento de la expresión del gen *exoS*, que codifica el efector de tipo III exoenzima S. Este fenómeno de incremento de la expresión de un gen de tipo III en el mutante *rhlI* fue eliminado mediante la adición de *N*-(butanoil)-L-homoserin lactona, lo que indica un efecto de regulación negativa por parte del factor transcripcional RhlR sobre la expresión de *exoS* (Hogardt *et al.*, 2004; Bleves *et al.*, 2005).

4.5.2.4 Subunidad AceA del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa

El complejo piruvato deshidrogenasa (PDHc) convierte piruvato a acetil-CoA mediante la combinación de la acción de tres enzimas: piruvato deshidrogenasa/descarboxilasa (E1), acetiltransferasa (E2) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3) (figura 4.3) (de Kok *et al.*, 1998).

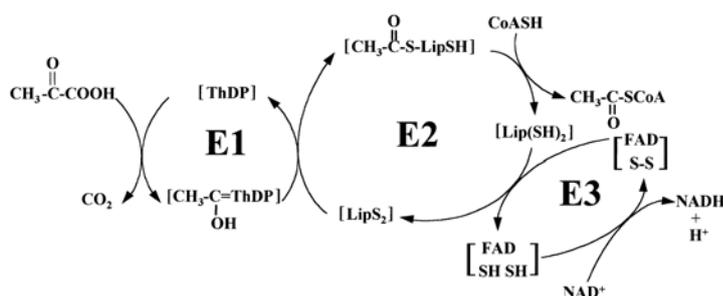


Figura 4.3 Secuencia de reacciones catalizadas por el complejo piruvato deshidrogenasa. La subunidad E1 utiliza tiamina difosfato (ThDP) para llevar a cabo la descarboxilación oxidativa del piruvato, dando lugar a la formación de ácido acetil lipoico unido covalentemente al componente E2. La subunidad E2 transfiere el grupo acetilo a la coenzima A, y el grupo dihidrolipoil resultante es reoxidado mediante NAD, reacción catalizada por la subunidad E3.

En *A. hydrophila* AH-3, la mutación del gen *aceA* provocó una disminución de la expresión de los promotores *aopNaopD* y *aexT*, indicando que el complejo PDH parece ser necesario para la expresión de los genes de tipo III. Dacheux y colaboradores habían descrito la relación del PDHc con la expresión de genes de tipo III en *P. aeruginosa*, indicando que la mutación de los genes *aceA* y/o *aceB* daba lugar a una marcada disminución de la secreción de translocadores y efectores, mutaciones que, a su vez,

quedaban compensadas con la expresión en *trans* del gen *exsA* (Dacheux *et al.*, 2002). Estos autores sugerían que, en los mutantes del PDHc, la expresión del gen *exsA* no estaba inducida, evitando esto un correcto funcionamiento del T3SS. Dicha hipótesis fue confirmada gracias a la realización de una fusión transcripcional del promotor del conjunto de genes *exsCBA* con el gen *gfp*, que permitió confirmar que los mutantes *aceA* y *aceB* no presentaban activación de la transcripción de dicho promotor en respuesta a la depleción de Ca^{2+} (Dacheux *et al.*, 2002). Se ha propuesto que, bien el acetil-CoA, bien algún metabolito derivado de éste, podría tener algún efecto de regulación sobre el regulón de tipo III, aunque no necesariamente directo, ya que este compuesto forma parte del metabolismo general de la célula (Rietsch and Mekalanos, 2006).

4.5.2.5 Proteína periplásmica DsbA

La formación de puentes disulfuro es un paso esencial en el plegamiento y, por tanto, el correcto funcionamiento de muchas proteínas secretadas y de membrana. En *E. coli*, la formación de puentes disulfuro es catalizada por las proteínas Dsb. DsbA es una pequeña proteína periplásmica que presenta un motivo Cys-X-X-Cys en su sitio activo que interactúa con sustratos reducidos, catalizando la oxidación de sus residuos de cisteína a puentes disulfuro (Miki *et al.*, 2004).

En muchas bacterias patogénicas, DsbA está implicada en la patogenicidad, ya que participa en el plegamiento de determinantes de virulencia. Entre otros, la función de DsbA parece ser necesaria para el correcto funcionamiento del T3SS de *Y. pestis*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa* y *S. enterica* serovar Typhimurium. En *Y. pestis*, la mutación del gen *dsbA* da lugar a complejos YscC (secretina de tipo III, ver ORF27) inestables (Jackson and Plano, 1999). En *S. flexneri* la mutación de *dsbA* provoca la acumulación de formas oxidadas de Spa32 (homóloga a YscP, ver ORF6), proteína implicada en el control de la longitud de la aguja y esencial para la secreción de efectores (Watarai *et al.*, 1995). En *P. aeruginosa*, DsbA parece ser necesaria para la expresión del T3SA en condiciones de baja concentración de Ca^{2+} (Ha *et al.*, 2003). Por último, en *S. enterica* serovar Typhimurium la mutación de DsbA parece afectar al funcionamiento y el ensamblaje de ambos de sus dos T3SA (Ellermeier and Slauch, 2004; Miki *et al.*, 2004).

En el caso de *A. hydrophila* AH-3, la mutación del gen *dsbA* provocó un cierto aumento de la expresión de ambos promotores de tipo III ensayados, *aopN-aopD* y *aexT*, indicando que la actividad de esta proteína parece ejercer un efecto negativo sobre la expresión de los genes de tipo III. Una posible explicación podría ser que, en el caso de *A. hydrophila* AH-3, DsbA estuviera implicada en el correcto plegamiento de alguna proteína implicada en la regulación negativa de los procesos de secreción y/o expresión del T3SS. Por otro lado, si tal y como sucede en otras especies, DsbA estuviera implicada en la formación de puentes disulfuro de algún(os) componente(s) del T3SA de la cepa AH-3, tal vez éstos no fueran esenciales para el correcto funcionamiento de dicha(s) proteína(s), o bien la función del mutante AH-3::*dsbA* podría verse compensada por la acción de alguna otra proteína de función similar.

4.5.2.6 Genes implicados en la biosíntesis del flagelo

Como se ha comentado anteriormente, las ultraestructuras de los cuerpos basales del flagelo bacteriano y la maquinaria de secreción de tipo III son muy similares, lo que hace suponer que podrían estar relacionadas en cuanto a funcionamiento y/o control (Blocker *et al.*, 2003). En *P. aeruginosa* se ha demostrado que la expresión del regulón de T3SS incrementa en cepas aflageladas, lo que conlleva un aumento de la secreción de efectores y de la citotoxicidad en macrófagos (Soscia *et al.*, 2007). Además, de manera inversa, la superproducción del activador transcripcional específico de tipo III, ExsA, afecta negativamente a la expresión del regulón del flagelo, disminuyendo drásticamente la movilidad de la bacteria (Soscia *et al.*, 2007). Este proceso de regulación negativa cruzada que se da entre los dos sistemas en *P. aeruginosa*, también se ha observado en *Y. enterocolitica*, donde la mutación de los reguladores FlhC y FlhD da lugar a un incremento de la expresión del T3SS y de la secreción de efectores, mientras que la sobreexpresión de los genes *flhC* y *flhD* da lugar a una disminución de la secreción (Bleves *et al.*, 2002). Recientemente, en *A. hydrophila* AH-1, se ha demostrado que la expresión constitutiva del T3SS mediante la mutación de los genes *exsD* o *aopN* parece dar lugar a una represión de la producción de las flagelinas laterales LafA1 y LafA2; mientras que los dobles mutantes *exsDexsA* y *aopNexsA* recuperan ambas flagelinas (Yu *et al.*, 2007). En contraste con todo lo anterior, en *Salmonella enterica* serovar Typhi, la mutación en genes codificantes de proteínas flagelares implicadas en regulación da lugar a una reducción significativa de la expresión del

regulón de T3SS codificado en SPI-1, y también de la secreción de efectores, sugiriendo en este caso una regulación cruzada positiva (Eichelber and Galán, 2000).

Con el fin de investigar si podría existir algún tipo de coordinación entre el ensamblaje y funcionamiento del flagelo polar y el T3SS en *A. hydrophila* AH-3, se analizó la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en mutantes en algunos genes implicados en la biosíntesis del flagelo polar: *rpoN*, *flrA*, *fliA*, *flhA_P*, *flgL* y *flmB*. Las mutaciones del factor σ^{54} de la ARN polimerasa (RpoN) y del regulador transcripcional específico de flagelo polar FlrA dieron lugar a una disminución de la expresión de ambos promotores, *aopN-aopD* y *aexT*; no obstante, la disminución fue más marcada en el caso de la cepa AH-3::*flrA*. Cabe destacar que ambas cepas mutantes son negativas para la natación (carecen de flagelación polar), y que AH-3::*rpoN* tampoco produce flagelación lateral. La diferencia en el nivel de reducción de la expresión del regulón de T3SS entre ambos mutantes podría ser debida a que la proteína RpoN, como factor σ^{54} de la ARN polimerasa controlado por factores ambientales, regulase positivamente algún otro sistema que, a su vez, ejerciera una función represora sobre la expresión de tipo III. De hecho, en *P. aeruginosa*, el sistema de *quorum sensing* parece estar regulado positivamente por parte de RpoN en determinadas condiciones (Thompson *et al.*, 2003). La mutación de *fliA* (factor σ^{28}) produjo un descenso de la actividad del promotor de *aexT*; sin embargo, la expresión del promotor *aopN-aopD* no se vio afectada. FliA permite la expresión de los genes de clase IV de la flagelación polar, entre los cuales se encuentran los que codifican las flagelinas; por tanto, la ausencia del factor σ^{28} conlleva la pérdida de filamentos polares. Diferentes autores han señalado un paralelismo entre las flagelinas en el FT3SS y los efectores en el T3SS. De esta manera, y en base a los resultados experimentales, es posible que, en *A. hydrophila* AH-3, FliA pudiera favorecer la expresión de efectores de tipo III, presentándose un *cross-talking* positivo a este nivel entre ambos sistemas. La mutación de *flhA_P* permitió incrementar la expresión de ambos promotores. FlhA_P forma parte del complejo de exportación del FT3SS, causando su mutación la pérdida del flagelo polar. El aumento de la expresión de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en el mutante AH-3::*flhA_P* podría ser debido a la acción de componentes flagelares que son sintetizados pero no ensamblados. La mutación de *flgL* dio lugar a la disminución de la expresión de ambos promotores de tipo III; sin embargo, la alteración que presenta este mutante es la pérdida de filamentos polares. En este caso, la alteración de la expresión de los promotores de tipo III podría

ser debida a una acumulación de monómeros de flagelina y, por tanto, a un desbalance de los componentes flagelares, en el citoplasma celular. En el mutante AH-3::*flmB* no se detectaron cambios significativos en la expresión de los promotores *aopN-aopD* y *aexT*. Este mutante no glicosila las flagelinas, lo que hace que no se produzca un correcto ensamblaje de las mismas y, por tanto, el mutante no posee un filamento del flagelo correctamente ensamblado y funcional, aunque sí se aprecian en el medio de cultivo fragmentos mal estructurados del filamento del flagelo (Gryllos *et al.*, 2001). En consecuencia, en el citoplasma celular no debe existir acumulación de monómeros de flagelina, lo que podría explicar el efecto diferencial en la expresión entre los mutantes AH-3::*flgL* y AH-3::*flmB*. Por otro lado, los monómeros de flagelina que se hallen en el citoplasma de la cepa AH-3::*flmB* no estarán glicosilados, a diferencia del mutante AH-3::*flgL*.

4.5.4.7 Genes implicados en la biosíntesis del lipopolisacárido

Debido a que el contacto célula bacteriana-célula eucariota parece ser clave para una secreción de tipo III efectiva, recientemente se han publicado estudios que relacionan cambios en la estructura del LPS con el correcto funcionamiento del T3SS (West *et al.*, 2005; Augustin *et al.*, 2007).

Con objeto de estudiar si cambios en la estructura del LPS podían afectar a la expresión del T3SS en *A. hydrophila* AH-3, se analizó la actividad de los promotores *aopN-aopD* y *aexT* en mutantes en algunos genes implicados en la biosíntesis del LPS: *lpxM*, *wzy* y *waaL*. La mutación de los genes *wzy* o *waaL* resultó en un incremento de la expresión de ambos promotores, mientras que la mutación del gen *lpxM* dio lugar a un descenso de la expresión. Los mutantes AH-3::*waaL* y AH-3::*wzy* presentan una pérdida total y parcial (una sola repetición) del antígeno O, respectivamente. Estos cambios estructurales podrían permitir una mejor exposición del aparato de secreción de tipo III a las condiciones del medio, facilitando así su apertura y la secreción, y favoreciendo de este modo la expresión. Por otro lado, la disminución de la expresión de ambos promotores, *aopN-aopD* y *aexT*, en el mutante AH-3::*lpxM*, podría estar relacionada con un malfuncionamiento del T3SS como resultado de algún problema de ensamblaje del aparato a causa de la falta de estabilidad de la membrana externa.

Recientemente, en *P. aeruginosa* se ha demostrado que, a medida que disminuye la complejidad del antígeno O del LPS, incrementa la expresión de genes de tipo III (agrupación génica de T3SS y efectores) (Augustin *et al.*, 2007). Anteriormente, se había descrito que la presencia o ausencia del antígeno O en *Y. enterocolitica* O:8 afectaba a la expresión de factores de virulencia en esta especie (Bengoechea *et al.*, 2004), lo que sugiere que el LPS tiene un papel, directo o indirecto, en la regulación de la expresión génica en diversas especies patógenas.

En *Shigella* spp. se ha demostrado que el LPS es clave para en la invasión mediada por el T3SS de células huésped (West *et al.*, 2005). Cepas con un LPS truncado son altamente eficientes en la invasión celular *in vitro*, posiblemente gracias a un mejor acceso del T3SS a las células huésped. Sin embargo, esto no supone una ventaja *in vivo*, donde la bacteria es susceptible al sistema inmune innato. Por otro lado, en cepas que expresan un LPS completo pero no glicosilado, aunque la bacteria es capaz de resistir la respuesta del sistema inmune, la isoforma extendida del LPS parece alterar la exposición del T3SS, lo que conlleva una reducción de la virulencia. Los cambios en la glicosilación del LPS dan lugar a cambios en el grosor de la membrana externa, lo que parece alterar la capacidad invasiva debido a una mayor/menor exposición de la aguja de T3SS. En ambos casos, la bacteria se encuentra en desventaja debido a la descompensación entre su capacidad invasiva y su capacidad de sobrevivir a la respuesta del sistema inmune (West *et al.*, 2005). West y colaboradores sugieren que la glicosilación del LPS facilita la invasión de células diana mediante la alteración de la conformación del LPS, de forma que se optimiza la exposición de las agujas de T3SS mientras se mantiene la resistencia contra las defensas del huésped. De este manera, proponen que la relación entre el LPS y la función del T3SS puede considerarse similar a un escudo y una espada, en la que existe un balance entre la longitud de las cadenas de antígeno O para proteger a la bacteria contra las defensas del huésped (escudo), y la influencia de la función del T3SS (espada).

4.6 Inducción del T3SS de *A. hydrophila* AH-3

4.6.1 Inducción del T3SS por depleción de calcio

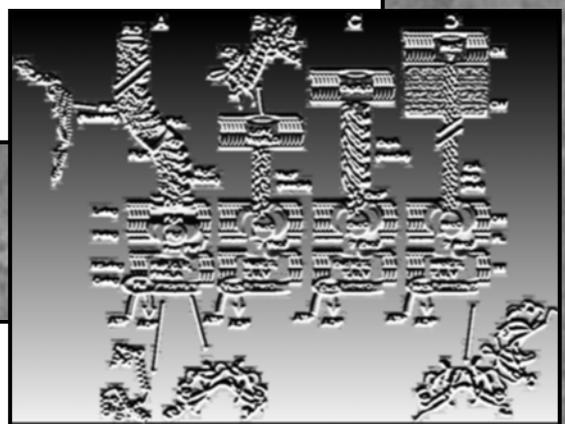
El objetivo biológico del T3SS es translocar proteínas efectoras del citoplasma bacteriano al interior de la célula huésped. No obstante, como ya se ha comentado, en algunas bacterias, como *Yersinia* spp. y *P. aeruginosa*, se ha observado secreción de tipo III *in vitro* cuando su crecimiento se realiza en un medio rico con depleción de calcio (Ramamurthi and Schneewind, 2002). Dada la similitud del T3SS de *A. hydrophila* con los de *Y. enterocolitica* y *P. aeruginosa* (todas las especies pertenecen a la familia Ysc en la clasificación de los diferentes T3SS) decidimos estudiar si en *A. hydrophila* AH-3 también se daba una secreción diferencial en función de la concentración de iones Ca^{2+} en el medio, tomando como indicador la presencia de la proteína AexT en sobrenadantes mediante ensayos de *Western blot*. Además, estudios previos en *A. salmonicida* indicaban que el funcionamiento del T3SS parecía depender de la concentración de iones calcio en el medio (Burr *et al.*, 2003).

Tal y como muestra la figura 3.37 A, se observó una banda de reacción positiva correspondiente a la proteína AexT en el sobrenadante procedente de la cepa salvaje, AH-3, crecida en condiciones de depleción de calcio. En las mismas condiciones (baja concentración de calcio), no se observó reacción positiva en los sobrenadantes procedentes de los mutantes AH-3::*aexT* y AH-3::*ascV*, recuperando ambos el fenotipo salvaje al ser complementados con los cósmidos pLA-AexT y pLA-T3SS4, respectivamente. Cabe destacar, que la proteína no se detectó en ninguno de los sobrenadantes procedentes de crecimientos en TSB. El mutante AH-3::*aopN* fue capaz de secretar AexT en condiciones de no depleción de calcio, TSB a 37°C (figura 3.37 B), recuperando el fenotipo salvaje al ser complementado con el plásmido pACYC-*aopN*. Estos resultados indican que, en *A. hydrophila* AH-3, la proteína AexT es un efector secretado vía T3SS, y que la depleción de calcio del medio induce el funcionamiento de este sistema, dando lugar a la secreción de efectores de tipo III. Además, el hecho de detectar la proteína AexT en sobrenadantes procedentes de crecimientos del mutante AH-3::*aopN* en condiciones de no inducción del T3SS, indica que este mutante es constitutivo para la expresión y secreción del T3SA.

4.6.2 Inducción del T3SS por contacto con células eucariotas

El mecanismo de activación de la secreción de tipo III *in vivo* parece ser el contacto de la bacteria con la célula eucariota huésped (Francis *et al.*, 2002). Con el fin de estudiar este fenómeno en *A. hydrophila* AH-3, se realizaron ensayos de translocación con la cepa salvaje AH-3, los mutantes AH-3::*aexT* y AH-3::*ascV*, y dichos mutantes complementados con los cósmidos pLA-AexT y pLA-T3SS4, respectivamente, detectando posteriormente el efector AexT mediante *Western-blot* con suero anti-AexT de *A. hydrophila* AH-3. Estos ensayos permitieron detectar AexT en el interior de las células eucariotas al emplear la cepa salvaje o los mutantes complementados, pero no al emplear las cepas mutantes. Además, los resultados fueron los mismos, independientemente del origen de las células eucariotas (mamífero o pez). De estos resultados se infiere que el efector AexT de *A. hydrophila* AH-3 es transportado al interior de las células eucariotas vía el aparato de secreción de tipo III. Esto se ve apoyado por el hecho de que adyacente a la secuencia codificante del gen *aexT* se encuentra una secuencia que presenta similitud con una chaperona de tipo III (SycE).

5. Conclusiones



1.- Se han identificado, mediante sustracción génica, una serie de secuencias génicas potencialmente implicadas en la virulencia de *A. hydrophila*. Estas incluyen genes previamente descritos en *A. hydrophila*, genes que muestran similitud con factores de patogenicidad descritos en otros géneros y no examinados en *A. hydrophila*, y secuencias que no muestran similitud con ninguna de las entradas de las bases de datos, pudiendo constituir nuevos determinantes de patogenicidad.

2.- Las agrupaciones génicas responsables de la biosíntesis del sistema de secreción de tipo III de las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila* están constituidas por treinta y seis genes, distribuidos probablemente en seis unidades transcripcionales, siendo ésta la primera vez que se describe una agrupación completa de este tipo en el género *Aeromonas*.

3.- La comparación de la organización génica global entre diferentes T3SS así como los análisis filogenéticos llevados a cabo con diferentes de sus componentes han permitido la clasificación de los T3SS en siete familias. El T3SS de *A. hydrophila* es prácticamente idéntico en organización génica al de *P. aeruginosa*, y muy parecido al de *Yersinia pestis*, habiendo sido clasificado en la familia Ysc, formada por *Yersinia* spp. (Ysc), *P. aeruginosa* (Psc), *P. luminescens* (Lsc), *V. parahaemolyticus* (Vsc), *D. vulgaris* (Dsc), y *Bordetella* spp. (Bsc).

4.- Las cepas de *Aeromonas* mesófilas que poseen genes de tipo III parecen tener un T3SS completo. Por otro lado, la presencia del T3SS es menos prevalente en cepas ambientales que en cepas clínicas; y, dentro de las cepas clínicas es más frecuente en las especies *A. veronii* y *A. hydrophila* que en *A. caviae*, tal y como sucede con otros factores de virulencia.

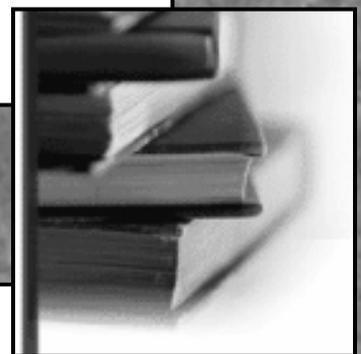
5.- El T3SS es un importante factor de virulencia para las cepas AH-1 y AH-3 de *A. hydrophila*, ya que su inactivación conduce a un aumento de la dosis letal₅₀, a un retraso de la citotoxicidad y a un aumento de la tasa de fagocitosis.

6.- *A. hydrophila* AH-3 produce un efector de características similares al efector AexT de *A. salmonicida*, la mutagénesis del cual produce una ligera disminución de la virulencia, indicando la posible existencia de otros efectores. Además, en el género *Aeromonas*, se observa una cierta tendencia a la coexistencia de los genes de la agrupación de T3SS y del efector AexT en el mismo genoma.

7.- Las condiciones de máxima expresión de la agrupación génica del T3SS y del efector AexT se dieron a 37°C con aireación, con la adición y la quelación del medio de iones Mg^{2+} y Ca^{2+} , respectivamente. Además, la depleción de Ca^{2+} del medio de cultivo induce el funcionamiento *in vitro* del T3SS en *A. hydrophila* AH-3, dando lugar a la secreción de efectores al medio. Por otro lado, se ha observado el transporte del efector AexT al interior de las células eucariotas vía este sistema.

8.- En la cepa AH-3 de *A. hydrophila*, parecen existir diversos mecanismos de regulación de la expresión génica del T3SS y del gen *aexT*, en los que parecen estar implicados, entre otros, componentes propios del T3SS, el flagelo polar, el lipopolisacárido, los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y AhyI/AhyR, la piruvato deshidrogenasa y la oxidoreductasa DsbA.

6. Bibliografía



A

- Abbott, S. L., Cheung, W. K. and Janda, J. M.** 2003. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2348-2357.
- Aguilar, A., Merino, S., Rubires, X. and Tomás, J. M.** 1997. Influence of osmolarity on lipopolysaccharides and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37 degrees C. *Infect. Immun.* **65**: 1245-1250.
- Aguirre, A., Cabeza, M. L., Spinelli, S. V., McClelland, M., García Vescovi, E. and Soncini, F. C.** 2006. PhoP-induced genes within *Salmonella* pathogenicity island 1. *J. Bacteriol.* **188**: 6889-6898.
- Aizawa, S. I.** 2001. Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**: 157-164.
- Akeda, Y. and Galán, J. E.** 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature.* **437**: 911-915.
- Albertí, S., Alvarez, D., Merino, S., Casado, M. T., Vivanco, F., Tomás, J. M. and Benedí, V. J.** 1996. Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **64**: 4726-4732.
- Allaoui, A., Sasonetti, P. J. and Parsot, C.** 1992. MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella* Ipa invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the *Yersinia* Yop proteins. *J. Bacteriol.* **174**: 7661-7669.
- Allaoui, A., Scheen, R., Lambert de Rouvroit, C. and Cornelis, G. R.** 1995a. VirG, a *Yersinia enterocolitica* lipoprotein involved in Ca²⁺ dependency, is related to ExsB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**: 4230-4237.
- Allaoui, A., Schulte, R. and Cornely, G. R.** 1995b. Mutational analysis of the *Yersinia enterocolitica* *virC* operon: characterization of YscE, F, G, I, J, K required for Yop secretion and YscH encoding YopR. *Mol. Microbiol.* **18**: 343-355.

- 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.
- 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.
- Altarriba, M.** 2003. Operones que codifican la flagelación polar de *Aeromonas* spp. Tesis doctoral.
- 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. and Nikaido, H.** 1974. Protein composition of outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **117**: 406-416.
- Anderson, D. M. and Schneewind, O.** 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science.* **278**: 1140-1143.
- Anderson, D. M., Ramamurthi, K. S., Tam, C. and Schneewind, O.** 2002. YopD and LcrH regulate the expression of *Yersinia enterocolitica* YopQ by a posttranscriptional mechanism and bind to *yoyQ* RNA. *J. Bacteriol.* **184**: 1287-1295.
- Asao, T., Kinoshita, Y., Kozaki, S., Uemura, T. and Sakaguchi, G.** 1984. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.* **46**: 122-127.
- Augustin, D. K., Song, Y., Baek, M. S., Sawa, Y. Singh, G., Taylor, B., Rubio-Mills, A., Flanagan, J. L., Wiener-Kronish, J. P. and Lynch, S. V.** 2007. Presence or absence of lipopolysaccharide O antigens affects type III secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**: 2203-2209.

Austin, B., Austin, D. A., Dalsgaard, I., Gudmundsdottir, B. K., Hoie, S., Thornton, J. M., Larsen, J. L., O'Hici, B. and Powell, R. 1998. Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 50-64.

B

Backert, S. and Meyer, T. F. 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 207-217.

Barnett, T. C., Kirov, S. M., Strom, M. S. and Sanderson, K. 1997. *Aeromonas* spp. possess at least two distinct type IV pilus families. *Microb. Pathog.* **23**: 241-247.

Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Ewinger, L., 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.

Béchet, M. and Blondeau, R. 2003. Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 1072-1078.

Belland, R. J. and 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. *J. Bacteriol.* **169**: 4086-4091.

Bengoechea, J. A., Najdenski, H. and Skurnik, M. 2004. Lipopolysaccharide O antigen status of *Yersinia enterocolitica* O:8 is essential for virulence and absence of O antigen affects the expression of other *Yersinia* virulence factors. *Mol. Microbiol.* **52**: 451-469.

Beveridge, T. J., Pouwels, P. H., Sara, M., Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Kari, K., Kerosuo, E., Haapasalo, M., Egelseer, E. M., Schocher, I., Sleytr, U. B., Morelli, L., Callegari, M. L., Nomellini, J. F., Bingle, W. H., Smit, J., Leibovitz, E., Lemaire, M., Miras, I., Salamitou, S., Beguin, P., Ohayon, H., Gounon, P., Matuschek, M. and Koval, S. F. 1997. Functions of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**: 99-149.

- Birnboim, H. C. and Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
- Birtalan, S. C., Phillips, M. R. and Ghosh, P.** 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell.* **9**: 971-980.
- Blaylock, B., Riordan, K. E., Missiakas, D. M. and Schneewind, O.** 2006. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J. Bacteriol.* **188**: 3525-3434.
- Bleves, S., Marenne, M. N., Detry, G. and Cornelis, G. R.** 2002. Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* yop regulon by deletion of the flagellum master operon *flhDC*. *J. bacteriol.* **184**: 3214-3223.
- Bleves, S., Soscia, C., Nogueira-Orlandi, P., Lazdunski, A. and Filloux, A.** 2005. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **187**: 3898-3902.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. and Allaoui, A.** 2001. Structure and composition of the *Shigella flexneri* “needle comple”, a part of its type III secreton. *Mol. Microbiol.* **39**: 652-663.
- Blocker, A., Komoriya, K. and Aizawa, S. I.** 2003. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **100**: 3027-3030.
- Borrell, N., Figueras, J. M. and Guarro, J.** 1998. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Cam. J. Microbiol.* **2**: 103-108.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Braun, M., Stuber, K., Schlatter, Y., Wahli, Y., Kuhnert, P. and Frey, J.** 2002. Characterization of an ADP-ribosyltransferase toxin (AexT) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J. Bacteriol.* **184**: 1851-1858.

