

Tesi doctoral presentada per En/Na

**Cecília URGELL URPI**

amb el títol

**"Análisis genómico y proteómico de los  
mecanismos de captación de hierro en  
*Aeromonas mesófilas*"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 2 de juliol de 2004.

Facultat de Biologia  
Departament de Microbiologia



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**1 INTRODUCCIÓN**

1.1 La Familia Aeromonadaceae.....	3
1.1.1 Taxonomía y hábitat.....	3
1.1.2 Patogenia y epidemiología.....	4
1.1.3 Factores de virulencia.....	4
1.1.3.1 Lámina S.....	5
1.1.3.2 Polisacáridos capsulares.....	5
1.1.3.3 Fimbrias y otras estructuras mediadoras de la adhesión.....	6
1.1.3.4 Flagelo y motilidad.....	6
1.1.3.5 Endotoxinas-el lipopolisacárido.....	7
1.1.3.6 Secreción de exotoxinas y enzimas extracelulares.....	8
1.1.3.6.1 Exotoxinas.....	8
1.1.3.6.2 Otras enzimas extracelulares.....	8
1.1.3.7 Mecanismos de captación de hierro de <i>Aeromonas</i> spp.....	9
1.2 La importancia del hierro en los sistemas biológicos.....	11
1.3 Disponibilidad del hierro.....	11
1.3.1 En el ambiente.....	11
1.3.2 Mecanismos de retención de hierro en los sistemas huésped.....	11
1.3.2.1 Transporte de hierro y hemo extracelular.....	12
1.3.2.2 Almacenamiento intracelular de hierro y hemo.....	13
1.4 Sistemas bacterianos de captación de hierro.....	13
1.4.1 Mediante modificación del ambiente.....	13
1.4.2 Mediante sistemas de transporte de iones ferrosos.....	14
1.4.3 Mediante sideróforos.....	14
1.4.3.1 Características estructurales de los sideróforos.....	15
1.4.3.2 Biosíntesis de sideróforos del tipo catecolato/fenolato.....	17
1.4.3.2.1 Biosíntesis de precursores aril.....	17
1.4.3.2.2 Ensamblaje de sideróforos de tipo catecolato/fenolato.....	18
1.4.3.2.2.A Activación del carboxilo.....	19
1.4.3.2.2.B Aminoacilación de los dominios de tiolación.....	19
1.4.3.2.2.C Formación del enlace peptídico.....	20
1.4.3.2.2.D Reacciones de modificación.....	20
1.4.3.2.2.E Terminación.....	21
1.4.3.2.3 Biosíntesis de enterobactina.....	22
1.4.3.3 Agrupación génica de enterobactina.....	22
1.4.3.4 Transporte de sideróforos.....	24
1.4.3.4.1 Eventos en la membrana externa de bacterias Gram-negativas.....	24
1.4.3.4.1.A Unión del ferri-sideróforo con el receptor.....	25
1.4.3.4.1.B Transducción de la señal.....	26
1.4.3.4.1.C Translocación del complejo ferri-sideróforo a periplasma.....	27
1.4.3.4.1.D Mecanismos de iniciación del transporte de ferri-sideróforos.....	28
1.4.3.4.2 Eventos en la membrana interna de bacterias Gram-negativas.....	29
1.4.3.4.2.A Proteínas periplasmáticas de unión a ferri-sideróforos.....	29
1.4.3.4.3 Sistemas de transporte de ferri-sideróforos en <i>E. coli</i> .....	30
1.4.3.4.3.A Sistemas de transporte de ferri-hidroxi- <i>amatos</i> en <i>E. coli</i> .....	31
1.4.3.4.3.B Sistemas de transporte de ferri-catecolatos en <i>E. coli</i> .....	31
1.4.3.4.3.C Transporte de dicitrato férrico en <i>E. coli</i> .....	32
1.4.3.5 Destino de los complejos ferri-sideróforos en citoplasma.....	32
1.4.3.6 Aplicaciones del estudio de los sideróforos.....	33
1.4.4 Mecanismos de adquisición directa del hierro de las proteínas del huésped.....	34
1.4.4.1 Captación de hemo y de hemoproteínas.....	34
1.4.4.1.1 Unión directa de hemo y hemoproteínas a receptores TonB dependientes de membrana externa.....	34
1.4.4.1.2 Adquisición del hierro del hemo y de las hemoproteínas dependiente de proteínas solubles.....	34

1.4.4.2 Captación del hierro de la transferrina y lactoferrina.....	35
1.5 Los mecanismos de captación de hierro como factor de virulencia.....	37
1.6 El hierro como señal reguladora.....	37
1.7 Regulación de los mecanismos de captación de hierro bacterianos.....	37
1.7.1 Regulación genética mediada por Fe <sup>2+</sup> -Fur.....	38
1.7.2 Regulación de la transcripción génica por presencia de ligando.....	39
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>2 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
2.1 Cepas bacterianas.....	47
2.2 Vectores utilizados.....	48
2.3 Cebadores utilizados.....	49
2.3.1 Cebadores de vectores.....	50
2.3.2 Cebadores en el transposón mini-Tn5::Km.....	50
2.3.3 cebadores de las secuencias nucleotídicas incluidas en el anexo.....	50
2.3.4 Cebadores de <i>E. coli</i> utilizados para amplificar genes y realizar complementaciones.....	52
2.4 Medios de cultivo y tampones.....	53
2.5 Extracción del hierro del material de laboratorio.....	53
2.6 Extracción del hierro del agua.....	54
2.7 Extracción intrínseca del hierro de los medios de cultivo.....	54
2.8 Crecimiento en condiciones de limitación de hierro.....	54
2.9 Detección de sideróforos.....	54
2.9.1 Test de CAS.....	54
2.9.2 Test de Arnow, detección de sideróforos de tipo catecolato.....	56
2.9.3 Bioensayos.....	56
2.10 Determinación de la dosis letal <sub>50</sub> .....	57
2.11 Estudios de la superficie celular.....	57
2.11.1 Obtención de proteínas de membrana externa.....	57
2.11.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida. Tinción.....	58
2.12 Técnicas inmunológicas.....	58
2.12.1 Obtención de suero inmune.....	58
2.12.2 Inmunotransferencia Western.....	59
2.13 Técnicas de genética molecular.....	60
2.13.1 Aislamiento y purificación de ADN genómico.....	60
2.13.2 Aislamiento de ADN plasmídico.....	60
2.13.3 Purificación de ADN por extracción fenólica.....	61
2.13.4 Precipitación de ADN.....	61
2.13.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	61
2.13.6 Cuantificación del ADN.....	62
2.13.7 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	62
2.13.8 Métodos de transferencia del ADN plasmídico.....	62
2.13.8.1 Conjugación.....	62
2.13.8.2 Trasformación por electroporación.....	62
2.13.9 Procesamiento enzimático del ADN.....	63
2.13.9.1 Restricciones.....	63
2.13.9.2 Defosforilación.....	63
2.13.9.3 Ligación.....	63
2.13.9.4 Obtención de extremos romos.....	64
2.13.10 Elaboración de una genoteca.....	64
2.13.11 Detección de fragmentos de ADN conocidos.....	64
2.13.11.1 Preparación de las sondas.....	64
2.13.11.2 Transferencia de puntos ( <i>dot blot</i> ).....	64
2.13.11.3 Transferencia de colonias ( <i>colony blot</i> ).....	64
2.13.11.4 Transferencia Southern ( <i>Southern blot</i> ).....	65

2.13.12 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	66
2.13.12.1 Amplificación de fragmentos de ADN.....	66
2.13.12.2 Secuenciación de fragmentos de ADN.....	66
2.13.13 Técnicas de mutagénesis.....	67
2.13.13.1 por inserción del elemento de transposición mini-Tn5::km.....	67
2.13.13.2 por recombinación en un punto.....	67
2.13.14 Estudios de complementación.....	68
2.13.14 Programas empleados para el análisis de las secuencias.....	68

### **3. Caracterización del sistema de captación de hierro de elevada afinidad de la cepa de *Aeromonas hydrophila* AH-3. Contribución a la virulencia.**

RESULTADOS.....	73
3.1 Precedentes.....	73
3.2 Caracterización preliminar de la presencia de un sistema de captación de hierro de elevada afinidad en diferentes cepas de <i>Aeromonas</i> spp. mesófilas.....	73
3.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de dipiridil de diferentes cepas de <i>Aeromonas</i> spp. mesófilas.....	74
3.4 Determinación del tipo de sideróforo secretado por varias cepas de <i>Aeromonas</i> spp. mediante la técnica del bioensayo con cepas indicadoras.....	74
3.5 Efecto de las condiciones de privación de hierro en la expresión de proteínas de membrana externa de las cepas AH-3 y AH-1.....	77
3.6 Obtención de mutantes por inserción mini-Tn5::Km con alteraciones en la producción de sideróforos.....	77
3.6.1 Análisis fenotípico de los mutantes en el sistema de transporte de sideróforos por inserción de un elemento de transposición.....	78
3.6.2 Caracterización genética de los mutantes AH-768 y AH-777.....	79
3.6.3 Secuenciación de los fragmentos de ADN adyacentes al transposón.....	80
3.7 Clonaje de la agrupación génica de biosíntesis, transporte y secreción de sideróforos de la cepa AH-3.....	81
3.7.1 Obtención de una sonda específica.....	81
3.7.2 Hibridación de la librería genómica con la sonda específica para el sistema de captación de hierro mediado por sideróforos.....	81
3.8 Complementación de los mutantes AH-777 y AH-768 con los plásmidos pCOS/SID-1 y pCOS/SID-8.....	82
3.9 Complementación de una cepa no productora de sideróforos con el clon pCOS/SID-1.....	82
3.10 Secuenciación del clon pCOS/SID-1.....	83
3.11 Análisis de la secuencia nucleotídica.....	85
3.12 Complementación del mutante de <i>E. coli</i> AN346.....	101
3.13 Complementación del mutante de <i>E. coli</i> AN117.....	102
3.14 Complementación del mutante de <i>E. coli</i> DK214.....	102
3.15 Construcción y determinación de algunas características fenotípicas de los mutantes de diversos genes de la agrupación de sideróforos de la cepa AH-3.....	103
3.15.1. Determinación de la capacidad de los diferentes mutantes de biosintetizar sideróforos mediante el test de CAS.....	103
3.15.2 Determinación de la presencia sideróforos de tipo catecolato en el sobrenadante de los diferentes mutantes mediante el Test de Arnou.....	104
3.15.3 Determinación de la capacidad de crecimiento en presencia del agente quelante dipiridil.....	104
3.15.4 Análisis de la captación de hierro mediante la técnica del bioensayo.....	105
3.15.5 Evaluación de la relevancia del sistema de captación de hierro mediante sideróforos en la virulencia de la cepa AH-3.....	107
3.15.6 Implicación de los componentes del sistema de transporte de ferri-sideróforos en la captación de hierro a partir de las hemoproteínas del huésped.....	107

3.15.7 Visión global de las características fenotípicas de los diferentes mutantes de la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3.....	108
3.16. Análisis de complementación de los mutantes.....	108
3.16.1 Complementación del mutante AH-768.....	109
3.16.2 Complementación del componente periplasmático del transportador ABC.....	110
3.16.3 Complementación del mutante carente del componente citoplasmático y del mutante carente del componente permeasa del transportador de sideróforos de la cepa AH-3.....	112
3.16.4 Análisis de complementación del mutante AH-1790.....	113
3.17. Distribución de los genes <i>aml</i> y <i>fap</i> en <i>Aeromonas</i> mesófilas.....	114
3.17.1 Distribución poblacional mediante dot-blot.....	114
3.17.2 Distribución de FapA en <i>Aeromonas</i> mesófilas.....	115
DISCUSIÓN.....	115
<b>4. Sistema de captación de hierro de las hemoproteínas del huésped en <i>A. hydrophila</i> AH-3.</b>	
RESULTADOS.....	131
4.1 Precedentes.....	131
4.2 Clonación del receptor de hemo y hemoglobina de <i>A. hydrophila</i> AH-3.....	131
4.3 La reconstitución en <i>E. coli</i> del sistema de captación de hemo y hemoglobina de <i>A. hydrophila</i> es un proceso TonB dependiente.....	133
4.4 Subclonación del clon COS-AHU.....	134
4.5 Análisis de la secuencia nucleotídica.....	135
4.6 Obtención de un mutante de <i>A. hydrophila</i> AH-3 incapaz de utilizar hemo y hemoglobina como fuente de hierro.....	140
4.7 Estudio de la presencia del gen <i>ahuR</i> en diferentes serotipos de <i>Aeromonas</i> spp. mesófilas.....	140
DISCUSIÓN.....	142
<b>5 CONCLUSIONES.....</b>	<b>149</b>
<b>6 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>153</b>
<b>7 ANEXO.....</b>	<b>171</b>
Secuencia nucleotídica de la agrupación génica de sideróforos de <i>A. hydrophila</i> AH-3.....	171
Secuencia nucleotídica de <i>ahuR</i> y de su entorno en el genoma de <i>A. hydrophila</i> AH-3.....	205

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 La familia Aeromonadaceae

### 1.1.1 Taxonomía y hábitat

La familia Aeromonadaceae está formada por bacilos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos y oxidasa positivos. Todas las especies, a excepción de *Aeromonas salmonicida* son móviles por flagelación polar. Las *Aeromonas* spp., además de las características ya mencionadas, son catalasa positivo, fermentan y oxidan la glucosa y numerosos carbohidratos con la producción de ácido y gas, reducen los nitratos a nitritos, son resistentes al agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina) y producen gran cantidad de exoenzimas. El porcentaje de guanina-citosina del ADN de las especies del género oscila entre el 57 y el 64%.

Inicialmente, la taxonomía de *Aeromonas* spp. comprendía dos grupos principales, el de las especies psicrófilas inmóviles representado por *A. salmonicida* y el grupo de las especies mesófilas representado por *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*.

La taxonomía de *Aeromonas* es compleja y ha cambiado mucho desde la descripción inicial en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Popoff, 1984). En la actualidad constituye una nueva familia, *Aeromonadaceae* (Colwell *et al.*, 1986) con las siguientes especies reconocidas, entre paréntesis se indica el grupo de homología, establecido mediante análisis de hibridación ADN-ADN, al que pertenecen: *Aeromonas 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* (Martínez-Murcia, 1992), *A. encheleia* (Esteve *et al.*, 1995) y *A. popoffi*. Recientemente se han descrito dos nuevas especies, *A. culicicola* y *A. simiae*. Los grupos de homología de ADN *Aeromonas* spp. (HG11) y *Aeromonas* spp. (HG13; Grupo Entérico 501), permanecen sin tener asignado un nombre de especie (Martínez-Murcia, 1999). Las nuevas especies *A. ichthiosmia* y *A. enteropelogenes* están consideradas en la actualidad como sinónimos de *A. veronii* y *A. trota*, respectivamente (Collins *et al.*, 1993).

Las pruebas bioquímicas convencionales utilizadas para la identificación de especies, presentan deficiencias incluso en la precisa identificación de las especies más comunes; aunque cabe decir que el grado de error es asumible en el laboratorio clínico por el mínimo impacto que presenta en la elección del tratamiento adecuado (Janda y Abbott, 1998). Entre los métodos de identificación moleculares a nivel de especie, cabe destacar el estudio del polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) del 16S rRNA por su fiabilidad y rapidez (Borrell *et al.*, 1997; Figueras *et al.*, 2000a).

*Aeromonas* spp. son habitantes autóctonos de un amplio rango de ambientes acuosos: aguas marinas, superficiales (ríos, lagos, pantanos...), sedimentos, aguas cloradas, redes de distribución de agua etc. Al margen de los sistemas acuáticos, también es frecuente aislar *Aeromonas* spp. de alimentos frescos, tales como carnes, pescados, mariscos o vegetales, o de preparados, como salsas, helados o productos de pastelería. Su capacidad de crecer a bajas temperaturas le permite permanecer durante largos periodos de tiempo en dichos productos refrigerados.

### 1.1.2 Patogenia y epidemiología

*Aeromonas* spp. son predominantemente patógenas de animales poiquiloterms, incluyendo peces, anfibios y reptiles. La especie psicrófila *A. salmonicida* es un importante patógeno de salmónidos, produciendo en los mismos la enfermedad conocida como furunculosis sistémica (Janda, 1991). Además, las *Aeromonas* spp. están consideradas como patógenos emergentes de humanos. Dos especies y el biogrupo de una tercera especie, *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bv *sobria*, suman más del 85% de los aislamientos clínicos a partir de infecciones extraintestinales (Janda *et al.*, 1991). Las infecciones extraintestinales producidas por *Aeromonas* spp. incluyen meningitis, endocarditis, síndrome urémico hemolítico, peritonitis, conjuntivitis, septicemia e infecciones de heridas superficiales. La mayoría de infecciones septicémicas ocurren en individuos inmunocomprometidos a causa de una diseminación de la infección desde el tracto intestinal hacia el torrente sanguíneo (Janda y Abbot, 1998).

El papel de *Aeromonas* spp. como agentes causantes de gastroenteritis bacteriana es un tema polémico y controvertido, principalmente debido a la baja incidencia de grandes brotes epidémicos asociados y a la carencia de un modelo animal adecuado; aunque cabe decir que los casos de diarrea del viajero debidas a *Aeromonas* spp. han aumentado considerablemente durante los últimos años. La mayoría de especies de *Aeromonas* mesófilas han sido detectadas a partir de muestras intestinales clínicas, aunque las más frecuentes son *A. hydrophila*, *A. veronii* bv *sobria* y *A. caviae* (Janda y Abbott, 1998). La mayoría de aislados de las dos primeras especies han demostrado *in vitro* potencial enterotoxigénico mediante la habilidad de expresar una enterotoxina citolítica frecuentemente llamada  $\beta$ -hemolisina.