-
- Bröms, J. E., Edqvist, P. J., Carlsson, K. E., Forsberg, Å and Francis, M. S.** 2005. Mapping of a YscY binding domain within the LcrH chaperone that is required for regulation of *Yersinia* type III secretion. *J. Bacteriol.* **187**: 7738-7752.
- Buckley, J. T. and Howard, S. P.** 1999. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infect. Immun.* **67**: 466-467.
- Burke, V., Cooper, M., Robinson, J., Gracey, M., Lesmana, M., Echeverria, P. and Janda, J. M.** 1984. Hemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. in relation to biotype and source. *J. Clin. Microbiol.* **19**: 39-43.
- Burr, S. E., Stuber, K., Wahli, T. and Frey, J.** 2002. Evidence for a type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J. Bacteriol.* **184**: 5966-5970.
- Burr, S. E., Stuber, K. and Frey, J.** 2003. The ADP-ribosylating toxin, AexT, from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is translocated via a type III secretion pathway. *J. Bacteriol.* **185**: 6583-6591.
- Büttner, D. and Bonas, U.** 2002. Port of entry – the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* **10**: 186-192.
- Büttner, D. and Bonas, U.** 2003. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 312-319.
- Byers, B. R., Massad, G., Barghouthi, S. and Arceneaux, J. E.** 1991. Iron acquisition and virulence in the motile aeromonads: siderophore-dependent and independent systems. *Experientia.* **47**: 416-418.

C

-
- Canals, R.** 2007. Estudio de la movilidad: característica fundamental de las *Aeromonas* mesófilas. Tesis doctoral.

- Canals, R., Ramírez, S., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J. G., Tomás, J. M. and Merino, S.** 2006. Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **188**: 542-555.
- Canals, R., Altarriba, M., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J. G., Tomás, J. M. and Merino, S.** 2006. Analysis of the lateral flagella gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. *J. Bacteriol.* **188**: 852-862.
- Cascales, E. and Christie, P. J.** 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**: 137-149.
- Chacón, M. R., Soler, L., Groisman, E. A., Guarro, J. and Figueras, M. J.** 2004. Type III secretion system in clinical *Aeromonas* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1285-1287.
- Chakraborty, T., Montenegro, M. A., Sanyal, S. C., Helmuth, R., Bulling, E. and Timmis, K. N.** 1984. Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infect. Immun.* **46**: 435-441.
- Chakraborty, T., Huhle, B., Bergbauer, H. and Goebel, W.** 1986. Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **167**: 368-374.
- Chakravorty, D., Rohde, M., Jäger, J., Deiwick, J. and Hensel, M.** 2005. Formation of a novel surface structure encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *EMBO J.* **24**: 2043-2052.
- Chang, A. C. and Cohen, S. N.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141-1156.
- Cheng, L. W. and Schneewind, O.** 2000. *Yersinia enterocolitica* TyeA, an intracellular regulator of the type III machinery, is required for specific targeting of YopE, YopH, YopM, and YopN into the cytosol of eukariotic cells. *J. Bacteriol.* **182**: 3183-3190.

- Cheng, L. W., Kay, O. and Schneewind, O.** 2001. Regulated secretion of YopN by the type III machinery of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **183**: 5293-5301.
- Chopra, A. K. and Houston, C. W.** 1989. Purification and partial characterization of a cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Can. J. Microbiol.* **35**: 719-727.
- Chopra, A. K., Vo, T. N., Houston, C. W.** 1992. Mechanism of action of cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**: 15-19.
- Chopra, A. K., Houston, C. W., Peterson, J. W. and Jin, G. F.** 1993. Cloning, expression and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Can. J. Microbiol.* **39**: 513-523.
- Chopra, A. K., Pham, R. and Houston, C. W.** 1994. Cloning and expression of putative cytotoxic enterotoxin-encoding genes from *Aeromonas hydrophila*. *Gene.* **139**: 87-91.
- Chopra, A. K., Peterson, J. W., Xu, X. J., Coppenhaver, D. H. and Houston, C. W.** 1996. Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* **21**: 357-377.
- Chopra, A. K. and Houston, C. W.** 1999. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect.* **1**: 1129-1137.
- Chu, S., Cavaignac, S., Feutrier, J., Phipps, B. M., Kostrzynska, M., Kay, W. W. and Trust, T. J.** 1991. Structure of the tetragonal surface virulence array protein and gene of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.* **266**: 15258-15265.
- Chuang, Y. C., Chiou, S. F., Su, J. H., Wu, M. L. and Chang, M. C.** 1997. Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. *Microbiology.* **143**: 803-812.
- Cianciotto, N. P.** 2005. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* **13**: 581-588.

- Collins, M. D., Martínez-Murcia, A. J. and Cai, J.** 1993. *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 855-856.
- Colwell, R. R., McDonell, M. T. and De Ley J.** 1986. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int. J. Sist. Bacteriol.* **36**: 473-477.
- Cordes, F. S., Komoriya, K., Larquet, E., Yang, S., Egelman, E. H., Blocker, A. and Lea, S. M.** 2003. Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J. Biol. Chem.* **278**: 17103-17107.
- Cornelis, G. R and Van Gijsegem, F.** 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 735-774.
- Cornelis, G. R.** 2006. The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 811-825.
- Creasey, E. A., Delahay, R. M., Daniell, S. J. and Frankel, G.** 2003. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol.* **149**: 2093-2106.
- Crepin, V. F., Prasannan, S., Shaw, R. K., Wilson, R. K., Creasey, E., Abe, C. M., Knutton, S., Frankel, G. and Matthews, S.** 2005. Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. *Mol. Microbiol.* **55**: 1658-1670.

D

- Daefler, S. and Russel, M.** 1998. The *Salmonella typhimurium* InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. *Mol. Microbiol.* **28**: 1367-1380.
- Dacanay, A., Knickle, L., Solanky, K. S. Boyd, J. M., Walter, J. A., Brown, L. L., Johnson, S. C. and Reith, M.** 2006. Contribution of the type III secretion system

- (T3SS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Microbiol. **152**: 1847-1856.
- Dacheux, D., Epaulard, O., de Groot, A., Guery, B., Leberre, R., Attree, I., Polack, B. and Toussaint, B.** 2002. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system requires an intact pyruvate dehydrogenase *aceAB* operon. **70**: 3973-3977.
- Darwin, K. H. and Miller, V. L.** 2001. Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. EMBO J. **20**: 1850-1862.
- Davis, A. J. and Mecsas, J.** 2007. Mutations in the *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion system needle protein, YscF, that specifically abrogate effector translocation into host cells. J. Bacteriol. **189**: 83-97.
- Day, J. B. and Plano, G. V.** 1998. A complex composed of a macromolecular SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. **30**: 777-788.
- Day, J. B. and Plano, G. V.** 2000. The *Yersinia pestis* YscY protein directly binds YscX, a secreted component of the type III secretion machinery. J. Bacteriol. **182**: 1834-1843.
- Day, J. B., Guller, I. and Plano, G. V.** 2000. *Yersinia pestis* YscG protein is a syc-like chaperone that directly binds YscE. Infect. Immun. **68**: 6466-6471.
- Day, J. B., Ferracci, F. and Plano, G. V.** 2003. Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by *Yersinia pestis* *yopN*, *tyeA*, *sycN*, *yscB* and *lcrG* deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies. Mol. Microbiol. **47**: 807-823.
- de Keyzer, J., van der Does, C. and Driessen, A. J.** 2003. The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. Cell. Mol. Life Sci. **60**: 2034-2052.

- de Kok, A., Hengeveld, A. F., Martin, A. and Westphal, A. H.** 1998. The pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex from Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1385**: 353-366.
- Desvaux, M., Parham, N. J., Scott-Tucker, A. and Henderson, I. R.** 2004. The general secretory pathway: a general misnomer?. *Trends Microbiol.* **12**: 306-309.
- Desvaux, M., Hébraud, M., Henderson, I. R. and Pallen, M. J.** 2006. Type III secretion: what's in a name?. *Trends Microbiol.* **14**: 157-160.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanow, S., Luyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. and Siebert, P.D.** 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes en libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 6025-6030.
- 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. and Trust, T. J.** 1985. Electrophoretic and immunochemical analyses of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **164**: 263-269.
- Dooley, J. S. and Trust, T. J.** 1988. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: identification of a surface array protein. *J. Bacteriol.* **170**: 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.

E

- Ebanks, R. O., Knickle, L. C., Goguen, M., Boyd, J. M., Pinto, D. M., Reith, M. and Ross, N. W.** 2006. Expression of and secretion through the *Aeromonas salmonicida* type III secretion system. *Microbiol.* **152**: 1275-1286.
- Eberhard, A.** 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* **109**: 1101-1105.
- Edqvist, P. J., Olsson, J., Lavandaer, M., Sundberg, L., Forsberg, Å., Wolf-Watz, H. and Lloyd, S. A.** 2003. YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. **185**: 2259-2266.
- Edqvist, P. J., Bröms, J. E., Betts, H. J., Forsberg, A., Pallen, M. J. and Francis, M. S.** 2006. Tetratricopeptide repeats in the type III secretion chaperone, LrcH: their role in substrate binding and secretion. *Mol. Microbiol.* **59**: 31-44.
- Eichelber, K. and Galán, J. E.** 2000. The flagellar sigma factor FliA (σ^{28}) regulates the expression of *Salmonella* genes associated with the centisome 63 type III secretion system. *Infect. Immun.* **68**: 2735-2743.
- Ellermeier, C. D. and Slauch, J. M.** 2004. RtsA coordinately regulates DsbA and the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 type III secretion system. *J. Bacteriol.* **186**: 68-79.
- Esteve, C., Alcaide, E., Canals, R., Merino, S., Blasco, D., Figueras, M. J. and Tomás, J. M.** 2004. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* serogroup O:14 and O:81 strains with an S layer. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5898-5904.

F

- Fairbanks, G., Sleck, T. L. and Wallach, D. W.** 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem.* **10**: 2606-2617.
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G., Gualerzi, C. O.** 1998. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A

temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J.* **17**: 7033-7043.

Falconi, M., Prosseda, G., Giangrossi, M., Beghetto, E., Colonna, B. 2001. Involvement of FID in the H-NS-mediated regulation of *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **42**: 439-452.

Fehr, D., Casanova, C., Liverman, A., Blazkova, H., Orth, K., Dobbelaere, D., Frey, J. and Burr, S. E. 2006. AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF-kappaB signalling pathway. *Microbiol.* **152**: 2809-2818.

Fehr, D., Casanova, C., Liverman, A., Blazkova, H., Orth, K., Dobbelaere, D., Frey, J. and Burr, S. E. 2006. AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits de NF-kappaB signaling pathway. *Microbiology.* **152**: 2809-2818.

Fehr, D., Burr, S. E., Gibert, M., d'Alayer, J., Frey, J. and Popoff, M. R. 2007. *Aeromonas* exoenzyme T of *Aeromonas salmonicida* is a bifunctional protein that targets the host cytoskeleton. *J. Biol. Che.* **282**: 28843-28852.

Feldman, M. and Cornelis, G. R. 2003. The multitalented type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**: 151-158.

Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L. and Hauser, A. R. 2001. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* **147**: 2659-2669.

Ferguson, M. R., Xu, X. J., Houston, C. W., Peterson, J. W., Coppenhaver, D. H., Popov, V. L. and Chopra, A. K. 1997. Hyperproduction, purification, and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* **65**: 4299-4308.

Ferracci, F., Schubot, F. D., Waugh, D. S. and Plano, G. V. 2005. Selection and characterization of *Yersinia pestis* YopN mutants that constitutively block Yop secretion. *Mol. Microbiol.* **57**: 970-987.

-
- Figueras, M. J., Guarro J. and Martínez-Murcia, A. J.** 2000. Use of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified 16S rRNA gene for the identification of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2023-2025.
- Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J. L. and Earhart, D. F.** 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.* **115**: 715-722.
- Forsberg, Á., Bölin, I, Norlander, L. and Wolf-Watz, H.** 1987. Molecular cloning and expression of calcium-regulated, plasmid-coded proteins of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microb. Pathog.* **2**: 123-137.
- Francis, M. S., Lloyd, S. A. and Wolf-Watz, H.** 2001. The type III secretion chaperone LcrH cooperates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **42**: 1075-1093.
- Francis, M. S., Wolf-Watz, H. and Forsberg, Á.** 2002. Regulation of type III secretion system. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 166-172.
- Frank, D. W. and Iglewski, B. H.** 1991. Cloning and sequence analysis of a trans-regulatory locus required for exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **173**: 6460-6468.
- Frank, D. W.** 1997. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **26**: 621-629.
- Frekkes, P. and Driessen, A. J.** 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **63**: 161-173.

G

- Galán, J. E. and Collmer, A.** 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* **284**: 1322-1328.

- Galán, J. E. and Wolf-Watz, H.** 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*. **444**: 567-573.
- Galindo, C. L., Sha, J., Ribardo, D. A., Fadl, A. A., Pillai, L. and Chopra, A. K.** 2003. Identification of *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced genes in macrophages using microarrays. *J. Biol. Chem.* **278**: 40198-40212.
- Galindo, C. L., Fadl, A. A., Sha, J., Pillai, L., Gutierrez, C. Jr. and Chopra, A. K.** 2005. Microarray and proteomics analyses of human intestinal epithelial cells treated with the *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin. *Infect. Immun.* **73**: 2628-2643.
- Galindo, C. L., Gutierrez, C. Jr. and Chopra, A. K.** 2006. Potential involvement of galectin-3 and SNAP23 in *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced host cell apoptosis. *Microb. Pathog.* **40**: 56-68.
- Garduño, R. A., Thornton, J. C. and Kay, W. W.** 1993. *Aeromonas salmonicida* grown in vivo. *Infect. Immun.* **61**: 3854-3862.
- Gardy, J. L., Laird, M. R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C. J., Ester, M. and Brinkman, F. S. L.** 2005. PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics.* **21**: 617-623.
- Garrote, A., Bonet, R., Merino, S., Simon-Pujol, M. D. and Congregado, F.** 1992. Occurrence of a capsule in *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **74**: 127-131.
- Gavín, R., Rabaan, A. A., Merino, S., Tomás, J. M., Gryllos, I. and Shaw, J. G.** 2002. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **43**: 383-397.
- Gentschev, I., Dietrich, G. and Gloebel, W.** 2002. The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol.* **10**: 39-45.

- Ghenghesh, K. S., Abeid, S. S., Jaber, M. M. and Ben-Taher, S. A.** 1999. Isolation and haemolytic activity of *Aeromonas* species from domestic dogs and cats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **22**: 175-179.
- Ghosh, P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 771-795.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ulmann, A. and Danechin., A.** 1988. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* **7**: 3997-4004.
- Gophna, U., Ron, E. Z. and Graur, D.** 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene.* **312**: 151-163.
- Goranson, J., Hovey, A. K. and Frank, D. W.** 1997. Functional analysis of *exsC* and *exsB* in regulation of exoenzyme S production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**: 1646-1654.
- Groisman, E. A.** 2001 The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.* **183**: 1835-1842.
- Gryllos, I., Shaw, J. G., Gavín, R., Merino, S. and Tomás, J. M.** 2001. Role of *flm* locus in mesophilic *Aeromonas* species adherence. *Infect. Immun.* **69**: 65-74.
- Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D., Khaspekov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A. and Sverdlov, E. D.** 1996. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* **240**: 90-97.

H

- Ha, U. H., Wang, Y. and Jin, S.** 2003. DsbA of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for multiple virulence factors. *Infect. Immun.* **71**: 1590-1595.

- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95-98.
- 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. and Monteil, H.** 2004. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**: 481-485.
- Hartland, E. L., Green, S. P., Phillips, W. A. and Robins-Browne, R. M.** 1994. Essential role of YopD in inhibition of the respiratory burst of macrophages by *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. **62**: 4445-4453.
- Hartland, E. L., Bordun, A. M. and Robins-Browne, R. M.** 1996. Contribution of YopB to virulence of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun. **64**: 2308-2314.
- Hathcock, T. L., Schumacher, J. Wright, J. C. and Stringfellow, J.** 1999. The prevalence of *Aeromonas* species in feces of horses with diarrhea. J. Vet. Intern. Med. **13**: 357-360.
- He, S. Y., Nomura, K. and Whittam, T. S.** 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. Biochim. Biophys. Acta. **1694**: 181-206.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia F. and Nataro, J. P.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. Trends Microbiol. **6**: 370-378.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. and Ala'Aldeen, D.** 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. Microbiol. Molec. Biol. Rev. **68**: 692-744.
- Henke, J. M. and Bassler, B. L.** 2004. Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. **186**: 3794-3805.

- Hofmann, K. and Stoffel, W.** 1993. TMbase – A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **374**: 166.
- Hogardt, M., Roeder, M., Schreff, A. M., Eberl, L. and Heesemann, J.** 2004. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiol.* **150**: 843–851.
- Hoicyk, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M. Lupas, A. and Heesemann, J.** 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesions. *EMBO J.* **19**: 5989-5999.
- Hoicyk, E. and Blobel, G.** 2001. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 4669-4674.
- Holbourn, K. P., Shone, C. C. and Acharya, K. R.** 2006. A family of killer toxins: exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins. *FEBS J.* **273**: 4579-4593.
- Honma, Y. and Nakasone, N.** 1990. Pili of *Aeromonas hydrophila*: purification, characterization, and biological role. *Microbiol. Immunol.* **34**: 83-98.
- Hornef, M. W., Roggenkamp, A., Geiger, A. M., Hogardt, M., Jacobi C. A. and Heesemann, J.** 2000. Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis. *Microb. Pathogen.* **29**: 329-343.
- Hovey, A. K. and Frank, D. W.** 1995. Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.* **177**: 4427-4436.
- Howard, S. P. and Buckley, J. T.** 1986. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 289-295.
- Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 379-433.

I

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.

J

Jackson, M. W. and Plano, G. V. 1999. DsbA is required for stable expression of outer membrane protein YscC and for efficient Yop Secretion in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **181**: 5126-5130.

Jackson, M. W. and Plano, G. V. 2000. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 85-90.

Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. and Antoine, R. 2001. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* **40**: 306-313.

James, C., Dibley, M., Burke, V., Robinson, J. and Gracey, M. 1982. Immunological cross-reactivity of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* and cholera toxin. *Clin. Exp. Immunol.* **47**: 34-42.

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., Oshiro, L. S., Abbott, S. L. and 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. *Infect. Immun.* **55**: 3070-3077.

- Janda, J. M., Abbott, S. L., Khashe, S., Kellogg, G. H. and Shimada, T.** 1996. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1930-1933.
- Janda, J. M. and Abbott., S. L.** 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 332-344.
- Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, W. G. and Sandkvist, M.** 2006. Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**: 175-186.
- Josenhans, C. and Suerbaum, S.** 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 605-614.
- Journet, L., Agrain, c., Broz, P. and Cornelis, G. R.** 2003. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science.* **302**: 1757-1760.

K

- Kay, W. W., Buckley, J. T., Ishiguro, E. E., Phipps, B. M., Monette, J. P. and Trust, T. J.** 1981. Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* **147**: 1077-1084.
- Kay, W. W., Phipps, B. M., Ishiguro, E. E., Olafson, R. W. and Trust, T. J.** 1984. Surface layer virulence A-proteins from *Aeromonas salmonicida* strains. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **62**: 1064-1071.
- Kay, W. W., Phipps, B. M., Ishiguro, E. E. and Trust, T. J.** 1985. Porphyrin binding by the surface array virulence protein of *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* **164**: 1332-1336.
- Kim, J. and Kendall, D. A.** 2000. Sec-dependent protein export and the involvement of the molecular chaperone SecB. *Cell Stress Chaperones.* **5**: 267-275.

- Kirov, S. M., Jacobs, I., Hayward, L. J. and 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*. *Microbiol. Immunol.* **39**: 329-338.
- Kirov, S. M.** 1997. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In Doyle, M. P., Beuchat, L. T. and Montville, T. J. (ed.): *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington D.C., pp. 265-287.
- Kirov, S. M., O'Donovan, L. A. and Sanderson, K.** 1999. Functional characterization of type IV pili expressed on diarrhea-associated isolates of *Aeromonas* species. *Infect. Immun.* **67**: 5447-5454.
- Kirov, S. M., Tassell, B. C., Semmler, A. B., O'Donovan, L. A., Rabaan, A. A. and Shaw, J. G.** 2002. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J. Bacteriol.* **184**: 547-555.
- Knirel, Y. A., Shashkov, A. S., Senchenkova, S. N., Merino, S. and Tomás, J. M.** 2002. Structure of the O-polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* O:34; a case of random O-acetylation of 6-deoxy-L-talose. *Carbohydr. Res.* **337**: 1381-1386.
- Knirel, Y. A., Vinogradov, E., Jiménez, N., Merino, S. and Tomás, J. M.** 2004. Structural studies on the R-type lipopolysaccharide of *Aeromonas hydrophila*. *Carbohydr. Res.* **339**: 787-793.
- Kokka, R. P., Vedros, N. A. and 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*. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2240-2247.
- Koshland, D. and Botstein, D.** 1980. Secretion of beta-lactamase requires the carboxy end of the protein. *Cell.* **20**: 749-760.
- Kostakioti, M., Newman, C. L., Thanassi, C. G. and Stathopoulos, C.** 2005. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J. Bacteriol.* **187**: 4306-4314.

- Koster, M., Bitter, W., de Cock, H., Allaoui, A., Cornelis, G. R. and Tommassen, J.** 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.* **26**: 789-797.
- Krause, M., Roudier, C., Fierrer, J., Harwood, J. and Guiney, D.** 1991. Molecular analysis of the virulence locus of the *Salmonella dublin* plasmid pSDL2. *Mol. Microbiol.* **5**: 307-316.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E. and Aizawa, S. I.** 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science.* **280**: 602-605.

L

- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lawton, D. G., Longstaff, G., Wallace, B. A., Hill, J., Leary, S. C., Titball, R. W. and Brown, K. A.** 2002. Interactions of the type III secretion pathway proteins LcrV and LcrG from *Yersinia pestis* are mediated by coiled-coil domains. *J. Biol. Chem.* **277**: 38714-38722.
- Lee, C. A.** 1997. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells?. *Trends Microbiol.* **5**: 148-156.
- Lee, P. A., Tullman-Ercek, D. and Georgiou, G.** 2006. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 373-395.
- Lee, S. H. and Galán, J. E.** 2004. *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol. Microbiol.* **51**: 483-495.
- Lee, V. T. and Schneewind, O.** 1999. Type III machines of pathogenic yersiniae secrete virulence factors into the extracellular milieu. *Mol. Microbiol.* **31**: 1619-1629.

- Lee, V. T. and Schneewind, O.** 2001. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Gen. Dev.* **15**: 1725-17
- Leung, K. Y. and Stevenson, R. M.** 1988. Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 151-160.
- Lewis, K.** 1986. Anomalous mobilities of DNA restriction fragments on polyacrilamide gels. *Promega. Notes.* **6**: 4-5.
- Lilic, M., Vujanac, M. and Stebbins, C. E.** 2006. A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. *Mol. Cell.* **21**: 653-664.
- Litvak, Y. and Selinger, Z.** 2007. *Aeromonas salmonicida* toxin AexT has a Rho family GTPase-activating protein domain. *J. Bacteriol.* **189**: 2558-2560.
- Liu, P.V.** 1973. Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa*. Factors that influence the production of exotoxin A. *J. Infect. Dis.* **128**: 506-513.
- Llosa, M. and O'Callaghan, D.** 2004. Euroconference on the biology of type IV secretion processes: bacterial gates into the outer world. *Mol. Microbiol.* **53**: 1-8.
- Lloyd, S. A., Norman, M., Rosqvist, R. and Wolf-Watz, H.** 2001. *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol. Microbiol.* **39**: 520-531.
- Lloyd, S. A., Sjostrom, M., Andersson, S. and Wolf-Watz, H.** 2002. Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol. Microbiol.* **43**: 51-59.

M

- Macnab, R.** 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim. Biophys. Acta.* **1694**: 207-217.

- Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. D. and Stover, C. K.** 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* **178**: 1274-1282.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.** 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galán, J. E. and Unger, V. M.** 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science.* **306**: 1040-1042.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D. R., Unger, V. M. and Galán, J. E.** 2006. Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature.* **441**: 637-640.
- Marmur, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
- Martin-Carnahan, A. and Joseph, S. W.** 2005. Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In Brenner, D. J., Krieg, N. R. and Staley, J. T. (ed.), *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 PartB, II ed. New York: Springer, pp. 556-578.
- Martínez, E. and de la Cruz, F.** 1988. Transposon Tn21 encodes RecA⁻ independent site-specific integration system. *Mol. Gen. Genetics.* **211**:320-335.
- Martínez, M. J., Simon-Pujol, D., Congregado, F., Merino, S., Rubires, X. and Tomás, J. M.** 1995. The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes O:11 and O:34. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 69-73.
- Martínez-Murcia, A. J., Benlloch, S. and Collins, M. D.** 1992a. 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 412-421.

- Martínez-Murcia, A. J., Esteve, C., Garay, E. and Collins, M. D.** 1992b. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. FEMS Microbiol. Lett. **70**: 199-205.
- Massad, G., Arceneaux, J. E. and Byers, B. R.** 1994. Diversity of siderophore genes encoding biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Aeromonas* spp. Biometals. **7**: 227-36.
- Mavris, M., Page, A. L., Tournebize, R., Demers, B., Sansonetti, P. and Parsot, C.** 2002. Regulation of transcription by the activity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. Mol. Microbiol. **43**: 1543-1553.
- McCardell, B. A., Madden, J. M., Kothary, M. H. and Sathyamoorthy, V.** 1995. Purification and characterization of a CHO cell-elongating toxin produced by *Aeromonas hydrophila*. Microb. Pathog. **19**: 1-9.
- McCarthy, D. H.** 1975. Fish furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* var. *achromogenes*. J. Wildl. Dis. **11**: 489-493.
- McCaw, M. L., Lykken, G. L., Singh, P. K. and Yahr, T. L.** 2002. ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. Mol. Microbiol. **46**: 1123-1133.
- McIntosh, D. and Austin, B.** 1991. Atypical characteristics of the salmonid pathogen *Aeromonas salmonicida*. J. Gen. Microbiol. **137**: 1341-1343.
- Merino, S. and Tomás, J. M.** 1988. Characterization of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated on a septicemic out-break in a fish-farm of Spain. Microbiologia SEM. **4**: 181-184.
- Merino, S., Camprubí, S. and Tomás, J. M.** 1992. Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. Infect. Immun. **60**: 4343-4349.
- Merino, S., Camprubí, S. and Tomás, J. M.** 1993a. Detection of *Aeromonas hydrophila* in food with an enzyme-linked immunosorbent assay. J. Appl. Bacteriol. **74**: 149-154.

- Merino, S., Camprubí, S. and Tomás, J. M.** 1993b. Incidence of *Aeromonas* spp. serotypes O:34 and O:11 among clinical isolates. *Med. Microbiol. Lett.* **2**:48-55.
- Merino, S., Albertí, S. and Tomás., J. M.** 1994. *Aeromonas salmonicida* resistance to complement-mediated killing. *Infect. Immun.* **62**: 5483-5490.
- Merino, S., Rubires, X., Knóchel, S. and Tomás, J. M.** 1995. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **28**: 157-168.
- Merino, S., Aguilar, A., Rubires, X., Simon-Pujol, D., Congregado, F. and Tomás, J. M.** 1996a. The role of the capsular polysaccharide of *Aeromonas salmonicida* in the adherence and invasion of fish cell lines. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**: 185-189.
- Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A., Guillot, J. F. and Tomás, J. M.** 1996b. The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization in vivo of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. *Microb. Pathog.* **20**: 325-333.
- Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A. and Tomás, 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 Microbiol. Lett.* **151**: 213-217.
- Merino, S., Aguilar, A., Nogueras, M. M., Regué, M., Swift, S. and Tomás, J. M.** 1999. Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect. Immun.* **67**: 4008-4013.
- Merino, S., Gavín, R., Vilches, S., Shaw, J. G. and Tomás, J. M.** 2003. A colonization factor (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. is inactive in *Aeromonas salmonicida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 663-667.
- Merino, S., Shaw, J. G. and Tomás, J. M.** 2006. Bacterial lateral flagella: and inducible flagella system. *FEMS Microb. Lett.* **263**: 127-135.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J. M. and Cornelis, G.** 1990. Secretion of Yop proteins by Yersiniae. *Infect. Immun.* **58**: 2840-2849.