Los patógenos humanos del género con menor incidencia clínica son *A. veronii* bv *veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. allosaccharophila*, *A. bestiarum*, *A. media*, *A. salmonicida*, *Aeromonas trota*, *A. encheleia* y *A. eucrenophila* (Bruckner *et al.*, 1999; Figueras *et al.*, 2000b).

### 1.1.3 Factores de virulencia

Los principales factores de virulencia asociados a *Aeromonas* spp. son los polisacáridos capsulares, las fimbrias o adhesinas, la presencia de lámina S, la secreción de exotoxinas, el lipopolisacárido o endotoxina, los sistemas de captación de hierro y la presencia de flagelo polar y lateral. Todos ellos tienen una gran importancia, y la patogenicidad de la bacteria es el resultado de la acción conjunta de varios de estos factores, que permitirán a la bacteria entrar y multiplicarse en el interior del hospedador, resistir su sistema inmune y producirle un daño.

#### 1.1.3.1 Lámina S

Las láminas S de *Aeromonas* spp. están formadas por proteínas que se ensamblan de forma tetragonal para formar una envuelta externa a la pared celular. De función desconocida, se piensa que actúan como barrera de permeabilidad, protegiendo a la célula de agentes externos, como por ejemplo de las proteasas.

La lámina S está presente en *A. salmonicida*, donde recibe el nombre de lámina A y es considerada un importante factor de virulencia (Ishiguro *et al.*, 1981). Hasta la fecha, las únicas cepas de *Aeromonas* en las que se ha detectado la presencia de lámina S pertenecen al serogrupo O:11, frecuentemente asociado a infecciones clínicas en humanos. Las *Aeromonas* mesófilas que pertenecen a dicho serogrupo son *A. hydrophila* y *A. veronii* bv *sobria*, (Dooley y Trust, 1988). La presencia de lámina S aumenta la capacidad de adhesión a las células del organismo hospedador y la colonización de la mucosa intestinal, además de disminuir la susceptibilidad de la bacteria a la opsonofagocitosis (Merino *et al.*, 1995).

#### 1.1.3.2 Polisacáridos capsulares

La cápsula es una estructura superficial, formada por exopolisacáridos, que recubre la superficie bacteriana. El polisacárido capsular se ha detectado *in vitro* en algunas especies cuando crecen en un medio con concentraciones elevadas de glucosa, entre ellas *A. hydrophila* AH-3 (O:34), *A. veronii* bv *sobria* AH-1 (O:11) (Martínez *et al.*, 1995), y en algunas cepas de *A. salmonicida* (Garrote *et al.*, 1992). Las células de *A. salmonicida* que presentan polisacárido capsular activan el complemento pero son capaces de degradar rápidamente el componente C3b y en consecuencia, presentan resistencia a la actividad bactericida del suero no inmune, disminuye la opsonización y se impide la fagocitosis (Merino *et al.*, 1997a). Además, la cápsula interviene en la adherencia y especialmente en la invasión de *A. hydrophila* O:34 y *A. salmonicida* a líneas celulares de peces (Merino *et al.*, 1997b; Merino *et al.*, 1996a).

### 1.1.3.3 Fimbrias y otras estructuras mediadoras de la adhesión

La habilidad de la bacteria para adherirse y colonizar las superficies de las mucosas del hospedador es crítica para el desarrollo de la infección.

Las fimbrias son proyecciones filamentosas no flagelares de naturaleza proteica que se hallan en la superficie bacteriana y que actúan como facilitadoras de la adhesión. En *Aeromonas* spp. han sido detectadas tanto en cepas ambientales como en cepas clínicas y se han descrito dos tipos diferentes.

Las fimbrias cortas y rígidas (S/R) son numerosas en la superficie celular, están ampliamente distribuidas en *Aeromonas* spp. y las fimbrias de las diferentes especies analizadas presentan epítomos comunes. Este tipo de fimbrias median la autoagregación bacteriana pero no tienen actividad hemaglutinante y no median la adhesión a las células intestinales (Honma y Nakasone, 1990).

Las fimbrias largas, flexibles (L/W) están presentes en menor número por célula que las anteriores y predominan en las cepas aisladas de heces, en particular *A. veronii* bv *sobria*. Este tipo de fimbrias presentan actividad hemaglutinante. La secuenciación del extremo amino-terminal, altamente conservado, ha demostrado que algunas de ellas son pilis del tipo IV, un importante apéndice mediador de la adhesión a células epiteliales, presente en muchos patógenos Gram-negativos (Hokama y Inagawa, 1991; Ho *et al.*, 1992).

Además de las adhesinas filamentosas o fimbrias anteriormente mencionadas, *Aeromonas* spp. presenta otras macromoléculas en su superficie que pueden contribuir considerablemente a su adhesión. Entre ellas cabe destacar el monómero constituyente de la lámina S, el lipopolisacárido y diferentes proteínas de membrana externa.

### 1.1.3.4 Flagelo y motilidad

Las *Aeromonas* spp. mesófilas son generalmente móviles gracias a un flagelo polar monotrico de expresión constitutiva, responsable de la natación en medio líquido. Aproximadamente un 18% de las cepas de *Aeromonas* mesófilas presentan además un tipo de movimiento llamado en forma de enjambado (*swarming*) que se debe a la expresión de múltiples flagelos peritricos asociada al crecimiento en superficies sólidas (Shimada *et al.*, 1985). Estos valores aumentan hasta el 50% en las cepas de *Aeromonas* asociadas a procesos diarreicos (Kirov *et al.*, 2002).

Las *Aeromonas* psicrófilas se caracterizan por su falta de movilidad (Popoff, 1984). En cuatro aislados *A. salmonicida* se ha demostrado por hibridación la presencia de genes relativos al flagelo lateral (Kirov *et al.*, 2002), sin embargo, las cepas no desarrollan movimiento por *swarming* ni expresan flagelos laterales a causa de la presencia de una transposasa en el gen de la flagelina lateral *lafA* (Merino *et al.*, 2003).

En *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* se ha demostrado la implicación del flagelo lateral tanto en la adhesión a células epiteliales humanas Hep-2, como en la formación de biofilms *in vitro* (Gavín *et al.*, 2002). La formación de biofilms parece ser muy importante para la colonización de las mucosas. Las bacterias que forman biofilms están envueltas por una matriz polisacáridica de elaboración propia que facilita la adhesión a las superficies. Las bacterias embebidas en los biofilms son más resistentes a las defensas del huésped y se piensa que expresan más factores de virulencia debido a la percepción de quórum.

El flagelo polar también ha sido implicado en el proceso de adhesión y en la invasión de líneas celulares de peces y humanas (Merino *et al.*, 1997c; Thornley *et al.*, 1997; Rabaan *et al.*, 2001).

#### **1.1.3.5 Endotoxinas-El lipopolisacárido**

Se trata de una estructura glucolípídica presente en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas que consiste en una porción polisacáridica unida covalentemente al lípido A. La parte polisacáridica consta de dos regiones, el núcleo del lipopolisacárido y la cadena lateral o antígeno O.

El género *Aeromonas* se ha clasificado en 96 serogrupos, 44 de los cuales están basados en el antígeno O del LPS (Sakazaki y Shimada, 1984). De estos, los serogrupos O:11, O:16 y O:34 destacan por su incidencia en infecciones en humanos (Janda *et al.*, 1996).

La contribución a la virulencia se debe por un lado a la actividad endotóxica producida por el lípido A. Por otro lado, la secreción de algunas toxinas es dependiente de la presencia de las cadenas polisacáridicas del antígeno O:34 (Merino *et al.*, 1992). Dicho antígeno O:34 facilita además el proceso inicial de adhesión (Merino *et al.*, 1996b), la colonización de la mucosa intestinal (Merino *et al.*, 1996c) y actúa de barrera física que impide la correcta activación de la cascada de reacciones de las proteínas del complemento, confiriendo resistencia a la actividad bactericida del suero no inmune. Este último aspecto se debe a que el antígeno O une el componente C3b a una distancia de la membrana citoplasmática suficiente como para que la formación del complejo de ataque a membrana no sea viable (Merino *et al.*, 1991).

La osmolaridad y la temperatura de incubación ejercen una importante influencia sobre el tipo de lipopolisacárido producido por los serotipos O:13, O:33, O:34 y O:44 de *Aeromonas* spp. En concreto, las células de estos serotipos presentaron formas S del LPS (con presencia de antígeno O) a 20 °C independientemente de la osmolaridad y a 37 °C en condiciones de elevada osmolaridad. Las células con formas S de LPS presentaron un aumento de la actividad extracelular, una mejor adherencia y resistencia a la actividad bactericida del suero no inmune,

hechos que se correlacionaron bien con una disminución en la dosis letal media en ratones y truchas (Merino *et al.*, 1992; Aguilar *et al.*, 1997).

### **1.1.3.6 Secreción de exotoxinas y enzimas extracelulares**

La mayoría de *Aeromonas* secretan una gran variedad de toxinas y enzimas extracelulares como nucleasas, lipasas, amilasas, cuyo papel en la patogenicidad no siempre es bien conocido.

#### **1.1.3.6.1 Exotoxinas**

Las exotoxinas de *Aeromonas* spp. se pueden dividir en enterotoxinas y hemolisinas. A su vez, las enterotoxinas se clasifican en citotónicas o citotóxicas, en función del daño epitelial generado.

La enterotoxina citotóxica de *Aeromonas* también se ha denominado aerolisina o  $\beta$ -hemolisina y presenta actividad hemolítica y citotóxica además de enterotóxica. Su detección es frecuente en cepas aisladas de infecciones gastrointestinales, especialmente en *A. hydrophila* y *A. veronii* bv *sobria*. La proteína se secreta en forma de proaerolisina y es necesaria una proteólisis para su activación. Además de las anteriormente mencionadas aerolisinas, se ha descrito una enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila* denominada Act con actividad citotóxica, hemolítica y enterotóxica. La expresión de dicha toxina está regulada por los niveles ambientales de hierro vía Fur (Sha *et al.*, 2001). El mecanismo de acción de las enterotoxinas citotóxicas descritas en *Aeromonas* es similar, se unen a la membrana de la célula diana, polimerizan y forman poros que median la destrucción celular (Chopra y Houston, 1999).

Las enterotoxinas citotónicas presentan un mecanismo de acción similar al de la toxina colérica, aumentando los niveles de AMP cíclico de las células eucarióticas.

Además de las enterotoxinas citotóxicas con actividad  $\beta$ -hemolítica, las *Aeromonas* spp sintetizan otras  $\beta$ -hemolisinas que median la completa destrucción de los eritrocitos debido a la producción de agujeros en las membranas mediante lisis osmótica. Las  $\alpha$ -hemolisinas median la lisis incompleta y reversible de los eritrocitos (Hirono *et al.*, 1992).

#### **1.1.3.6.2 Otros enzimas extracelulares**

Las lipasas bacterianas están implicadas en diferentes procesos patogénicos y frecuentemente han sido asociadas con el daño intestinal. Las glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasas (GCAT) son fosfolipasas que pueden mediar la lisis de los eritrocitos mediante la digestión de las membranas plasmáticas (Pemberton *et al.*, 1997). Entre las otras lipasas caracterizadas, se ha demostrado que Plc de *A. hydrophila*, con actividad lecitinasa y capacidad citotóxica, es un importante factor de virulencia para la cepa, además de ser detectado en la mayoría de cepas de *Aeromonas* mesófilas analizadas (Merino *et al.*, 1999).

Las proteasas pueden contribuir a la virulencia causando daño directo a los tejidos, potenciando la invasividad o como mediadores de la activación proteolítica de las toxinas. En *Aeromonas* mesófilas se han detectado tres tipos de proteasas distintas, que incluyen una serina proteasa termolábil, y dos metaloproteasas termostables que se diferencian por su grado de sensibilidad al EDTA (etilendiaminotetraacetato). La serina proteasa de 68kDa y la metaloproteasa de 38 kDa están presentes en la mayoría de sobrenadantes de los cultivos de *A. hydrophila*. Se piensa que las serina proteasas median la activación de la aerolisina (Abrami *et al.*, 1998) y de la GCAT (Vipond *et al.*, 1998).

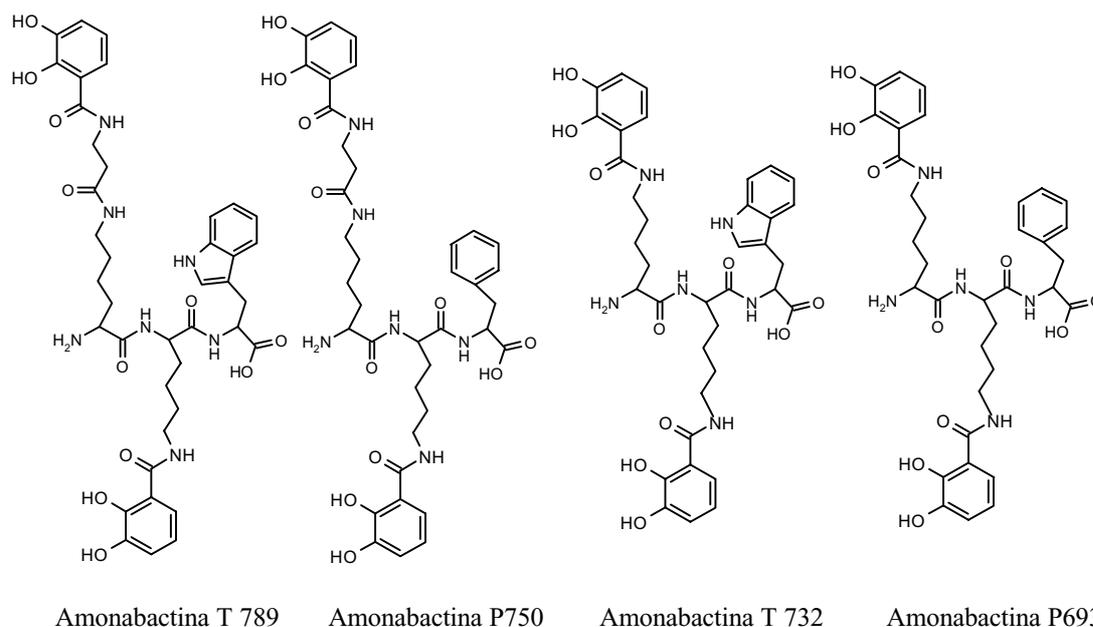
Las mayoría de *Aeromonas* spp. también producen amilasas, gelatinasas, nucleasas, quitinasas, cuya contribución a la virulencia está aun por determinar, aunque sin duda alguna potencian la capacidad adaptativa a los cambios ambientales. El estudio de la contribución a la virulencia de las ADNasas es de especial interés, dada la elevada prevalencia en las cepas clínicas de *Aeromonas* spp. de los genes que las codifican (Chacón *et al.*, 2003).

#### **1.1.3.7 Mecanismos de captación de hierro de *Aeromonas* spp.**

La mayoría de *Aeromonas* mesófilas utilizan el hemo, la hemoglobina y el complejo hemoglobina-haptoglobina como fuente de hierro mediante un mecanismo sideróforo independiente. (Massad *et al.*, 1991)

La mayoría de especies de *Aeromonas* mesófilas producen un único sideróforo que suele ser la enterobactina o la amonabactina. La amonabactina es el sideróforo predominante en los grupos de hibridación del 1 al 5 y en el 12. La mayoría de cepas pertenecientes al HG 8/10 y al HG 9 sintetizan enterobactina (Zwyno *et al.*, 1992). Ambos sideróforos son de tipo catecolato y están formados por ácido 2,3-dihydroxidobenzoico conjugado con aminoácidos. Las amonabactinas, ilustradas en la Figura 1.1, son una familia de cuatro biscatecolatos. Su esqueleto aminoacídico esta compuesto por dos L-lisinas, un aminoácido aromático (D-fenilalanina o D-triptófano) y una glicina opcional (Barghouthi *et al.*, 1989; Telford y Raymond, 1997; Telford y Raymond, 1998).

Algunos de los genes de *Aeromonas* que codifican para enzimas que intervienen en los pasos iniciales de la vía de biosíntesis de amonabactina (*amoA*) y de enterobactina (*aebCEBA*), fueron identificados mediante complementación interespecífica de mutantes de *E. coli* defectivos en la producción de ácido dihydroxidobenzoico, un precursor de ambos sideróforos (Massad *et al.*, 1994; Barghouthi *et al.*, 1991).



**Figura 1.1** Representación de las cuatro formas estructurales de la amonabactina, producidas por *Aeromonas* spp. Los nombres hacen referencia al peso molecular y al residuo correspondiente al aminoácido aromático (D-triptófano o D-fenilalanina). Figura tomada y modificada de Telford y Raymond 1998.

Varios estudios confirman que las *Aeromonas* productoras de amonabactina utilizan la transferrina y la lactoferrina, como fuente de hierro, mediante un mecanismo sideróforo dependiente. En cambio, las cepas de *Aeromonas* productoras de enterobactina y el mutante *amoA* de *A. hydrophila*, deficiente en la producción de amonabactina, no tienen la capacidad de utilizar la ferri-transferrina sérica como fuente de hierro, tal y como se deriva de su incapacidad de crecer en suero descomplementado por calor (Massad *et al.*, 1991; Stintzi y Raymond, 2000).

En contraste con todos los demás sistemas de transporte de hierro estudiados, una gran variedad de sideróforos estructuralmente diferentes, naturales y sintéticos, sirven como fuentes de hierro y son transportados, por un único transportador, a través de la membrana externa de *A. hydrophila*. Basándose en estudios de competición, se determinó que esta variedad de sideróforos son transportados por el mismo receptor que internaliza la ferri-amonabactina. Durante el transporte hay un proceso de intercambio de ligando que tiene lugar en la superficie celular, cuando el ferri-sideróforo transfiere el átomo de hierro a un apo-sideróforo previamente unido al receptor (Stintzi *et al.*, 2000). En este punto hago referencia al apartado 1.4.3.4.1.D de la presente memoria, donde se comparan los diferentes mecanismos de iniciación del transporte de sideróforos descritos hasta la fecha.

Es precisamente el estudio de diversos aspectos de los mecanismos de captación de hierro de *Aeromonas* spp. el objetivo básico de la presente tesis doctoral.

## 1.2 La importancia del hierro en los sistemas biológicos.

El hierro juega un papel esencial en el metabolismo de casi todas las formas de vida, con la excepción conocida de las bacterias del género *Lactobacillus*, que utilizan preferentemente manganeso y cobalto como cofactores enzimáticos. La ubicuidad del hierro es un reflejo de su esencialidad.

El par  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  tiene un rango de potencial redox que abarca desde  $-300\text{mV}$  hasta  $+700\text{mV}$ , en función del grupo ligando y del entorno proteico (Guerinot, 1994). La misma propiedad subyacente a la versatilidad del hierro como biocatalizador, su amplia capacidad reactiva, promueve la generación de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar el ADN, las membranas lipídicas y las proteínas. El hierro libre reacciona con el peróxido de hidrógeno generando, vía la reacción de Fenton, radicales hidroxilo que causan daños a los componentes celulares. El anión superóxido es tóxico en la medida que su interacción con las proteínas ferrosulfurosas libera hierro que puede participar en las reacciones Fenton (Zheng *et al.*, 1999). Los macrófagos promueven la acumulación endosómica de  $\text{Fe}^{2+}$  vía la proteína Nramp1, para generar radicales hidroxilos dañinos para los patógenos.

## 1.3 Disponibilidad del hierro

### 1.3.1 En el ambiente

Aunque el hierro es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre y el segundo metal más frecuente después del aluminio, su biodisponibilidad es escasa. La atmósfera oxigénica del planeta induce, en ambientes acuosos y pH superiores a 5, la rápida oxidación química de los iones ferrosos y la subsiguiente precipitación de iones férricos en forma de polímeros oxihidróxidos de escasa solubilidad,  $1.4 \times 10^{-9}$  M a pH neutro (Ratledge y Dover, 2000). La forma ferrosa del hierro es relativamente más soluble, siendo más fácil el proceso de obtención de hierro para las bacterias anaerobias.

### 1.3.2 Mecanismos de retención de hierro en los sistemas huésped

Los mecanismos de retención de hierro forman parte del sistema inmune innato del huésped; y son una decisión Darwinística lógica, si tenemos en cuenta la toxicidad del hierro libre y los efectos bacteriostáticos derivados de su privación nutricional. Además, el déficit de hierro debilita las defensas bacterianas al estrés oxidativo, cruciales para la supervivencia de patógenos en el macrófago, porque diferentes componentes de estas, entre ellos las catalasas y peroxidasas bacterianas, utilizan hierro o hemo como cofactor (Byers y Arceneaux, 1998). La situación de retención de hierro se ve claramente agudizada en la hipoferranemia de infección,

en la que se reduce el porcentaje de saturación de la transferrina sérica durante los procesos inflamatorios.

### 1.3.2.1 Transporte de hierro y hemo extracelular.

Las transferrinas, ubicuas en vertebrados, son una familia de glicoproteínas de cadena única y peso molecular cercano a 80.000. Se estructuran formando dos lóbulos, cada uno con un sitio de unión de elevada afinidad para el ion férrico ( $K_d \sim 10^{-20}$  M).

En sangre y linfa, el hierro se encuentra asociado con elevada afinidad a transferrinas séricas que, debido a su generalizado estado de saturación parcial (30%), mantienen eficazmente los valores de hierro libre en un orden cercano a  $10^{-18}$  M. Las transferrinas séricas transportan este preciado oligoelemento desde los sitios de absorción y almacenamiento hasta los sitios de utilización; lugar donde el complejo ferri-transferrina entra a la célula vía endocitosis mediada por receptor. Las células eucariotas utilizan el ambiente relativamente ácido de los endosomas para liberar el hierro de la ferri-transferrina, que posteriormente será devuelta a circulación (Baker *et al.*, 2003).

La lactoferrina esta presente en la leche, en muchas otras secreciones exocrinas y en el ambiente relativamente ácido de los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares. Durante la desgranulación de leucocitos se libera apo-lactoferrina, aumentando su concentración local en los sitios de infección. La lactoferrina, a diferencia de la transferrina, une hierro a pH inferiores a 4.5, confiriendo una buena capacidad quelante en áreas donde el crecimiento microbiano puede producir ácidos. Además, la lactoferrina tiene una cierta actividad bacteriolítica. Dicha actividad reside en un fragmento peptídico catiónico, llamado lactoferricina, que cuando es liberado mediante proteólisis, interacciona con la membrana externa bacteriana, desorganizando su estructura (Farnaud y Evans, 2003).

Además, el huésped produce proteínas que unen hemo y hemoglobina, limitando su biodisponibilidad como fuente de hierro de bacterias patógenas y evitando su participación en la formación de radicales libres. La hemoglobina liberada a plasma, debido a la lisis de eritrocitos espontánea, o promovida por las hemolisinas bacterianas, es rápidamente capturada y dirigida a hígado por la haptoglobina ( $K_d < 10^{-15}$ ). La hemopexina es una glicoproteína sérica que une hemo en relación equimolar, reversiblemente y con gran afinidad ( $K_d < 10^{-12}$ ) y lo entrega a los hepatocitos mediante endocitosis mediada por receptor (Baker *et al.*, 2003). La haptoglobina y la hemopexina son proteínas de fase aguda cuyos niveles aumentan de dos a cuatro veces durante los procesos inflamatorios. La haptoglobina no es una verdadera proteína transportadora, porque a diferencia de la transferrina y la hemopexina, que son devueltas a

circulación después de liberar sus respectivos ligandos, el complejo haptoglobina-hemoglobina es degradado por el sistema retículoendotelial.

### **1.3.2.2 Almacenamiento intracelular de hierro y hemo.**

Las ferritinas almacenan el hierro intracelular mediante un proceso de deposición oxidativa. Son las principales proteínas de almacenamiento de hierro y están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos. Las ferritinas de mamíferos están constituidas por 24 subunidades cilíndricas de 20 kDa, que se ensamblan formando una coraza esférica hueca capaz de almacenar hasta 4.500 átomos de hierro férrico, en forma de fosfatos hidróxidos de hierro. Las ferritinas de mamíferos tienen dos tipos de cadenas peptídicas: las H, cuya actividad ferroxidasa es responsable de la oxidación de los iones ferrosos y las L, que facilitan el proceso de mineralización (Chasteen, 1998).

La hemoglobina, la proteína de las células rojas sanguíneas que transporta oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, es una proteína oligomérica de 64,5 kDa. Está formada por cuatro cadenas polipeptídicas ( $\alpha_2\beta_2$ ) y cuatro grupos hemo, en los que los átomos de hierro se encuentran en su estado ferroso. Otras proteínas intracelulares que contienen hemo son la mioglobina, varios citocromos, catalasas y peroxidasas.

## **1.4 Sistemas bacterianos de captación de hierro.**

En consecuencia a lo anteriormente expuesto, numerosos ambientes que parecen abundantes en hierro, en realidad 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.

### **1.4.1 Mediante modificación del ambiente**

La afinidad de la transferrina por la forma ferrosa del hierro es varios órdenes de magnitud inferior que la afinidad por la forma férrica. En concordancia, algunas bacterias utilizan procesos reductivos para la captación de hierro. *Streptococcus mutans* acopla una flavín reductasa asociada a membrana con un transportador de iones ferrosos.

*Lysteria monocytogenes* sintetiza una reductasa férrica asociada a superficie (que puede ser también secretada al ambiente) para extraer el hierro de la ferritina, transferrina y lactoferrina. Recientemente, se han caracterizado ferri-reductasas secretadas por *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Pseudomonas aeruginosa* (Schröder *et al.*, 2003).

El crecimiento de *Clostridium perfringens*, *in vivo*, desencadena una disminución progresiva generalizada del potencial redox de los tejidos infectados. Estas condiciones extremadamente reductoras, así como la acidificación, facilitan la liberación del hierro de la transferrina.

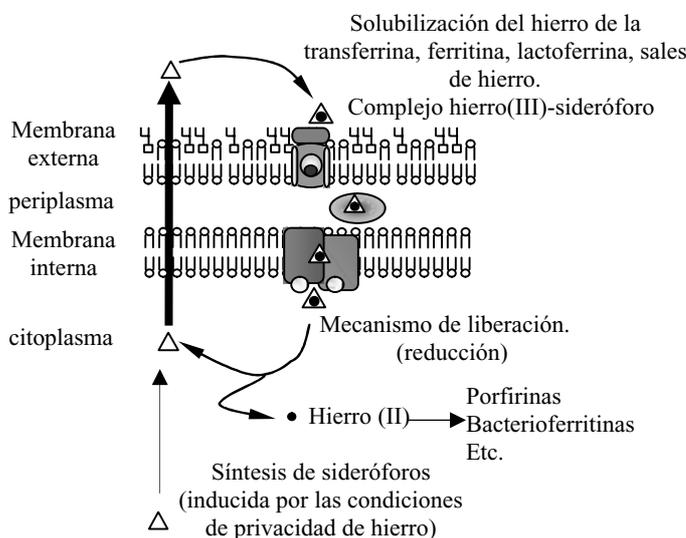
### 1.4.2 Mediante sistemas de transporte de iones ferrosos

El transporte de iones ferrosos persiste en muchas bacterias, aunque no tengan sistemas de reducción de hierro externo. En consecuencia, este sistema sólo parece ser útil en ciertos ambientes, como por ejemplo los anaerobios, donde el hierro está disponible en su forma reducida. El operón *feoAB* (del inglés *ferrous iron uptake*) de *E. coli* está regulado por la fumarato nitrato reductasa y por Fur. Los mutantes Feo de *E. coli* son defectivos en la colonización del intestino de ratones (Hantke, 2003).

### 1.4.3 Mediante sideróforos

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (600-1.000 Da), con grupos funcionales que coordinan los iones férricos con elevada afinidad ( $k_{aff} > 10^{30}$ ) y especificidad. La afinidad de los sideróforos por el ion férrico es lo suficientemente alta como para permitirles competir eficientemente *in vivo* con la ferri-transferrina, la ferri-lactoferrina y la ferritina, y en ambientes terrestres o acuáticos con los hidróxidos férricos. Los sideróforos, en general, no pueden extraer el hierro de las hemoproteínas (Crosa y Walsh, 2002; Neilands, 1995). La unión específica permite discriminar el hierro del aluminio, calcio, cobre y zinc, más abundantes en la naturaleza (Tilbrook y Hider, 1998).

Los sideróforos son sintetizados y secretados por multitud de bacterias, hongos y plantas monocotiledóneas en respuesta a las condiciones de privacidad de hierro; aunque algunos, como por ejemplo las micobactinas de las micobacterias, permanezcan anclados a la membrana externa mediante largas cadenas alifáticas (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003).



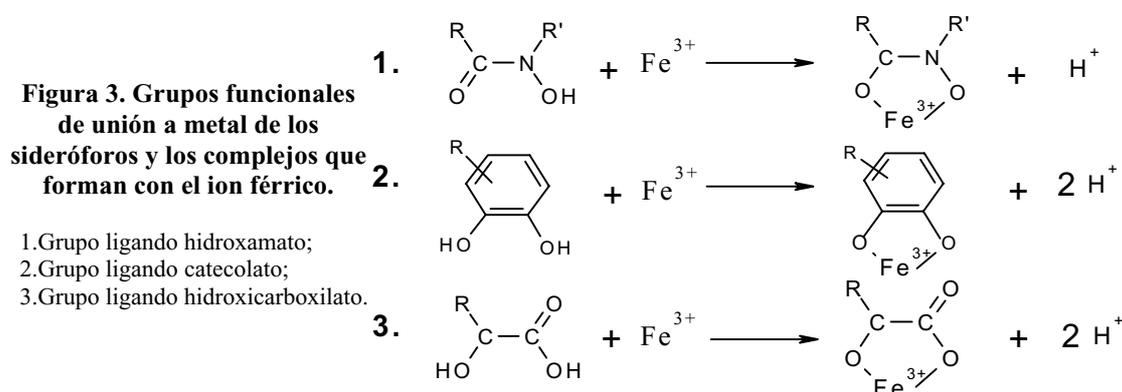
**Figura 2. Esquema del transporte de hierro (III) mediado por sideróforos en una bacteria Gram-negativa.**

La célula sintetiza y secreta sideróforos en respuesta a las condiciones de privacidad de hierro. El sideróforo solubiliza el hierro de las fuentes de hierro y el complejo ferri-sideróforo es internalizado a citoplasma. El hierro es frecuentemente liberado mediante reducción y el ion ferroso se incorpora a varias proteínas. En algunos casos el sideróforo es reciclado y secretado al exterior. Figura modificada de Ratledge y Dover, 2000.

### 1.4.3.1 Características estructurales de los sideróforos.

Las principales características estructurales que determinan la selectividad de un sideróforo por el ion férrico son: el tipo, número (denticidad) y distribución espacial de los grupos de unión a metal (Boukhalfa y Crumbliss, 2002).

A pesar de los más de quinientos sideróforos identificados hasta la fecha, la diversidad de los grupos funcionales que coordinan el ion férrico es escasa, debido a la necesidad de grupos donadores duros, como por ejemplo los oxianiones, para coordinar la forma más oxidada del hierro; permitiendo agrupar a la mayoría de sideróforos en hidroxamatos (1), catecolatos (2), ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos (3) y sideróforos mixtos.

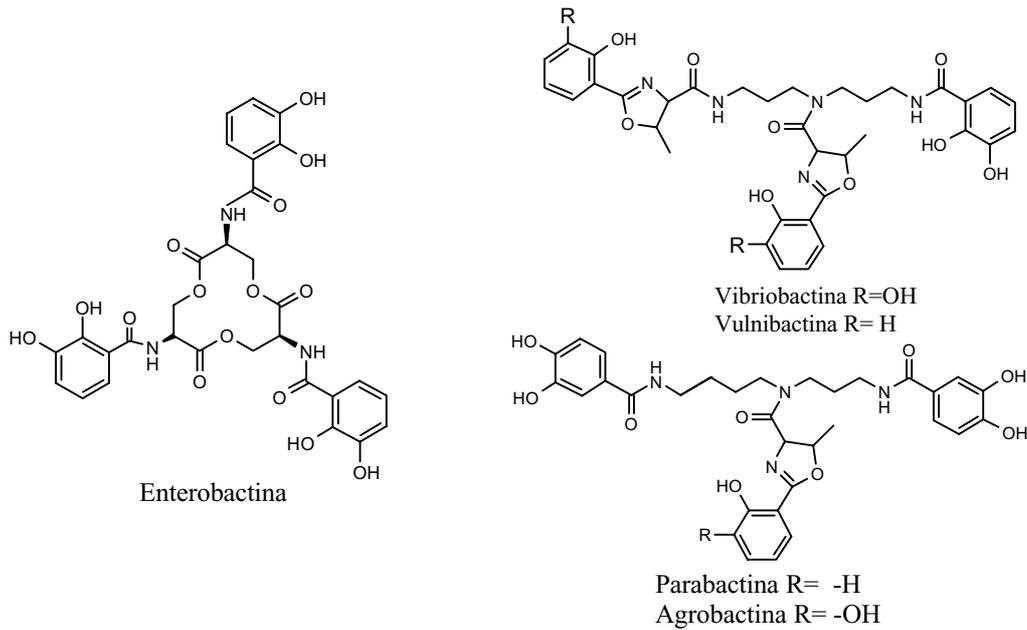


Estas unidades funcionales se distribuyen para formar arquitecturas moleculares lineales, endocíclicas o exocíclicas, que facilitarán en mayor o menor grado, la eficiente preorganización de una cavidad de quelación, la flexibilidad del ligando y la facilidad relativa de asumir una geometría de coordinación pseudo-octaédrica; afectando en última instancia a la estabilidad termodinámica del complejo ferri-sideróforo (Albrecht-Gary y Crumbliss, 1998).

Los centros de unión de la mayoría de sideróforos son hexadentados, están compuestos por tres grupos ligando bidentados dispuestos alrededor del ion férrico central, permitiendo un sistema hexacoordinado con geometría octaédrica de elevada estabilidad. Los sideróforos hexadentados forman complejos 1:1 con el ion férrico, de modo que la redistribución del hierro es poco probable, disminuyendo así la toxicidad potencial del complejo ferri-sideróforo (Tilbrook y Hider, 1998). En el caso de los sideróforos tetradentados y bidentados es frecuente la formación de estequiometrías  $\text{Fe}_2\text{L}_3$  y  $\text{FeL}_3$ , respectivamente, para satisfacer la plena coordinación del átomo de hierro.