- Michiels, T. and Cornelis, G. R.** 1991. Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *J. Bacteriol.* **173**: 1677-1685.
- Mihara, K, Tanabe, T., Yamakawa, Y., Funashashi, T., Nakao, H., Narimatsu, S. and Yamamoto, S.** 2004. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T. *Microbiol.* **150**: 2587-2597.
- Miki, T., Okada, N. and Danbara, H.** 2004. Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 type III secretion system. *J. Biol. Chem.* **279**: 34631-34642.
- Milton, D. L., O'Toole, R., Horstedt, P. and Wolf-Watz, H.** 1996. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **178**: 1310-1319.
- Minamino, T., Tame, J. R., Namba, K. and Macnab, R.** 2001. Proteolytic analysis of the FliH/FliI, the ATPase component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*. *J. Mol. Biol.* **312**: 1027-1036.
- Miñana-Galbis, D., Farfan, M., Fuste, M. C. and Loren, J. G.** 2004. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2073-2078.
- Miyazaki, T. and Kaige, N.** 1985. A histopathological study on motile aeromonad disease in Crucian carp. *Fish Pathol.* **21**: 181-185.
- Mooi, F. R., Held, H. G. J., Avest, A. R. T., Welinder, K. G., Livey, I., Zeijst, B. A. M. and Gaastra, W.** 1987. Characterization of fimbrial subunits from *Bordetella species*. *Microb. pathog.* **2**: 473-484.
- Morrison, D. C.** 1983. Bacterial endotoxins and pathogenesis. *Rev. Infect. Dis.* **5 Suppl 4**: S733-747.
- Mota, L. J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C. and Cornelis, G. R.** 2005. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science.* **307**: 1278.

-
- Mota, L. J.** 2006. Type III secretion gets an LcrV tip. *Trends Microbiol.* **14**: 197-200.
- Mueller, C., Broz, P., Müller, S. A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., Kuhn, M., Engel, A. and Cornelis, G. R.** 2005. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science.* **310**: 674-676.

N

- Neilands, J.** 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**: 26723-26726.
- Nogueras, M. M., Merino, S., Aguilar, A., Benedí, V. J. and Tomás, J. M.** 2000. Cloning, sequencing and role in serum susceptibility of porin II from mesophilic *Aeromonas* sp. *Infect. Immun.* **68**: 1849-1854.
- Noonan, B. and Trust, T. J.** 1995. Molecular analysis of an A-protein secretion mutant of *Aeromonas salmonicida* reveals a surface layer-specific protein secretion pathway. *J. Mol. Biol.* **248**: 316-327.
- Noonan, B. and Trust, T. J.** 1997. The synthesis, secretion and role in virulence of the paracrystalline surface protein layers of *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 1-7.
- Nummelin, H., Merckel, M. C., Leo, J. C., Lankinen, H., Skurnik, M. and Goldman, A.** 2004. The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel β -roll. *EMBO J.* **23**: 701-711.

O

- Oliver, D. C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S. and Fernandez, R. C.** 2003. A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol. Microbiol.* **47**: 1367-1383

O'Toole, G. A. and Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**: 295-304.

P

Pallen, M. J., Francis, M. S. and Fütterer, K. 2003. Tetratricopeptide-like repeats in type-III-secretion chaperones and regulators. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**: 53-60.

Pallen, M. J., Beatson, S. A. and Bailey, C. M. 2005. Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 201-229.

Palmer, T. and Berks, B. C. 2003. Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiol.* **149**: 547-556.

Paniagua, C., Arguello-Villares, J. L., Arias, M. A. and Herreros, M. 1998. *Aeromonas hydrophila* associated with a severe outbreak of infection in farmed rabbits. *Zentralbl. Hyg.Umweltmed.* **201**: 423-430.

Payne, P. L. and Straley, S. C. 1998. YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *J. Bacteriol.* **180**: 3882-3890.

Pemberton, J. M., Kidd, S. P. and Schmidt, R. 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 1-10.

Pepe, C. M., Eklund, M. W. and 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. *Mol. Microbiol.* **19**: 857-869.

Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K. E. and Wolf-Watz, H. 1996. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science.* **273**: 1231-1233.

- Phipps, B. M. and Kay, W. W.** 1988. Immunoglobulin binding by the regular surface array of *Aeromonas salmonicida*. J. Biol. Chem. **263**: 9298-9303.
- Pidiyar, V., Kaznowski, A., Narayan, N. B., Patole, M. and Shouche, Y. S.** 2002. *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 1723-1728.
- Pierson, D. E. and Falkow, S.** 1990. Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences. Infect. Immun. **58**: 1059-1064.
- Plano, G. V., Day, J. B. and Ferracci, F.** 2001. Type III export: new uses for an old pathway. Mol. Microbiol. **40**: 284-293.
- Plano, G. V.** 2004. Modulation of AraC family member activity by protein ligands. Mol. Microbiol. **54**: 287-290.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. and Meyer, T. F.** 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Nature. **325**: 458-462.
- Popoff, M.** 1984. Genus III. *Aeromonas* Kluver and Van Niel 1936, 308 AL. In Krieg, N. R. and Holt, J. M. (ed.), *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 Section 5, IX ed. Baltimore/London: Williams and Wilkins, pp. 545-547.
- Potomski, J., Burke, V., Robinson, J., Fumarola, D. and Miragliotta, G.** 1987. *Aeromonas* cytotoxic enterotoxin cross reactive with cholera toxin. J. Med. Microbiol. **23**: 179-186.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F. and Mekalanos, J. J.** 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103**: 1528-1533.

- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D. and Mekalanos, J. J.** 2007. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 15508-15513.

Q

- Quinaud, M., Chaber, J., Faudry, E., Neumann, E., Lemaire, D., Pastor, A., Elsen, S., Dessen, A. and Attree, I.** 2005. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **280**: 36293-36300.
- Quinn, D. M., Atkinson, H. M., Bretag, A. H., Tester, M., Trust, T. J., Wong, C. Y. and Flower, R. L.** 1994. Carbohydrate-reactive, pore-forming outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **62**: 4054-4058.

R

- Raetz, C. R. and Whitfield, C.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 635-700.
- Rahman, M., Simm, R., Kader, A., Basseres, E., Römling, U. and Möllby, R.** 2007. The role of c-di-GMP signaling in an *Aeromonas veronii* biovar *sobria* strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**: 172-179.
- Ramamurthi, K. S. and Schneewind, O.** 2002. Type III secretion in *Yersinia* species. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**: 107-133.
- Reading, N. C. and Sperandio, V.** 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *REMS Microbiol. Lett.* **254**: 1-11.
- Reed, L. J., and Muench, H.** 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* **27**: 493-497.

-
- Reeves, P. R., Hobbs, M., Valvano, M. A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., Kido, N., Klena, J., Maskell, D., Raetz, C. R. H., Rick, P. D.** 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* **4**: 495-503.
- Rietsch, A. and Mekalanos, J. J.** 2006. Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **59**: 807-820.
- Roberts, I. S.** 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 285-315.
- Rodriguez, L. A., Ellis, A. E. and Nieto, T. P.** 1992. Purification and characterization of an extracellular metalloprotease, serin protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B32: all are lethal for fish. *Microb. Pathog.* **13**: 17-24.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. J.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In Krawetz, S., Misener, S. (ed.): *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.
- Rubires, X., Saigí, F., Piqué, N., Climent, N., Merino, S., Albertí, S., Tomás, J. M. and Regué, M.** 1997. A gene (*wbbL*) from *Serratia marcescens* N28b (O4) complements the rfb-50 mutation of *Escherichia coli* K-12 derivatives. *J. Bacteriol.* **179**: 7581-7586.

S

- Sakazaki, R. and Shimada, T.** 1984. O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **37**: 247-255.
- Salmond, G. P. and Reeves, P. J.** 1993. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 7-12.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.

- Sandkvist, M.** 2001. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* **40**: 271-283.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.
- Schubot, F. D., Jackson, M. W., Penrose, K. J., Cherry, S., Tropea, J. E., Plano, G. V. and Waugh, D. S.** 2005a. Three-dimensional structure of a macromolecular assembly that regulates type III secretion in *Yersinia pestis*. *J. Mol. Biol.* **346**: 1147-1161.
- Schubot, F. D., Cherry, S., Austin, B. P., Tropea, J. E. and Waugh, D. S.** 2005b. Crystal structure of the protease-resistant core domain of *Yersinia pestis* virulence factor YopR. *Protein Sci.* **14**: 1679-1683.
- Secombes, C. J.** 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In Stolen, S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S. and Van Muiswinkel, W. B. (ed.): *Techniques in fish immunology*. SOS Publications, Fair Haven, N. J., pp.137-154.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano K., Sasakaya, C. and Abe, A.** 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 11638-11643.
- Sha, J., Pillai, L., Fadl, A. A., Galindo, C. L., Erova, T. E. and Chopra, A. K.** 2005. The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **73**: 6446-6457.
- Sha, J., Wang, S. F., Suarez, G., Sierra, J. C., Fadl, A. A., Erova, T. E., Foltz, S. M., Khajanchi, B. K., Silver, A., Graf, J., Schein, C. H. and 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. *Microb. Pathog.* **43**: 127-146.

- Sierra J. C., Suarez, G., Sha, J., Foltz, S. M., Popov, V. L., Galindo, C. L., Garner, H. L. and Chopra, A. K.** 2007. Biological characterization of a new type III secretion system effector from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* – Part II. *Microb. Pathog.* **43**: 147-160.
- Soler, L., Yáñez, M. A., Chacon, M. R., Aguilera-Arreola, M. G., Catalan, V., Figueras, M. J. and Martínez-Murcia, A. J.** 2004. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1511-1519.
- Sory, M. P., Boland, A., Lambermont, I. and Cornelis, G. R.** 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 11998-12002.
- Soscia, C., Hachani, A., Bernadac, A., Filloux, A. and Bleves, S.** 2007. Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**: 3124-3132.
- Sperandio, V., Mellies, J. L., Nguyen, W., Shin, S. and Kaper, J. B.** 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 15196-15201.
- Stebbins, C. E. and Galán, J. E.** 2001. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature.* **414**: 77-81.
- Stintzi, A. and Raymond, K. N.** 2000. Amonabactin-mediated iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Aeromonas hydrophila*: direct measurement of individual microscopic rate constants. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**: 57-66.
- Stuber, K., Burr, S. E., Braun, M., Wahli, T. and Frey, J.** 2003. Type III secretion Genes in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* are located on a large thermolabile virulence plasmid. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3854-3856.

Sukhan, A., Kubori, T., Wilson, J. and Galán, J. E. 2001. Genetic análisis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion-associated needle complex. *J. Bacteriol.* **183**: 1159-1167.

Swift, S., Karlyshev, A. V., Fish, L., Durant, E. L., Winson, M. K., Chhabra, S. R., Williams, P., Macintyre, S. and Stewart, G. S. 1997. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.* **179**: 5271-5281.

T

Tamano, K., Aizawa, S. I., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S. and Sasakawa, C. 2000. Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.* **19**: 3876-3887.

Tamm, L. K., Arora, A. and Kleinschmidt, J. H. 2001. Structure and assembly of β -barrel membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **276**: 32399-32402.

Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J. and Kokkinidis, M. 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell. Microbiol.* **6**: 805-816.

Tardy, F., Homblé, F., Neyt, C., Wattiez, R., Cornelis, G. R., Ruyschaert, J. M. and Cabiliaux, V. 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion-translocation: channel formation by secreted proteins. *EMBO J.* **18**: 6793-6799.

Telford, J. R. and Raymond, K. N. 1998. Coordination Chemistry of the Amonabactins, Bis(catecholate) Siderophores from *Aeromonas hydrophila* (1). *Inorg. Chem.* **37**: 4578-4583.

Thanassi, D. G. and Hultgren, S. J. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**: 420-430.

- Thelestam, M. and Ljungh, A.** 1981. Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of alpha- and beta-hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **34**: 949-956.
- Thomas, L. V., Gross, R. J., Cheasty, T. and Rowe, B.** 1990. Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 980-984.
- Thomas, S. R. and Trust, T. J.** 1995. A specific PulD homolog is required for the secretion of paracrystalline surface array subunits in *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **177**: 3932-3939.
- 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, L. S., Webb, J. S., Rice, S. A. and Kjelleberg, S.** 2003. The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene *rhlI* in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**: 187-195.
- Troisfontaines, P. and Cornelis, G. R.** 2005. Type III secretion: more systems than you think. *Physiology.* **20**: 326-339.
- Trust, T. J., Kostrzynska, M., Emody, L. and Wadstrom, T.** 1993. High-affinity binding of the basement membrane protein collagen type IV to the crystalline virulence surface protein array of *Aeromonas salmonicida*. *Mol. Microbiol.* **7**: 593-600.

U

- Umelo, E. and Trust, T. J.** 1997. Identification and molecular characterization of two tandemly located flagellin genes from *Aeromonas salmonicida* A449. *J. Bacteriol.* **179**: 5292-5299.

V

- van der Goot, F. G., Pattus, F., Parker, M., Buckley, J. T.** 1994. The cytolytic toxin aerolysin: from the soluble form to the transmembrane channel. *Toxicology*. **87**: 19-28.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J. C., Marena, M. and Boucher, C.** 2000. *Ralstonia solanacearum* produces hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.* **36**: 249-260.
- Veiga, E., de Lorenzo, V. and Fernandez, L.A.** 1999. Probing secretion and translocation of a β -autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. *Mol. Microbiol.* **33**: 1232-1243.
- Vilches, S., Urgell, C., Merino, S., Chacón, M. R., Soler, L., Castro-Escarpulli, G., Figueras, M. J. and Tomas, J. M.** 2004. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6914-6919.
- Vilches, S., Wilhelms, M., Yu, H. B., Leung, K. Y., Tomas, J. M. and Merino, S.** 2007. *Aeromonas hydrophila* AH-3 AexT is an ADP-ribosylating toxin secreted through the type III secretion system. *Microb. Pathogen*. **En prensa**.

W

- Wang, Z., Larocque, S., Vinogradov, E., Brisson, J. R., Dacanay, A., Greenwell, M., Brown, L. L., Li, J. and 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. *Eur. J. Biochem.* **271**: 4507-4516.

- Wang, Z., Vinogradov, E., Larocque, S., Harrison, B. A., Li, J. and Altman, E.** 2005. Structural and serological characterization of the O-chain polysaccharide of *Aeromonas salmonicida* strains A449, 80204 and 80204-1. *Carbohydr. Res.* **340**: 693-700.
- Wang, Z., Li, J. and Altman, E.** 2006a. Structural characterization of the lipid A region of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **341**: 2816-2825.
- Wang, Z., Li, J., Vinogradov, E. and Altman, E.** 2006b. Structural studies of the core region of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **341**: 109-117.
- Watarai, M., Tobe, T., Yoshikawa, M. and Sasakawa, C.** 1995. Disulfide oxidoreductase activity of *Shigella flexneri* is required for release of Ipa proteins and invasion of epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 4927-4931.
- West, N. P., Sansonetti, P., Mounier, J., Exley, R. M., Parsot, C., Guadagnini, S., Prévost, M. C., Prochnicka-Chalufour, A., Delepierre, M., Tanguy, M. and Tang, C. M.** 2005. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science.* **307**: 1313-1317.
- Whitfield, C., Amor, P. A. and 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. *Mol. Microbiol.* **23**: 629-638.
- Woestyn, S., Sory, M. P., Boland, A., Lequenne, O. and Cornelis, G. R.** 1996. The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol. Microbiol.* **20**: 1261-1271.
- Wong, C. Y., Heuzenroeder, M. W. and Flower, R. L.** 1998. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiol.* **144**: 291-298.

Wulff-Strobel, C., Williams, A. and Straley, S. 2002. LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion. *Mol. Microbiol.* **43**: 411-423.

Wyss, C. 1989. *Campylobacter-Wollinella* group organisms are the only oral bacteria that form arylsulfatase-active colonies on a synthetic indicator medium. *Infect. Immun.* **57**: 1380-1383.

X

Xu, X. J., Ferguson, M. R., Popov, V. L., Houston, C. W., Peterson, J. W. and Chopra, A. K. 1998. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. *Infect. Immun.* **66**: 3501-3509.

Y

Yahr, T. L. And Wolfgang, M. C. 2006. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* **62**: 631-640.

Yáñez, M. A., Catalan, V., Apraiz, A., Figueras, M. J. and Martínez-Murcia, A. J. 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 875-883.

Yao, R. and Guerry, P. 1996. Molecular cloning and site-specific mutagenesis of a gene involved in arylsulfatase production in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **178**: 3335-3338.

Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Finlay, B. B., Miller, S. I., and Strynadka, N. c. 2005. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature.* **435**: 702-707.

-
- Yip, C. K. and Strynadka, N. C.** 2006. New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem. Sci.* **31**: 223-230.
- Yu, H. B., Srinivasa Rao, P. S., Lee, H. C., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J. M. and Leung, K. Y.** 2004. A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infect. Immun.* **72**: 1248-1256.
- Yu, H. B., Zhang, Y. L., Lau, Y. L., Yao, F., Vilches, S., Merino, S., Tomás, J. M., Howard, S. P. and Leung, K. Y.** 2005. Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4469-77.
- Yu, H. B., Kaur, R., Lim, S., Wang, X. H. and Leung, K. Y.** 2007. Characterization of extracellular proteins produced by *Aeromonas hydrophila* AH-1. *Proteomics.* **7**: 436-449.

Z

-
- Zhang, Y. L., Arakawa, E. and Leung, K. Y.** 2002. Novel *Aeromonas hydrophila* PPD134/91 genes involved in O-antigen and capsule biosynthesis. *Infect. Immun.* **70**: 2326-2335.
- Zywno, S. R., Arceneaux, J. E. L., Altwegg, M., Byers, B. R.** 1992. Siderophore production and DNA hybridisation groups of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 619-622.

7. Anexos



7.1 Nomenclatura de los genes del sistema de secreción de tipo III

<i>A. hydrophila</i> (<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>)	<i>Yersinia</i> spp.	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i> spp. SPI-1	<i>Shigella</i> spp.	Nomenclatura unificadora
<i>ascU</i> (<i>ascU</i>)	<i>yscU</i>	<i>pscU</i>	<i>spaS</i>	<i>spa40</i>	<i>sctU</i>
<i>ascT</i> (<i>ascT</i>)	<i>yscT</i>	<i>pscT</i>	<i>spaR</i>	<i>spa29</i>	<i>sctT</i>
<i>ascS</i> (<i>ascS</i>)	<i>yscS</i>	<i>pscS</i>	<i>spaQ</i>	<i>spa9</i>	<i>sctS</i>
<i>ascR</i> (<i>ascR</i>)	<i>yscR</i>	<i>pscR</i>	<i>spaP</i>	<i>spa24</i>	<i>sctR</i>
<i>ascQ</i> (<i>ascQ</i>)	<i>yscQ</i>	<i>pscQ</i>	<i>spaO</i>	<i>spa33</i>	<i>sctQ</i>
<i>ascP</i> (<i>ascP</i>)	<i>yscP</i>	<i>pscP</i>	<i>invJ</i>	<i>spa32</i>	<i>sctP</i>
<i>ascO</i> (<i>ascO</i>)	<i>yscO</i>	<i>pscO</i>	<i>invI</i>	<i>spaM/spa13</i>	<i>sctO</i>
<i>ascN</i> (<i>ascN</i>)	<i>yscN</i>	<i>pscN</i>	<i>invC</i>	<i>spa47</i>	<i>sctN</i>
<i>aopN</i> (<i>aopN</i>)	<i>yopN/lcrE</i>	<i>popN</i>	<i>invE</i>	<i>mxiC</i>	<i>sctW</i>
<i>acr1</i> (<i>acr1</i>)	<i>tyeA</i>	<i>per1</i>	-	-	-
<i>acr2</i> (<i>acr2</i>)	<i>sycN</i>	<i>per2</i>	-	-	-
<i>ascX</i> (<i>ascX</i>)	<i>yscX</i>	<i>per3</i>	-	-	-
<i>ascY</i> (<i>ascY</i>)	<i>yscY</i>	<i>per4</i>	-	-	-
<i>ascV</i> (<i>ascV</i>)	<i>yscV/lcrD</i>	<i>perD</i>	<i>invA</i>	<i>mxiA</i>	<i>sctV</i>
<i>acrR</i> (<i>acrR</i>)	<i>lcrR</i>	<i>perR</i>	-	-	-
<i>acrG</i> (<i>acrG</i>)	<i>lcrG</i>	<i>perG</i>	-	-	-
<i>acrV</i> (<i>acrV</i>)	<i>lcrV</i>	<i>perV</i>	<i>sipD</i>	<i>ipaD</i>	-
<i>acrH</i> (<i>acrH</i>)	<i>lcrH</i>	<i>perH</i>	<i>sicA</i>	<i>ipgC</i>	-
<i>aopB</i> (<i>aopB</i>)	<i>yopB</i>	<i>popB</i>	<i>sipB</i>	<i>ipaB</i>	-
<i>aopD</i> (<i>aopD</i>)	<i>yopD</i>	<i>popD</i>	<i>sipC</i>	<i>ipaC</i>	-
<i>axsC</i> (<i>hscY</i>)		<i>exsC</i>	-	-	-
<i>axsE</i> (<i>exsE</i>)	<i>virB</i>	<i>exsE</i>	-	-	-
<i>axsB</i> (<i>ascW</i>)	<i>yscW/virG</i>	<i>exsB</i>	<i>invH</i>	<i>mxiM</i>	-
<i>axsA</i> (<i>ascA</i>)	<i>virF</i>	<i>exsA</i>	<i>invF</i>	<i>mxiE</i>	-
<i>axsD</i> (<i>ascZ</i>)	<i>yscA</i>	<i>exsD</i>	-	-	-

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

<i>ascB (ascB)</i>	<i>yscB</i>	<i>pscB</i>	-	-	-
<i>ascC (ascC)</i>	<i>yscC</i>	<i>pscC</i>	<i>invG</i>	<i>mxiD</i>	<i>sctC</i>
<i>ascD (ascD)</i>	<i>yscD</i>	<i>pscD</i>	<i>pgrH</i>	<i>mxiG</i>	<i>sctD</i>
<i>ascE (ascE)</i>	<i>yscE</i>	<i>pscE</i>	-	-	-
<i>ascF (ascF)</i>	<i>yscF</i>	<i>pscF</i>	<i>pgrI</i>	<i>mxiH</i>	<i>sctF</i>
<i>ascG (ascG)</i>	<i>yscG</i>	<i>pscG</i>	-	-	-
<i>ascH (ascH)</i>	<i>yscH</i>	<i>pscH</i>	-	-	-
<i>ascI (ascI)</i>	<i>yscI</i>	<i>pscI</i>	<i>pgrJ</i>	<i>mxiI</i>	<i>sctI</i>
<i>ascJ (ascJ)</i>	<i>yscJ</i>	<i>pscJ</i>	<i>pgrK</i>	<i>mxiJ</i>	<i>sctJ</i>
<i>ascK (ascK)</i>	<i>yscK</i>	<i>pscK</i>	-	<i>mxiK</i>	<i>sctK</i>
<i>ascL (ascL)</i>	<i>yscL</i>	<i>pscL</i>	-	<i>mxiN</i>	<i>sctL</i>
-	<i>yscM/lcrQ</i>	-	-	-	-

7.2 Secuencia nucleotídica de la agrupación génica del sistema de secreción de tipo III de *Aeromonas hydrophila* AH-1

Los codones de inicio están marcados en negrita y los codones de parada se localizan en recuadros. Las posibles secuencias promotoras se indican mediante subrayado y, dentro de las mismas, el putativo inicio de transcripción se señala mediante un recuadro sombreado. Las posibles secuencias terminadores rho-independientes se indican en cursiva y negrita. Finalmente, las putativas cajas de unión al factor transcripcional AscA (ver apartado Resultados, ORF23) se indican en cursiva dentro de un recuadro.

```

1   CTCTTCGTGT GATTGATGAT GTTGGTGCAT AGAGTCGCAA GAACAGGGGA
51  CAACTGGATA TAAATTGAAG CCGGGCATT TTAGATGAAG GGGTGCGCAG
101 ATAACCCGAT GGTGGTTACC ATTGCGGCC TCGTTTTGG CGCCACTGCT
151 CCAGCCAGCG CAGCACCTCG GCTGTTGCTT CAATCTGATC GGCAGGGATG
201 TAGTTGTTGA TCAGCGCATC TCGATAGAGG GCACGGGCCA ATGGGATACG
251 CTGCAGCACT GGGATACCTT CCTCTTCGGC TATCTTGCGA ACCTGCAGTG
301 CCTGGGCATC GGTGAATTTG AGAGTTACCA CAGGCAGGGG GGTCTCACCT
351 CGCTCGTAGC GGATGCCGAT GGCAATATGA GTCGGGTTGG CGACGATGAC
401 CGAGGAACGC TTCACGTCGG CACGCATGTT GCTCGACTGC AGCTCCTGAT
451 GGAATTGACG GCGTTTGCTC TTGATCTCTG GACTCCCTTC CATTTCTTTG
501 TATTCCCGTT TTACCTCGTC CTTGCTCATC TTGAGTTGCT TGGTGTGCTG
551 ATAGTGTTTCG AAGGCGTAGT CGGCGATGGC GATCACCACG AAGCCCATGG
601 CGCAGACCGC CATCAGCTGG CTCAACATGC CTCCCAGCAC AGGCGGAATA
651 CAGCTCATGC CGCACCTGG CAGCTGCAAC AGTGCCTGCA GGTTGCCCTC
701 GATGGTGATC CAGACCAGCA GGCTGAGCAG AGTGACCTTG AGGAGGGATT
751 TGACGAACTC CATCAGGCTC TTGATGGAGA AAATCTTCTT GGCCCCTTCC
801 ACCGGGTTGA TCTTCTTGAT GTCCGGTTTG ATGGATTCGC CGCTCAGCAG
851 AAAGCCGTAC TGGGCAAAGT GGGAGATGAG CACCACCAGT ACCGAGACGC
901 CGAGCAGCGG GATGCAGAGA TAAGCCATCT CCTGCATCAG GTTTTCCAGC
951 ACATGGTTGA GAGCCTGGGT AAAAGGGAGG TTGAGATGGG ATTCCGGGAT

```

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

1001 CAGCATCAAT TTGCCCAGGT GTTCCAGATA GTAATCGGAC ATCGCCATCA
1051 ACATGCCGAT AAGACTCAGA ATGATGGCGG TGGAAACCAC CTCCTTGCTT
1101 TTGACCACTT GCCCCTTCTT GCGTGCGTCT CGCAGTTTTT TAGGGGTGGG
1151 CAGCTCGGTT TTCTCTCCGC **TCA**TTCGGGCC TCCAGAATGG GGATCAGCAG
← **orf1 (ascU)**
1201 TCGCAGCGGA TCCATGACCG CCAGTACCTG CCTATAGGCG TGGTCCATCA
1251 TCAACTTGAT GTAGATAACC AGCAGCAGAC TGGCAACGGC ACTCTTGATC
1301 GGCATTGCCA GTACGAAGAC GTTGAGGGAG GGGGCAAAGC GGCTGATGAG
1351 TGCCAGCCCG AATTCAGCCA AAAACATGGC GATAAGCAGC GGTGCGGCCA
1401 GCAGAGCGCA AAGCAGCAGC ATCTGGCTGA ACTGGCTGTA GAAGAAGCTC
1451 ACCCAGCGAT CGCCGATGGT GGGGAAGAAG TGTGCGACAG GCCAGCTGGC
1501 ATAGCTCTGA AATAGAGCAG AAAGGAGGGC GAGAAAGGCA CCGCTGGCAA
1551 AGAAGAGGGT GATAAGAGTC TGGGTCAGCA ATAGTCCGGT CGGGCTGGTT
1601 TGGCTGGCAA GACTCGGGTT AAAAATGGAG GCCATGGCGG CGCCACGCTG
1651 GTTGTCGATG AGAAAGCCAC TTGCCTCGAT AGCCCAGAAG GGGATGGCAG
1701 CCACAAAGCC GATCAGCAGG CCAAGCAGTA CTCCTTTGC TACCAGCAGA
1751 GCAAGATCCA GTGCTGTGAT GGTGGGTGGC AACGTGTTGG CCACCATGGG
1801 GTAGGCAAAG AGGGCCAGCG AACAGATTAC GCCATTGCGG ATCATCGCCC
1851 CCCCCAGCAT CTGTTTGCTC AATACCGGCA ACATGACGAA ACAGCTGATA
1901 AAGCGCGGCA GCAACAGGGT GTAGGCCAGC ATCTGGCCCT GCAAGCTATC
1951 CAGGT**TCA**TT GGATCTGAGG CACCTTGAAT AGCACCATGT CGGCAAAACT
← **orf2 (ascT)**
2001 GTAGAGTTCG TTGCCAAGCC AGGCGGTAGT GGCAAACAGG GTGATCACCA
2051 CGGCAATCAG TTTGGCGACG AAGCCCAGGG TTTGTTCCCTG GATCTGGGTC
2101 AAGGCTTGCA ATAAAGAGAC AAGCGTCCCC ACCAGCGCTG CCACCAACAC
2151 CGGCGGCATG GAGAGGATCA GCACCAGCCA GAGGGTCTGG CTGGTGAAGT
2201 GGAGGATATC GGC GTGACTC ATG**TTA**GCCT CCGTAACTGA TGACCAGCCC
2251 GTGGGTGAGA CGGGCCCAGC **CAT**CGAGCAG CACAAACAGC AGCAGTTTGA
← **orf3 (ascS)**
2301 AGGGCAGCGA GATGGTCATG GGGGACACCA TCATCATCCC CATCGCCAGC