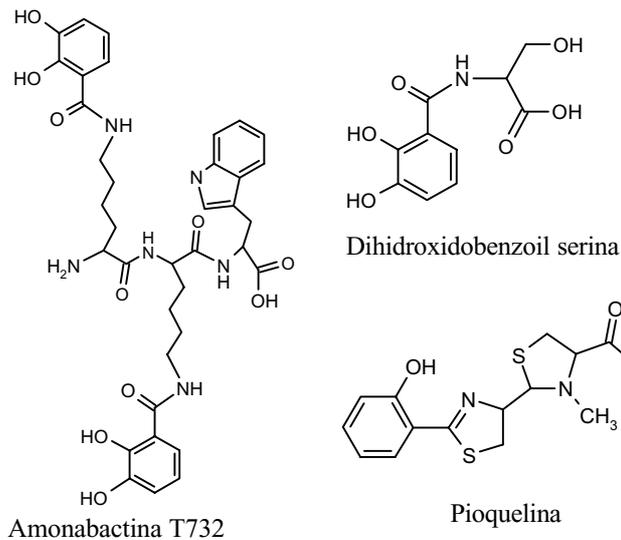
En general cuando comparamos sideróforos del mismo tipo, el aumento de la denticidad de ligando conlleva una mayor afinidad para el hierro (III), una mayor constante de estabilidad del complejo y una mayor independencia entre la afinidad del sideróforo por el hierro (III) y la concentración de sideróforo (Albrecht-Gary y Crumbliss, 1998).

## SIDERÓFOROS HEXADENTADOS DE TIPO CATECOLATO O FENOLATO

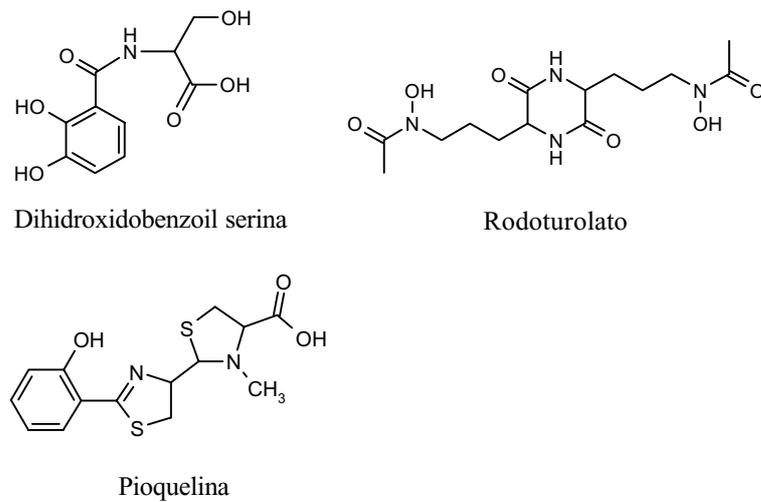


## SIDERÓFOROS NO HEXADENTADOS

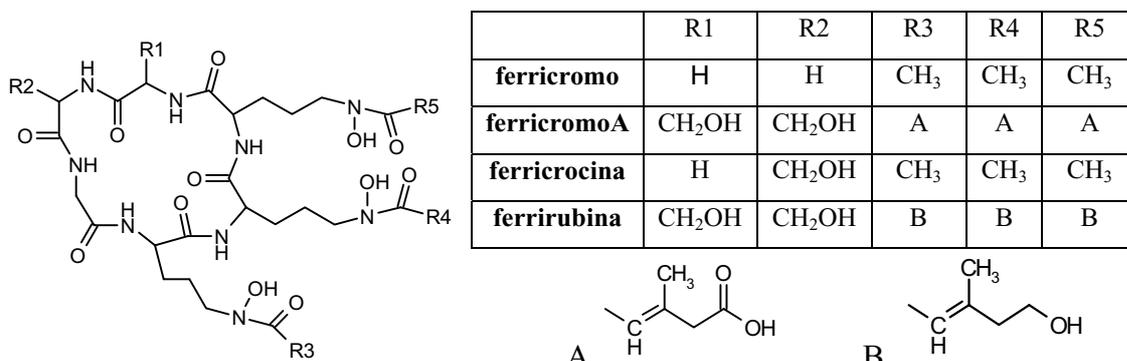
### DE TIPO CATECOLATO O FENOLATO



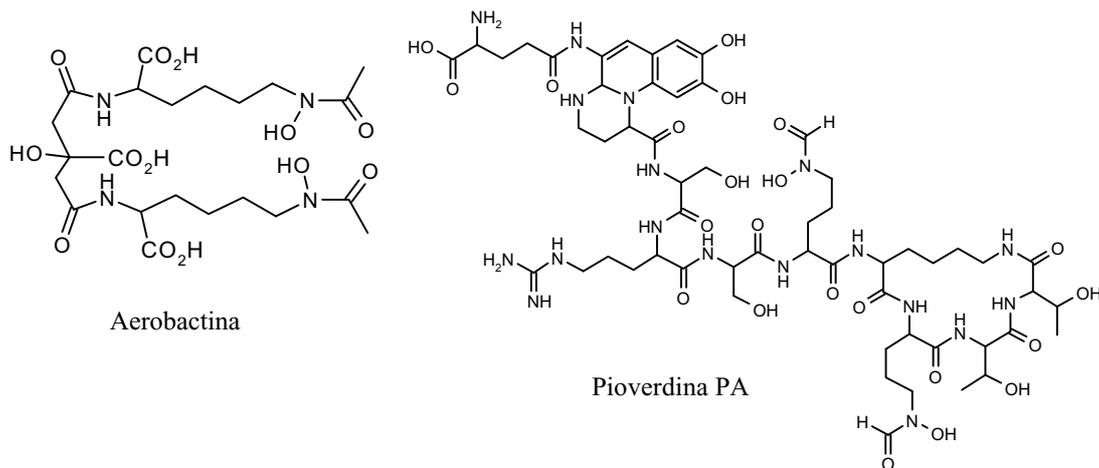
### DE TIPO HIDROXAMATO



## SIDERÓFOROS HEXADENTADOS TIPO HIDROXAMATO



## SIDERÓFOROS MIXTOS



## 1.4.3.2 Biosíntesis de sideróforos de tipo catecolato/fenolato

Los sideróforos de tipo catecolato/fenolato están generalmente compuestos por un esqueleto peptídico y por grupos funcionales fenolato encargados de la coordinación del hierro. El esqueleto peptídico es ensamblado mediante un mecanismo no ribosomal (independiente del molde de ARNm) por enzimas de la familia de las sintetasas de péptidos. Los sideróforos se ensamblan a partir de bloques de construcción básicos, generalmente aminoácidos, anillos aril y ácidos carboxílicos pequeños (Quadri, 2000).

## 1.4.3.2.1 Biosíntesis de precursores aril

Los sideróforos de tipo catecolato utilizan ácido 2,3-dihydroxidobenzoico (DHBA) y los de tipo fenolato utilizan ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico). Estos precursores se sintetizan a partir del ácido corísmico, un intermediario de la ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. Figura 1.4. (Ratledge y Dover, 2000). En *E. coli* esta vía metabólica se produce gracias a la acción secuencial de los enzimas EntC, EntB y EntA, codificados en el operón *EntCEBA* de la agrupación génica de biosíntesis y transporte de enterobactina. Se cree que las bacterias que produzcan sideróforos con DHBA conjugado con aminoácidos, tendrán versiones del operón *EntCEBA*. Este es el caso de *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Paracoccus denitrificans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Aeromonas* spp., *Agrobacterium tumefaciens* y *Azotobacter vinelandii*, entre otros (Byers y Arceneaux, 1994).

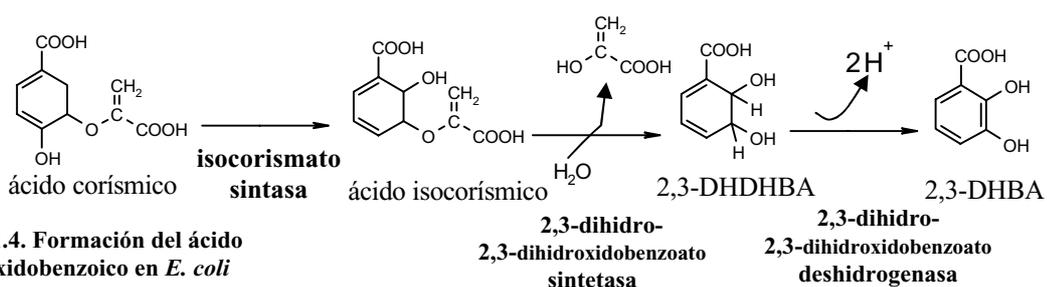


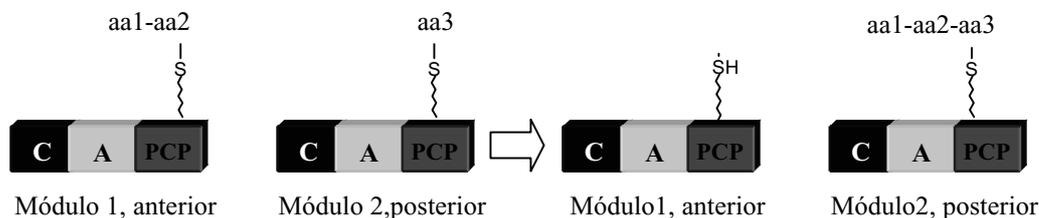
Figura 1.4. Formación del ácido Dihidroxidobenzoico en *E. coli*

Los sideróforos que contienen conjugados de ácido salicílico con aminoácidos, sintetizan dicho fenolato mediante vías alternativas. *Yersinia pestis* sintetiza el ácido salicílico de la yersiniabactina directamente a partir del ácido corísmico, en cambio *P. aeruginosa* deshidrata el 2,3-DHDHBA para obtener el precursor fenolato de la pioquelina (Ratledge y Dover, 2000).

#### 1.4.3.2 Ensamblaje de sideróforos de tipo catecolato/fenolato

La biosíntesis de péptidos no ribosomales es un mecanismo tiotemplado de múltiples transportadores, en el que se forman enlaces peptídicos entre aminoácidos, cuando éstos se hallan unidos al complejo multienzimático mediante enlaces tioéster. Dichos complejos multienzimáticos se llaman sintetasas de péptidos no ribosomales (SPNR) y forman líneas de ensamblaje multimodulares. Los módulos, a su vez constan de regiones catalíticas cooperantes, funcional y estructuralmente semiautónomas, llamadas dominios. Los módulos de iniciación, elongación y terminación se diferencian según su posición dentro de la cadena de ensamblaje y su composición en dominios catalíticos (Quadri, 2000).

El típico módulo de elongación es responsable de la adición de un aminoácido a la cadena peptídica creciente, Figura 1.5. El dominio de adenilación del Módulo 2 (A2) selecciona y activa el sustrato aminoacídico, que posteriormente será fijado al dominio de tiolación del Módulo 2 (PCP2). La fijación es un requisito esencial para que el dominio de condensación (C2) catalice la formación del enlace peptídico entre el aminoacil-S-enzima y el peptidil-S-enzima unido al módulo precedente. Finalmente, se produce la translocación de la cadena elongada y la regeneración del dominio de tiolación del módulo precedente (PCP1). Tras los ciclos de elongación necesarios, el proceso termina con la liberación del producto peptídico final. El orden de los dominios de adenilación embebidos en las líneas de ensamblaje acostumbra a ser colineal con el orden de aminoácidos del producto peptídico final.



**Figura 1.5. Esquema que ilustra la biosíntesis del esqueleto peptídico de los sideróforos.** C, dominio de condensación; A, dominio de adenilación; PCP, dominio de tiolación.

Los dominios se podrían describir como la caja de herramientas de los sistemas de síntesis de proteínas no ribosomales y son fácilmente identificables mediante alineamientos de secuencia primaria, por la presencia de secuencias señal o núcleo que imparten a cada dominio un patrón característico (Moffitt y Neilan, 2000).

#### 1.4.3.2.2.A Activación del carboxilo

Los dominios de adenilación (A) reconocen selectivamente una gran variedad de sustratos (aminoácidos proteínogénicos, no proteínogénicos, grupos aril) y los activan mediante la transferencia de un grupo AMP formando el aminoaciladenilato o ariladenilato.

El estudio de la estructura de los dominios A ha permitido dilucidar el mecanismo de selección de sustrato. Se han definido 10 regiones núcleo conservadas (A1-A10) en todos los dominios A conocidos. Nueve residuos esparcidos entre las regiones A4 y A5 interactúan con la cadena lateral del aminoácido incorporado. Las secuencias formadas por estos nueve residuos se agrupan en concordancia con la especificidad de sustrato del dominio de adenilación; permitiendo la predicción de selección de sustrato a partir de la secuencia primaria de un dominio de adenilación (Stachelhaus *et al.*, 1999; Challis *et al.*, 2000).

Los dominios de adenilación y sus secuencias código desarrollan respectivamente una función análoga a las aminoacil-RNAt sintetasas y a los codones de la síntesis ribosomal (von Döhren *et al.*, 1997). Una diferencia crucial entre la biosíntesis de péptidos ribosomal y la no ribosomal es que la última tiene en general una menor estrictencia de selección de sustrato (Weber y Marahiel, 2001; Moffitt y Neilan, 2000). Por ejemplo, el biscatecolato lineal amonabactina producido por *Aeromonas* spp. consiste en una mezcla de cuatro compuestos que varían en dos posiciones (Telford y Raymond, 1997).

La mayoría de los dominios de adenilación están inmersos en los módulos de las sintetasas, a excepción de los dominios de adenilación de los enzimas de arilación de péptidos, que son autónomos y catalizan específicamente la activación de grupos aril (por ejemplo EntE de *E. coli*).

#### 1.4.3.2.2.B Aminoacilación de los dominios de tiolación

Para que los dominios de tiolación sean funcionales, es necesaria una modificación postraducciona: la adición de un grupo fosfopanteteínico a una serina invariante de entorno DNFYxLGGxSL presente en dichos dominios. Esta modificación es catalizada por fosfopanteteinil transferasas, por ejemplo EntD de *E. coli*, frecuentemente codificadas en las agrupaciones génicas de biosíntesis y transporte de sideróforos (von Döhren *et al.*, 1997).

Los dominios de tiolación también son denominados dominios transportadores de aril (ArCP), peptidil (PCP), o acil (ACP) según si fijan anillos aril, aminoácidos sustrato/intermediarios peptídicos o ácidos carboxílicos, respectivamente.

La fijación de los bloques de construcción activados y de los intermediarios biosintéticos, se produce mediante un enlace tioéster con el grupo tiol terminal del cofactor 4'-fosfopanteteínico (4'-PP), presente en la forma holo de los dominios de tiolación.

Es importante destacar que los dominios transportadores de grupos aril son, a diferencia de la mayoría, autónomos y en *E. coli* dicha actividad se localiza en el extremo carboxilo-terminal del enzima bifuncional EntB, que además participa en la biosíntesis del 2,3-dihidroxidobenzoato, precursor de la enterobactina.

Los dominios de tiolación no sólo intervienen en la fijación de los intermediarios biosintéticos y de los bloques de construcción, además también se encargan de su transporte, acercándolos al dominio de condensación para que pueda producirse la formación del enlace peptídico.

#### **1.4.3.2.2.C Formación del enlace peptídico**

Los dominios de condensación se localizan generalmente en el extremo amino-terminal de los módulos y es el sitio donde se cataliza la formación del enlace peptídico y la translocación de la cadena (Konz y Marahiel, 1999).

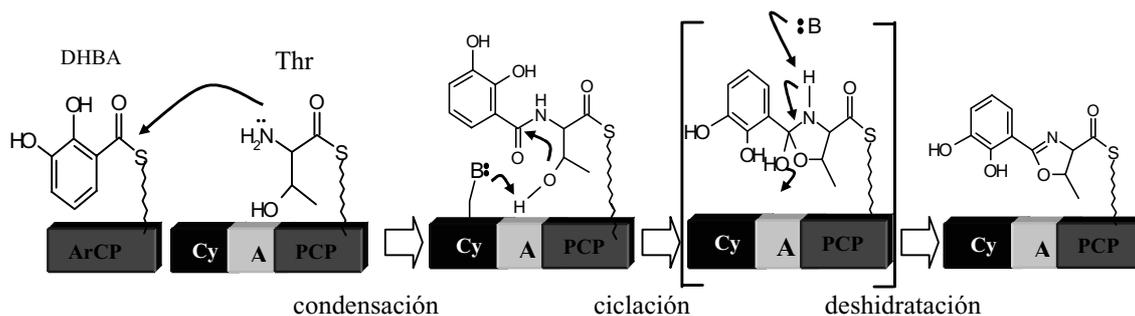
Después de la fijación del aminoácido, este es posicionado, por el cofactor 4'-PP del dominio de tiolación, en el locus aceptor del dominio de condensación. Paralelamente, el sustrato fijado al cofactor 4'-PP del módulo precedente, es posicionado en el locus donador del dominio de condensación, para que se catalice la formación del enlace peptídico.

#### **1.4.3.2.2.D Reacciones de modificación**

Además de la gran variedad de aminoácidos seleccionados por los dominios de adenilación, las líneas de ensamblaje de péptidos no ribosomales tienen la capacidad de aumentar la diversidad del producto final modificando dichos sustratos durante, o una vez finalizado, el proceso de elongación. Dichas modificaciones son posibles gracias a la acción de una gama de dominios de modificación que pueden actuar en *cis* si están inseridos en los módulos, o en *trans* si actúan como subunidades separadas (Walsh *et al.*, 2001).

Los dominios de epimerización (E) se encuentran en los módulos responsables de la adición de un D-aminoácido a la cadena peptídica creciente. Estos módulos tienen una composición C-A-PCP-E y se encargan de epimerizar los L-aminoácidos una vez estos han sido seleccionados, activados y fijados al dominio transportador. Esta parece ser la estrategia general, aunque se han descrito módulos sin dominio de epimerización que incorporan D-aminoácidos gracias a la acción de racemasas externas que epimerizan el aminoácido previamente a que éste sea seleccionado por los dominios de adenilación (Konz y Marahiel, 1999).