2351 AAAATGTTGG AGATGATGAG GTCGATGGCG ATAAAGGGGA GATAAATCAG
 2401 GAACCCTATC TCGAAGGCCG GGCTCAACTC GCTCACGGTA AAAGCAGGCA
 2451 GCAGGATCAG CAGGCTGTCT GATTCCAGTC TATCGGCATA CTCGCTGGGC
 2501 CAAAGCTGTT TGGTGTCTGTC GATGAAGAAG GCGTGCTCCC GCGGTTTGAT
 2551 CTGTTTTTTC AGGAAGGTGC GATAGGGGGC CATTCCCTCG TCGAGAAACT
 2601 TCTCCACCGA TTCGATTGTC GCCAGCGATA CCTCGTTTTG GCGCAGGTAA
 2651 TCCTGGGTTG CGAAACCGAC CGGGGCCATC ACATAGATGC TGAGGATGAT
 2701 GGCCAGTCCG TACATCGCCA TATTGGGGGG GATCTGCTGT ACCCCCAGGG
 2751 CGTTGCGCAG CAGCGAGAAG ACCACCGCCA GCTTGACAAA GGAGGTAGCC
 2801 ATCACGGCAA TAAAGGGGAG CAGCGCCAGC AGCGCCAGCC CGACGATAAG
 2851 GTTTAGCTCG TCTGGCAACT GGA**TCA**TGAC GCGACTCGC TCTTGAGGCT
 ← **orf4 (ascR)**
 2901 CTCGACCCGC ACACCGAGTC GCCCCTGGAT CTCAACCAGT CTGCCGCTAC
 2951 CGAGCTGATG GCCATTGCTG ATGATGCGTA CCTCGCCGTC GATGGGGGTG
 3001 CCTAGATCGA TAAGGGAACC TGGTTGCAAG GTGGTCAGAG AGTGCCAGTC
 3051 CAGCGTTTGG CGGCCCACTT CAAAGGTAAC TTGAATGGGG AGGTTATCCA
 3101 GCTGAGTGGC ATCGAGATTG TCATCGGCGG CGTTGTGCAT GGCAGTCAGT
 3151 TCCAGATGTT GTTGATGGGG TAGGCAATAG GCAAAGGGTC GCCCCTCGAC
 3201 ACAGAGCAGC AATTGCTGGC CGAGCAACGG GTGAGGCAGC GGCAACAACA
 3251 CATCGCCGTA GCTCAGCGTC TCAAGCTCGC TGATGGCGAC CCGCATCGCT
 3301 CCCCCTGCA AGGAGAGGGT GAGGGGCAGC GTCAGGCGCT GTTGGCTTGG
 3351 CCGTGTGGGC AGCTTGCCAA ACAGCGGGCC TGGTTCGGCA AGCCAGAAGG
 3401 CGAGGGTGGC ACCCTCCC GC TTGAGCAGCA GCTGCAGTGC CGGCTGACCG
 3451 GCAGCTTCGT TGGTGGCGAT CGGAGCCAGC GCCGAGCAGC TGAGGTTGCC
 3501 AAGAGGTTGA CCAAGGCGCT CGATCAGCGC CAGTTGCAGC GATTCTGGCA
 3551 GGCTGAACAG CGCTGCCTGC TGCAAGTCCG GCGCAAGCCA GCGGGCCAGT
 3601 TCGGCGCCAT GGCACAAAAG CGGCAGGGAG AGCCCCTGCC ACTGCAGTTG
 3651 CAACCGGTAT TCGAGGGACG CTGGCTGCGA TGCGATGGCG AGTATGAGCT
 3701 CGCCGCCGCT CCAGCCATAG TGGTGGCGGC ACTGGCTGAG CCGCTGTTGC

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

3751 AGGGTCAGCT CCGCCGGTGA GGCGGAGGTA AAGGCAATCG ATGTCATGCG
orf5 (*ascQ*) ←

3801 TCGGCATCCC ACTCGTCATA GATGGATCGT TTCTGGCGCG ACCCCTGCTC

3851 GCTGTGCCCC CGGGTAAATA GATCAACGGC GACTCGCTCA CCGGGGTAGA

3901 GACGTTGCAG GCGATCGATA AGCTCACCGC GCCCTTGATT GAGCAGCTGG

3951 GAACCCTGTT CGCTAGCCAG CATCTCCACC TGCAGCATGC CCTGATGGCG

4001 ATCGATGCGG ATGGTGAGTT CCCCAGCGC GGCAGGGAG AGTTGCAGCA

4051 AAGGGGGGCG TTCCAGACGA CCCAGTTCAA GGTGCATATC CACTGCCAAT

4101 CGGCTGATCA GCTGGCCCAG TTCGTGATGA TCGAAACTGG GCGTTACCCG

4151 GGCCAGCAGC AGATCTCCCG GCGTGGTCGC GAGAGGAGGA ACCCGGATGG

4201 CCGAGCCGGC AAAGTTCTCT TGCGCAAACG ACTCTTCCTC GCTGGCCACC

4251 GGCGCCAGTT CGGTAGATTC ATCTTCTGTT TGCAGCCGTT CGCTGACCTC

4301 AGGCAGAGTG GCCAGTTCGC CGGGCTCTTG CAGTTTGTG CTGTCGCTTA

4351 GCTGTAGCCG GCTGAGTATT ATGTTGAAA CCGCGATCTG TGGCAGGTCT

4401 GCTGCATTTT CATTGATTCC GTCCCTCGTC TCCGGTTCGG CTGCGGCAAG

4451 TAACTCAGGA CTGCTGGTGA TATCACTCGG CACTCTCCTA GACTGCTCAG

4501 CTTGTGCTGT CTCACGCTCT TGCTGCGTGG TTGGTGCCTG CATAACCTCG

4551 TGGATCTGCG GCAACATCGC AGGAAGCAAC TGGGATTCCT GCCAGTCGCT

4601 TCCCTCTTGC TTGTCATGAG GGGCTTTGGC ATGTGGGGCT GGACGAGTCA

4651 GCTTCCTCTC TGCCAGTTCC CCCTCCTTGT TAGCCGCTTT ACTGTTTGAC

4701 TGGGGGGCAT CCGGTTTTGA CCGGCGATCT TGCTCCTGTT TACCGAGCAC

4751 TCTCTTCTGA TCACGCACTT TCTGTGATGC GGACTCTAGC TGCAGGGCCT

4801 GCTCGAAGCG CTGCTGCTGC GCCGGATCAG CCTTGTTAGT TTCGCGTTGC

4851 AAGCTGTGCT GCTCGCAAGC AATCTTGGTA TCAGCGCGGG GGGCGGTGAG

4901 TCGGTT**CATC** TCTGGTCA**CA** TCCTGATCTG CTGGCGGAAC TCTTCCTGTT
orf6 (*ascP*) ←

4951 CCTGCTCTTC GTTGTAGTCG CGCAGGGCTT GCTGGGCTGT CAGCTCCTGC

5001 CGGTGTAATT CGGCAAACCT CTCTTGCTGC TGGCGGGCTC GGTGCACCGC

5051 TAGCTGGCAT GCCTGTAGTC GGATGCGCTC TTCGGCTACC CGCTCGCCCT

5101 GTTCGGCGGC CAGTTGTTCA AGGTGGGCTT CTTGCTCTCG CAGCAGAGCG

5151 ACCTGCTGTT GCCACTCTTT GAGTCCTTTG CGATCAAGCT GCTCTGCCTG
5201 ACAGAGGGCA AACAGACGAT CTTCTTCGAC GAGGCGCCAC TGACGGTAGT
5251 CAAGGCACTC CTGCTGCGCC TCTCGTTGCC GGGCATGGGC CTGCTGCAAT
5301 CTGGTCTGCT GGGCGGCGAG CTGCTGCTCG GCCCGCTCCA GCCGCAACTG
5351 TTTTATCTGT TGCAGACGGC TGA**TCA**TCCG GTCAACGCCT CTAGGGTAGC
← **orf7 (ascO)**
5401 GAGTGCCTCG GGCAGCGAGC TCGGTTTCATG GGTGCCTTGT TTGAGCCACT
5451 GGCGGATCGC TTCAATGCGG GCGATTGCCT CGTCGGCCAC CTTGTCTTGA
5501 CCCTTCTGGT ATTCGCCGAT CTGCAGCAAC AGTTCGACCT CTTTCGTACTT
5551 GGCTAGCCAG CTGCGCAGGC GACCGGCCCTG TGCCTGATGC TCAGGCTCGA
5601 TGATCTGGTT CATGACCCGA CTGGCGGAGC GCAGTACGTC GATAGCCGGG
5651 TAGTGATTGG CGGCCGCCAG CTTGCGCGAG AGGATGATGT GGCCATCGAG
5701 GATGGATCGG GTCTCATCGG CCACCGGCTC GGTCATGTCA TCACCTTCTA
5751 CCAGCACGGT ATAAAGAGCG GTGATGGAAC CTTTGTCCGA CTGGCCTGCC
5801 CGTTCCATCA GACGGGGCAG GCGGGCAAAC ACCGACGGCG GGTAGCCGCG
5851 GCGGGTTGGC GGTTCACCGG CGGCTAGGCC AATCTCACGC TGGGCACGGG
5901 CGAAGCGGGT GACGGAATCC ATCAACAGCA GCACGCGTTT GCCCTGATCC
5951 CGGAAGTATT CAGCGATGGA AGTGCGGACA AAGCCGGCTT TGGCGCGCTC
6001 CATGGCGGGG CGATCAGAGG TGGCCACCAC CAGCACGGCC TTTTTTAACC
6051 CCTCTTCTCC CAGATCCGCC TCGATAAACT CCCGGACTTC CCGGCCGCGT
6101 TCGCCGATGA GGGCAAGCAC GGTGACATCC ACTTCGGCGC TGCGAATAAG
6151 CGAAGCAAGC AGGGTGCTCT TGCCGCCACC GGCTGCCGCG AAGATCCCCA
6201 TCCTCTGTCC CTCGCCACAG GTCAGCAGAC CGTCAATGGC GCGAATGCCC
6251 AGCGAAATGG GTTGAGCGAT TCGTTTACGG CTCATGGGAG GAGGAGCATC
6301 CCGATAGACC GGATACCAAG CGGCTGGCTC TGGCAGGTGT CCGCCGGCAA
6351 AAGGATTGCC AAGCCCCTCC AATACCTGGC CAAGCAAATG CTCGCCCACT
6401 CCGACCTGAT GCATGGCACC GGTAGGGCTC ACCTCGGTGT TGGAGGAGAT
6451 GCCGAACATC TCGCCAAGAG GGGTGAGCAG CGCCTGATGC TGGGCAAATC
6501 CGATCACTTC TGCTTGCAAG GAGAGGGTGT TGTCCGGGTT GCGCAGATGG

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

6551 CACAACCTCGC CGATGCGAAC TCCGGGGACC ACGGCTTTCA GCAGGGTCCC
6601 GGTACACTGG GTGACACGGC CACGGATCTG GATCAACCGG GCATCGTCAA
6651 TGGCGTGACG CAGTTGGCCT GCAATGTGGT CGAAGGAAAG ATT**CAT**AGGA
6701 AGCAACACCA GTAAAAACGG TGAGCACTAT AAGTGATGGC GGCCAGAGCT
6751 GGATTTTCAGC GCGAGTCGGG ACTTTTTAGA AAACAGTTGG GAGAGGGCTA
6801 AAAATTCACG GCTGATTTTG GCATAGGTGA GGAACGGTGA TTTTTATAAT
6851 GCAATCCTCG TCAATCCATT CATCACGGGA GTTTCC**ATGG** CCATTATCCA
6901 GAGCAACCCC TACCTCTCTG CCGCCCAGCC TGAAGGGCGC GCGGCAGAGG
6951 AGGTGTCCCG GCAACCCGCT TTGCAGAGAG GGCAATTTCA GGGCGAGCGG
7001 GTCGTCCCTGG TGCCTGCATC CCAATCCCTG GCCGATGCGG CTGAAGAGCT
7051 CACGTTTGCC TTTTCCGAAC GAGCCGAATT ATCCCTGTCC AAGCGCAAGC
7101 TGAGTGACAG CCATGCCCGG ATCAGCGAGA TCGAGGCGCT GGTGGGGGAG
7151 TACCTGGACA AGGTTCCCGA GCTTGAACGC CAGCAGAAGA TAAAGGAAAT
7201 GGTGAGTCAT CTTGGCAGCG GCGACTGGC CAATCTATCG CAACTTCTGG
7251 CCTACCTGGA GAGCTATTCC GGGGAGGTTA GCGAACAGTT TGAAGCGCTT
7301 TACCAGGCGC GAACAATCCT GGCGGGACGC CCCGAGATGC AGGGCACCTT
7351 CAATCTCATT GAGCAGGCGC TGGCCAAACT GGCTGATGAG CAGGGCACTG
7401 CCATCGTACT TGGCGCGCGC ATCACGGGCC CGGCAGCCGA AGCTGCCAGG
7451 CAAGGTGTGG GGAGTGAGCA GGCCTGCGG GACCTCTATC GTGATGCGGT
7501 GCAGGACTAT CGAGCCCTCT CCAGCGCGTG GCGTGATATT CACCATCGTT
7551 TTGGCAACGG TTCTCTGGAA AAGGTGACCG GTTTCATGAT GAAGGCACTC
7601 AGTGCTGATC TCGACTCACA GCAGCGCTGG CTCGATCCGG TCAAGTTGGA
7651 ACGGGTGATG AGCGACATGC ACAAGCTGCG GTTGCTCAAT ACCCTCTCGG
7701 CTCAGGTAGA TGAGCTGTGG CAGCGGGTGA AGGAGGGGGC GGCC**ATGG**C
7751 ATACGGGCCT TCTGATCTGA TGGGTGATCT GATTGCATTG GTGGAGAAGC
7801 GCTGGGCAAC GGTTCGGGAT GTAGAGCAGG TCGGGAGTGC ACTGGAATTG
7851 GCGGATACCC GGCAGCAGGT GCAGCTCTAT CAGGAGCTCA AGCGATTGAT

← **orf8 (ascN)**

orf9 (aopN) →

orf10 (acr1) →

7901 CCGTTTGTG CCGATCGAGC TGTTCACTGA GGAAGAGCAG CGTCAAACC
 7951 TGTTGCAATG TTGTCAGGGG GCGCTCGATA ACGCCATCGA GCGGGAAGAG
 8001 GATGAATTGT CTGGAGACCC GTC**ATGA**ACT GGATTGAACC TCAGCTGGTA
 8051 CAGTTTTGCC AGGATCTGGG CATTCCCATT GGAGAGCATC CTCACCACCT
 8101 GATCCAGCTG GAACTGGAAC AGAGCGGTAC GTTGCAACTG GAGCGTCATC
 8151 AGGGACGGCT TATCCTCTGG TTGGCTCGCC GAGTGCCGTG GCATCAGAGT
 8201 GCGGATGCCA TTCGCCATGC GATGACCCTT ACCGCTGCGG CGCAGGCTCC
 8251 CGTCTTGCCA GTGCGTTGTG GTTGGCTGGG TGAGGATCAA CTGCTTTTGT
 8301 TTGTCACGCT GGATGAGCGA GCGGTTACTC TGCCGCTGCT GCATCAGGCG
 8351 CTGAGAACCC TGACGCAACT GCAACGAGAG GCCCTGGCAC CA**TGA**GCTGG
 8401 ATCACAACAG CCTGTCATCC AGCAATCGCC TGCTCCGAGG ACATCACTGG
 8451 GCTCTTTTCGC AAGGG**ATG**GA GACGATGAGC CGTATTACTG CCGCCCATAT
 8501 CGGCATAGAG CAGCTCAGTG CCCTCACTCT GGATGAGCAA GAGCAGAGCT
 8551 TGCCCGGACG CTACGCTCTG TTGCCTGATG GACAGTCCAT CGAGCCTCAC
 8601 ATCAACCGAC TTTATCCCGA ACGCCTGGCT GAACGAGCAC TGCTGGACTT
 8651 TGCCGCTCCC GCGCACGGCT TTCACGATTT ACTGCGGCCA CGGGATTTCA
 8701 CCCTGGCGAT GCAGGGGTTG CGAGCCCTAT TGAAAGAGGG GGGAACGGAC
 8751 GAGCTCATGG CGGCGTCGGT ATTGCTCGAA CAGATGCATG AAGATGAACA
 8801 ACTGATGCAG ATGACGCTTC ATCTGTTGCA CAAGGT**ATGA** CCATGACCCT
 8851 TTCGTCACAG CAACAGGATC TGCTGTTGCT CACCGGCTGG CTGCATTTGC
 8901 AGTACGGCCA CCCTGATCGT GCCCGTACCC TGTTGACGGC TCTGTTGCAG
 8951 CTCCATCCAG GACATGAGAG CGGGCGACGT ACGCTGTTGG TGGCCTTGCT
 9001 CAAGCTGGGC AGAGGAGAGG AAGCACTGGC TCATGTCGAT CATCTGGTCT
 9051 CGGAAGGTGT GACCGACGAG GCTTTATGGC TCTGCCGACG CCGAGCCTGC
 9101 CAGCTGGCAG GCGACTCGA **TGA**AGCCCGT TTTGCCTATC AATACTATCT
 9151 CGAACTGGAA GAGCAGAATG AATCAACGCA CCCT**TGA**GCT GCTGCGCCGG

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

9201 ATTGGCGAGC GCAAGGACAT CATGCTGGCG GTATTGCTGC TTGCCATCGT
9251 CTTTCATGATG GTECTGCCGT TGCCGCCGGT GCGCTCGAT ATTCTCATTG
9301 CCATCAACAT GACCATCTCG GTGGTGCTGC TGATGATGGC GGTCTATATC
9351 AACTCACCAT TGCAGTTCTC TGCCTTCCCG GCGGTGTTGC TGATCACCAC
9401 CCTGTTCCGG CTCGCCCTCT CGGTGAGCAC TACCCGAATG ATCCTGCTGC
9451 AGGCCGATGC CGGCCAGATC GTCTACACCT TCGGCAACTT CGTGGTAGGG
9501 GGCAATCTGG TAGTGGGGAT CGTCATCTTC CTCATCATCA CCATCGTCCA
9551 GTTTCTGGTG ATCACCAAGG GCTCGGAGCG GGTAGCGGAG GTTAGCGCCC
9601 GCTTCTCCCT CGATGCCATG CCCGGCAAGC AGATGAGTAT CGACGGCGAC
9651 ATGCGTGCCG GGGTGATCGA CGTTCATGAG GCGCGGGAGC GGCGCAGCGT
9701 CATCGAGAAG GAGAGCCAGA TGTTTGGCTC CATGGATGGC GCCATGAAGT
9751 TTGTGAAGGG GGACGCCATC GCGGGCCTCA TCATCATCTT TGTCAACATC
9801 CTTGGTGGGG TCACCATAGG GGTGACCCAA AAGGGGTTGT CGGCGGCCGA
9851 TCGGTTGCAG CTCTACTCCA TCCTGACGGT AGGGGACGGC ATGGTCTCCC
9901 AGGTGCCGGC GCTGCTTATC GCCATCACGG CGGGCATTAT CGTGACCCGG
9951 GTTTCTTCCG AAGAGTCGGC CGATCTCGGT TCCGACATCG GTGCCAGGT
10001 GGTGGCCCAG CCCAAGGCGA TGCTGATCGG TGGTGTGCTG CTGGTACTGT
10051 TTGGTCTGAT CCCGGGCTTC CCGATGGTGA CCTTCTTAC CCTGGCTGCC
10101 GTCGTGACCG CTGGTGGCTA CTTTATCGGA TTGCGCCAGC GTAATGCGCA
10151 GACTAGCAAC CAGGATTTGC CCACTGTCCT GCGCAAGGT GCTGGGGCCC
10201 CGGCGGCTCG CAGTAAACCC AAGGCTGGCG GTAAAGCCCG CAGCAAGCTC
10251 GGTGAAAAGG AAGAGTTTGC CATGACGGT CCTCTGCTGA TCGATGTGGA
10301 TGCCGCCTTG CAAGCTGAGC TGGAGGCCAT CGCCCTCAAC GACGAGCTGG
10351 TGCGGGTGAG GCGGGCTCTC TACCTCGATC TGGGGTGCC TTTTCTGGG
10401 ATCCACTTGC GATTCAACGA AGGTGTGGC GCTGGTGAAT ATCTGATCCA
10451 GCTGCAGGAA GTGCCGGTAG CCCGTGGCCT GCTAAGACCG GGCTATCTGC
10501 TGGTACAGGA GAATGCCTCT CAGCTTGAGC TGTGGGGAT CCCCTATGAA
10551 GAGGGCACTC CGCTGTTGCC GGGGCAGCCC ACCCTGTGGG TGGCCAAGGA
10601 GCATCAGGAG CGGATCGAGA AGATGCGTCT TGCTGCTCTG ACCCCGATC

10651 AGGTGGTGAC CTGGCATCTA TCCCATGTGC TGCGTGAGTA TGCCGAGGAC
 10701 TTTATCGGTA TTCAGGAGAC CCGATATCTG CTGGAGCAGA TGGAGGGAAG
 10751 CTATGGGGAG CTGGTGAAAG AGGCTCAGCG GATCATCCCG TTGCAGCGGA
 10801 TGACTGAAAT ATTGCAACGG CTGGTAGGGG AGGACATCTC CATCCGCAAC
 10851 ATGCGTGCGA TTCTGGAGGC CATGTTGAA TGGGGCCAGA AGGAGAAGGA
 10901 TGTGGTGCAG CTCACCGAAT ATATCCGCAG CAGCCTCAAA CGCTACATCT
 10951 GCTACAAGTA CGCCAACGGC AACAAACATTC TGCCTGCTTA TCTGCTTGAT
 11001 CAGCAGGTGG AGGAGCAGAT CCGTGGCGGT GTTCGTCAAA CCAGCGCGGG
 11051 CAGTTACCTG GCGCTCGACC CCACTATTAC CCAGAGCTTT CTGGAACAGG
 11101 TGCGCCATAC GGTAGGAGAC CTGACCCAGA TGCAGAACAA GCCGGTGCTC
 11151 ATCGTCTCCA TGGATATTCG CCGCTATGTG CGCAAGCTCA TCGAAGGTGA
 11201 TTACCATGCG CTGCCGGTAC TCTCCTATCA GGAGTTGACT CAGCAGATCA
 11251 ACATTCAGCC GCTGGGAAGA GTGGGTCT**AT GA**CGCAGGAT CCCTTGTTGC
 11301 CCTGGTTTGC AGAAAGAGGG ATTGCTTGCG CCGTGCATAC CCTGTGCAGA
 11351 ACGCCGATCC CGCTTGGTCA TGTGTTTGGAG CATGCGGGGC TGCGGGTTGC
 11401 CTGGCGTGTC GAGGCGTCAG AGCGGCGTAT CTGGATTGTA TTTATTGAGA
 11451 GAGTGCATGA ACGAGCAGGA CTCAGTAATC CATTGCGCCG CTTTATCTT
 11501 TTGGCCAGCG CCGGCTTTTC CGTCTTGGGG AGCGGTTATG TGCTGTATGG
 11551 CAATGTCTGT GTGTTGGGGA GCAGTCCCCT GAGCAGTGAC CGGCTATCCC
 11601 GTTTTTACCG TTGTTGGGCC GGGGCAAGTG AGCCGCAGCC AGGTTGGTTT
 11651 TCACTCGATG TTGCAAAAGT TATCTCGTTG ACATCCATGA GAAAACAACA
 11701 AAACAGCGAC CTCCCT**TGAT** AGGAAGGGAC GGCACGCAAA ATTA**AAATGG**
 11751 GAGGCAAGAT GAAAGAACGC CCGGGCAATA GCGATGAGGC AACGCTTGCG
 11801 CAAGCGGAGC TGCCATAAA AGACAGTGAG CAGCGCGCTG CCTTGTTGAA
 11851 TGAGATGTGG GATTCCCTCG GTATCAGCCC ACAAATAACC CACTTGTTGT
 11901 TTGCGGAAGG GTCGGCGGCA CAAAAGTCAC AGGCTGAGAA GGAGTTGCTG
 11951 GGGGAGCTGC ATCGACGTCG TCAACACTCC CCACAGGAAA AAAACAGTGG

orf15 (acrR) →

orf16 (acrG) →

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

12001 GGCCCGTCCC AGACGCCCGG CCATGATGCG CGGTTTGGTC ATATAGGATA
orf17 (*acrV*) →

12051 TAGCG**ATG**GGA AATTAGCTCG TATAAAAAAG ATCCCCAACT GTTCTGTGCG

12101 GATCTTGGA AGGTTGAACT GAATCAGCTG CAAGGCGGCA GCTCGTCGGC

12151 ATTAGATGCG CTGGTCAAAC TCCTTCAAGA GAAGAAAATA GTCATTACCG

12201 CCACCTACGA CAAGAAAATA GACAGCAATC CTTTTGCCGA CAAGGTCGTC

12251 ACCGAAAATG AGATGCTGTT GAAAAAAGTA CTCGCCTATT TTATGCCTGC

12301 CGACTCGAAG AATTCGGGCG GACAATACGA TCTTCAGATA AAAGCCGGAT

12351 TTGAGCAGCT TCATAAGTTA ATTAATGAGG CTGCCGCCGC TGGCAAGACT

12401 AAATTCACCC TGCGAGAATT CTTGGCTGCC ACCCACTTTT CCCTGACCCC

12451 CGATCGCATC GATGATGATG TCATCGGAGC CATGCTCGAT GCCATGGGCA

12501 GCCACAGCAG CAAACGGGAT ACGCTCAAAC ACGAGGTGGG CAAGTTGACT

12551 GCCGAGTTGC GAAGCTACTC GATCATAACAG ACGGAGATCA GTACGGCGCA

12601 GCAGCATAAC GGTACCGTAG AGGTCGGCAG GAAAGGCGTC AATATATTCG

12651 ATTACAAGCA TTATGGTTAT GACAGCCATG AGGCTTTTGC CAAGAAAGAT

12701 GCCAATGGCC AATATAATCC TCAGTACCAG CTGCTGAAAG AAATTGCTGT

12751 CGAGAGAAAA GAGACAGTGT TGAAGGAAGA ATCTTTATTA CGCGCCGAAG

12801 CGACTGACCA GGGTTTTTTCG CTAGAGGACT ACCGTACTAA ATTACAAACA

12851 GAGCTAGTTG ATCTTAAAAA TGATAAGCAG GTATTCCTCT CGGCTAGAGA

12901 TTTCTGATC TCACCGAAGA AGGATACCGG CGCGCTGAGC AACGTAAAGT

12951 ATTCCTATAA ATATGAAAAA GATAATAATC CACTGAGCAA TTTTGCGACC

13001 ACAGTGGGTG ACCGGGCCAA ACCCCTCAAT GACAAACTCG GCCAGAAGAC

13051 CACGGAGCTA AATGATATCA GCTCCCGTTA TAACGCCGTT ATTGAAGCGC

13101 TCAATCGTTT TATCCAGAAA TATGAAAGTG TAATGCAGCA GATCCTTCAG

orf18 (*acrH*) →

13151 GCTATT**TAA**T TTTCAGGAGC AGTA**ATG**GAA CACGACATGA CCCAAGTGAA

13201 CGAGCCAGCG ATAGAGGCCT TCCTGCAGGA TGGTGGCACC CTCGCCATGC

13251 TCAACGATGT ATCTACCGAT ACCCTCGAGC AGCTCTATAC CCTGGGTTTC

13301 AATCAATATC ACGCCGGCAA GCATGACGAG GCACACAAGA TTTTTCAGGC

13351 CCTCTGCGTG CTGGATCATT ACGAAGCGCG TTTTTTCTG GGA

13401 CTTGCCGCCA GGCCTGGGA CAATTCCGGC TGGCCATCGA CAGTTACAGC
 13451 TATGGCGCCA TGATGGACCT GCAGGAGCCC CGCTTTCCCT TCCGTGCCGC
 13501 CGAGTGTCTC CTGCAGTTGG GAGAACTCGA GGGGGCCGAG AGTGGCTTCC
 13551 ACTCGGCCCA GTTGCTGGCG GCAGCAAAGC CGGAGCTGGC GGAAGTGGCC
 13601 GCCCGTGCCG GCATCATGTT GGAAGTAGTC AAAACCAAAA AGGATATGGA
orf19 (aopB) →
 13651 GC**ATG**CATTC GATAAGCAGT **GA**ACGCCCTC TCTCCATTGG AGGGATGCAA
 13701 CCTCCTCTGG TCGAGGACAG CAAGGGGAGC AGTCAAGCCA CTCAGGTGGC
 13751 TGCCGGGGAT AGCCATCGCC ACGTCGAAAA ACATGGGCAG GGGGTGGTGT
 13801 TGCCGCAACC CATGCCAGGT ATCGGGCAGC AGATGAGTCC ACCCAAACAG
 13851 CAGGAACTTG ATCAATTGAG GAAGACGGCA CAGCTGGGGA CCGCCAATGC
 13901 GGCCAAGCTG CTGGGCAGCA GTACCCTGCT GAACAAACTG GCGTTTGCCT
 13951 CTCCCGAAGA GTTCGAGATT GAGCTGAGCA AGATGACCAG CGAACTGGAA
 14001 CAAACCCAAA AGAAGTTGAA ACTGGCCGAT CTCGAGCGGA TCCGTGCCGA
 14051 GAATCTGAAA AAAATTGATG AAAACCAGAC CAAGATGAAG GAAGCCAGCG
 14101 AGGCTGCCGA CAAGGCCAAG AAGTCTGGTC TGGCTTCCAA AATCTTTGGC
 14151 TGGATCAGCG CTATCGCTTC CATGGTCATC GGTGCCATCT TGATCGCTAC
 14201 CGGCGTAGGG GCCGCCGTTG GAGCCATGAT GATCGTCGGC GGTGCCGTTG
 14251 GGGTCGCGAA TATGGCGATC CAGCAAGCCG CTGCAGATGG CCGTATTTCCG
 14301 CCCGAAACGA TGAAGGTATT GGGGCCCATC ATGATTGCGG CCGAGATCTT
 14351 AGTGGCCATT GTTCTATCG CGGTCACCTT TGGGGCAAGT GCTGCCAGTA
 14401 CCGCCATGAA AGCCGTCAAA TTTGCTACTC AGGCGGCAGA TCTGGTAGTT
 14451 GATATTGGTA CCGGGACAGC CAAGGCCGTC GATGGCGGGT TGCAGGCAGA
 14501 CGCGCAAATC AACAGGCGA ACTTGCTGGA AAATCGGCAG GTGATGACCG
 14551 AGCTGCAAGG GGTGATGGAC AAGCTCAAGG AGGTCTTGTC ACAGATGACG
 14601 GAATCATTCC AACAGGTAAT GGAGATGATT TTCCAGATGA TCACGGCCAA
 14651 GGGGGCCATG CTCAACAGCC TTGCCAGCAG ACCGACAGCC ATT**TAA**GGAG
orf20 (aopD) →
 14701 AATGCGAGAT **GA**ACAATATC AATCCGAATA ACCACATCCC GGGTAACACC

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

14751 TATGTTGCGC CTGCCGATGG GCAGGGGGTA GAAAGCAAAG AGGGTTTGAC
 14801 AGGGCAGGGG ACCGCCCATG AGCCAGGTCA CAAGACAGTG CACACAGCCC
 14851 CGCAACGTCA AGCGTTGCCC GAGTTGATAG GGCCACGTCA GGGGCTGGAT
 14901 TCGAGCCTGC TGAGCAAGGG GGGGTCTGAG CTCGACAATG TTCTCAGTAT
 14951 TATGAGCCTG CTGTTCGAGA TGGCGCGCAA GGCCCGGAG ATGGGCTTGT
 15001 TGCAGCGGGA CATGGAAAAT CAGGCCGTGA TCGCCGCCA GAAGGATCAG
 15051 GTGAGCGAGA TGCGACATGG CGCCAATCTG ATGATCGCCA TGGCGGTGGT
 15101 ATCCGGTGTG ATGACCGTCG CTTCGGCCGT CATGGGCGGC TTTTCCTTGA
 15151 GCAAGTCTGC CAAAGCCATC AAACAGGACA AGGCACTGAA CGCCAATATG
 15201 GCGGGTCGAG AGAAAGATCT GCAAAAAATG GCGGACGTGA AGAAGAGTAC
 15251 GGGGCAAGAA ATGGGGGATG CTGGTCAGGA GTTAATGACC AGAAACCAGC
 15301 ATGACAAGGC TGCCTTGAAA AACTGAACA AGAAGTTTGA GGCCAACAAT
 15351 GCGCGTCAGC AGCTGGCTGG CACCGTGTG CAAGGATCTG CCCAAATGGG
 15401 CAATAGCACC ACCCAGGTTT TCCAGGGCTA TTCCCAGGCC AATGCCAAGG
 15451 AAGATGAAGT GCGCTCCAGC ATTGCCCAGA CGCAGAAGCA AAAAGTGAA
 15501 GATCTGATGA ACTTCAACAA CAACTTCATG AAAGATGTGC TTCAGATGAT
 15551 GCAGCAATAT GCCCAGAGCC ACAATCAGGC CATGCGTGCC GCATTTGGCG
 15601 TGGCA**TAA**CG GCCTCATCAC CAATGTGTGT **CAAGCGCCA** TCC**GGGCGCT**
 15651 **TTTTTT**TATCA TTTTTC**TTAA AAG**AGCCGCC TTTGAGTGAC AGCCAGCGTG
 15701 GTACGGGCAG GCTAACATCC TCT**C**CTCTCT **orf21 (hscY)** → GCTGGAGGAC ATC**ATG**GATC
 15751 TAACCCTCAC CATCAATCAG CTGTTTGCTG AGTTTGCTAC CAAATATGGC
 15801 TTGCCATCTT TAGCCTTGAA TCAGGAAGGC GTTGCAGCAT TGTGCTTTGA
 15851 TGACCAGCTA AAGCTGGGTC TGATCCTGGT GCCAGAACGG GATCATCTGG
 15901 TTTTGCAGGT CGATGTCGCC GAATTGCATC AGGTTGGCGA AGGTATTTTT
 15951 CGTCAGCTGG CCAGTTTCAA CCGCCATTGG TATCAGTTCA ATCTGCACTT
 16001 CGGTTTTGAT GACGAGAGCC TGACGGTACA GCTATATCGT CAGATGTCCG
 16051 CCAGTCAACT GACACTGACA GCCCTCGAAG AGAGTCTGGC CAGCATGCTG
 16101 GAACATGCCG AGTTCTGGCA GGAGTTGCTG CAATCACGGC ATGAGGTCEA

orf22 (axsE) →

16151 GCATGGCCAT GAAGAGATGA GGGGAGTTCG GGTA TAG CCA **TGA**AAGATACA

16201 GGAACAGCAA GCGATGACGG TATCGCAAGG CACGCTCCAA GCAAGAGATG

16251 GCAGCTTTGC CGGGCGAGCG ATGCATGTGC TCCCCATGAC CCGCGTTCAG

16301 CAGCCCTTGT CGGTATTGTT GCGTGGTTC ATTACCCTCG ATCGGGTTCA

16351 GGAAGTGGCG TTGCAGCGTC TGCAGCAGGG TGAGCATTTG CCGCTGTCCG

orf23 (ascW) →

16401 CTCGCAGGAT CAGGGTCGTA **TGA**GAATATG GCTTGCCTG GTGCTGCTGA

16451 CTGCGCTGAG TGGTTGCGTC ACGACACCCG TGTCAAACC CGCGCTGACA

16501 CAGGTAAAAG GAGAGGTGCG TCTGGCGGGA AGATTGCCTT TCCCGGCCG

16551 GGTGGAGGTC ACTGTGCTGA GCGTGATCGA TGGTCGTCTT TTGGCTGTGG

16601 CGGCAACGGA ATATGACGTG ACCATGTTGC CATTGGTATC TGAGCTGCGC

16651 CTGACACCTT TGCAAATGGC GGAGGGTGAC TTATATCTGC GTACGCGATT

16701 GCGTTTCATT GGCAGTTCAG CAGTACAAGC CAGTCATCAA CAGAAAGTTT

16751 TTAAGGCGTT TAATCCTGAT GGTACGTCA TTAATTTACA GGTCAGAACT

16801 TGCTATCCAT TATGTCAA TA A TGACGTGAT TCACAAACAA CACTGAA**AATC**

16851 **AG**CTGTTTAT GGCTCTTATG **ATT**CAATGGG AAAGTTTCTT TTTGTAACAA

16901 ACTATCCCAG CATATAACAG TAACTTAATT TGAATCTCCA AATAACGCAT

16951 GGCTAGTGTA TTGACTCTAA TTTGTGGCTG GTTTTCTTGC GTATAGCTGT

17001 TGTAGGATGC TCCCCTCAT TTCAATGGTG ATTAATTAGT TGCTGGTATT

17051 GAGATGAATT AATT **TAAAAA** TAAACGCCA ATAATAAGAC TCCCA **G**CAGA

17101 AATCCTGTCT TTGCTGAGGC GTCACAGGCA CCACACGCAG ATTCAGGAAA

orf24 (ascA) →

17151 ACGAAATATA **TG**AAAGGCAT TACAACCACA GAGAAGGGCG ATATAGCCCA

17201 GCTCCAGTGG TGCATGTCTG CTTTAAACGT CATTGAGCAT ACACAGGAGG

17251 GAATATACAT CCTGCTGGAA GGCTCCATGA CCTGGCAAGA CTGCACCGAT

17301 ACCTACGAGT TATCCGCCAA TGAGTTGATG TTCGTACGCC GTGGCAATTA

17351 TGCGGTTTGT ACCGGTGAAG CACCTTGCCA CCTGCTTTGG TTACCCCTTT

17401 CAAATACCTT TCTGCAAGGC TTCTTGCAAC GTTTTGGTTC ACTGCTGAGC

17451 GACGTGCCCA GAATTGACGC CATGGCCCC AGTCTGTTGC CATTTTGTGC

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

17501 CTCGCCACTA TTGACCCAAT GTATTCAGGG TTTACGTGGC TTGACCGAAC
17551 ATGAATACCC GCCAGCATT A GCTCAGCTAC GTACTGAGGA GCTGTTGTTT
17601 CTATTGGCTT TTGGTGAGTC CGGCCACAA CTGATGTCGA TTCTGCGTCA
17651 ATTGAGCAAC CGCCAGGTTG AACGATTACA GCACTTCATG GAAAAGCATT
17701 ACTTGATGGA GTGGAAACTC AGTGAGTTTG CCAAAGAGTT TGGCATGGGC
17751 TTGACCACAT TCAAGGAGCT TTTCGGGTCT ATTTATGGGG TGTCTCCCCG
17801 AGCCTGGATC AGCGAGCGGC GTATTCTCTA TGCTCATCAG TTATTACTCA
17851 ATAGCGAGAT GAGCATAGTG GATATTGCGA TGGAGGCCGG GTTCTCCAGC
17901 CAGTCTTATT TCACCCAGAG TTATCGCCGC CGTTTCGGTT GTACGCCAAG
17951 TCGTGCCAGA CATGGCAAAG ATTAACGTCG GACTAAAAATA ATCTGACGTT
18001 TTTTATAAGT CAGGGAAGGG CGTAATGGAT AGAATGGTCG CATATCAAAA

orf25 (*ascZ*)

→

18051 CATTATCCCA TTTATTGCCCG CAGCAAGATG AGCAAGGCAT AGCATGAGTC
18101 AGCAAGATCA CCAATCTCCC AAACGAGGCC TGTTTGCAGG CCGCCGGGTC
18151 ACTGTGCTCC AGTCAGCGTC TCTTTGTAAA GACCAGCTGG TTGGTCAGCA
18201 GTCCATGCTC AGCTATCAGG ATGCCGGTGT GTTACTGACC CAGCAGATGA
18251 GCCTGTTGCA GCGGGTGTG CCCAGAACCC GTCTGGAGTG TCTGCTGGCA
18301 TCGGTCTGGT TTCAGCGCCG TGTGGATGTC GCCATGGCCG TGTCACGTC A
18351 GGATCTGCAA CGGATCCTGC GGCTGGCTGC GGGTGAGGAG GGTACTGGA
18401 TTGCCCAACT GGGGGATAGC ATCAATCTGG CAGAGCGGTC GCAGTTATGG
18451 CATTGGGTGT TATATCCCTT GCATCGCTGG TGGGCCCGTC ATCAGGAACC
18501 CCTCCACACA GGCTGGATCA ATGAGTTGGC ACAGTTGCAG GTCATGCGGC
18551 GGCAGTTGCA TGCTCAGGCC GCCTTCTGGC AGACGGTGGT GGATGTACAG
18601 TCTGGCATTG AGAGCAAGAT TGCAGCCCAG CTGGCTAAGC TGACCCAGCG
18651 TGAACGGGAA CTGCAACAGC TGCAAGCCGA ATGTGAAGAT CGCCTTCATC
18701 TGGCCTGGCC TGCCTGGTAT GGGCAGCAGA CAGAGGAAGG TGACCCGAAT
18751 GTGCTCATGC CGGTACCGCT CGAGCTGGAG GCATTCTGGC ATGCCCTGCA
18801 GGTGTTACCG CATCAATCCA CAGCTGCTCA GATGTTGCAC GAGTGGCTTG
18851 CTGAAAGAGG GCTGGCCCTT TCTCAGGACC GCTTCTACTG GCAGCCACCG

orf26 (ascB) →

18901 GCCCGC**TAGA** TAACCCGAGG AACT**ATG**CAA AATCTACTTA ATCGATTGGC

18951 CGAAAAGCTT GGCCAAGGGC CTTTGTGTTGC CGATGTTTCAG GGCAAATATC

19001 ATTTGCGACT CGATGGTTAT CCTCTGTTTT TGCTACCCAG GCACAACGAA

19051 CTGCTGCTGA GCACTCCCTT GGCAAGCGCC GTCATGTCAG AAGGTAAATC

19101 TCTGGATCCG GCATTGTTGA AACGCCTCTT GCAACAGGTT GTGGCCTGGG

19151 GACGCCATGC CCCCAGGCT CTGACACTCG ATGAACTCGG CAATCTGCAA

19201 CTGGAAGCCA GGCTGGAGCT TGACGGACTT GATGAACACC AGCTGGAAGT

19251 CTTTCTGAGC CAGCACATTA CCTTGCTGGA GCGGCTGGAA CCCCAGTTGA

orf27 (ascC) →

19301 ATGAGCGGGC CTTAGCCCCG GA**ATG**GAGAC AGATGATATG GCATCCG**TAA**

19351 ACATGCAACG TCTGCTGCAT CCTCTGCTAT GGCTCGGTAT GGGGATGATG

19401 ATGTGGTCGC GTCCACATT GGCACAAGAG CTTGACTGGT TGCCCATGCC

19451 CTATAGCTAT GTGGCGGAAG GGGAAAGCCT GCGTGATGTG CTGGTCAACT

19501 TCGGTGCCAA CTACGAGGTA TCGGTGTCG TCAGCGACAA GGTCAATGAT

19551 CAGGTCAATG GCCAGTTCGA ACATGATGAG CCGCAGGCGT TCTTGCAGCA

19601 GCTTGCCCTCT CTCTACAACC TGGTCTGGTA CTACGATGGC AACGTGCTGT

19651 ACGTGTTCOA GAACAGTGAA GTTCAGTCTC GTCTCATCAA ATTGGCACAG

19701 ACTGGTGCGG CGGAATTGCA GCAAGCGCTG CAGCGTGCCG GGATCTGGGA

19751 GGCGCGTTTT GGCTGGCGAC CAGACACAGA CAATCGCCTG GTCTATGTTT

19801 CCGGCCCTCC CCGCTACCTT GAGCTGGTTG AACAAACTGC CCTGGCGCTG

19851 GAGCAACAGT CCAATTGCG TAGCGAGAAG ACGGGACCGC TTGCCATCGA

19901 GATCTTCCCG CTCAAGTACG CTTCGCGAC CGATCGTTCC ATTCAGTATC

19951 GCGATACGGA TGTGAGGCA CCCGGCGTTG CCACCATTCT CTCTCGCTTG

20001 CTCAGCGATG CTGGCGTGCA GATGGTCAAT GGTGAGGGCA CAAAAGGGAG

20051 CACATCCCAT TCAGGGCAGG CAATCGTGCA GGCAGATCCT TCCCTTAATG

20101 CCGTGCTGGT GCGCGATGCT CCGGAGCGGA TGGCCATGTA TGGCAAATTG

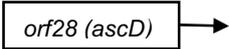
20151 ATTGCTGCAC TGGACAAGCC GTCTGCCCGT ATTGAAGTGG CTCTCTCCAT

20201 CATCGATATC AATGCCGAGG ATCTCTCCA GCTGGGGGTG GATTGGCGAG

20251 TCGGGATCCG CACCGGCTCC AATCAGCAGG TGATTATCAA GACCACCGGC

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

20301 GATCGCAAGG GCATTGAGGG GGGCGCAGCC CTCGGCAGTC TGGTGGATTC
 20351 CAAGGGGCTC GATTATCTGC TGGCCAGAGT GAATCTGCTG GAGAACCAGG
 20401 GCAATGCCCA GGTTGTCTCC CGGCCGACAC TGCTGACCCA GGAAAAACACC
 20451 CAGGCGGTGA TCGACCACAG CGAAACCTAC TACGTCAAGA TCAGTGGCGA
 20501 GCGGGTGGCG GAGCTGAAAG GGATCACCTA TGGCACCATG TTGAGAATGA
 20551 CGCCCAGAGT GATCCAGCTG GGGGACAGAC CGGAAGTGAG TCTGAGCCTG
 20601 CATATCGAGG ATGGTAATCA AAAACCAAAC AGCTCGGGTC TGGATGGCAT
 20651 TCCCACCATC AGTCGTACCG TAGTGGATAC TATAGCCCGG GTAGGACATG
 20701 GCCAGAGCCT GCTGATCGGC GGTATCTACC GCGATGAACT GAGCGAAAAGC
 20751 CTGAGCAAGG TGCCTTTTTT GGGCGACATC CCCTATCTGG GTGCCCTGTT
 20801 TCGCAGCAAA GAGAGTCAGA CACGTCGTCA GGTTGCGCTC TTCATCATCG
 20851 AGCCTCGGCT GATCGACGAT GGCATCGCTC ACTATCTGTC GCTCGGGCAT
 20901 GGTCAGGATC TGCCTGCAGG TGTGCTGGGG GTTGACGAGA TATCCAACCA
 20951 GAGTCTCTCT CTTGGCAAGG TACTGGGAGG TGCCCAGTGT CAGCCGTTGG
 21001 CGGCCGCTCG TGAGGTGCAG CAACTGATGC GCCAGGGAGG CAAGAGTTCT
 21051 TCTTTGACGC AATGCCAGAT GGGCAATGAA CTGGGGTGGC GGCTGGTCTGA
 21101 AATGGGCAAG GCGCAGAAGT GTACGCCGGC ATTGACCTGG TCGTGCAAG
 21151 CCGGGGAAGC CCGA**ATGA**GCT GGAAATGTCTG CATATACCGC GGGTTGAACC
 21201 ACGGCGTTGA AGTCTCCCTG CCGGAGGGAC GTCTGATAAT CGGTGCCGAT
 21251 CCGCTGCAAG CCGACCTGGT ATTGGTGGAC GAGGGCATGG CGCCTGTTCA
 21301 TCTGACGCTG ATGGTGACGG CAGAGGGCAT CGTACTGCAG GAATGGGCCC
 21351 AGGGCGTGAT GCCGACTCAA GACGGGGAAG TGTTGGCTGC TGGGGCTTTG
 21401 CTCAAGGCGG CAACCCGGCT GGAAGCGGGC CCGTGCTCT GGAGTTTTTTG
 21451 TGATAGCAGT CGTTCGTTGC CAGAGCAGCT TGAGCCACTG ACTACCGTGC
 21501 AGACAGCCCT TCGCCCACCG AAACGGGCTG CACGTGCCGA TGTCTGGATG
 21551 GGAGGGCTAT GCCTGATGTT GATCATCGCC GTGCTGGCAC TGCTAGGGCA
 21601 TGGCTGGTGG CAGGGGAGCA GTGAAAATGA TGCGGCACGC CAGGAGCAGG
 21651 CTCTGAAGCG TTTCTTTGTG GCGCCAGCCT ATCAGCAGGT CACGCTGATT



21701 AACGATACCC ATGGCATTTC GCAGCTGGCT GGTATGTCG ATGAGAACAG
 21751 CACGCGACTG GCTCTGCAGC AGTATCTGGA GGGTAACGGT TTCAATTATC
 21801 GGCTGGACGT TCGCACCATG GAGGATCTGC GTCAGGGAGC CGGTTTCATC
 21851 TTGCAAAAGC TGGGATATGA GCGACTGCAG ATCCGCAATG GCAAGGAACC
 21901 TGGCTGGCTG CGGCTAAGTG GCGAGATTGA TACGCAGGAC CCGAAGTGGA
 21951 GCACGCTCGA TACGCTACTA AGGCAAGAGG TGCCCGGTGT GCTGGGGATT
 22001 GAGAATCAGG TTCAGGTGGC AGGGGCCTAT CGCAAACGAC TGGATGACCT
 22051 GCTGCAGGAG CAGGGGTTGG CCGGGCTGTT GCGAGTGGCT GAAACCAGCG
 22101 GCCGTATCGA GGTGTCCGGC CAGCTGGACA GTGCCCAGCT GGCCAAGTTT
 22151 CAACTGGCCC AGCAGCAATT CAAGCGCGAG TTCGGTTCCC ACCCTGTGCT
 22201 GGAGCTGGTC AATCAGGAGC GGATCCCAG TCAGGATGAG CTGGAGTTTG
 22251 AGGTACGCAG TGTCTCGTTT GGCCGGATTC CTTACGTGAC CCTGGCGGAT
 22301 AAGCAGCGTT ATCCAATCGG CGGGGCGACT GCCAACGGGG TTCGCGTATT
 22351 AGCGATTTCGT CCTGATGCCG TGGTGGTCAG CAAGGGCAA CAGCAATATA

orf29 (ascE) →

 22401 TCGTCAAGTT AAAAGGAGTC GAGCGTC**CATG** ATGACCAATT TGGAAACGCG
 22451 ACTGTCCGGC GC**TGA**TCCGG TATTTGCCCG CGAGCTGCAT GCGCAGCTTG
 22501 TCCAGGCGCT GGGTGACGTG AAGCGGCGAC TGCTGCGCGG GGGTACCCAG
 22551 CAGCAGTATC AGCAGTGGCA ACAAGAAGCC GACGCCATCG AGGCGGGGCT

orf30 (ascF) →

 22601 CAACATAATT GAGAAAATAA AAGGAGAG**TGA****ACCATG**GCTA TCGAGAGATT
 22651 TTTTGACAAT GGAGGGGATA ATAACAACAC CCTTGATAGT GTTGCCAAAG
 22701 CATTGAAAGA TCAGGCTAAT GAGAGCAATC AAGCAGTTAA CAAAGCTATT
 22751 GCTGATATGA AACTGCCCC GGACAACCCG GCCCTGCTGG CCGAGCTGCA
 22801 GCACAAGATC AACAAATGGT CGGTGGTGTA CAACATCAAC TCTACCGTGA

orf31 (ascG) →

 22851 CGCGGGCGAT GAAAGACTTG ATGCAGGGCA TTTTACAGAA GATC**TGA****TGA**
 22901 **TGA**ATGTTCA ACTGAAAAA CAACTGGCAG AACTGGCCCT GGCTGGAACA
 22951 GGTCATCATT GCCACCAGGA GGCCGCATCC ATTGCCGACT GGCTGGCGCA
 23001 AGAGGAGTGC ATGGCCGAAT GCGTCACGTT GATCCGCCTC TCATCCTTGA

23051 TGAATCAAGG AGATTATCAG CGCGCACTGC TGCTGGAAAC CTCGCACCAC
 23101 TCTGCGGATG TTGAACCCTG GTTCGCCCTG TGTGAATGGC GGCTCGGCAT
 23151 GCACGATGAG CTGGTATTGC GGTTGGCAAG GCTGGAAGCG AGCGGTCAGC
 23201 CCTCCCTGTG TCAGTTTGCA GCCGGCTTGC GTGAGCAGAT GGCCTCA**ATGA**
orf32 (ascH) →
 23251 AGATTGAAGG CAGTGAGCAT CCACCCGAA GTGGATTTGC CGATACCGAA
 23301 CCACTTCCCA GGCAACAGAT TCAACATCAG TTTGAACGGC TGCTGGCAAA
 23351 AGCAGATGAG CCTACCCTGT TCAGTCGCTG GCAGCAGGGG GCTGGGCTTG
 23401 AGACCCTGCT TGAGGGTGCT TCGCCTTCTG CCCAGCGGGA CCTGCTCTGG
 23451 CAGATCCATC AGCAGGGAGG AGAGCATGCC CAGGCGGTTG GCAAGCGACT
 23501 GTTCCAGCCT GTTACCGACA AGTTGGTGGC ACATTTTTTCC GGCCGTCAGC
 23551 TGCCTGTCTG TGCTGCCATT GACCAGCCTG AGCTGCGCGC GCTGATGCGA
 23601 GAGTTTGATC CACTGTCATC ACGGCGAGAG ACGGTGCTGC TGAATGTGAT
 23651 GGCAGATATC AAGAAGGCTG CCAACGGAAC TCAGGTTGAC CTGGCATATC
 23701 TCGAGGAATT GGCTCGTCGT GAGCTGATGA CGTTGATCCC GCTTAACGGC
 23751 GTGGTGAACA ACCTGATACG GCATTACAC AAACCTTGATC TGGAGGCG**TA**
orf33 (ascI) →
 23801 **ATG**GAGATTA CCCAGTCAGC CCAGGCGGTC GTGACCAGCC TGGATGAGTT
 23851 GAAAACGGCG GACACTGCCT CTTCCCAAGT TGCCAGCTTT GAACAGGCGA
 23901 TGAGTGCTCC ATCCCAAGGC ATAGGCGGTT CTTTGCTTGG TGAGCTGGGG
 23951 GAAATAAAGC AGCAGTTTGT GGAGGCCAAG GAGAGCCTGC GGGCCGAGCT
 24001 ATCTACGCCG GGAGACGATC CCAACAGCCT GATGCAGATG CAGTGGGCGC
 24051 TGATGCGTAT CACCATGCAG GAAGAGCTGA TTGCCAAGAC AGTTGGCAAG
orf34 (ascJ) →
 24101 ATGAGTCAGA ACGTAGAAAC CCTGTTGAAG ACCCAG**TGA**G GTAGT**GTGAA**
 24151 GAGATCGATG CTGATGGGGG TGTGTGCAC CTCAATGCTG CTAGGTGGCT
 24201 GCAAAGTGGA GCTCTATACC GGAGTCAGTC AGAAAGAAGG TAATGAAATG
 24251 TTGGCGTTGC TGCGTACCGA GGGGATCTCC TCAGACAAGC AACCGGACAA
 24301 GGATGGCAAT ATCAAGTTGT TGGTGGAGGA GTCCGATGTA GCGCAAGCCA
 24351 TCGAGGCACT CAAGCGCAAG GGCTATCCGC GGGAGAGTTT CTCCACCTTG