Una de las modificaciones más dramáticas efectuadas por algunas cadenas de ensamblaje, durante el proceso de elongación, es la heterociclación de residuos de cisteína para generar anillos tiazolínicos y la heterociclación de residuos de serina o treonina para generar anillos oxazolínicos. Esta modificación es catalizada por los **dominios de ciclación (Cy)** mediante un mecanismo de dos pasos: condensación del monómero seguida de ciclodeshidratación. La yersiniabactina, pioquelina, anguibactina y vibriobactina entre otros, utilizan estos anillos heterocíclicos para coordinar el hierro (Walsh *et al.*, 2001).



**Figura 1.6. Mecanismo propuesto para la formación de anillos heterocíclicos a partir de monómeros de treonina catalizada por los dominios de ciclación (Cy).** Los dominios Cy catalizan la condensación del aminoácido con el grupo aril y la posterior ciclación del enlace peptídico recién formado con la cadena lateral hidroxilo de la treonina, para la formación de un intermediario heterocíclico que sufrirá un proceso de deshidratación para la obtención del enlace C=N de los anillos de oxazolina. El esquema está basado en la hipótesis que el grupo amino actúa como nucleófilo durante la condensación. ArCP, proteína transportadora de aril; Cy, dominio de ciclación; A, dominio de adenilación; PCP, dominio de tiolación; Thr, treonina. Figura tomada y modificada de Walsh *et al.*, 2001.

Además se han descrito dominios reductasa para el reajustamiento redox de los anillos heterocíclicos de la pioquelina, dominios metiltransferasa (biosíntesis de pioquelina, yersiniabactina), o oxigenasas que median la formación de N-hidroxi aminoácidos que participarán en la coordinación del ion férrico (biosíntesis anguibactina).

#### 1.4.3.2.E Terminación

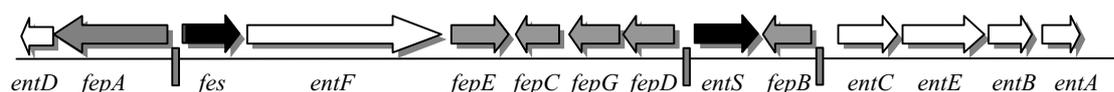
La terminación y liberación de la cadena peptídica es catalizada por los dominios tioesterasa (TE), presentes generalmente en el extremo carboxilo-terminal del módulo que incorpora el último aminoácido de la cadena peptídica (C-A-PCP-TE). La liberación de la cadena implica la transferencia entre dominios, concretamente desde el dominio PCP hasta la cadena lateral hidroxilo de la serina del sitio activo de los dominios tioesterasa; para generar un intermediario enzimático acil-O-TE. Dicho intermediario puede tener dos destinos: la hidrólisis intermolecular que liberará un sideróforo lineal con un grupo carboxílico en el extremo carboxilo-terminal (yersiniabactina, pioquelina), o la captura intramolecular mediada por un nucleófilo hidroxilo o amina de la cadena peptídica que liberará un sideróforo cíclico (enterobactina, bacilibactina) (Crosa y Walsh, 2002).

### 1.4.3.2.3 Biosíntesis de enterobactina

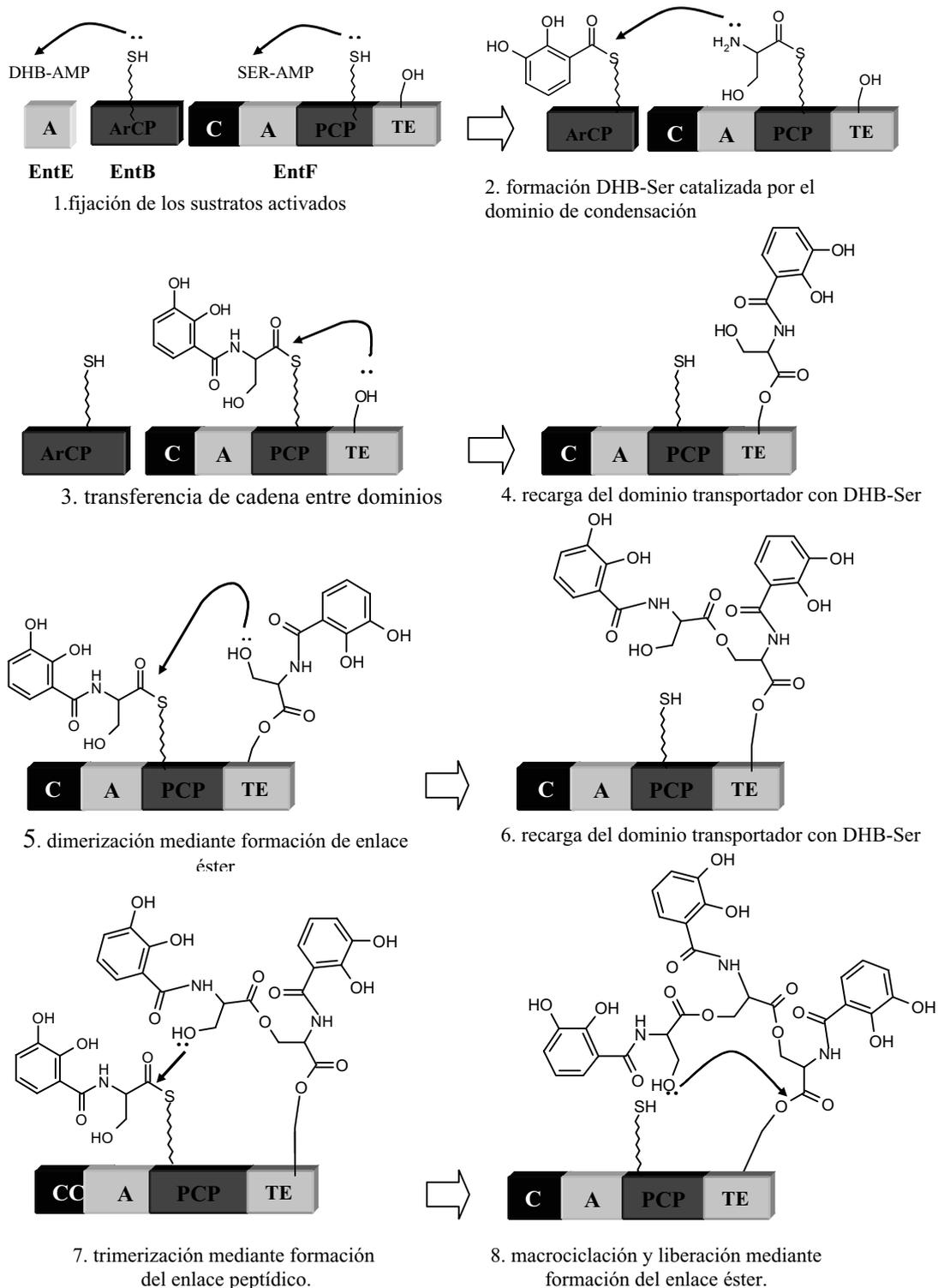
La enterobactina o enteroquelina, de 663 Da, es un trímero cíclico de N-(2,3-dihidroxidobenzoil)-L-serina producida por varios miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, por algunas cepas de *Aeromonas* spp. e incluso por algunas especies de *Streptomyces* (Raymond *et al.*, 2003). La afinidad de la enterobactina por el ion férrico es superlativa ( $k_d=10^{-52}$ ). En suero humano, la enterobactina es inactivada por la albúmina sérica (Konopka y Neilands, 1984).

La enterobactina se sintetiza en un proceso de dos etapas. En la primera etapa se biosintetiza el precursor ácido dihidroxidobenzoico, intervienen los enzimas EntC, EntB y EntA. En la segunda etapa participa la enterobactina sintetasa, formada por los enzimas EntD, EntE, EntB y EntF. EntD es la fosfopanteteinil transferasa que cataliza la formación de la holo-enterobactina sintetasa, transfiriendo el cofactor 4'-PP a los dominios de tiolación de EntB (ArCP) y de EntF (PCP). EntE activa el DHBA y lo fija al dominio ArCP del extremo carboxilo-terminal de EntB. El dominio de adenilación encajado en EntF activa la L-Serina y la fija al dominio PCP de EntF. Se producen tres ciclos de condensación de DHBA y L-Serina ( $3\text{DHBA} + 3\text{L-Ser} + 6\text{ATP} \longrightarrow \text{Ent} + 6\text{AMP} + 6\text{PP}_i$ ). La unión mediante enlaces éster de los tres conjugados DHBA-Serina es posible gracias al comportamiento atípico del dominio tioesterasa de EntF. La Figura 1.7 esquematiza las reacciones del segundo paso de biosíntesis de enterobactina (Quadri, 2000).

### 1.4.3.3 Agrupación génica de enterobactina



La agrupación génica del sistema de enterobactina es de localización cromosómica e incluye seis genes de transporte (*fepABCDGE*), seis genes de biosíntesis (*entABCDEFG*), *entS*, cuyo producto interviene en la secreción de la enterobactina y *fes*, que codifica para una esterasa citoplasmática que media la liberación del hierro del complejo ferri-enterobactina. (Chenault y Earhart, 1991; Shea y McIntosh, 1991; Earhart, 1996; Furrer *et al.*, 2002). Se cree que *fepE* codifica para un componente del sistema de transporte de enterobactina, aunque su elevada similitud con las proteínas que controlan la longitud del antígeno O del lipopolisacárido es intrigante (Ozenberger *et al.*, 1987; Whitfield *et al.*, 1997). La agrupación génica consta de seis unidades transcripcionales reguladas por Fur.



**Figura 7. Modelo de ensamblaje de enterobactina.** Los dominios de adenilación seleccionan y fijan los bloques de construcción de la enterobactina (2,3-dihydroxidobenzoato y L-Serina). Además el sistema EntBEF interviene en la formación de tres enlaces amídicos, catalizados por el dominio de condensación de EntF (condensación de tres DHB con tres Ser para formar tres unidades DHB-Ser) y la formación de tres enlaces éster ( para la unión de las tres unidades DHB-Ser que formarán la enterobactina). El dominio tioesterasa de EntF participa en la transferencia de cadena entre dominios y cataliza la formación del enlace éster necesario para la ciclación intramolecular y liberación de enterobactina. Figura modificada de Quadri, 2000

### 1.4.3.4 Transporte de sideróforos

La mayoría de bacterias, incluso las que no producen sideróforos, tienen la capacidad de utilizar ferri-sideróforos exógenos o heterólogos, es decir producidos por otras bacterias y hongos, además de internalizar sus ferri-sideróforos endógenos u homólogos.

#### 1.4.3.4.1 Eventos en la membrana externa de bacterias Gram-negativas

En muchas especies bacterianas, las condiciones restrictivas de hierro inducen la expresión de proteínas de membrana externa (IROMP). Los receptores de ferri-sideróforos son una clase de IROMP con elevada especificidad y afinidad por los complejos ferri-sideróforos. Estos receptores extraen los ferri-sideróforos del medio y los concentran en la superficie bacteriana. Además, forman canales a través de los cuales se produce la translocación de dichos complejos al espacio periplasmático; son canales cerrados, cuya apertura, promovida por unión de ligando, depende del potencial electroquímico de la membrana citoplasmática (Van der Helm, 1998).

Tabla 1.1. Especificidad de sustrato de diferentes receptores de ferri-sideróforos. Tomado de Van der Helm, 1998.

Receptor	Peso Molecular	Reconoce y transporta	Tipo de sideróforo	microorganismo
FepA	79.908	enterobactina	homólogo	<i>E. coli</i>
IutA	77.345	aerobactina	homólogo	<i>E. coli</i>
FhuA	78.992	ferricromo	heterólogo	<i>E. coli</i>
FhuE	77.453	ferrioxamina B coprógeno rodotorulato	heterólogos	<i>E. coli</i>
FecA	81.718	dicitrato férrico	heterólogo	<i>E. coli</i>
CirA	67.169	dihidroxidobenzoilserina	homólogo	<i>E. coli</i>
FiuA		dihidroxidobenzoilserina	homólogo	<i>E. coli</i>
FyuA	71.677	yersiniabactina	homólogo	<i>Y. enterocolitica</i>
FcuA	77.966	ferricromo	heterólogo	<i>Y. enterocolitica</i>
FoxA	75.768	ferrioxamina B	heterólogo	<i>Y. enterocolitica</i>
FptA	78.993	pioquelina	homólogo	<i>P. aeruginosa</i>
FpvA	86.245	pioverdina	homólogo	<i>P. aeruginosa</i>
PfeA	78.385	enterobactina	heterólogo	<i>P. aeruginosa</i>
PupX	86.257	pseudobactina B10	homólogo	<i>Pseudomonas</i> B10
PbuA	85.759	pseudobactina M114	homólogo	<i>Pseudomonas</i> M114
PupA	86.010	pseudobactina 358	homólogo	<i>P. putida</i> WCS358
PupB	83.127	pseudobactina BN7/8	heterólogo	<i>P. putida</i> WCS358
ViuA	72.417	vibriobactina	homólogo	<i>V. cholerae</i>
FatA	71.164	anguibactina	homólogo	<i>V. anguillarum</i>

La fuerte dilución de los ferri-sideróforos en el ambiente y su peso molecular relativamente grande (600-1000) en comparación con el límite de exclusión de las porinas, que es aproximadamente de 600 Da, explican la necesidad de un mecanismo de transporte activo. Los receptores de ferri-sideróforos operan eficientemente a concentraciones muy bajas de ligando, debido a la gran afinidad del sitio de unión y a la dependencia energética del proceso de translocación (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003). Estos receptores han sido evolutivamente parasitados por fagos, colicinas y sideromicinas. Por ejemplo, el receptor de ferricromo de *E. coli*, FhuA, es también el sitio de unión de los fagos T1, T5,  $\Phi$  80, UC-1, la toxina proteica colicina M, la toxina peptídica microcina J25 y la sideromicina albomicina.

La estructura atómica tridimensional de tres transportadores de ferri-sideróforos de *E. coli*: FhuA (ferricromo), FepA (ferri-enterobactina) y FecA (dicitrato férrico), ha sido recientemente resuelta. Estos monómeros están compuestos por dos dominios funcionales claramente diferenciables. Un dominio en forma de barril- $\beta$  estructurado por 22 láminas  $\beta$  transmembrana, amfifílicas y antiparalelas ( $\beta$ 1- $\beta$ 22), interconectadas entre ellas por pequeñas vueltas en la cara periplasmática (T1-T10) y por grandes bucles extracelulares (L1-L11); y un dominio globular formado por aproximadamente 150 residuos altamente conservados del extremo amino-terminal, que se pliega dentro del barril obturando la cara periplasmática del interior del receptor. Dicho dominio globular es una característica diferencial entre las porinas y los receptores de ferri-sideróforos (Ferguson *et al.*, 1998; Buchanan *et al.*, 1999). El mutante de *E. coli* FhuA sin dominio globular pierde la actividad transportadora TonB dependiente (Braun *et al.*, 2003).

Las tres etapas del proceso de transporte de sideróforos al nivel de membrana externa son: unión de ferri-sideróforo con el receptor, transmisión de la señal y translocación del complejo ferri-sideróforo al espacio periplasmático.

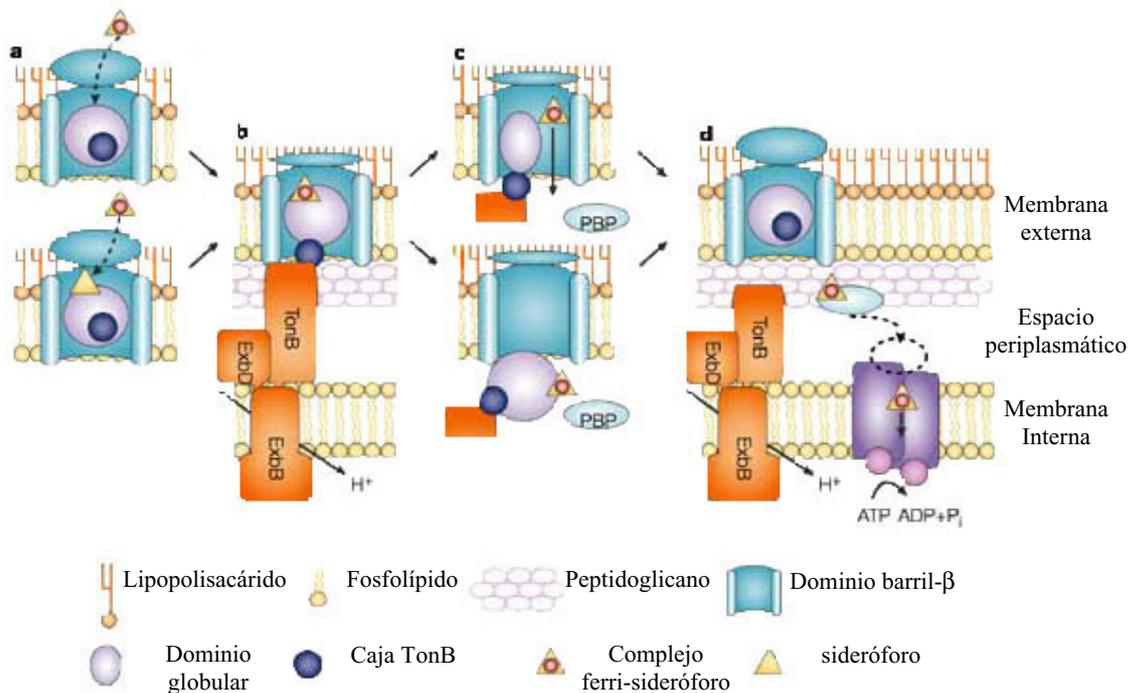
#### **1.4.3.4.1.A Unión del ferri-sideróforo con el receptor**

La unión entre el ferri-sideróforo y el receptor de membrana externa es de gran afinidad  $K_d=0.1\mu\text{M}$  (Moeck y Coulton, 1998). La mayoría de receptores de ferri-sideróforos reconocen un ferri-sideróforo específico o un pequeño rango de ferri-sideróforos estructuralmente similares. El lugar de unión a ligando de FepA y FhuA está formado por determinados residuos de los bucles extracelulares y por varios residuos de algunos bucles del dominio globular que sobresalen al exterior (Clarke *et al.*, 2001). Se han descrito apo-sideróforos con capacidad de unión a los receptores de ferri-sideróforos. Estos casos atípicos serán tratados en el apartado 1.4.3.4.1.D de la presente memoria.