24401 CAGGATGTAT TTCCAAGGA TGGTCTCATC TCCTCGCCTA CCGAAGAGCG
 24451 GGCGAGGCTC AACTACGCCA AAGCCCAAGA AATTTCCCAT ACCCTCTCGG
 24501 AGATTGATGG CGTATTGGTC GCGAGAGTAC ACGTGGTACT GCCAGAAGGA
 24551 AATGAAGGGA TCAGCAAGAA ACCCTTACCC GCTTCGGCAT CCGTTTTTCAT
 24601 CAAGCATGCC GCCGATATCC AGCTGGACAG TTATATTCCG CAGATCAAGC
 24651 AGCTGGTCAA CAACAGCATT GAGGGGTTGG CTTACGATCG GATCAGCGTG
 24701 GTGCTGGTAC CTTCGGCCGA TATTCGTCAG ATGCCTCTGG TATCGCGAAA
 24751 CACCAGCCTC TTCTCCATCG AGGTGAGTGA GTCGTCGAAG TGGCGGCTGG
 24801 CAGGACTGAT TGCCCTGTTG TTGATGCTGG TCGTGACCAC CAATCTGGCC
 24851 CAGTACATGT GGCACCGGAG CCGGAGTCGT **TCATG**ACGGT AGGCCTGACA
 24901 CCTTATCAAT TCGCCTTCTG TCCAGCAGCC TATCTTGATG ACGGCCATTT
 24951 TCCCGATTCA TGGCGCTGGC TGCAGGATGC ACTGCCTGAC TGGCGTATCC
 25001 ACCCCGCCGT AAATGAAGCG CTGCTTGAGG AGCTGGCCTT GGACATTGCC
 25051 TATGAGTCGC CCTCATCCCT TGGCGGCTTG GCATTGTTCC CCCAGTCTGA
 25101 GCTCGCGAGT ACCTTGTCAC ACCTTGGCGC CGTGTTCAT GGGGAGGCCA
 25151 TCCGTCATTG TCTGCAGGGG AGCACGCTGC GCCATATCAT CTGCTTGTTG
 25201 GGGGAAGAGG GGCACAGGAA TCTGCTGTCC CAGATTGATC TGTTGATCGG
 25251 CCCCTGGCCT GCAGGCTGGC AGCAGCCGTT GCCGCTTGAA CTGAATGGCT
 25301 CTTATCTGGA AGCGGCTGGC TTGCAATTCT GGTGGCAGC CGCAGGGAAT
 25351 GTTGAACCTG GCTGGGCTCG CAGGCTTGCC CTGCGTCTTC CCCATCATC
 25401 CACCGTACCA TCCTGGCATC TGGCGAATGA GTCGTTGCCA CTGGCTCGGG
 25451 CGCTCTGTCT TAAAATCGCC AAACAGGTCA CACCACA**ATG** CTGCCATTTG
 25501 TTGAAA**TAAA** GAGTGAACAC CTGCAACTGG AGCCTGGTCA GCGGATCCTG
 25551 CGCAGTCAGG ATTACCAATC TTATCTGAGT GCCCAGGCAC TGTTGAGGC
 25601 GGCCAGGGAA CAGGCGGCCG AGATTGTGCA GGACGCTCGT ACCGTGTACG
 25651 AGCAACAGCG CGAGCTTGGT TGGCAAGCTG GCATGGAGCA GGCTCGCCGT
 25701 GAGCAGGCGG TGTTGATCCA CCAGACTCAA CTGCAGTGCC AAGAGTACTA

orf35 (askK) →

orf36 (ascl) →

Sistema de secreción de tipo III en *Aeromonas* mesófilas

25751 TCGCACTGTA GAGCAGCAGA TGAGCGAGGT GGTGTTGCAA GCCGTGCGCA
25801 AGATCCTGCA TGA CTATGAC CAGGTTGCAT TGACCCTCAA GGTAGTGCGC
25851 GAGGCACTCT CGTTGGTGAG CAACCAGAAG CAGGTCACGG TCGGGGTGCA
25901 CCCTGAGCAA GTCACGGCGG TACGGGATCA AATCGCCAGG GTACACAAGG
25951 ATTTCCCGGA GATCGGTTAT CTGGATATTT CCGCCGATGC CCGGCTCGAT
26001 CAGGGGGGAT GTATCCTGGA AACCGAAGTG GGGATCATTG ATGCCAGTCT
26051 GGATGGCCAG CTGGAGGCAC TGTCACGGGC CATTTCATG ACGCTTGAGC
26101 GGGGCGACCA TTCTGCGCAT TAATCTGTAC CATGTCAGGT GATTTGCGCC
26451 ACAGTGCATA

7.3 Secuencia nucleotídica de la agrupación génica del sistema de secreción de tipo III de *Aeromonas hydrophila* AH-3

Los codones de inicio están marcados en negrita y los codones de parada se localizan en recuadros. Las posibles secuencias promotoras se indican mediante subrayado y, dentro de las mismas, el putativo inicio de transcripción se señala mediante un recuadro sombreado. Las posibles secuencias terminadores rho-independientes se indican en cursiva y negrita. Finalmente, las putativas cajas de unión al factor transcripcional AxsA (ver apartado Resultados, ORF23) se indican en cursiva dentro de un recuadro.

```

1   TTCCTTGAGG TAGAGGTTGC CATTGCTGGC TCGCAGCTCT TGCTGACTGT
51  CGGCGGAGGA CAAATGGAGG CCACGATGGA GTAACGTCAA TGAGGTCGCT
101 GAGGTGGTGT TCATGAATTA TCCCTTGATG GCGGACATCA TCGTCATTGA
151 GTGGGGTGCC GCTGTGGCGG CCTGGCAGCA CTCCCTCACC AGTTGCAGGA
201 AGTTGTGTGT CAAGCTGGCC AGCACGTCGT CATCAGCGCC TGTGACCGGC
251 AATTGCATCA CGAAGCGATG GTTACCCGTC AGCTCCATCC GCCCTGTACT
301 GGCCAGCAGC CCGTTATAGC TGAGCAGCAG CGGCACCCAG CGGGGATCCA
351 GTTCTAGGTC ATCGGGGCAG CAAGCTAGCA CCACCATGCC GGTGCCAGTT
401 CGGGTGATTT GCAGGGTCCA TCCGCAGTGA GCAACAGCCA CTCGTCGGCA
451 GATATCTGAT AGAGTTGATC GGCATTGAGC TGCCTAGCCC GCCGGGTCAA
501 TCGAGTATTG AGATCCATGC TCATATCTCT GGAGGGGGGA TGATGTAGGT
551 GCACAGGATC GCAAAAAGG GGAACATGCC GAATATTAAC CAAGGCCGGG
601 TATTTTTAGG TGATGCGGCG CAGTGGTGAT CAGGATTACG CTACCGTTGC
651 GGTCCCTTCG TCTGGCGCCA CTGCTCCAGC CAGCGCAATA CCTCGGCGGT
701 CGCCTCGATC TGGTCGGCGG GAATGTAGTT GTTGATCTGG GCGTCCCGAT
751 AGAGGGCGCG GGCCAGCGGA ATGCGTTGCA GCACCGGAAT GCCTTCCTCT
801 TCGGCAATCT TGCGCACCTG TAGCGCCTGG GCATCGGTGA ACTTGAGAGT
851 GACCACTGGC AGCGGCGTTT CCCCCGCTC GTAGAGGATG CCGATGGCGA
901 TATGGGTCCG GTTGGCGACG ATCACCGAGG AGCGTTTCAC GTCGGCGCGC
951 ATGTTGCTCG ATTGCAGCTC CTGATGGAAC TGACGGCGCT TGCTCTTGAT
1001 CTCCGGGCTC CCCTCCATCT CTTGTACTC CCGCTTCACC TCGTCCTTGC

```

1051 TCATCTTGAG CTGCTTGATG TGCTGGTAGT GTTCGAAGGC GTAATCGGCG
 1101 ATGGCGATCA CCACAAAACC CATGGCGCAG ACTGCCATCA GCTGGCCCAT
 1151 CATCCCCCCC AGCACCGGAG CGACGCAGCT CATGCCGCAG CCGGGCAGTT
 1201 GCAGCATCGC CTGCAGATTG CCCTCTATGG TGACCCACAC CAGCAGGCTC
 1251 AGCAGGGTGA CCTTGAGCAG GGATTTGACG AACTCCATCA GGCTCTTGAT
 1301 GGAGAAGATC TTCTTGCCCC CCTCCACCGG ATTGACATGC TTGATGTCGG
 1351 GTTTGATGGA CTCGCCGCTC AGCAGAAATC CGTACTGGGC GATGTGGGAG
 1401 ACGAGCACCA CCAGCACCGC GACCGCCAGG ATCGGGATGC AGAGATAGGC
 1451 CATCTCCTGC ATCAGGTTCT CCACCACATG GTTCAGTGCC TCAGTAAAGG
 1501 GGAGGTTGAT GTGGGACGCC GGGATCAGCA TCAGTTTGCC CAGATGTTCC
 1551 AGATAGTAAT CGGACATCGC TATCAGCATG CCGACCAGGC TCAGGATGAT
 1601 GGCGGTGGAG ACCACCTCCT TGCTCTTGAC CACTTGCCCC TTCTGGCGGG
 1651 CGTCCCGCAA CTTCTTGGGG GTGGGCTGTT CGGTTTTTTC GCCGCT**CATC**
 1701 GTGCCTCCGG GGCAAGGTCA ATCCGGCTAG ACTCAGCGCG GGTCACAGGA
 1751 TAAATGGCCA TTACGCTCCC CAGACAGAAA GGAACAGACC CAGGGGATCT
 1801 ATCTGCGTCA CCATCCAGCT GCCGAGCTCA TCCATCAGCC GTAGCAGCGA
 1851 GTGTGCAAG CAGATACCTG ACTGGGCGAT CAGTATGCTG ACAAGGAGGA
 1901 TGAGGGTGAC CGTCATTACG GAGTATTTGA TCATGTGTT**TC A**TTGTGCTCC
 1951 CAGAATGGGC CCAAGCAGGC GCAGCGGATC CATCACTGCC AGTACCTGTT
 2001 GGTAGGCATG GTCCATCATC AGCTTGATGT AGATGACCAG CAGCAGGCTG
 2051 GCGACAGCGC TCTTGATTGG CATCGCCAGC ACGAAGACGT TGAGAGAGGG
 2101 GGCAAAGCGG CTGATAAGCG CCAGCCCGAA TTCTGCCAGA AACATGGCAA
 2151 TAAGCAGCGG GGCTGCCAGT AGGGTACAGA GTAGCAACAT CTGGCTGAAC
 2201 TGGCCGTAGA AAAAGCTGAC CCACTGGCTG CCGATAGTTG GAAAGAAGTA
 2251 CGCCACAGGC CAGCTGGTAT AGCTCTGGAA AAGGGCTGTC AGCAGGGCGA
 2301 GGAAAGCACC GCTGGCAAAG AAGAGGGTGA TAAGGGTCTG GGTGAGCAGC
 2351 AGACCGGTGG GACTGGTCTG GCTGCCGAGG CTCGGGTGTA ACAGAGAGCC
 2401 CATGGCGGCA CCGCGCTGGT TGTCGATCAG AAAACCGCTC GCCTCGATGG
 2451 CCCAAAAGGG GATGGCGGCG ACAAAGCCGA TCAGCAGGCC GAGCAGCACC
 2501 TCCTTGGCCA CCAACAGGGC CAACTCCATG GCGCCGATGC TTGGTGGCAG

← **orf1 (ascU)**

2551 GGTGTCAGCG ATCATGGGGT AGGCGTAGAG CGCCAGCGAG CAGACCACAC
2601 CGTTGCGGAT CATTGCCCCC CCCAGCATCT GCTTGCCGAG TACAGGCAGC
2651 ATCACGAAGC AGCTGATAAA GCGTGGCAAC AGCAGGGTAT AGGCCAGCAT
2701 CTGGGCCTGC AGACTCTCCA GGG**TCA**TGG ATCTGCGGTA CCTTGTAGAG
← **orf2 (ascT)**
2751 CACCATGTCTG GCGAAGCTGT AGAGCTCGTT GCCTAGCCAG GCGGTGGTGG
2801 CAAACAGGGT GATCACCACC GCGATCAGCT TGGCGACAAA GCCCAGGGTC
2851 TGCTCCTGGA TTTGTGTCAG GGCCTGCAAT AAGGAAACTA ACGTCCCCAC
2901 CAGCGCGGCC ACCAGCACCG GTGGCATAGA GAGGATCAGC ACCAGCCAGA
2951 GGGTTTGGCT GGTGAAGTGG AGAATATCGG CGTGACT**CAT** **CCTA**GCCTCC
← **orf3 (ascS)**
3001 GTAGCTGATG ACCAGCCCAT GGGTGAGGCG AGCCCAACCA TCTAGCAGCA
3051 CAAACAGCAG CAGCTTGAAT GGCAGCGAGA TGGTCATGGG GGAGACCATC
3101 ATCATTCCCA TCGCCAGTAG GATGTTGGAG ATGATGAGGT CGATGGCGAT
3151 AAAGGGCAGG TAGATGAGAA AGCCGATTTT GAAGGCACGG CTGAGCTCGC
3201 TCACGGTAAA GGCAGGCAGC AGAATCAGCA GGCTGTCCGG TTCCAGCCGG
3251 TCGGCATATT TGCTTGCCA AAGCTGCTTG GTGCTGTCAA TAAAAAAGGC
3301 GTGCTCCCGT GGCTTGATCT GTTTTTTCAA AAAGGCGCGG TAGGGGGCTA
3351 TTCCCTCGTC GAGGAATTTT TCCACTGATT CGGACTTGGC CAGTGACACC
3401 TCGTTCTGGC GCAGGTAATC CTGAGTGGCG AAACCGACCG GGGCCATTAC
3451 ATAGATGCTA AGGATGATTG CCAGCCCGTA CATCGCCATG TTGGGGGGGA
3501 TTTGCTGCAC GCCCAGGGCG TTGCGCAGCA GTGAAAAGAC CACTGCCATC
3551 TTGACGAAGG AGGTGGCCAT CACGGCGATA AAGGGGAGTA GGGCCAGCAG
3601 GGCAGGCCG ACGATGAGGT TAAGCTCATC TGGTAGCTGG **ATCA**TGCCTG
← **orf4 (ascR)**
3651 CACTCTCCA CTCAAGGTTT CGATACGCAC CCCCAGGCGT CCCTGGATCT
3701 CCACCAGTCG GCCCACGCCA AGCGAGTGGC CGTTGCTGAT GATACGTACT
3751 TCGCCATCGA GGGGCGTGCC AAGATCAATC AGGGCGCCCG GTTGATGCT
3801 GGTGAGGGTG TGCCAGTCCA GCGTCTGGCG GCCCACTTCA AAGCTCACCT
3851 GAATCGGCAG TTGCTCCAGT TCGGTCGGGC CGAAGGGGTC AGCGGGGGTA
3901 GCGTTGTGCA TGGCAGTCAG TTCCAGATGT TGTTGATGGG GTTGGCAGTA
3951 GGCAAAGGGG CGACCCTCCA CGCAGATGGT CAGTTGCTGG CCGAGCTGCG

4001 GATGGGGTGG CGGCAGCAGC ACATCGCCTA TAGCAAGGGC GCCAAGTTCA
4051 TCCATGGTCA ATCCCATCTC GCCCCACTGC AGGGAGAGGA TGAGGGGCAG
4101 CAGCAACCGC TGCTGCTGTG GCCGTGGCGG CAATCTGGTC AGCAGGGGCC
4151 CTGGCTGAGA CAGCCAGAGG GCGAGGTTGG CACCCTCCCG TTGCAGCAAC
4201 AGTTGCAGGG CGGGATCGTC GGCCTTATCG CCACTTTGCT GCCGGGTCAG
4251 CGCCGAGCAG GTGAGGCCAC CGAGGGGTTG TCCCAGCCGC TCGATCAGCG
4301 CCAGTTGCAG GGATTCTGGC AGGCTGAACA GCGCAGCTTG CTGCAGATCC
4351 GGCGCCAGCC AGTGGGCCAG TTCGGCGCCG TGGCAACAGA GTGTCAGGGA
4401 GAGCCCCTGC CACTGCAGTT GCAGCCGGGT ATCGAGCGTA GCCGGAGGCA
4451 AACCGATGGC GAGGGCAAGC TCGCCGCCCC CCCAGCTAAA GTACTGGCGG
4501 TATTGGCTCA GAGTCTGTTG CAGGGTTAAT TCTGCCAGCG AGGCAGAGGG
4551 AAACGTTATC AGTGTCATGTC GTCGGCATCC CACTCGTCAT AGATGGAGCG
← orf5 (ascQ)
4601 CTGCTGGCGC GAGCCCTGAT CGCGGTCGGG CTGGCTGAAG AGATCGAGGG
4651 TGACCCGCTC GCCAGGATGG AGGCGCTGCA GGCGATCGAT CAACTCGCTA
4701 CGCCCCTGAT TGAGCAGCAG CTCTCCTTGG GTGGTGGCGA GGATCTCGAT
4751 CTGCATCTCG CCATGGTGGT GGTTGATGCG GATGGCAAGT TCTCCCAATG
4801 CAGGCAGGGT GAGGCGCAGC AGCGGCGGCC GCTCCGGGCG GCCCAGCTCC
4851 TGATAGATAT CCACCGCCAG CCGCTCCAGC AGTTGACCCA GTTCCCTGTT
4901 GTTTTCGGCA GGTGCCATCC GGGCTAGCTG TAGATCCCCG GGGGTTTTTCA
4951 CCTGCGGGGG GATCAGTTGA TCACCTGCCT CGGGCATCTC ATCGGTCAGA
5001 GTGAGCTCAT TGATGACGGT GTCAGAGGCC TTTCGTTCGA CGTACTCGAC
5051 GTCTTCAGGC AGAGAGGCCC CACCCTGCTG AAGAGCTGCT TGCTCGGCTC
5101 CTAGCGGCAC CTCTGCACCT GCGGTGATCC CGGTTCCCTG CATATCATGT
5151 TGCTGAGAGT CATGCCCTC TTGCTTGGGG TGTGGGACCT GCTCTTTTAC
5201 CAAGGATGGC AACGTTGCCA GAGCGCTCTC CGGTGCCGAC CCTCCCGCTC
5251 CCTCAAGGGG AAGGTGCGGG GTCGGTGTAT TCACCATGGA TGAAGGCGCT
5301 AAAAACGAGT TCTCTGGTGC GGGTAGCTCC ACACCTCTGG TTCCGTCCCTC
5351 CAGCTTTTTA TCTTGTGTAT CCAACATTTT CTGCGATTTT TTGCTCTCGA
5401 TTTCTTCTG GTCACGGGCG GTCACCTCCG AGATGGCAGG GGCGGATAAA
5451 CCGGATGCCT CTCTTGTGAT GAACGGTTGT GTCTGCAACT GCTTTGACTG

5501 GCTGTGAGAA GCTGAAATAT CAGGCTGCCG GGCCGTATCG GCCGCCTGTT
 5551 TTTTTTGCTG TTGTGTCTGC AATAGTTGCT GAGGCTGCGG CTCCTGTGTC
 5601 TGCAATAGTT GCTGAAGCCG AGGCTCCTGC GTCTTGCTCT GGCCATTCGC
 5651 CCTGTGCTGG TAGGTTGCCT TTTGTTCTCG CTCAAGCCGC ATCGCCTGCT
 5701 CGAAACGCTG CTGTTGCGAC CGATTGGCCT CAGCCATCGG GCGTTCGCCC

 5751 GGTGCTGTTA CTGCGCCCTT TATCGGGAGG ATTTCGGTTC**CA** **TGACTCGTTA**
← **orf6 (ascP)**
 5801 CATCCTGATC TGCTGGCGGA ACTCTTCCTG TTCCTGCTCT TCGTTGTAGT
 5851 CACGCAGGGC TTGCTGTGAG GCCAACTCCT GACGGTGTAG TTCGGCAAAT
 5901 TTCTGTTGCT GCTGGCGGGC GCGGTGTACC GCCTGCTGGC GCTCCTGCAA
 5951 GCGGATGCGC TCTTCGGCAA CGCGCTCGGC CTGCTCGGCG GCACTTTGCT
 6001 CCAGTTGCGC CTCTTTCTCC CGCAGCAGGG ATRACTTGCTG TTGCCACGCT
 6051 TTGAGCCCCT TGCATCGAG CTGCTCTGCC TGACAGATGG TGAACAGTCG
 6101 CTCCTCCTCA GCAAGGCGCC ACTGGCGATA GGCCTGGCTC TCCTGCTCTG
 6151 CTTACAGTTG GCGGATACGG GCGAGTTGCA CACGCGCCTG TTGTGCGGCG
 6201 AGCTGCTGTT CGGCCCGATC CAGCCGCATG TCTTTGATCC GTTGACAGGCG
 6251 GCCAA**TCA**TC GGGTCAGTGC CTCCAGGGTC GTGAGGGCTT CTGGGAGTGA
← **orf7 (ascO)**
 6301 GCTAGGTTCA TGGGTTCCCT GCCTGAGCCA CTGGCGAATC GCCTCGATAC
 6351 GGGCGATCGC CTCATCGGCC ACCTTGTCTT GACCTTTCTG GTATTTCGCCG
 6401 ATTTGCAGCA ATAGCTCCAC CTCTTCATAT TTCGCCAGCC AGCTGCGTAT
 6451 CCGACCGGCC TGTGCCTGAT GCTCGGGTTC GATGATCTGG TTCATCACCC
 6501 GGCTGGCGGA GCGCAGCACG TCGATGGCCG GGTAGTGGTT GGCCGCCGCC
 6551 AGTTTGCGCG ACAGTATGAT GTGGCCATCA AGGATGGATC GGGTCTCGTC
 6601 AGCGACTGGC TCTGTCATGT CATCCCCCTC CACCAGCACG GTATAGAGGG
 6651 CGGTGATGGA GCCCTTATCC GACTGACCGG CGCGCTCCAT CAGGCGGGGC
 6701 AGGGCGGCAA ATACCGACGG CGGATAGCCC CGTCTGGTTG GTGGCTCGCC
 6751 GGCGGCCAGA CCAATTTCCC GTTGGGCACG GGCAAACGG GTCACGGAGT
 6801 CCATCAGCAG CAGCACTCGC TTGCCCTGAT CGCGGAAATA TTCGGCGATG
 6851 GAGGTGGCGA CAAAGCCTGC CTTGGCCCGC TCCATGGCGG GGCGATCCGA
 6901 GGTAGCCACC ACCAGCACCG CCTTCTTGAG CCCCTCTTCC CCCAGATCAG

6951 CTTGATAAA CTCCCGCACC TCCCGGCCAC GCTCACCGAT CAGCGCCAGC
7001 ACTGTGACAT CCACCTCGGC ACTGCGAATA AGCGAGGCCA GCAGGGTGCT
7051 CTTGCCGCCA CCAGCCGCCG CGAAGATCCC CATCCGCTGT CCCTCGCCGC
7101 ACGTGAGCAG GCCATCGATG GCGCGAATGC CCAGCGAAAT AGGCTGGGTG
7151 ATGCGTTTGC GGCTCATGGG GGGAGGGGCA TCCCGATAGA CCGGATACCA
7201 GGCGGCGGGT TCCGGCAGAT GGCCGCCACC AAAGGGGTTG CCGAGGCCAT
7251 CCAGCACCTG ACCGAGCAGG TGCTCGCCGA CCCCACCTG ATGCATGGTG
7301 CCGGTCGGGC TCACTTCGGT GTTGGAGGAG ATGCCGAACA TCTCGCCAAG
7351 GGGGGTGAGC AGCGCCTGGT GTTGGGCAA GCGGATCACC TCCGCCTGCA
7401 ACGAGAGGGT GTTGTCGGGG TTGCGCAGAT GACAGAGCTC GCCGATCCGC
7451 ACTCCGGGCA CCACCGCCTT GAGCAGGGTG CCGGTCACCT GGGTGACCCG
7501 GCCACGGATC TGGATCAGGC GGCACCTCGTC GATGGCATGA CGAAGCTGGC
7551 CGGGGATGTG GTCGAGGGAG AGGTT**CATAG** AGATCTGCAC CATTGAAACT

← orf8 (ascN)

7601 GGTGGCCACT ATAGGGGATG GCGTGTACG GGCATTTCAG CGCGAGTCGG
7651 GACTTTTTAG AAAACCGTTG GGGGCGGGC TAAAAATTCAC GGCCGATTTT
7701 GGCATAGGGA CGCGGGGCA ATTTTTATAA TGCCACCCTC ATCAATCCAT
7751 TCGTCACGGG AGTTTCC**ATG** GCCATTATCC AGAGCAACCC CTATGCCCCT

orf9 (aopN) →

7801 GTCGCCCAGC CCGAGTCGCG TGGCGCAGAG GTCGCATCCC GTCAGGCTCC
7851 CCTGCCGGGG GGGCAGTTTC AGGGGGAGCG GGTCTGTCTG GCCAGTGCGT
7901 CCCAGTCCCT GGCCGATATG GCCGAAGAGC TCACCTTCGT CTTCTCGGAG
7951 CGTAAGGAGC TGTCGCTGGA CAAACGCAAG CTGAGCGACA GCCATGCTCG
8001 CATCAGCGAG ATCGAGGCAC TGGTCGGAGA CTACCTCGAC AAGGTGCCGG
8051 AGCTGGAGCG ACAGCAGAAG ATCAAGGAGA TGGTGAGCCA CCTTGGCAGC
8101 GGCCGCTTGG CCAACCTCTC CCAGTTGCTG GCCTATCTCG AGAGCTATTC
8151 GGGGGAGGTG AGCGAGCAGT TCGACGCGCT TTGTCAGGCG CGCAAGGCC
8201 TCTCTGGACG GCCTGAGATG CAGGGCACCC TGGCGCTGGT CGAGCAGGCG
8251 CTGGCCAAGC TGGCTGACGA GCAGGGTAGT GCCATCGTGT TGGGGGCACG
8301 CATTAGCGGC CCTGCGGCCG AGGCAGCCCG CGCCGGTGTG GGCGGTGAGC
8351 AGGATCTGCG AGATCTCTAT CGCGATGCGG TGCAGGACTA TCGCGCGCTC

8401 TCCACCGCCT GGC GTGATAT TCACAGCCGC TTTGGCAACG GCGCGCTGGA

8451 GAAAGTGACC GGTTTCATGA TGAAGGCCCT CAGCGCCGAT CTCGACAGCC

8501 AGCAGCGCTG GCTCGATCCG GTCAAGCTGG AGCGGGTGAT GAGCGACATG

8551 CACAAGCTGC GGCTGCTCAA TACCCTCTCG GCGCAAGTAG ACGAGCTGTG

orf10 (acr1) →

8601 GCAACGGGTG AAGGAGGGGT CGGCTC**ATGG** CATA CGGGCC TTC**TGA**TCTG

8651 ATGGGCGATC TCATCGCCCT GGTGGAGAAA CGTTGGGCCA GTGTGCGGGA

8701 TGTGGAGCAG GTCGGAGCAG CCCTGGAGCT GTCGGAGAGT CGCCAGCAGG

8751 TGCTGCTTTA TCAGGAGCTC AAGCGGCTGA TCCGCCTGCT GCCGGTGGAG

8801 CTGTT CAGCG AAGAGGATCA GCGCCAGAAC CTGTTGCTGT GCTGTCAGGG

8851 GCGCCTCGAT AACGCCATCG AGCGCGAAGA AGATGAGTTG TCTGGAGAGT

orf11 (acr2) →

8901 CGTC**ATGA**AC TGGATTGAAC CCCTGCTGGT GCACTTTTGC CAGGATCTGG

8951 GCATCACCAT CGGGGATACC CCCCACTCGC TGATCCAGCT GGA ACTGGAG

9001 CAGAGTGGCA CCTTGCAGTT GGAGCGCCAT CAGGGACAGC TGACCCTCTG

9051 GCTGGCGCGC GCCGTGCCTT GGCATCAGAG CGGCGAAGCG ATCCGTCGTG

9101 CCATGACCCT CACTGCGGCG GCGCAAGGAC CGGCGCTGCC GGTACGCTGC

9151 GGCTGGCTGG GAGAGGATCA GCTGCTGCTC TTCGTCACCC TGATGAGCG

9201 GGCCGTTACC CTGCCCCAGC TCCATCAGGC GTTGACCACC CTGACCCGGT

9251 TGCAACATGA GGTGGTCGCA CCA**TGA**GCCG GATTACCGCT GCCAGTGATC

9301 CGGGCATCGC GCAGCCGAGC GGCATGACAG CAAACCGCAG TAAGGGGTGG

orf12 (ascX) →

9351 AGCAT**ATG**AG TCGAATTACT GCTGCACATA TCGGTATCGA GCAGCTCAGC

9401 GCCATCTCCC TGGATGATCA GGAACGTAGT CTGCCGGGGC GTTATGCCCT

9451 GCTGCCGGAT GGTCAGTCTA TCGAACCCCA TATCAGCCGC CTCTACCCCG

9501 AGCGGCTGGC GGATCGGGCG CTGCTCGATT TTGCCACCCC CCATCGCGGC

9551 TTCCACGATC TGCTGCGCCC CGTTGATTTC CATCAGGCAA TG CAGGGGCT

9601 ACGAAGCGTG CTGGCAGAGG GGCAGAGCCC CGAATTGAGG GCTGCGGCCA

9651 TCTTGCTTGA GCAGATGCAT GCCGATGAAC AACTGATGCA GATGACCCTT

orf13 (ascY) →

9701 CATCTGCTGC ACAAGGT**ATG**ACCATGGTTC TCTCGTCACA GCAGCAGGAT

9751 GCGCTGCTGC TTACCGGCTG GCTGCAACTG CAATATGGCC ACCCCGATCG

9801 GGCCTGTGTT CTGCTGCTGG CTCTGCTGTT GATCCACCCC TCGCATCAGC

9851 AAGGGCGGCG TACCCTGCTA GTGGCTCTGC TCAAGCAGGG CGAGGGGGAG
 9901 GCCGCGCTGG CCCATGTCTGA TCAGCTGATG CTGGAACGTG AGGCCGACGG
 9951 CCCGCTCTGG CTCTGTCTGCA GTCGCGCCTG CCAGCTGGCA GGGCGGCTCG
 orf14 (ascV) →
 10001 **ATG**AGGCCCG CTTTGCCTAT CAACAATACC TCGAACTGGA AGAGCAGAAT
 10051 GAATCAACGT TCCCT**TGAG**GC TGCTGCGCCG GATAGGCGAG CGCAAGGACA
 10101 TCATGCTGGC GGTGCTGCTG CTGGCCATCG TCTTCATGAT GGTCTTGCCG
 10151 CTGCCGCCGG TGGCCCTCGA TATTCTGATC GCCATCAACA TGACCATTTT
 10201 GGTGGTGCTA CTGATGATGG CGGTCTATAT CAATTCGCCA CTGCAGTTCT
 10251 CCGCCTTTCC GGCGGTACTG CTTATTACCA CCCTGTTCCG GCTCGCGTTA
 10301 TCGGTGAGTA CCACCCGGAT GATCCTGTTG CAGGCCGATG CGGGGCAGAT
 10351 CGTTTACACC TTCGGTAACT TCGTGGTGGG GGGCAATCTG GTGGTGGGGA
 10401 TTGTCATCTT CCTGATCATC ACCATCGTTC AGTTTCTGGT GATCACCAAG
 10451 GGATCGGAGC GGGTGGCGGA GGTGAGTGCC CGCTTCTCTC TTGATGCCAT
 10501 GCCGGGCAAG CAGATGAGTA TCGACGGCGA CATGCGCGCC GGGGTGATAG
 10551 ATGTACACGA GCGCGGGGAT CGACGCGGGG TCATCGAGAA GGAGAGCCAG
 10601 ATGTTGCGCT CCATGGACGG TGCCATGAAG TTCGTGAAGG GCGACGCCAT
 10651 CGCGGGCCTC ATCATCATCT TCGTCAACAT CCTCGGCGGG GTCACCATAG
 10701 GGGTGACCCA GAAGGGATTG TCTGCCGCCG AGGCGCTGCA GCTCTACTCC
 10751 ATCCTGACGG TGGGGGACGG CATGGTCTCC CAGGTGCCGG CATTGCTGAT
 10801 CGCTATCACT GCGGGGATCA TCGTTACCCG TGTCTCTTCC GAGGAGTCCT
 10851 CCGATCTGGG TACCGATATC GGCGCCAGG TGGTTGCTCA GCCAAGGCG
 10901 CTGTTGATCG GTGGCCTGCT GCTGGTGTG TTCGGGTTGA TCCCGGGCTT
 10951 CCCTATGATC ACCTTCTTTA CCCTGGCGGC CATCGTCACG GCCGGGGGCT
 11001 ACTTTATCGG GTTGCCTCAG CGTAAGGAGC AGCACAGCAA TAGCCAGGAT
 11051 CTGCCCCTG TGCTGGCCCA GGGGGCCGGT GCGCCCGCAG CTCGCAGCAA
 11101 GCCGAAACCG GGTGGCAAGC CGCGGGGCAA GCTGGGGGAG AAAGAGGAGT
 11151 TTGCCATGAC TGTACCCCTG TTGATCGACG TGGATGCGGC GCTGCAGGCG
 11201 GATCTGGAGG CGATTGCCCT CAACGACGAA CTGGTGCGAG TGCGGCGCGC
 11251 CCTCTATCTC GATCTCGGGG TGCCCTTTCC GGGTATTCAC CTGCGTTTCA
 11301 ACGAGGGGAT GGGGCCCGGC GAATATTTGA TCCAGCTGCA AGAAGTGCCA

11351 GTGGCGCGCG GTCTGTTGCG GCCGGGCCAT CAGCTGGTAC AGGAGAATGC
 11401 CTCCCAGCTC GATCTGCTGG GGATCCCCTA CGAAGAGGGG GCGCCGCTGT
 11451 TACCTGGTCA GCCCACTCTC TGGGTTGCCA ATGAACATCA GGATCGTCTG
 11501 GAGAAGTCGC GGCTTGCGAC GCTCACCCT GGTTCAGGTAG TGACCTGGCA
 11551 CCTTTCCCCT GTGTTACGTG AATATGCCGA GGACTTTATC GGCATTCAGG
 11601 AGACTCGCTA TCTGCTGGAG CAGATGGAGG GGAGCTATGG CGAGCTGGTC
 11651 AAGGAGGCGC AGCGCATCAT TCCGTTGCAG CGGATGACTG AAATTTTGCA
 11701 GCGATTGGTG GGGGAGGATA TCTCCATCCG CAACATGCGC GCCATTCTGG
 11751 AGGCCATGGT GGAGTGGGGC CAGAAGGAGA AGGATGTGGT GCAGCTCACC
 11801 GAGTACATCC GCAGCAGCCT CAAACGCTAC ATCTGCTACA AGTACGCTAA
 11851 CGGCAACAAC ATACTGCCTG CTTATCTGCT CGATCAGCAG GTGGAAGAGC
 11901 AGATCCGTGG CGGTATTCGT CAGACCAGCG CTGGCAGCTA TCTGGCGCTC
 11951 GACCCTACCA TTACCCAGGG CTTTCTCGAT CAGGTGCGGC ATACCGTAGG
 12001 TGACCTGGCC CAGATGCAGA ACAAGCCGGT GCTGATCGTC TCCATGGATA
 12051 TCCGCCGTTA CGTACGCAAG TTGATTGAGG GGGATTACCA CGCCTTGCCG
 12101 GTGCTCTCCT ATCAGGAGCT GACCCAGCAG ATCAATATCC AGCCGCTCGG
 12151 GAGGGTCTGC CT**GTGA**GTGG CGATCCGCTA ACCTGTGACC CCTTGATCCC
 12201 CTGGCTGCAA GCCAGGGGGC TCGACGTGAC GCCCTACCAT CTGGGCAATA
 12251 CCCCAGTCCA GCTTGGTCAC GGTTTTTGTT ATCGCCATAT CTACCTCGCC
 12301 TGGCGGGTTG ACCTTGCGAC CCGGCGGGTC TGGATCCTGC TGGTGCGCCG
 12351 CCAGGGGGAG CAGGCCGGTC TGGTCAATCC CTTTGCCGCC CTCTATCTGC
 12401 TGGCCGAAGC CACTCAGGCG GTGCTCGGCC CGGGTCATGC CCTTTACGGC
 12451 AACGTCGATG TGTTTCGCGG CAGTTCCTT AGCGGCGAGC GGCTCGGCCG
 12501 TTTCTACTTG CGCTGGACCG GCGCCAGCGA ACCGGAGCCC GGCTGGTTCT
 12551 TGCTGGCGGC CGAACAGGTC TGTTGCTGCG GGGATATGCG AAAACGACAA
 12601 AAGCACGGCC TTGCG**TG**ACA GGCATGTCCA AAGGGCCTC **AT**AGAATAGG
 12651 AGCCAAG**ATG** AAACAACCGC GTTTTGCCCA CCATAGCGAG ACCATTTTCGC
 12701 AGGCAGAGCA AGCCATCGCT GACAGTGATC ACCGCAACGA TCTGTTGAAG
 12751 GAGATGCTGG CCGGACTTGC CCTTTCGGAT CAGACCTGTC AGTTGCTGTT

orf15 (acrR) →

orf16 (acrG) →

12801 TGATGCCCCG ACCGAACGGG TGGCGGTGGC CGAACAGGAG TTGTTGGCGG
 12851 AGATCCAGCG CAGACAGGCG CTA CTGCGCGG CCCAGCCGGG AGAGGACCGC
 12901 AAAAGCAGGC GTCCGACCAT GATGCGCGGA CTGATGATT **AA**GGAGTTGT
orf17 (acrV) →
 12951 **GATG**AGCGTT ATCCCTGACT ACAACAGCAA TCCTGCCGGA TTTGTGCGCT
 13001 GGCTCGGTGG GCAAGCGGTC GATACCTTGC CGGGCCATAA CAATCCCAAG
 13051 CTGGCCGAGT TGCTCGCCTT GCTCGAGGGC AAGATCACCA TCAGTACCGA
 13101 CCAACCGACC GTGCTGAGCA AGGCCAGCT GGAGAAGCTG CTGGCGAAGT
 13151 ACTTGACGGA CCCAGCCACG GTCACTGGGT CATGGCCAC CGATCAGTTT
 13201 TTGCGAGGCC AAGAAGCAGC CGTTACCGCC ATCAAAGGGC TGATTGAGCA
 13251 AGGTGAGAAA CGAGAGCCCA AGGTCACCAG CTGGACCGTG TCTGAATTTA
 13301 TGCTGCTCTC CTT CAGTGCG TTGACCATGG ACCGCATTGA TGACGACATC
 13351 ATCAATGTCT TTACCGGGGT GATGGCGTTT CAAGACAATC AGCGTAAAGC
 13401 TCTCGGCAAT GAACTGAAAG ATATGACCGC CGAGCTCAAG ATCTACGGGG
 13451 TGATCCAGTC TGAGATCAAC AAGGTGCTCT CTGCTGCATC CAGCCAGACC
 13501 TTCAACACCG ATTTCAATCT GATGGATTAC AAGCTCTATG GCTATGAGTC
 13551 ACTGGCCAAA TTTATGGACG GGGCAGAGTT CAAACTGTTG TCAAAAAATGT
 13601 TTACCGACGT ACAGGTTAAA AAAGCACAGC AAGATTTAC CAACGCTAAA
 13651 AATGAGCTGG AAAAAGTAAA GTCGGCCAGC CTCGACCCCA AAACCCTGGA
 13701 GGAAGCTAAT GCCGATTATG AGAGTAAAAA AGCCATTCTT GAGAAGAGCG
 13751 TAGAGAAGCA GAGCATAACC GTTAAATCGT TCCTCGAAAAG TGACCAGAAG
 13801 AAGAGTGGCG CGATGAAAAA TATCGAAGCC AGCTACAGCT ATGACAAGGA
 13851 CAACAACAAG CTTGGCAACT TCTCCACCAG TGTGAGTGAC CGCTCCCGTC
 13901 CGCTCAACGA TCAGGTCAGC GAGAAGACGA CCCGCCTCAA CGATGTCAGC
 13951 TCGCGCTACA ACGCCGCTAT TGAGGCACTC AACCCTTTA TCCAGAAATA
orf18 (acrH) →
 14001 CGACAGCATC ATGCGCGACA TTCTTGGCGC TATT **TAA**GGA GAGACC**ATGC**
 14051 AGACCGACAC CACCCTGACC CCGGAATATG ACGCCGAGCT GGAAGCCTTT
 14101 ATGGCAGATG GTGGCACCTT AGCCATGCTG CAGGACATCT CCAGCGATAC
 14151 CCTGGAGCAG CTCTATTCCC TGGCGTTTGG CCAGTATCAG GCGGGCAAGT
 14201 GGG AAGATGC CCACAAGATT TTCCAGGCGC TCTGCATGCT GGATCACTAC
 14251 CAGCCGCGCT ATTTCTCGG GCTTGGTGCC TGCCGTCAGG CGATGGGCGA

14301 GTTTGAACG GCGGTTTACA GCTACAGCTT TGGCGCCATG CTCGACCTGA
 14351 AAGATCCCCG TTTCCCGTTT CATGCCGCTG AATGTCGGTT ACAACAAGGT
 14401 GATTTGAACG GGGCCGAGAG TGGCTTCCAC TCGGCCCACT TGCTGGCGGA
 14451 CGCCGATCCG CTGCAGGCTG ACCTGGCGAC AAGCGCCAAG GTTATGTTGG
 14501 AAGCCGTTCG AATCAGAAGG GATCTGCAAG **orf19 (aopB)** → **ATGA**ACCCGA TCAGCAA**TGA**
 14551 AAGAAGCGTT TCCCCGCTGG GAAACATTGG TGAGGTCGCG GGCCTGACGC
 14601 CCGTTACCCA ACCACGTAGT GAGACACGGC TCGATGCCGC GACGGCGCAG
 14651 GCCAGTGGGC CAGCCCGCAA GTCTGGTGTC TCGTTGAACG CCCCCCTTGC
 14701 CGTGAGTAAT GGCCAGCTCG GAGCAGAGCA GTTTGCGCAG GTCAATAAGC
 14751 TGATCTCCAC AGTTAAGGGG AGTGTCATGG CGACCCTGCC GCACGTCAGT
 14801 GCGCTGGTCA CTGCGGCCTT TACGTCACCC GCCGCGTTTCG AGATTGAGTT
 14851 GGGCAGGCTG ACCAGCGATC TGGAGAAGAG TCAGAACAAG CTGAAGCTTG
 14901 AGGATATCAA GCGTGCTCGC GATCTGAACG AGAAGAAGAT CGGCGAGAAC
 14951 CAGGAGAAGA TCAAAGAGGC GGAAGAAAGT GCCAAGGAGG CCAAGAAAGC
 15001 CGGTATTTTT GGCAAGATTT TTGGTTGGCT CAGTGCCATC GCCTCGGTTCG
 15051 TTATCGGTGC CATCATGGTG GCAACCGGTG TAGGGGCTGT CGCCGGTGCT
 15101 CTGATGATTG CCGCCGGTGT GGTGGCATG GTCAGCATGG CCGTACAGCA
 15151 TGCCGCTGAT GCGGGCCTCA TCTCCAAGGA GGTGATGGAA AAGCTGGGGC
 15201 CTGCCCTGAT GGGGATTGAA ATAGCGCTGG CCGCGCTTTC GCTGGTTCGCG
 15251 AGTTTTGGTT CCTCTATTGG CACTCTATT AGCAAGGTAG CAACCAAGAT
 15301 TGGTGGCAAG GCCGTGGATA TGGCCGCCAA GATGACTGCC AAAGTCGCGG
 15351 AGCTGGCAGC CCAGTTCACG GCCAAGAGCA CAGTTGAAGC ATTGAAGGTG
 15401 ACCGGGGCCG CTGCCAAGGT ATTGAAAGCG GGTACCCAGG CAACAGATGT
 15451 GCTTGTCGAT GTCAGTGGTG GCGTGACCAA AACGGTCCAG TCTGTGAAAG
 15501 AGTCTGCGTC ATTGAATGCG CAGGCTGATC TCGCGTTGAA CAAGAGCGAG
 15551 ATGACCCAGT TACAAGGAGT TATCGACAAG CTCAAGGAGG CAATTGCCCA
 15601 GATGATCGAG GCGTTCCAGC AGACCATGGA GATGATCTTC CAGATCATCA
 15651 ATGCCAGGGG CGACATGATG AACAACTGG CCCGCAGACC CGCCGCTATT
 15701 **orf20 (aopD)** → **TAA**GGAG**GTGC** CGACCATGAT TAACAGTGAT TATGCAAACA GTGTGACCCA

15751 GACAGTTCCG TTGACCAACG TGCTTAGCAG TGACGTGCAG CCGGTTTCGCA
 15801 CTCAGGGCAC CAACCATGAA GCGGCTGGCA CTATCAACAG CCAAATGCCT
 15851 GGTA AACAG GTGTTCCCGT GTTGCCGCGC CCCTCGATCC CTTTCGATAC
 15901 CAAGGGGGTT ACTCAAATTG TCGGCCAGCT CGAAAGCTCC ATGGATATGA
 15951 TGTCCTTGCT GTTCCAGCTG GCCCGGCAGG CTCGGGAAGA GGAATACAG
 16001 CTGCGGGATA TCGAAAACAA GCTGGTTATC AGTCACCAGC AAGCGCAGGT
 16051 TGATGAGATG CGCAATGGTG CCAAGTTGAT GATCGTCATG GCGGTAGTTT
 16101 CCGGTGTGAT GCGGGGTGTT TCGGCCTAA TGGGGGGCTT CTCCCTGGCC
 16151 AAATCGACTA AGGCCATCAA GCAGGACAAG GCACTTAACG CCAACATTGC
 16201 CGGGCGGCAG CAAGACTTGA AGCAAGTCGG GGATATCAAG AAGCGGCGG
 16251 GCCTGGAAAT GGGGGATGCG GGCCAGGATC TGA CTGCAAG GATCAAGAAC
 16301 GACAAGGCTG CACTGCAAAC CCTGAACAAG ACGTTTGATA CCAATAACAG
 16351 CCGTCAGCAG ATTTTTAATA CCGTGATCCA GTCGTTAGGG CAAGCAGGTA
 16401 ACTCGGCGGT GCAAGTCGCT CAGGGTGATA GTCAGGCAGA TGCCAAGGAA
 16451 GATGAAGTGA ACGCAAGCAT CAGCCAGACT GAAAAGCAGA AGGCCGAGGA
 16501 TTATCTCTCC TTCATGCAAA ACCTTATGAA TGA CTTGGTG AAGATTATGC
 16551 AGCAGTACTC ACAGAGCCAG AACCAGACTT TGAAAGCGGC ATTCGGTGT
 16601 GCAT **TAAA**ACAC CCTGGTTAGC **AAGGC GCCC** CGT **GGGCGCC** **TTTT**TTTTTTT
 16651 TCCGGCCATT TTTCT **TAAAA** GTGGCGTCCT **TGAGTGACAG** **CCTACATGGA**
 16701 CGTGGCAAGC TAACATCAAC TCCTCTGTGC **orf21 (axsC)** → TGGAGGAAAT CATGGATGTA
 16751 ACTGTCATCA TCAATCGGCT GCTCACTGAG TTTGCCACCA AATATGGTTT
 16801 GCCATCCCTG ACCCTGAATC AGGAGGGGGT TGCTGCGCTC TGTTTTGACG
 16851 AGCAACTGCA ACTCAGCCTG ATCCTGGTAT CGGAGCGGGA TCAGCTGGTG
 16901 TTGCAGGCCG ACGTGGCCGA GCTCCATCAG GTAGGTGAGG GGATTTTTTCG
 16951 TCAGTTGGCC AGCTTCAATC GTC ACTGGTA TCAGTTCAAT CTCCACTTTG
 17001 GTTTCGATGA AGAGAGCCTG ACGGTGCAAC TTTATCGGCA GATGACGGCA
 17051 AGCCGGTTGA CCCTGGCATA CCTTGAAGAG AGTCTCGCCA GCATGCTGGA
 17101 GCATGCCGAG TTCTGGCAAG AGTTGCTGCA ACCTGGTACT CGGGACGCAG
 17151 GCGGTAGTGA TCAGGTGATG GGAGTGCGGG TA **TAA**CC**ATG** AAGATTCAGG
 17201 AATCACAAGG CGCACTGGCC CTGCATGCGG CAGAGCCGGG CAAGGTGGGG

17251 GGATTTGCTG GCAGAACCAT GAGTGCACAG CCAGCCAGTG CGAGCCAAGT
 17301 TCCCCTGTCG GCACTTCTGC GACGCTCCAT TACCCTCAAT CAAGTACAGG
 17351 AGCTGGCGCT TCAGCGACTG CAACAGGGCG AGCATACTC ACTGGCCGAA
 17401 CGTCGGATCC GGGTGT**ATG**AGAGGTCTGC TGGCACTGAT GCTGTTGGTC
 17451 ACGCTTGCCG GTTGTGTTAC CACCCAGAG CTGAAGCCAT CTCTACAGCA
 17501 ACTCAAGGGA GAGGTGCATT TTCCTGCAGC CTTGCCACGC CCGGCCACAG
 17551 TCGAGGTGGC AGTGTGAGC GTGATTGAGG GGCGCCCTT GCAAGTGGCG
 17601 GCTACCCGCT ATGAGGTGAG CATGCTGCCA TTGCTATTTG ATTTACGCTT
 17651 GACTCCCCTG CAATTGGCAG AAGGGGAGAT CTATGTGCGT GCCAGATTGC
 17701 GATTTATGGA TAGCACAGTA GTGCAGGCCA TGAGTCAACA GAAAGTTTTT
 17751 AAGGTTTTTA ATGGCGAGAG AATCATTATT CAATTGCAGC CCAAACATTG
 17801 TTATCCACTG TGTCAG**TAGT**GGCCATGTTT AAATAAAAAA CACT**TAAATC**
 17851 AATC**ATTTA**TAATTTCTTT CGGTTAAAAC TGAAAGTTTC TTTTTGTAAC
 17901 GAAGTATATT TCTCTGTAAG CACAATATGA AGTATGAGCC GCTCTAGTGG
 17951 ATGAGTAGTG CGTTAACTCT AATTTAGAC TGGTTTTTCT GCTTGTGACT
 18001 GTTGTAGGAT TCGTCCTCAT TTCAATGGTG GTTAATT**TTA AAATC**ACCAG
 18051 ACGATGTGCT TAATTA AAAA **A**TAAAAGCCA ATAAGAAACC ACCCGACAGA
 18101 GCGTGCTTC TATCGAGGTG TCACTGGCAC TACACGCAGA TTCAGGTTCA
 18151 GGAAAACAAA AAAT**ATGA**AT GGCATTACTA CTGCAGAGAA GGGCGATATG
 18201 GCCCTGCTCC AGTGGTGCAT GTCTGCTTTC AACGTCATCG AACATCCGCA
 18251 AGAGGGAATA TATATCCTTC TTGAAGGTTT GATAACCTGG CAGGACTGTA
 18301 CCGATACCTA CGAACTCACC CCCAACCAAC TCCTGTTCGT GCGCCGTGGC
 18351 AACTACGCGG TTTGTACCGC TGGCAGCCCC TGCCGCCTGC TTTGGCTGCC
 18401 CCTGTCAAAC AGCTTTTTGC AAGGATTCTT GCAACGTTTC GGTTCCTGT
 18451 TGAGCGAAGT CGCCCGGCTG GAGGGGATGG CCCCAGCCTG GTTGCCGTTT
 18501 CACTCTTCCC CCCTGCTGAC CCAATGTATT CAGGGGCTGT ACGGTTTGAT
 18551 TGACCATGAG CATCCGCCC GACTGGCCCA ATTACGCACC GAAGAGCTGC
 18601 TGTTTCTACT CGCCTTTGGT GAGCAGGGGC CTCAACTGAT GTCAATTTTG
 18651 CGTCAGCTGA GCAATCGTCA GGTCGAGCGG TTGCAACAGT TCATGGAAAA

orf23 (axsB) →

orf24 (axsA) →

18701 GCACTACTTG ATGGAGTGGA AGCTCAGCGA ATTTTCCAAA GAGTTCGGCA
18751 TGGGGCTGAC CACCTTCAAG GAGCTATTCG GCTCGATATA TGGTGTCTCA
18801 CCGCGAGCCT GGATCAGTGA ACGGCGGATC CTGTTTCGCTC ATCAGTTATT
18851 GCTCAATAGC CCTTCTAGCA TCGTTGATAT TGCGATGGAG GCCGGTTTTT
18901 CCAGCCAATC TTATTTTACC CAGAGTTATC GCCGTCGTTT TGGTTGTACG
18951 CCAAGTCGTG CCAGACATGG CACTGAT**TAA** CGCCGGA**CTA AAATA**AATCTG
19001 ACGTTTTTTA TAAGCCGCGG AGCGAGGCAA TGGATAGAAT AGCCAGCATA
└─ **orf25 (axsD)** ──▶
19051 TCGAAACATC ATTCCAT**T**AT TGCCCGCAGC AAGATAAGCA AGGCATAGCA
19101 **TG**AGTCAGCA AGATCACAAT TCATCTAACC AAGGCCTGTT TGCAGGTCGT
19151 CGGGTTACCG TTGTTTCAGCC AGATACCTTG AGTCGGGATC GTCTGGTCGG
19201 CCAACTGTCC GTGCTCCGTT ATCAGGATGC CGGCGTGATC ACCTCGCAGC
19251 AAATGGACCT GTTGCAACGG CTGTTGCCAA GAACCCGGCT GGAGAGCCTG
19301 CTGGAATCCC TCTGGTTCCA GCGTCGTCTG GATGCCGCGC TGAGCGTCTC
19351 TCGCGAAGAG CTGCAACAAA TTCTGCGGCT GGCGGGCAGT GAGCGATACG
19401 ACTGGCTGCA ACAGCTGGGA GATCGCATCA ATCTGGCGGA TCGCGCCTTG
19451 CTGTGGCACT GGGTCCTTCA CCCTTTGCAT CGCTGGTGGG TGCAGCGTCT
19501 GGAACCGCTC TACGGCGCTT GGCCAACGA GCTGGTACAG CTGCAGGTTA
19551 TGCGCCGTCA ACTCAATGCC CAGGCGGTGT TCTGGCAGAC AGTGGTCGAT
19601 GTGCCGGCGG ATCTGGAGAG CCGGATCACC GACCAGCTTG CGCAGTTGAG
19651 CCAGCGCGAG CAGGAGCTTA CACAACCTGCA TTCCGATTGC GAAGCGCGTC
19701 TTCAGCTGGC TTGGCCCGCC TGGTATGGGC AGACCAGTCA GGAAGGCGAC
19751 CCGGCACTTC TTATGCCGGT ACCGCTGGAG CTTGGCGTAT TCTGGCACGC
19801 CCTGCTGGCG CTGCCCCACC AGGACGACGT GGCCCTTACG TTGCACGAGT
19851 GGCTGGTCGG TCGGGGTATT GCCCTGGGTC AGGATCACTT CTA**CT**GGCAG
└─ **orf26 (ascB)** ──▶
19901 CCTGCCGAGC CC**TAG**ATAGC CCGAGGAACT **ATG**CAA**ACTT** TACTGAATAG
19951 ATTGGCCGCA ACCCTTGGTC AAGGGCCTTT TGTTGCCGAC GCGCAGGGAA
20001 AATACCACCT GCGCCTCGAT GGTATCCGC TCTTTTGGAC CCAGAGAAGC
20051 GGTGAGTTGT TGCTGAGTAC CCCCCTTGCA AGCAGCGGGA CGAACGCTGC
20101 TGCAACAGAT GATCCGGTAC TGCTGAAGCG CTTGCTGCAA CAGGTGGTGG
20151 CTTGGGGTCG TCATACCCCC CATGCCCTGG TGCTGGACGA GCTGGGAAAC