#### 1.4.3.4.1.B Transducción de la señal

La comparación entre las estructuras atómicas de FecA y FhuA en su estado libre y de unión a ligando, ha permitido evidenciar los cambios conformacionales, derivados de la unión a ligando, que señalizan hacia periplasma el estado cargado del receptor. La transmisión de la señal es un prerequisite para la transferencia de energía, Figura 1.8. Curiosamente, la unión del ferricromo y FhuA provoca la disrupción de la estructura secundaria de una pequeña hélice del dominio globular cercana a la caja TonB de FhuA. Así pues, este segmento se distancia del resto del dominio globular aumentando la probabilidad de interacción entre la caja Ton B y el complejo Ton (Ferguson *et al.*, 1998).

Muchos estudios han enfatizado la importancia de una franja hidrofóbica de siete aminoácidos llamada caja TonB, localizada en el extremo amino-terminal de muchos receptores Ton B dependientes (Nau y Konisky, 1989). Los estudios de entrecruzamiento con formaldehído demuestran que FepA con mutaciones en la caja TonB pierde la capacidad de interactuar físicamente con TonB (Larsen *et al.*, 1997).



**Figura 1.8. Mecanismo propuesto para la captación de sideróforos y Vitamina B<sub>12</sub> en bacterias Gram-negativas.** a/ Se produce la unión del receptor de membrana externa y el complejo ferri-sideróforo (se han descrito receptores con el apo-sideróforo previamente unido). b/ Transducción de la señal. La unión de ligando provoca cambios conformacionales que tienen como resultado un cierre al ambiente extracelular y una mayor exposición del dominio amino-terminal al espacio periplasmático, aumentando la probabilidad de interacción con el complejo Ton. c/ La interacción con el complejo Ton induce cambios estructurales en el receptor, que resultan en la translocación del ferri-sideróforo al espacio periplasmático. Se desconoce si la interacción induce simplemente la apertura de un canal de difusión o si causa la salida de todo el dominio globular hacia el espacio periplasmático. d/ Las proteínas de unión periplasmática dirigen el complejo ferri-sideróforo a transportadores ABC-dependientes de membrana interna. Figura tomada y modificada de Faraldo-Gómez y Sansom, 2003.

#### 1.4.3.4.1.C Translocación del complejo ferri-sideróforo a periplasma

La energía necesaria para el proceso de translocación de los ferri-sideróforos a través de membrana externa es suministrada por el complejo ExbB/ExbD/TonB de estequiometría 7:2:1. Este complejo proteínico transduce la energía derivada de la fuerza motora de protones de la membrana citoplasmática a los receptores de membrana externa TonB dependientes (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003).

Las primeras evidencias de este mecanismo se derivaron de los estudios de la infección del fago T1 en *E. coli*. Las células con mutaciones en los genes *tonA* y *tonB* eran resistentes al fago T1 (*ton* de Tone). La incapacidad de unión del fago T1 a los mutantes *tonA* (más tarde llamados *fhuA*) y la adsorción reversible a los mutantes *ton B* sugirieron que *ton A* determina el primer sitio de unión y que *tonB* define un paso posterior en la infección. A su vez, el proceso de adsorción irreversible del fago T1 depende del potencial electroquímico de la membrana citoplasmática. Se concluyó que TonB induce cambios conformacionales energía dependientes en FhuA, que permiten el proceso de infección del fago T1 a las células de *E. coli*; léase que, el fago T1 reconoce específicamente el estado conformacional energizado de FhuA (Braun *et al.*, 1998).

TonB es una proteína anclada a membrana interna, por el extremo amino-terminal, que se extiende hacia el periplasma. Los mutantes carentes de TonB son deficientes en el transporte de ferri-sideróforos, vitamina B<sub>12</sub> y hemo, infección de ciertos fagos y internalización de colicinas. Estudios de mutagénesis han permitido identificar los putativos sitios de interacción del dominio carboxilo-terminal de TonB con diversos receptores TonB dependientes.

ExbD es también una proteína periplasmática anclada por el extremo amino-terminal a la membrana citoplasmática, mientras que la mayor parte de ExbB está en citoplasma anclada a la membrana citoplasmática mediante tres hélices.

TonB, a través de la acción de ExbB y ExbD en respuesta al gradiente de protones sostenido por la membrana interna, alterna varios estados conformacionales; al menos uno de los cuales es capaz de permitir la unión de su dominio carboxilo-terminal preferentemente con los receptores de membrana externa en estado de unión a ligando. La interacción produce cambios conformacionales en el receptor que derivarán en el proceso de permeación del ferri-sideróforo al espacio periplasmático (Moeck y Coulton, 1998).

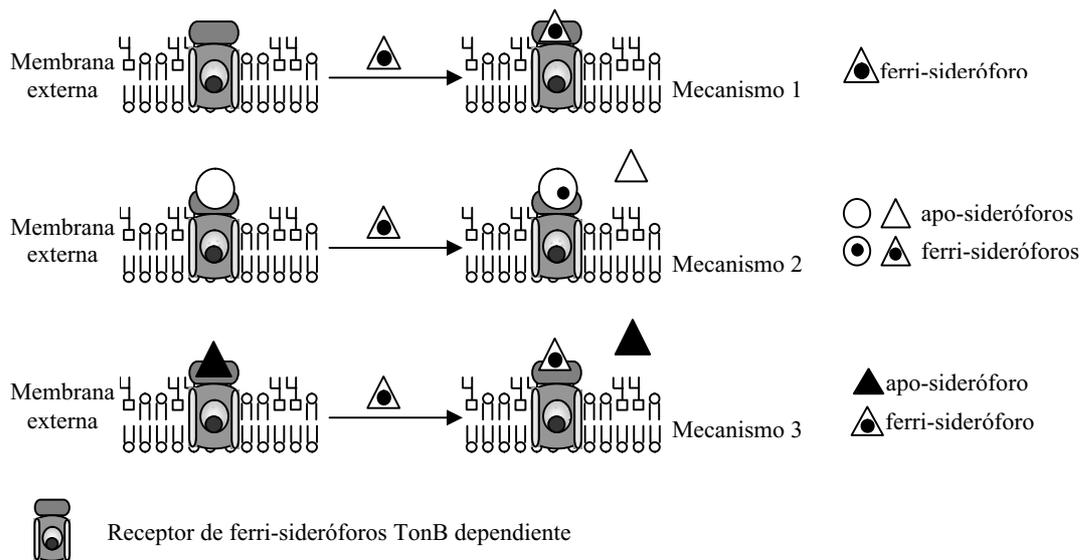
En *V. cholerae* se han identificado dos proteínas TonB, TonB1 y TonB2, que parecen tener especificidad para diferentes receptores de membrana externa. En *P. aeruginosa* también se han descrito dos genes *tonB* (Braun y Braun, 2002).

#### 1.4.3.4.1.D Mecanismos de iniciación del transporte de ferri-sideróforos

En los últimos cuatro años se ha conseguido destrivializar los pasos iniciales del transporte de ferri-sideróforos. La Figura 1.9 ilustra los tres mecanismos de iniciación descritos hasta la fecha. El más frecuente es el mediado por un receptor de membrana externa de elevada afinidad y especificidad para un ferri-sideróforo en concreto.

El segundo mecanismo se denominó mecanismo lanzadera y está basado en un proceso de intercambio de hierro que tiene lugar en la superficie celular, cuando el ferri-sideróforo transfiere el átomo de hierro a un apo-sideróforo previamente unido al receptor. El intercambio de hierro no se produce mediante la reducción del átomo de hierro. La teoría del intercambio de ligando, o mecanismo lanzadera, se postuló para el receptor de amonabactina de *A. hydrophila* gracias al empleo de análogos sintéticos de apo-sideróforos marcados radioactivamente y se hizo extensiva a CirA de *E. coli*, insinuando así la amplia distribución de esta estrategia entre los microorganismos. Además, el receptor de amonabactina de *A. hydrophila* es un receptor multifuncional de baja afinidad y especificidad, con capacidad de transportar un amplio rango de ferri-sideróforos estructuralmente muy diversos. Para ratificar esta teoría sería muy útil la caracterización genética de dicho receptor (Stintzi *et al.*, 2000).

El tercer mecanismo se dilucidó con la copurificación de apo-pioverdina con su receptor, FpvA, de *P. aeruginosa*. FpvA es un receptor de elevada afinidad cuyo estado normal en condiciones restrictivas de hierro es el de estar cargado con la apo-pioverdina. La apo-pioverdina no es transportada, sino que es desplazada en presencia de ferri-pioverdina (Schalk *et al.*, 2002).



**Figura 1.9. Mecanismos de iniciación del transporte de ferri-sideróforos.** Mecanismo 1, el ferri-sideróforo es reconocido por el receptor de membrana externa y subsiguientemente es internalizado; Mecanismo 2, se produce un proceso de intercambio de hierro entre el ferri-sideróforo y un apo-sideróforo previamente unido al receptor de membrana externa; Mecanismo 3, el ferri-sideróforo desplaza al apo-sideróforo previamente unido al receptor. Figura tomada y modificada de Schalk *et al.*, 2002.

#### 1.4.3.4.2 Eventos en la membrana interna de bacterias Gram-negativas

Los sistemas transportadores responsables de la translocación de ferri-sideróforos a través de la membrana citoplasmática son sistemas ABC (del inglés *ATP Binding Cassette*), dependientes de proteína de unión periplasmática y forman complejos proteínicos de tres componentes: una proteína periplasmática, un complejo permeasa transmembrana compuesto por dos proteínas hidrofóbicas y una ATPasa dimérica, esta última aporta la energía necesaria para el transporte a través de la membrana citoplasmática (Andrews *et al.*, 2003). Los mutantes de cualquier componente del sistema tienen un sólido fenotipo transportador deficiente. Los sistemas transportadores de ferri-sideróforos, hemo y VitB<sub>12</sub> pertenecen a la misma familia.

##### 1.4.3.4.2.A Proteínas periplasmáticas de unión a ferri-sideróforos

Los componentes periplasmáticos de Gram-negativas son generalmente proteínas solubles, aunque ocasionalmente, como por ejemplo ViuP de *V. cholerae*, son lipoproteínas ancladas a membrana interna (Wyckoff *et al.*, 1999).

La unión entre las proteínas periplasmáticas y sus ferri-sideróforos sustrato es de gran afinidad. Los ensayos de unión a sustrato utilizando fracciones de proteínas periplasmáticas solubles han sido estériles y han obligado a buscar mecanismos alternativos para determinar la especificidad de sustrato de las proteínas periplasmáticas que unen ferri-sideróforos (Stephens *et al.*, 1995).

Las proteínas periplasmáticas de diferentes sistemas presentan una baja similitud de secuencia entre ellas, sin embargo comparten la misma estructura de dos dominios globulares interconectados por una cadena polipeptídica que facilita el movimiento de los dos lóbulos mediante un mecanismo bisagra. FhuD parece ser diferente básicamente en la región conectora flexible y no parece adoptar las conformaciones abierta/cerrada característica de las respectivas apo/holo-proteínas de unión periplasmática caracterizadas hasta la fecha (Clarke *et al.*, 2001).

No está claro si la proteína periplasmática recoge el ferri-sideróforo directamente del receptor, o si simplemente lo extrae del periplasma. La proteína periplasmática cargada con su sustrato lo entrega específicamente a una permeasa de membrana interna. El transporte a través de membrana interna implica el reconocimiento específico entre el componente periplasmático unido a ligando y el componente permeasa, seguido de la extracción del complejo ferri-sideróforo y de su translocación a través de la membrana citoplasmática, gracias al aporte energético proporcionado por el componente ATPasa del sistema (Köster, 2001).

La permeasa de membrana citoplasmática es en el transporte de ferri-sideróforos generalmente un heterodímero formado por dos polipéptidos que atraviesan la membrana citoplasmática. En cada proteína se ha detectado una región conservada denominada bucle

EAA, cercana al extremo carboxilo-terminal y de secuencia EAA---G-----I-LP. Se piensa que estas secuencias señal están orientadas hacia citoplasma y interactúan con el componente de unión a ATP (Boos y Lucht, 1996).

Los componentes hidrolasas de ATP tienen dos motivos altamente conservados llamados Walker A y Walker B. Se supone que la energía aportada por las hidrolasas induce cambios conformacionales en los componentes del complejo permeasa que tienen como desenlace el trasvase del ferri-sideróforo al espacio citoplasmático. Las ATPasas son los componentes más conservados entre los diferentes sistemas de transporte (Köster, 2001).

#### 1.4.3.4.3 Sistemas de transporte de ferri-sideróforos de *E. coli*

La Figura 1.10 ilustra los tres sistemas transportadores de ferri-sideróforos, ABC dependientes de proteína de unión periplasmática, caracterizados en *E. coli*: el sistema transportador de ferri-hidroxiámato, el de ferri-catecolato y el de dicitrato férrico. Igual que *E. coli*, otras bacterias tienen más receptores de membrana externa que sistemas transportadores de membrana interna, reflejo de que la especificidad del transporte de ferri-sideróforos reside en el reconocimiento de los receptores de membrana externa, de mayor afinidad y especificidad que las proteínas periplasmáticas.

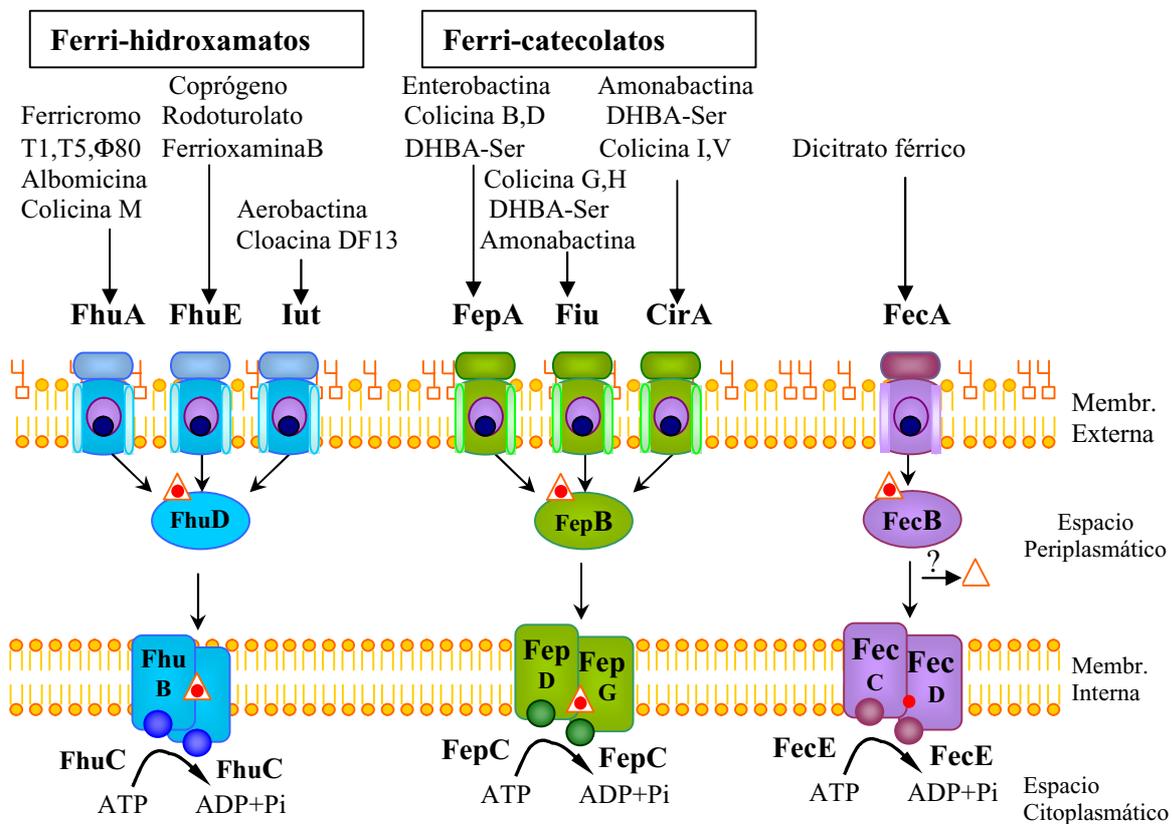


Figura 1.10. Sistemas de internalización de ferri-sideróforos de *E. coli* K-12.

#### 1.4.3.4.3.A Transporte de ferri-hidroxiatos en *E. coli*

El sistema de transporte Fhu está implicado en la internalización de ferri-hidroxiatos. El receptor de membrana externa para el ferricromo, FhuA, y el sistema de transporte ABC dependiente de proteína de unión periplasmática, FhuBCD están codificados en un mismo operón. Figura 1.11.

El componente periplasmático del sistema transportador de ferri-hidroxiatos de *E. coli* FhuD, une promiscuamente una gran variedad de sustratos con grupos hidroxiato estructuralmente diferentes, que ordenados de menor a mayor  $K_d$  son: ferri-coprógeno (300 nM), ferri-aerobactina (400 nM), ferricromo (1000 nM), albomicina (5400 nM), ferrioxamina B y ferrioxamina E (Köster, 2001).

La aerobactina, producida por las *Enterobacteriaceae* que tienen el plásmido pColV-K30, aunque en ocasiones los genes de biosíntesis son de codificación cromosómica, es un sideróforo dihidroxiato (dos hidroxilisinas modificadas) montado en ácido cítrico, transportado a nivel de membrana externa por el receptor IutA. La aerobactina es un factor de virulencia particularmente importante en infecciones invasivas (Williams, 1979).

#### 1.4.3.4.3.B Transporte de ferri-catecolatos en *E. coli*

Como ya he comentado anteriormente, los genes del sistema de transporte de ferricatecolatos de *E. coli* están codificados en la misma agrupación génica que los genes de biosíntesis y secreción de enterobactina (Chenault y Earhart, 1991; Shea y McIntosh, 1991).

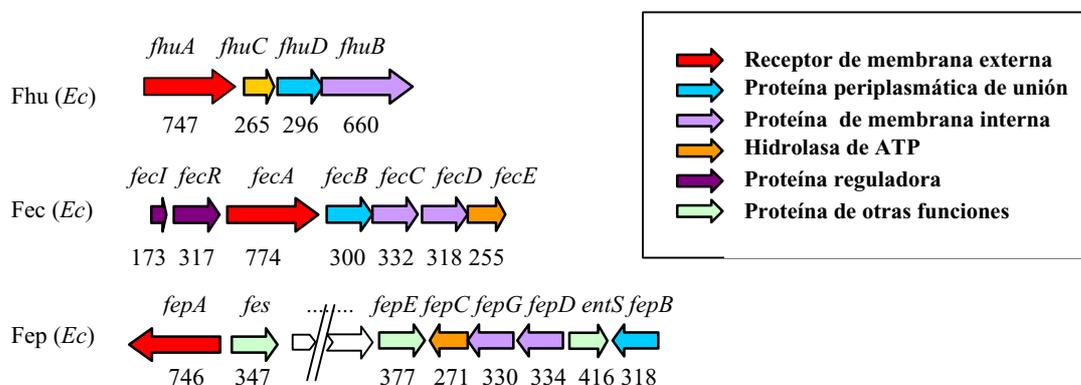
La unión de FepB, el componente periplasmático del sistema, con la ferri-enterobactina se demostró gracias al trihíbrido LppOmpAFepB, utilizado para vehiculizar FepB a la membrana externa (Stephens *et al.*, 1995). Los estudios recientes de unión empleando proteína purificada sugieren que FepB une ferri-enterobactina con gran afinidad ( $K_d=30\text{nM}$ ) y que no es capaz de unir la agrobactina, un catecolato de estructura similar a la vibriobactina (Sprenkel *et al.*, 2000).

Pero además de internalizar la enterobactina, el sistema FepBCDG es capaz de internalizar los ferri-sideróforos reconocidos por los receptores de membrana externa CirA y Fiu. Los estudios de bioensayo han permitido inferir que ambos receptores son capaces de importar a periplasma la dihidroxidobenzoil-serina férrica y la ferri-amonabactina (Hantke, 1990; Rabsch y Winkelmann, 1991). Ambos receptores transportan además una impresionante variedad de antibióticos con grupos catecolato, incluyendo cefalosporinas y antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Nikaido y Rosenberg, 1990).

### 1.4.3.4.3.C Transporte de dicitrato férrico en *E. coli*

El dicitrato férrico, a pesar de su bajo peso molecular, 443 daltons, es transportado activamente a través de membrana externa vía FecA (Staudenmaier *et al.*, 1989),

El dicitrato férrico es internalizado por el único sistema de transporte de ferri-sideróforos de *E. coli* cuya expresión está inducida por la presencia de sustrato. Los seis genes de transporte, *fecABDCE* se transcriben, en condiciones de limitación de hierro y presencia de dicitrato férrico, a partir de un promotor en la región 5' de *fecA*. La inducción de la expresión génica por presencia de ligando será tratada en el apartado 1.7.2. Los estudios de transporte utilizando [<sup>55</sup>Fe<sup>3+</sup>] [<sup>14</sup>C] citrato, revelan que la fijación de citrato, a diferencia de la fijación de hierro, es residual; insinuando que únicamente el hierro es internalizado a citoplasma (Stiefel *et al.*, 2001).



**Figura 1.11. Agrupaciones génicas de *E. coli* relacionadas con el transporte de ferri-sideróforos.** La dirección de transcripción de los genes se indica mediante flechas y también se indica el número de aminoácidos de las proteínas. *Ec*, *Escherichia coli*; Fhu, transporte de ferri-hidroxamatos; Fec, transporte de dicitrato férrico; Fep, transporte de ferri-enterobactina. Figura tomada y modificada de Braun *et al.*, 1998.

### 1.4.3.5 Destino de los complejos ferri-sideróforos en citoplasma

Generalmente, el proceso de liberación del hierro de los complejos Fe(III)-sideróforos es efectuado por ferri-reductasas citoplasmáticas, que median la formación del complejo Fe(II)-sideróforo para facilitar su subsiguiente disociación, puesto que la afinidad de los sideróforos por la forma reducida del hierro es relativamente baja. Las ferri-reductasas citoplasmáticas bacterianas tienen un amplio rango de especificidad de sustrato y hasta la fecha no se ha caracterizado ninguna ferri-reductasa cuya expresión esté inducida por las condiciones restrictivas de hierro (Schröder *et al.*, 2003).

El hierro liberado es incorporado a proteínas o almacenado intracelularmente en forma de ferritinas, bacterioferritinas y proteínas Dps. Algunos sideróforos se reciclan, como por ejemplo la aerobactina. En cambio, el desferri-ferricromo se inactiva mediante la acetilación de los grupos hidroxamato (Braun y Braun, 2002).

En ocasiones, el proceso de liberación es facilitado por la hidrólisis del complejo ferri-sideróforo. Los enlaces éster de la ferri-enterobactina son hidrolizados por una esterasa codificada por el gen *fes* perteneciente a la agrupación génica de enterobactina. Se piensa que la hidrólisis de la ferri-enterobactina y la reducción del hierro son eventos encadenados. Por consiguiente, la liberación del hierro se produce a expensas de la pérdida de una molécula de enterobactina. De todos modos, los monómeros de dihidroxidobenzoilserina tienen capacidad quelante de hierro y son considerados sideróforos bidentados (Andrews *et al.*, 2003; Hantke, 1990).

#### 1.4.3.6 Aplicaciones del estudio de los sideróforos

Algunos sideróforos, como por ejemplo la desferrioxamina B (Desferal®) producida por *Streptomyces*, han sido comercializados para extraer el exceso de hierro de individuos afectados por hemocromatosis o por sobrecarga de hierro derivada de transfusiones sanguíneas recurrentes. Pero la utilización terapéutica de la desferrioxamina B no está exenta de efectos secundarios. Al ser un sideróforo natural, algunos patógenos, a destacar *Y. enterocolitica*, son capaces de utilizar este agente quelante como fuente de hierro, dando lugar a infecciones oportunistas. Además, su débil absorción gastrointestinal, hace necesaria la administración por vía parenteral (Tilbrook y Hider, 1998).

La emergencia de bacterias resistentes es un problema en aumento, que hace atractivo el diseño de antibióticos conjugados con sideróforos para ser transportados, cuál caballos de Troya, a las células bacterianas; con la finalidad última de reducir la concentración mínima inhibitoria del agente terapéutico (Braun, 1999). Este concepto permite una importación a periplasma de elevada afinidad y si fuera necesario, los conjugados podrían diseñarse para ser capaces de ser trasvasados por un sistema ABC dependiente y así poder llegar a citoplasma de los patógenos (Köster, 2001). La aproximación es óptima para aquellos sistemas transportadores implicados en la virulencia del patógeno, dado que incluso la aparición de resistencia, derivada de la pérdida del sistema de transporte de elevada afinidad, sería perjudicial para el patógeno.

Las aplicaciones de la ingeniería de proteínas a la biosíntesis de sideróforos, abren la posibilidad de sobrepasar las fronteras de la diversidad natural de estos péptidos no ribosomales, mediante el diseño dirigido de nuevas líneas de ensamblaje. Las estrategias se basan en la adición, delección, reorganización de dominios y módulos, alteraciones en los dominios de adenilación que repercutan en la especificidad de selección de monómeros y combinación de subunidades compatibles de diferentes líneas de ensamblaje (Quadri, 2000).

#### **1.4.4 Adquisición directa del hierro de las proteínas del huésped**

##### **1.4.4. 1 Captación de hemo y hemoproteínas**

Los mecanismos bacterianos de captación de hemo se dividen en dos grandes grupos, dependiendo de si existe unión directa entre el grupo hemo y/o la hemoproteína y los receptores de membrana externa TonB dependientes, o de si en la adquisición intervienen proteínas solubles llamadas hemóforos, que después de interactuar con la hemoproteína entran en contacto con la superficie celular, donde interactúan con el receptor TonB dependiente.

##### **1.4.4.1.1 Unión directa de hemo y hemoproteínas a receptores TonB dependientes de membrana externa.**

Los sistemas bacterianos de unión directa de hemo y hemoproteínas se clasifican, a su vez, dependiendo del grado de especificidad del receptor. Así, encontramos receptores que pueden utilizar como fuente de hierro una gran variedad de compuestos que contienen hemo, como por ejemplo los receptores de hemo/hemoglobina de *Yersinia*, *E. coli* y *Shigella*; y receptores altamente específicos para una hemoproteína en particular, como por ejemplo HutA de *V. cholerae* (Wandersman y Stojiljkovic, 2000).

A pesar de las diferencias en la especificidad, todos estos receptores median la disociación del grupo hemo de la hemoproteína y el subsiguiente trasvase del grupo hemo a través de la membrana externa de un modo complejo TonB-Exb dependiente. El transporte de hemo a través de la membrana interna parece requerir una permeasa del tipo ABC sin necesidad de intervención de proteína periplasmática de unión (Genco y Dixon, 2001).

Los receptores de hemo y los receptores de ferri-sideróforos tienen una similitud de secuencia significativa, de modo que cabe esperar que todos ellos se estructuren globalmente de una forma parecida. La región amino-terminal es la más conservada entre los receptores de hemo, de ferri-sideróforos, de lactoferrina y de transferrina (Lundrigan y Kadner, 1986). Los receptores de hemo se caracterizan por la presencia de un dominio altamente conservado, el dominio FRAP/NPLN (Bracken *et al.*, 1999).

##### **1.4.4.1.2 Adquisición de hemo y hemoproteínas dependiente de proteínas solubles**

Los hemóforos son pequeñas proteínas extracelulares secretadas por transportadores de tipo ABC mediante un proceso que implica su secuencia de secreción carboxilo-terminal. Su función es la de unir hemo y entregarlo a un receptor específico de membrana externa. El sistema HasA/HasR de *Serratia marcescens* es el mejor caracterizado.

Brevemente, HasA es un hemóforo secretado en condiciones restrictivas de hierro que puede extraer el hemo de la hemoglobina. HasR tiene similitud con otros receptores TonB dependientes. HasA es indispensable para la adquisición del hemo de la hemopexina y de la mioglobina, y aunque no es imprescindible para la adquisición de hemo vía HasR, se ha visto que la presencia de HasA aumenta sustancialmente la capacidad de transporte de hemo libre o hemo asociado a hemoglobina. De este modo, HasA además de aumentar la eficiencia del sistema de transporte, aumenta también la variedad de fuentes de hemo utilizadas. Se han detectado hemóforos libres de ligando con capacidad de unión a su receptor; se desconoce si se produce un intercambio de hemo o un desplazamiento debido a las afinidades diferenciales del receptor por la forma cargada y libre del hemóforo (Létoffé *et al.*, 2001).

HxuA es un hemóforo de *Haemophilus influenzae* implicado en la captación de hemo y hemopexina. La agrupación génica *hxuCBA* codifica también para un receptor de membrana externa y para una proteína de secuencia similar a los componentes de exportación de toxinas proteicas.

#### 1.4.4.2 Captación del hierro de la transferrina y lactoferrina

Los sistemas de adquisición directa del hierro de glicoproteínas séricas mejor estudiados son los de *Neisseria* y *Haemophilus*. Se han identificado receptores de transferrina y receptores de lactoferrina, localizados en la membrana externa y inducidos por las condiciones restrictivas de hierro.

*N. gonorrhoeae* no sintetiza sideróforos, aunque puede utilizar sideróforos exógenos como la aerobactina, enterobactina y agentes quelantes de baja afinidad como por ejemplo el citrato y otros intermediarios metabólicos con capacidad de unir hierro (malato, piruvato). A pesar de no secretar sideróforos, las especies patógenas de *Neisseria* pueden utilizar el hierro de glicoproteínas humanas (transferrina, lactoferrina) así como del hemo, la hemina y la hemoglobina.

La utilización de la ferri-transferrina por parte de los gonococos requiere el contacto directo entre la proteína y la superficie celular, puesto que el aislamiento de la glicoproteína en una bolsa de diálisis no sólo no permite el crecimiento del gonococo, sino que además lo inhibe, debido a la capacidad de retención de hierro de la glicoproteína.

Cuando se suministra ferri-transferrina doblemente marcada con  $^{125}\text{I}$ - $^{59}\text{Fe}$  a las células privadas de hierro, éstas únicamente incorporan el hierro radioactivo. La transferrina marcada con  $^{125}\text{I}$  se une a las células pero no se acumula intracelularmente. La captación del hierro de la transferrina, a diferencia de la unión de la transferrina, es energía dependiente (Cornelissen y Sparling, 1994).

Se han caracterizado dos proteínas del gonococo, inducidas por las condiciones de limitación de hierro, que unen exclusivamente transferrina humana. Los mutantes carentes de estas proteínas son avirulentos en humanos. Tbp1 está codificada por el gen *tbpA* y Tbp2 por el gen *tbpB*. Tbp1 es un receptor de membrana externa TonB dependiente que forma un canal a través del cual el hierro liberado de la transferrina atraviesa la membrana externa. Los mutantes carentes de Tbp1 pierden la capacidad de utilizar la ferri-transferrina como fuente de hierro, aunque aún conservan una significativa capacidad de unión de la proteína. Tbp2 es una lipoproteína codificada por el gen *tbpB*, localizado en el extremo 5' del gen *tbpA*; ambos genes forman parte de la misma unidad transcripcional.

El mecanismo de acción propuesto tiene en consideración la estructura bilobulada de la transferrina y la observación que Tbp1 forma dímeros en solución. La habilidad de Tbp2 para discriminar la forma apo y holo de la transferrina, sugiere que Tbp2 reconoce y une inicialmente la ferri-transferrina y la presenta al dímero transmembrana Tbp1. Las posteriores interacciones entre ambas moléculas receptoras y la ferri-transferrina podrían orientar los sitios de unión de hierro de la transferrina a los poros formados por Tbp1. Se cree que la asociación de las dos proteínas receptoras induce cambios conformacionales en la transferrina que median la liberación del hierro (Ratledge y Dover, 2000).

El transporte de los iones férricos, procedentes de la transferrina, a través de periplasma y su subsiguiente trasvase a citoplasma, es dependiente de una proteína de unión periplasmática llamada Fbp (del inglés *Ferric Binding Protein*) y de un sistema permeasa de tipo ABC (Andrews *et al.*, 2003).

La capacidad de captación directa de una fuente de hierro del huésped contribuye a la disminución de los gastos energéticos derivados de la biosíntesis de sideróforos. Además, en el caso de que los receptores de transferrina eucarióticos y procarióticos reconocieran diferentes dominios de la transferrina, sería posible que el complejo receptor-transferrina actuara como una adhesina, promoviendo la interacción con la membrana de las células del huésped (Cornelissen y Sparling, 1994).

<b>Característica</b>	<b>Receptor Bacteriano</b>	<b>Receptor eucariótico</b>
número de copias	2.500/cfu	90.000-300.000/célula
afinidad	$5 \times 10^{-7}$ M	$1 \times 10^{-9}$ M
reconocimiento	ferri-transferrina	ferri-transferrina
especificidad	Transferrina humana	Varias transferrinas
internalización del complejo ferritransferrina	no	sí
estructura	Tbp1,Tbp2 (2:1)	homodímero

**Tabla 1.2. Características de los receptores de transferrina bacterianos y eucarióticos.**

### 1.5 Los mecanismos de captación de hierro como factor de virulencia

Desafortunadamente, en muchos casos no se han construido mutantes isogénicos para poder valorar la implicación de un determinado sistema de captación de hierro en la virulencia de un patógeno bacteriano (Ratledge y Dover, 2000). La virulencia de las cepas de *E. coli* y otras entéricas es fuertemente promovida por la presencia del sistema aerobactina, ya sea de codificación cromosómica o mediada por el plásmido pColV-K30 (Williams, 1979). La virulencia del patógeno de peces marinos *Vibrio anguillarum* depende del sideróforo anguibactina, cuyo sistema de biosíntesis y transporte está codificado en el plásmido pJM1 (Crosa, 1980). El pretratamiento de ratones con ferrioxamina reduce la dosis letal<sub>50</sub> de *Y. enterocolitica* desde  $10^8$  hasta menos de 10 microorganismos (Robins-Browne y Prpic, 1985). La detección de anticuerpos contra Fbp en el suero de pacientes con infección por *Neisseria spp.* es un hecho indicativo de que estas proteínas se expresan *in vivo* y que pueden ser importantes para la patogenicidad. Se ha propuesto que la especificidad de huésped de *Neisseria spp.* y *Haemophilus influenzae* es debida a que únicamente pueden utilizar la lactoferrina y la transferrina de origen humano. Se ha demostrado que los mutantes de *N. meningitidis* incapaces de utilizar hemoglobina como fuente de hierro son atenuados en su virulencia (Stojiljlovic *et al.*, 1995).