20201 C TTCAGCTGG AGGCCCGACT CGCGCTGGAG TGGCTCGACG AGCAATTGCT
 20251 GGCTGAGCGA CTGAGTCAGC ACATTGCCCT GCTAGAGCAG TTGGAGCCCC
 20301 AATTAACCGA GGCCGCATTG G CCCCCCAGT **GGAGACAGAT** GATATGGCAC
 20351 CCTTGA GCAT GCAGCCCCTG CTGCATCCTT TGTTGTGGTT CTGCCTCTCG
 20401 GTGGCGATCT GGTCGCGCCC AGTCGCGGCG CAGGAGCTGG ATTGGGTGCC
 20451 TATGCCTTAC AGCTATGTGG CGGAAGGAGA GAGTCTGCGC GATGTACTGG
 20501 TCAACTTCGG GGCCAATAT GAGGTCTCGG TGGTGGTCAG CGACAAGGTC
 20551 AACGATCAGG TCAACGGCCA GTTTGAACAT GACGAGCCGC TGGCCTTTTT
 20601 GCAGCAACTC GCCTCCCTCT ACAACCTGGT CTGGTACTAC GACGGCAATG
 20651 TGCTCTATGT CTTCAAGAAC AGTGAAGTAG AGTCTCGCCT CATCAATCTG
 20701 GAGCAGACCG GTGCCGCTGA GTTGAAGCAG GCGCTGCAGC GCGCGGGGAT
 20751 CTGGGAGCCG CGCTTTGGCT GGCGCCCCGA TGCGGATAAC CGGCTGGTCT
 20801 ATGTTTCTGG CCCGCCCGG TACCTCGAAT TGATCGAGCA GACTGCGGTG
 20851 GCGCTGGAGC AGCAGACTCA GCTGCGCAGC GAGAAGACTG GGCCGCTGGC
 20901 CATCGAGATC TTCCCGCTCA AGTACGCTTC GGCCACCGAT CGCTCGATCC
 20951 AGTATCGCGA TACCGATGTG GAGGCACCCG GTTTAGCAAC CATATTGGCC
 21001 A GACTGCTCA GCGATGCCGG GGTGCAAATG GTCAACGGCG AGGGTAACAA
 21051 GAAAGGGGCT GCGGTCACTT CCGGCCAGGC TATCGTGCAG GCCGATCCCT
 21101 CCCTCAACGC GGTGATCGTG CGCGATACCC CTGAGCGGAT GGCGATGTAC
 21151 GGCAAGCTGA TCGCCGCGCT CGACAAACCG GCGGCCCGCA TCGAGGTGGC
 21201 GCTCTCCATC ATCGACATCA ATGCCGAAGA TCTCTCCCAG CTGGGGGTGG
 21251 ACTGGCGAGT AGGGATCCGA ACAGGCTCCA ACCAGCAGGT GATCATCAAG
 21301 ACCACTGGCG ATCGCAAAGG AATTGAAGGC GCTGCGGCGC TTGGCAGTCT
 21351 GGTGGACTCC AAAGGACTCG ATTATCTGCT GGCCAGGGTC AATTTGCTGG
 21401 AGAACGAGGG CAATGCCCAA GTGATTTCCC GTCCGACCCT GCTGACCCAG
 21451 GAGAACACCC AGGCGGTGAT CGACCACAGT GAGACCTACT ACGTCAAGAT
 21501 CAGCGGCGAG CGGGTAGCGG AACTGCAGGG GATTACCTAC GGCACCATGC
 21551 TACGAATGAC ACCACGGGTG GTCCAGATGT GGGACAAGCC AGAGATTAGC
 21601 CTGAGCCTCC ATATCGAAGA TGGCAGCCAG AAACCTAACG GCACGGGGGC
 21651 GGATGGATTG CCCACCATAC AACGCACCGT AGTGGACACC ATAGCCCCGG

21701 TCGGCCACGG CCAGAGTTTG CTGATCGGTG GGATCTACCG GGATGAGATG
 21751 AGCGAGAACC TGAGCAAGGT GCCCTTCCTT GGCGATATTC CCTATCTGGG
 21801 GGCCTATTTT CGCAGCAAGG ATACCCAGAC CCGTCGCTCG GTGCGGCTCT
 21851 TTATCATCGA GCCTCGGCTG ATTGATGACG GCATCGCACA CTATTTGTCTG
 21901 CTCGGAAACG GCCAGGATCT GCGGGCCCGC GTGCTGGGCG TCGACGAGAT
 21951 CTCCAATCAG AGCCTCTCTC TTGGCAAGGT GCTGGGTGGT GCCCAGTGTC
 22001 AGCCGCTGGC CGCGGCACGG GACGTGCAGC AGCTGTTGCG TCAGGGTGGC
 22051 AAGAGCTCCT CCCTTACCCA GTGCCGGATG GGCAACGAAC TGGGATGGCG
 22101 ACTGGTCGAG ATGAACAAGG ATCAAAAATG TACGCCCCTG GCCAGCTGGT
 22151 GTGTGCAGGC GGGCAACGAG GGTGCCACCC **GATGA**GCTGG AAGTGCCGCG
 22201 TATATCGCGG GCTCAACCGC GGGGTAGAAG TCCCTCTGCC GGAGGGGCGT
 22251 CTGGTCATCG GTTCTGATCC CCTCAAGGCC GATCTGGTGC TGGTGGATGA
 22301 GGGGATGGCC GCTGAGCATC TGGTGCTGCT GGTCTAGTACT GAAGGAATCA
 22351 CCCTGCAAGC GTGGGCCGAC GGCATTACCC CGACTCAGGA CGGTGTCCGC
 22401 CTGACCGCGG GGGACCCGCT CAGGGCGGGG ACGCGACTGG AGGCAGGCC
 22451 GCTGCTCTGG AGTTTCTGTG ACAGCAGCCG TGTCTTGCCC GCGCAGTTTG
 22501 ACGACAGTGC CCAAGTGGCT GCGCCACCTC GCCCACACCA TCGTGCTGGT
 22551 CGTACCGACC TGCTGCTGGG CGGAGTTTGC CTGACCTTGA TGATGGGGGT
 22601 GCTGTTCTTG CTGGCCCAAG GTTGGTGGCA GGGCAGCGGT GAAGGGGATA
 22651 CTGCCCAGCAG TGAGCAGACC TTGAAGCGAT TTCTTGCCGC GCCGATCTAC
 22701 CGTCAGGTAG TGATCGGCAA TGCCGAACCT GCGCTGTGGT TGTTATCGGG
 22751 TTATGTGCAT GAAAACAGTA GTCGCCTTGC CCTGCAGCAG TTCCTTGACG
 22801 GCAATGGTTT CAGCTATCGC CTGGATCTGC GCACCATGGA GGATCTGCGG
 22851 CAGGGGGCCG GTTTTATCCT GCAAAAAGCTC GGTTATGAAC AGCTGAAGAT
 22901 CCGCAATGGC GAGGAGCCTG GCTGGCTCAA GCTCAGCGGT GAAATTCAGG
 22951 GGCAAGATGG CAAGTGAAC AGCATTGAAT CCCTGCTCAA GCAGGAGGTG
 23001 CCCGGCTTGC TGGGGGTTGA AAATCAGGTG CAAATCGCCG GTGCCTATCG
 23051 CAAGCGTCTT GATGTCCTAC TACAGGAGCA GGGGCTGACG GGGACGTTGC
 23101 GCGTGCGCGA GGCAAGCGAT CGTCTTGAGC TCTCTGGGCA ATTGGATGAG
 23151 CACCAACTCG TCCTGTTTCA GCAGGTGCAT CAGCAGTTTC GCCGCGAGTT



23201 TGGTGCCTAC CCTGCGCTGG AGTTGATCAA TCAGACCCGA ACACCGCGCC
 23251 AGGATGAGCT GGAGTTCGAT GTGCGCAGCG TTTCGTTTGG CCGGGTGCCC
 23301 TATGTGATCC TGGCGGACAA CCAGCGCTAT CCGGTCGGAG GGGCGACCAC
 23351 CAGCGGGGTA CGTGTGCTGG CTATTGCGCG CGATGCGGGTGT GTGGTGAGCA

orf29 (ascE) →

 23401 AGGGCAAACA GCAATACATC GTCAAATTAA AAGGAGTCGA GCGCC**ATG**AT
 23451 GACCAATTTG GAAACGCGAC TGTCCGGCGC TGATCCGGCG TTTTCCCGCG
 23501 AGCTGCGCGA TCAGCTTGTTG CAGGCGCTGG GCGCTGTAAA ACGCGATTTG
 23551 CTGCGCGGGG GCACGACCCA GCAGTTCCGG GAGTGGCAAC AGCAAGCCGA
 23601 CGCCATTGAG GCGGGCATGA AGATACTTGA ACAGATAGAG GGAGCATGAC

orf30 (ascF) →

 23651 **AGATG**GCCGA TATTTTTAAC CCGGGAAATA CCCTAGACAA GGTCGCCGAG
 23701 AACCTGAAGG GGCAGGCTAA CACAGCCAAT GATGAGGTTC AAAAAGCGAT
 23751 TGAAGCGTTG AAAACCTCCC CGGATGACCC TGCTCGTCTT GCCGAGCTGC
 23801 AACACAAGAT TAACAAGTGG TCAGTGATCT ACAACATTAA TTCCACCGTG

orf31 (ascG) →

 23851 ACTCGAGCTA TTAAAGACAT GATGCAATCT ATCTTGCAGA AGATTTGA**ATG**
 23901 ATGAACACTC AACTCAAGCG ACAGTTGGCC GAGATCGCGC TGGCAGGGAC
 23951 CGGTCACCAT TGTCACCAAG AGGCGACAAC CATCGCCAAT TGGCTGGCTG
 24001 GTGAACCTGA GATGGCGGAG TGTGTGACGC TCATCCGTCT CTCCTCTCTG
 24051 ATGAACCGGG GGGATTACCA GGGAGCCCTG CTGCTGGGTC AAGAGAGCTG
 24101 CACTGCGGAT ATCGAGCCCT GGCTGGCCCT GTGCGAGTGG CGGCTTGACC
 24151 TGCATGATGC GCTGGCACTC AGGTTGGTTC GGCTGGAGCA GAGCGGCCAA

orf32 (ascH) →

 24201 CCGGCCTTGC AACAGTTTGC CGCTGGCCTG CGTGAGCAGA TGGCGTCAATG
 24251 AGGATTGAAG GCGGCGAGCC GTCGGGACAG CCGCCGACTC AGCCACTGCC
 24301 ACCCCCTGAG CCGATTGCC AGCGCCAGTT CGATCGGCTG CTGACCAAGG
 24351 CTCCCGAGCC GGATCTGTTT GAACGCTGGC AGCAGGGAGT ACCACTCGAT
 24401 GGTTTGTTGG CCAATGCAGC CCCATCCGCT CGGCGTGAGT TGCTCTGGCA
 24451 GGTTTATCAA CAGGGTGACA AACGGCAGGC CGAGATTGGA AAACAGCTTT
 24501 TTGAACCGGT AACCAACAAG CTTACCGAGC GATTTGGTGG GCGCCAGTTG
 24551 CCGGTCGTTG CTGCGATAGA TCAGCTCGAA TTACGGGCTC TGATGCGGGA

24601 ATTTGATCCG CTGGCGTCGC GACGAGAGGC GGTGCTGCTG GATCTGCTCA
 24651 GTAAGCTCAA GGGCGAGCAG TGTGTTGTGC CACCCGGGCA TGAATTTCTC
 24701 GATGCGCTGG CCCGGCGCGA GCTGATGACC CTGATCCCGC AAAACGGCAT
 24751 GGTGACCAAT TTGATGCGCC ATTCTCACAA ACTTGATCTG GAGGAT**TGAT**
 24801 **G**GAAATTGCA CAGACTGCCC AGGCGGTTCGT CACCAGCCTG GATGAGTTGA
 24851 AAGCGGTGGA GGCCTCCTCT CCCCATATTG CCAGTTTTGA ACAGGCGATG
 24901 GGCAGTTCTT CCCAGGGGCT CGGTGGCTCC TTGTTGGGGG AGCTGGGGGA
 24951 GTTGAAGCAG CAGTTTACCG ATGCCAAGCA GAGCCTGCAG GCCGAGCTGG
 25001 CAACCCCGGG GGATGATCCC AACAGCCTGA TGCAGATGCA ATGGTCCCTG
 25051 ATGCGGATCA CCATGCAAGA AGAGCTGATT GCCAAGACTG TGGCAAGAT
 25101 GAGCCAGAAC GTAGAAACCC TGTTGAAGAC CCAG**TGA**GGT AGT**GTG**AAGA
 25151 GATCGATGCT GATGGGGGTG CTCTGCACCT CGCTGCTGCT CAGTGGCTGC
 25201 AAAGTGGAGC TCTATACCGG GGTAAGCCAG AAAGAGGGCA ACGAGATGCT
 25251 GGC GTTGCTG CAGACCGAGG GTATTTCCCTC GGACAAACAG CCCGACAAGG
 25301 ATGGCAATAT CAAGCTATTG GTTGAAGAAT CCGACGTGGC GCaAGCCATT
 25351 GAGACCCTCA AGCGCAAGGG GTATCCGCGG GAGAGCTTCT CTACCCTGCA
 25401 GGATGTCTTT CCCAAGGATG GCCTTATCTC TTCGCCGACC GAGGAGCGTG
 25451 CACGCCTGAC CTATGCCAAG GCACAGGAGA TATCCAATAC GCTGTGCGAA
 25501 ATAGACGGGG TGCTGGTGGC CCGAGTCCAT GTGGTGCTGC CGGAAGGCAA
 25551 TGAAGGCTTC AACAAAAAAA CCTCTCCCGC CTCGGCCTCA GTCTTTATCA
 25601 AGCATGCGGC GGATATCCAG CTTGATACCT ACATCCCCCA GATCAAGCAG
 25651 TTGGTCAACA ACAGCATCGA GGGGTTGGCT TACGACCGGA TCAGTGTGGT
 25701 ACTGGTGCCC TCAGCCGATA TTCGCCAGAT GCCGTTGATG GCCCGCAACA
 25751 CCAGCCTGTT TTCCATCGAG GTGAGTGAAG GATCTAAGTG GCGTCTTGCC
 25801 GGTTTGATTG CCCTGCTGCT GGCCTGGTG GTGACCAGCA ACCTGGCCCA
 25851 ATATCTGTGG CACCGGAGCC GGAGTCGCGG **ATGA**CGGTCG GTCTGACCCC
 25901 TTATCAACTG CGCTTTTGCC CGGCCAGTTA CCTTCATGAG GCGCACCTGC
 25951 CCTCATCTTG GGC GCGGGTG CCGGAGATCC TGCCAGAGTG GCGGACTCTG
 26001 CCGGCCAGCA ACGGCGCTTT GCTCGAAGCG CTGACGCTGG GGACTGGCTA

orf33 (ascl) →

orf34 (ascJ) →

orf35 (ascK) →

26051 TGAGATGCCG GCCATGCTGG GCGGCGTTGC ACTGTTTCCT CAAGGTGAGC
 26101 TTGTACAGCT CTTGCGTCGT TTGGGGGCTG TGCTGCATGG AGAAGCGATC
 26151 CGCCACTGTT TGCTGGCACC GGC GTTGC GC CAGGTTATCA CTCTGCTCGG
 26201 GGAGGAGGGA CACAGAGCTG TGCTCTCCCA GCTCGACCTG CTGATCGGTC
 26251 CCTGGCCAGC CGGATGGCAG CAGCCCTTGC CCACCCAACT GGAAGAGGCC
 26301 TCGCTGGAAG TGGCCGGATT ACAGTTCTGG CTAGCAGCAG GGGAGGGCGA
 26351 GCCTGACTGG GCGCGGCGTC TTGCCCTGCG CCTTGCTCCT GCGTCGCTGG
 26401 GCCCCTCATG GCGGTTGACC ACGGATCAAC TGCCGCTGGC TCGGGCGCTC
 26451 TGTCTCAAGA TTGCCAAACA GGTAACACCC **CAATG**CTGCC ATTTGTTGAA
 26501 A**TAA**AGAGTG AACACCTGCA ACTGGCGCCA AGCCAGCGCA TTTTACGCAG
 26551 TCAGGATTAT CAGTCTTACC TGAGTGC GCA GGAGCTGGTG GAGGCGGCCC
 26601 GTGCTCAAGC CGCCGACATA GTGGCGGAGG CCCGCGCTAT CTATGAAGAG
 26651 CAGAAGAGCC TTGGTTGGCA GGCCGGTATT GATGCGGCCC GCCGTGAACA
 26701 GGC GGTGCTG ATCCACCAGA CCCAGTTGCA GTGCCAGGGT TATTACCGCA
 26751 CGGTGGAGCA GCAGATGAGT GAGGTGGTGT TGCAGGCGGT ACGCAAGATC
 26801 CTCCACGATT ACGATCAAGT TGC GCTCACC CTCAAAGTGG TGC GCGAGGC
 26851 GCTTGCATTG GTGAGCAACC AGAAGCAGGT GACGGTGCGG GTTCATCCCG
 26901 AGCAGGTGCA GGCGGTGCGC GACCAGATCG CCCGGGTACA CAAGGATTTTC
 26951 CCCGAGATCG GCTATCTGGA GATTTCCGCC GATGCCCGGC TCGATCAGGG
 27001 CGGCTGCATT CTGGAAACTG AGGTGGGGAT CATAGACGCT AGTATGGATG
 27051 GTCAGTTGGA GGC ACTTGCC ACTGCTATGG CTGCGGTTTT GAAAAAACGT
 27101 AGTGAGCAGT TGCCTCGTGA AGATAACGTT ATGTTAGCCG CAGTG**TAA**GT
 27151 TGACCACTAC AGAGAGCCAA GATACAAAA **AGGTTGGCTT CATGATGAAG**
 27201 **CTAACCTTT** TTTAAAAAAT GGTGCCGGTA AGGGGAGTCG AATCTTGCGG
 27251 CAATTTGTT GTTTTTAAAA GGAAAATAAA TTCTCTCTGT AGGTGATAACC
 27301 CCCTTATGTA CCCCCAAATG TTTTCTGTG GTCGCAATCA GGGTGAAAAT
 27351 TCAGCAGCCA TAATCGGCGC AGGTGTCCGG GCGGAGGTGC CGTGCATTTCG
 27401 TGCCCGGAAG CCGATGCCGG GCTGGTCTGC CAGGTACAGC TTGGAGTTGC
 27451 CAGGTTCTGC GGCCACGGCA TAGGTCTGAT CCATCTTGGA TTGGTCCTGC
 27501 ATGCTTTTGA GCGCCTGGCC AGATACCCCG GAGGCCTGTG ACACCATCAC

orf36 (*ascL*)

27551 CTCGAACAGC TCGCGCTTTG CCATCTCCAA TGTCTTTTGT GTATCCCTGT
27601 TTATGGGACA CCTTTACCCC AGTTTCTGGG ACACTTTCTG TCACCAAATC
27651 AGTGACACTG TCACCAATAC AGTGACAGTC CTAGGCGGAC CTCTGGGGAG
27701 ACCTTGCCCG GCTGCACAGA GTAGAGCCAC GCTGGCAGCT TCGAAGGGG
27751 TAGGCAAGTC ATGGTCTGAT TGCCGCCAGC TGAAGGTATC ACCATTTCGG
27801 TGATACCTTT GCTGAACTTG CTTGCTTGCC AGCTTGCGAT GCTGTACTTG
27851 CCAAGCCAGA CCCATCCCCT CAACCACTGG CTTTCATCGGC ACGTAGGGCT
27901 CGCCTTGATG CTCGACCAGA TAGAGGTTGT CGCCGTGGAA CGGAACAATC
27951 ATGGAATTGC GATTTGCTTG GTTTTGCGCT TGACTTTGAT GTATAGTCAT
28001 GTCGTACACC TTA CTTGGTA GTTGGTTTAC AAATCTCGGC CCTGGCTGTT
28051 GGCAGCTG GGGCCGAACT CTTTCCGCTA AAATTTGAAC TCATTCAGGT
28101 TCACCTCTCC TCGCTTTACC AGCGTATCCA GTACCGCCAG

7.4 Secuencia nucleotídica de la región génica codificante del efector de tipo III AexT de *Aeromonas hydrophila* AH-3

Los codones de inicio están marcados en negrita y los codones de parada se localizan en recuadros. Las posibles secuencias promotoras se indican mediante subrayado y, dentro de las mismas, el putativo inicio de transcripción se señala mediante un recuadro sombreado. Las posibles secuencias terminadores rho-independientes se indican en cursiva y negrita. Finalmente, las putativas cajas de unión al factor transcripcional AxsA (ver apartado Resultados, ORF23) se indican en cursiva dentro de un recuadro.

```

1   GATTACCAGC TCTATCTATC ACCGGAATTT GTCGAAACCG AGGCGGATTT
51  TTCCCGCCTG AAAGCGCAGA TGGTGCACGT TGGGCCGGTC AAAACCTTTG
101 ACAACTTTAT CGTGACACTG CCCGCCAGCA TCGATCCAGC CAGCTACAGC
151 AGCGTAATCG TCTGGTGTGA AACCTTCGGC CAATTCATCA CCGCAGCCCG
201 TTATCGCTGA GTTCAACGTC AGATGGCCCC CAGTCGACTG GTTTTACCA
251 TCAAAAAGGC GCCAAAAGGC GCCGTTTTTC TTGTTGCAGC ACATCCCCAC
301 AACTAACTC GGAGGGAAGT GGCCGCCAAT GCTGATCACC TTGACCTGCT
351 GCAGGGTGCC ATTGATGGTA AAAGCGACCC TGTGCTCCTG ACTGAGCCGG
401 ATCGTGTAGA TCCCTTTGTT GTTGCCGCTC AGTTGCTCGT AATGCATATC
451 GCCGACCTTG CCGGCGGCAC TCTTGGGATC CGAGCCGCGC TCGATCTCCC
501 GCCGCCACTC ATGGTATTTG CCCATGGCCG ACGGGGTCAC GGCAACATGC
551 TTGTCCTTGT TGTAGAGGAT CCGGGGTTGA GAATCATCGA TAGTCCATGC
601 CATAGCCCATC TCCATAGTTA GGCTCCAAAG AGAACCAAAC TATAGCCCAA
      ← orf-U (proteína hipotética)
651 ACGAGCAGAA TGACAGAAAT CCCTAACTGT CATTGCTGCC ACCATTGCCC
701 ACTGAGGACC AGCAAGCGCA GGGTAATACA CACCGGGCGC ACCATCTGGC
751 CAAGGCGAAT ACTCCAAGGC AAACGTGCAC CCCTTGGGGT GCACGTGATG
801 GACATAGTGG TTTATTCACT CATATCCGAC AACATAAGCA CGCTTACAGA
851 TAGTGCTCAT CAACACCGAT ATGGGTTAAC GCAGCCAGCT CCAATGGCGT
901 CAACTGTGCC GCATCGTCGA TCATTGTCCG CTCGCCGCGA GCGGATTCCG
951 GCAGCTGGAG GCGCACCTTG AGCGTGTCCG TCAGGCTGCC AACCAGATTG
1001 CCCATGCGGG TCAGGCGGGA AAC CAGTACG GCCTCCGAC TGCTTTCGCT

```

1051 GTCGGCAAAG GTAGAGACCT ATGCCACCGC GAAGTCACAG ATGGCCTTGG
 1101 CCCGATCACC AAAAGCCCCT TCCAGCTGTT GTAGCACCTG TTGCGCCTCA
 1151 CTGTGCGCCA GACGATCCAG CTCCGCCTTC ATATGGCCGG TGTCAAAAGCG
 1201 TAGGGCGGCC CCGGCATCAA GCCGATCTTC CGGCTTGCCG GCAGTATGGT
 1251 TGGCCCACGT CTGATCGGTT TGACCAGCGA ACTGCATCAG GCCGCCCAGC
 1301 ACCAGTCGCT GGTGGGGCG CGACGAGGCC AGGCTGTCTGA GGGCATGACC
 1351 AAGGGAAGAC CCCTTGGCAT CGCTGCCGCT GGCCAAGGAA AGCGCCAGGG
 1401 TGCGAAGGGT TTGCAGATCG CCACGGGTCT GCAATTTGGC CATGTGGGAG
 1451 CCATTGATGG AGCCATCGGC AATATGCTGG TGCAGGGCGT TGAGATCGCT
 1501 GCTGCTCAGG GTCACTGCCG TCGAGGTTTG ATCCCGCAGC AGGTAGCTGG
 1551 CCTGATGGCT GATCAGATCC AGCGCCAGCT TGTAACCGGT CGCTGGCGTC
 1601 TGGCGCGCAA CGGCGACCTG TTCGCGGGCT ACCCCTCTGG CCTCCCCGCT
 1651 TTGGGCTTGC GCCGGTTTCG CAGCAACTTC GGCTTTACT GCACGCTGCA
 1701 GGTGCGCAAC CTCGGCCATC ACGGCATGCA GCTGGCTCAT CGCCTCTTGC
 1751 AACAAATTCGG GGGTAGCGCT AGCCACCAGC TCGGTCACCT TGCTCCCCAC
 1801 AGTGCCCCAC TGCTGGAGCG GGATAACCGC GATGGGATGC TCCAGCAACC
 1851 CGGCGGCCAA TGTCTGACTC TCCTGCCGCA TGGAACCATC CCGGATCCCC
 1901 ATCAGGGAGG TCGCCAGTGA ACGCAGGGCC CCATTACCGG TCGCCAGACG
 1951 GGCGTGATCC TGTCCCAGTT GCTCGGCATT GATGCTGTTC AGTTCGCTTG
 2001 CCTTGTCGAG ACCGCTCAGA GTAAAAGGCA GCGCCTGTTG CAACAGCAAC
 2051 CGTTTCTGTT CAGCCAGCGA GAGGTTCCGA GTCTGCTGCG CCTTCGGCGC
 2101 AGCGGCACTC TTGTCTGCCC CCAGCAAGTT GCCGATCCAC TCTTTGATGG
 2151 CCACGAATGG GCGGGCCAGC TGGGCCCCCA GCCGCGAGAG CAGCCCCTGG
 2201 CCTTTTTGCG GTTCGCTGCG GTTGCCCAGC AGGATCGCAT CTGCCCCGTT
 2251 GGCGATCTGA CGTACATCCA GCTGGCCCAT CCGGCCAACC CCTGTGGTTG
 2301 CATCAGTGTG GTGAGCGACG GCCTGCATGC CGCCGGTGTG TGCTTGAATC
 2351 TG**CAT**GATAA TTGTCTTCTT GT**C**ATGTTTC GCCGCCAGTC TAGGAGAGGC
 ← **orf1 (aexT)**
 2401 CATCAACAGG GACTATCGGG ATTGGTCGCG A**TTTTGTAC** TGAGCGCGGA
 2451 GTGCTATCTC ACTGACCGAA AAGC**TAAAAA AA**GAGAGCCA TCGTTAACAG
 2501 TGCCGCTGGC GGCGACCTGC TCTAATGGCG **C**ATCATCAA TCTGGAGCCA

orf2 (sycE) →

2551 TCA**ATG**AACT CTCTTTATCA CGCCGCCATC CACCAGTTGT TTCTCTCCCT
2601 CTCCCTTCCG GCACCGCAGC AGGAGGAGAG CGTCACCAGC CTGCAGATCG
2651 GCGAGCTTAC CTGCCATCTG ACCGAGCACC CGGCCAACTA TCTGCTGATG
2701 TTTACGCGCC TTGAGGCTGC GACCAGTGCC CAAGCCGCGG CGCAGAACCT
2751 GTTCAGCCAA GACCCCTGCA AACCGGTACT TGGCTTCGAT TCACAGACCC
2801 TGAACCCGGT GTTATGGAAC CGTCAGCCGC TGCAACAGCT GGAACGTGCC
2851 CAGATCCACC ACCAACTGGA ACAACTGGTC TCTGCCGCTG ATGAGCTAAG
2901 CAGGCAG**TAA** CAGGTACGCC CCAAATCGGA CCATATGGAA TCCAGGGCGG
2951 CTCTCCAGAC TAAAATACGG GTCTGCCGTC GGAGTCCCCA **CAGTAAAACG**
3001 GCGCCCTAGG GCGCC**GTTTT ACTG**CATGCC GCCGGTGACG GCGGCTGGCT
3051 GTTTATATGG A**TCA**GCCGGT ATAGACGGGC AGCAGACCCG CCATGTTGAG
3101 CAGATGGAAC AGGGCGGTCA GCACACCGAA CAGCACGACG CCCACTATCA
3151 TCGGCATGCC GCCCGGCGCG CGGAAGCCGT CGCCTTTGCC GCCTTGCTCG
3201 CCCTTGCCGG TACGCACCTT CCAGGCCAGC AGGGCCGGTA TGATGCAGGT
3251 CCAGAGGGTC GCCACGGCGC CGGCGTAGCC GATTGCCATC AGGAAGCCGA
3301 ACGGGAACAG CAGGGAGAGC AGCAGCGGTG GCAGGAAAGT CACACCCAC
3351 GACTTGCGC GGCCCTGATG ACTGTTGTCG AACTTGAACA GATCAGCCAG
3401 ATAGTCGAAC ACCCCCAGAC CCACACCAAT AAAGGAGGAG AGGATGGCGG
3451 CCATGGAGAA GAGGTTGAGG GCGTTGAGA CGGCCTCCGA CTCTATCACC