### 1.6 El hierro como señal reguladora

La gran mayoría de bacterias responden a la privación de hierro regulando, de forma coordinada, no sólo la expresión de las proteínas implicadas en la homeóstasis del hierro (sistemas de captación y almacenamiento de hierro); si no que además se ven afectados un número de factores de virulencia, entre ellos, varias toxinas: Shiga-like 1 de *E. coli*, toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae*, exotoxina A de *P. aeruginosa*, hemolisinas, elastasas y proteasas alcalinas (Litwin y Calderwood, 1993; Vasil y Ochsner, 1999).

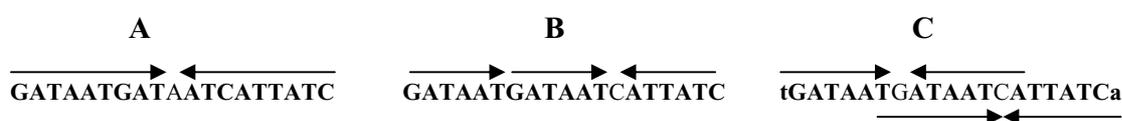
Aunque es importante tener en mente que los factores de virulencia pueden estar controlados simultáneamente por varios reguladores de respuesta a diferentes parámetros. A destacar, la temperatura, la osmolaridad, el pH, la disponibilidad de fuente de carbono, los niveles de oxígeno y la percepción de quórum (Finlay y Falkow, 1997).

### 1.7 Regulación de los mecanismos de captación de hierro bacterianos

El uso efectivo del hierro como biocatalizador requiere cumplir con las constricciones impuestas por sus propiedades de solubilidad y reactividad.

### 1.7.1 Regulación genética mediada por Fe<sup>2+</sup>-Fur

La proteína Fur forma homodímeros y actúa como represor transcripcional gracias a su capacidad de unión, dependiente de ion ferroso, a las regiones operadoras de los promotores de los genes del modulón Fur. Las secuencias de ADN diana del complejo Fe<sup>2+</sup>-Fur se denominaron Cajas Fur y fueron interpretadas inicialmente, mediante la técnica de la impronta en las regiones promotoras del operón aerobactina, como una secuencia palindrómica degenerada de 19 pares de bases. Cada palíndrome representaba el sitio de unión de un único dímero (De Lorenzo *et al.*, 1988). Hoy en día, diferentes autores interpretan la Caja Fur como repeticiones de hexámeros o de heptámeros, figura 1.12. (Baichoo y Helmann 2002; Lavrrar y McIntosh, 2003).



**Figura 1.12. Diferentes interpretaciones de la caja Fur.** A/ Dos palíndromes de nueve pares de bases. B/ tres repeticiones de 6 pares de bases C/ dos palíndromes de siete pares de bases en las dos cadenas.

El gen *fur* de *E. coli* está autoregulado, pero además es inducido por el sistema cAMP-CAP que correlaciona su expresión con el estado metabólico celular y por los reguladores de respuesta al estrés oxidativo (De Lorenzo *et al.*, 1988; Zheng *et al.*, 1999).

Fur es una proteína pleiotrópica que regula globalmente el metabolismo celular, los genes regulados por Fur forman el modulón Fur. En *E. coli*, el complejo Fur-Fe<sup>2+</sup> puede actuar como represor de: sistemas de captación de hierro, producción de toxinas, hemolisinas, flagelación y otros determinantes de virulencia, enzimas de respuesta al estrés oxidativo Mn<sup>2+</sup> dependientes; o puede actuar positivamente, de forma indirecta: almacenamiento de hierro, enzimas de respuesta al estrés oxidativo hierro dependientes, aconitasas, ciclo de los ácidos tricarbónicos. En *S. enterica* serovar Typhimurium, Fur induce algunos genes de respuesta al estrés ácido (Andrews *et al.*, 2003). Recientemente, se ha descrito un pequeño RNA no codificante, llamado RyhB, que podría actuar como mediador en la regulación positiva ejercida por Fur (Massé y Gottesman, 2002).

La proteína Fur y sus secuencias diana están conservadas en bacterias Gram-negativas y en algunas Gram-positivas y su papel como regulador global ha sido repetidamente evidenciado (Hantke, 2001). En *A. hydrophila* Fur acopla la expresión de la enterotoxina citotóxica Act a las condiciones restrictivas de hierro (Sha *et al.*, 2001).

Las bacterias Gram-positivas con un alto porcentaje en G+C, sintetizan otro represor, llamado DtxR. Los mutantes de *C. diphtheriae* defectivos en DtxR presentan una síntesis

constitutiva de los genes regulados por hierro, entre ellos los genes de captación de hierro y los genes de la toxina diftérica (Hantke, 2001).

### 1.7.2 Regulación de la transcripción génica por presencia de ligando

En algunos casos, la presencia ambiental de una determinada fuente de hierro induce específicamente la expresión de los genes que codifican para su sistema de adquisición. La regulación en la expresión génica ejercida por estos mecanismos de inducción está subordinada a Fur. En consecuencia, la inducción sólo se produce en condiciones restrictivas de hierro (Jorge H. Crosa, 1997).

Dependiendo del mecanismo molecular de inducción, el receptor además de intervenir en el transporte, media la expresión de los genes del sistema de captación, en la medida que actúa como transductor de la señal. El papel dual de FecA (dicitrato férrico) de *E. coli* y FpvA (ferri-pioverdina) de *P. aeruginosa* se correlaciona con una extensión amino-terminal de la proteína madura. En estos dos casos intervienen además proteínas reguladoras transmembrana (FecR, FpvR) que en presencia de ligando activan a factores sigma alternativos, llamados ECF de respuesta a la privación de hierro (*ExtraCyttoplasmic Functions*): FecI para el dicitrato férrico y en el caso de la pioverdina FpvI, PvdS. La inducción mediada por la ferri-pioverdina requiere además PtxR que es un regulador transcripcional del tipo LysR (Stiefel *et al.*, 2001; Visca *et al.*, 2002).

En *P. aeruginosa* se han descrito otros sistemas de inducción mediados por sistemas de transducción de la señal de dos componentes (PfeS/PfeR, enterobactina) o por reguladores transcripcionales del tipo Ara-C (PchR, pioquelina). El generalizado uso de mecanismos de inducción por presencia de ligando, permite a *P. aeruginosa* establecer una jerarquía de utilización del ferri-sideróforo más efectivo en un ambiente particular. La jerarquía afecta a los sideróforos endógenos y exógenos (Poole y McKay, 2003).

## **OBJETIVOS**

El principal objetivo de la presente tesis doctoral era la caracterización genética y proteómica de los mecanismos de captación de hierro en *Aeromonas* spp. mesófilas.

Tal y como hemos desarrollado en la introducción, estudios anteriores habían caracterizado la estructura química de los sideróforos producidos por *Aeromonas* spp mesófilas, principalmente enterobactina y amonabactina, así como la identificación de algunos de los genes que codifican para los enzimas que catalizan los primeros pasos de la biosíntesis de ambos. A pesar de haber generado mutantes con un fenotipo defectivo en la producción de sideróforos, la contribución a la virulencia de los diferentes mecanismos de captación de hierro de elevada afinidad de *Aeromonas* spp., no había sido determinada, siendo éste un objetivo primordial para nosotros.

Decidimos pues, caracterizar los mecanismos de captación de hierro de elevada afinidad, centrándonos en la cepa de *A. hydrophila* AH-3 a pesar de desconocer el tipo de sideróforo producido, por ser una de las cepas mejor caracterizadas en nuestro grupo de investigación. Uno de los primeros objetivos era la obtención y caracterización de mutantes isogénicos, con alteraciones en la capacidad de biosíntesis o de transporte de sideróforos, que nos permitieran valorar la funcionalidad de los diferentes componentes del sistema de captación de hierro de elevada afinidad y su contribución al proceso patogénico. De igual importancia era la caracterización genética de la agrupación implicada en la biosíntesis y transporte de sideróforos, para poder realizar los pertinentes estudios de complementación y estudiar la prevalencia de dichos genes entre las cepas de *Aeromonas* spp. La obtención de un mutante deficiente en el receptor de ferri-sideróforos de la cepa AH-3, nos encaminó hacia la obtención de anticuerpos para poder estudiar la presencia de dicho receptor en la membrana externa de las diferentes cepas de *Aeromonas* spp.

Estudios anteriores habían demostrado la independencia entre el sistema de captación de elevada afinidad y el sistema de captación del hierro de las hemoproteínas del huésped. Ante estas evidencias, parecía más que probable que la utilización de las hemoproteínas del huésped estuviera mediada por uno o varios receptores del grupo hemo en la membrana externa. Así pues, el principal objetivo a este respecto era la caracterización de dicho receptor a nivel genético, la generación de un mutante para evaluar la redundancia funcional de los sistemas de captación del grupo hemo y la distribución poblacional del gen entre las Aeromonadáceas.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 2. Material y Métodos

### 2.1. Cepas bacterianas

Cepa	Características principales	Procedencia
AH-3	<i>A. hydrophila</i> O:34	Merino <i>et al.</i> , 1988
AH-405	Mutante de AH-3 resistente a la rifampicina	Merino <i>et al.</i> , 1996c
AH-777	Mutante derivado de AH-405 con inserción del mini-Tn5::Km en el gen <i>fapG</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-768	Mutante derivado de AH-405 con inserción del mini-Tn5::Km en el gen <i>fapA</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-1789	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto de pFS- <i>amlA</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-1790	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto de pFS- <i>amlH</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-1791	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto de pFS- <i>fapB</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-1792	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto de pFS- <i>fapC</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-1793	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto de pFS- <i>mrp</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-1794	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto de pFS- <i>exc</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-1795	Mutante derivado de AH-405 por recombinación en un punto de pFS- <i>ahuR</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
AH-1	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> O:11	Merino <i>et al.</i> , 1993
AH-1R	Mutante de AH-1 resistente a la rifampicina	Este trabajo
AH-1796	Mutante derivado de AH-1R por recombinación en un punto de pFS- <i>fapA</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
A19	<i>A. hydrophila</i> HG1 productora de amonabactina	Martin Altwegg
A34	<i>A. hydrophila</i> HG1 productora de amonabactina	Martin Altwegg
A82	<i>A. hydrophila</i> HG1 productora de amonabactina	Martin Altwegg
A145	<i>A. hydrophila</i> HG1 productora de amonabactina	Martin Altwegg
A162	<i>A. hydrophila</i> HG1 productora de amonabactina	Martin Altwegg
A167	<i>A. hydrophila</i> HG1 productora de amonabactina	Martin Altwegg
SB22:: <i>amoA</i>	Mutante con alteraciones en la biosíntesis de amonabactina, derivado de <i>A. hydrophila</i> 495A2	Barghouthi <i>etal.</i> , 1991
A11	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> HG8 productora de enterobactina	Martin Altwegg
A66	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> HG8 productora de enterobactina	Martin Altwegg
A151	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> HG8 productora de enterobactina	Martin Altwegg
A20	<i>A. caviae</i> HG4 no productora de sideróforos	Martin Altwegg
A20R	Mutante de A20 resistente a la rifampicina	Este trabajo
A1	<i>A. caviae</i> HG4 productora de un sideróforo que no es amonabactina ni enterobactina	Martin Altwegg
A59	<i>A. caviae</i> HG4 productora de un sideróforo que no es amonabactina ni enterobactina	Martin Altwegg
A261	<i>Aeromonas</i> sp. HG5A productora de un sideróforo que no es amonabactina ni enterobactina	Martin Altwegg

AN117	<i>E. coli</i> AB1515 <i>proC14 leu-6 trpE38 thi-1 fhuA23 lacY1 mtl-1 xyl-5 rpsL109 azi-6 tsx-67 entF</i>	C. F. Earhart
AN346	<i>E. coli entA403 glnV44 (AS) λ<sup>-</sup> rpsL109 (strR) pyrE41 ilvC7 ΔargH1</i>	CGSC*
DK214	<i>E. coli</i> AB1515 <i>purE42 proC14 leu-6 trpE38 thi-1 fhuA23 lacY1 mtl-1 xyl-5 rpsL109 azi-6 tsx-67 fepB</i>	Pierce <i>et al.</i> , 1983
EB53	<i>E. coli aroB thi mala tsx hema</i>	Eberspächer y Braun, 1980
IR754	Derivado <i>tonB</i> deficiente de <i>E. coli</i> EB53, km <sup>r</sup>	Stojiljkovic <i>et al.</i> , 1995
DH5α	<i>E. coli</i> F <sup>-</sup> <i>endA hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1 recA1 gyr-A96 80lacZ</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
MC1061λpir	<i>E. coli</i> <i>thi thr1 leu6 proA2 his4 argE2 lacY1 galK2 ara14 xyl5 supE44 λpir</i>	Rubires <i>et al.</i> , 1997
S17-1 mini-Tn5:: Km-1	<i>E. coli</i> ( <i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km<sup>r</sup> λpir</i> ) que contiene el plásmido pUTminiTn5 Km-1	De Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
XL1-Blue	<i>E. coli</i> <i>recA1 lacI<sup>q</sup>ZΔM15 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Tn10 (Tc<sup>r</sup>)</i>	Stratagene
HB101	<i>E. coli</i> <i>pro, leu, thi, lacY, str<sup>r</sup>, endoI<sup>-</sup>, recA<sup>-</sup></i>	Ditta <i>et al.</i> , 1985
C3	<i>K. pneumoniae</i> O8:K66	Tomás <i>et al.</i> , 1986

\* CGSC, E. coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, Conn.

## 2.2 Vectores utilizados

Vector	Características principales	Procedencia
pLA2917	Cósmido con resistencia a kanamicina y tetraciclina	Allen y Hanson, 1985
pCOS-SID/1	pLA2917 con parte de la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3, procedente de una genoteca, Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
pCOS-SID/8	pLA2917 con parte de la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3, procedente de una genoteca, Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
pCOS-AHU	pLA2917 con el gen <i>ahuR</i> y su entorno en el genoma de la cepa AH-3, procedente de una genoteca, Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
pGEM-T easy	Vector para clonaje de fragmentos obtenidos por PCR. Contiene el gen <i>lacZ</i> , Amp <sup>r</sup>	Promega
pGEM-T-AmlA	pGEM-T con un fragmento de 1,2 kb que contiene el gen <i>amlA</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3	Este trabajo

pGEM-T-FapA1	pGEM-T con un fragmento de 782 pb que contiene parte del gen <i>fapA</i> de la <i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> AH-1	Este trabajo
pGEM-T-FapA495A2	pGEM-T con un fragmento de 782 pb que contiene parte del gen <i>fapA</i> de <i>A. hydrophila</i> SB22	Este trabajo
pBCSK(+/-)	Vector de 3,4 kb derivado de pUC19. Contiene el gen <i>lacZ</i> y resistencia a cloramfenicol.	Stratagene
pRK2073	Plásmido derivado de pRK2013 facilitador de la conjugación. Presenta resistencia a espectinomicina	Ditta <i>et al.</i> , 1985
pFS100	Plásmido suicida derivado de pGP704, $\lambda$ pir con resistencia a kanamicina	Rubires <i>et al.</i> , 1997
pFS- <i>amlA</i>	pFS con un fragmento interno del gen <i>amlA</i> de AH-3, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pFS- <i>amlH</i>	pFS con un fragmento interno del gen <i>amlH</i> de AH-3, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pFS- <i>fapB</i>	pFS con un fragmento interno del gen <i>fapB</i> de AH-3, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pFS- <i>fapC</i>	pFS con un fragmento interno del gen <i>fapC</i> de AH-3, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pFS- <i>mrp</i>	pFS con un fragmento interno del gen <i>mrp</i> de AH-3, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pFS- <i>exc</i>	pFS con un fragmento interno del gen <i>exc</i> de AH-3, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pFS- <i>ahuR</i>	pFS con un fragmento interno del gen <i>hemR</i> de AH-3, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pFS- <i>fapA</i>	pFS con un fragmento interno del gen <i>fapA</i> de AH-1, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pACYC184	Plásmido derivado de p15A1 con resistencia a cloramfenicol y tetraciclina	Chang <i>et al.</i> , 1978
pACYC-FapA	pACYC con un fragmento de 2,8 kb que contiene el gen <i>fapA</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pACYC-FapB	pACYC con un fragmento de 1,1kb que contiene el gen <i>fapB</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pACYC-AmlH	pACYC con un fragmento de 2,1 kb que contiene el gen <i>amlH</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3, Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
pACYC-FepB	pACYC con un fragmento de 1 kb que contiene el gen <i>fepB</i> de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
pACYC-FecB	pACYC con un fragmento de 1,1 kb que contiene el gen <i>fecB</i> de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
pACYC-FepDGC	pACYC con un fragmento de 3 kb que contiene los genes <i>fepD</i> , <i>fepG</i> y <i>fepC</i> de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo

### 2.3. Cebadores utilizados en este estudio

Los cebadores utilizados, tanto en la amplificación de fragmentos de ADN por PCR, como en la secuenciación, fueron diseñados utilizando el programa informático *GCG* (*Wisconsin Package Version 9.0*, *Genetic Computer Group*, *Madison, Wisconsin*) y sintetizados por Amersham Biosciences. La tabla siguiente resume los cebadores utilizados, la temperatura de hibridación a la que fueron utilizados y su localización dentro de las secuencias nucleotídicas incluidas en el anexo de la presente memoria.

### 2.3.1 Cebadores de los diferentes vectores utilizados en este estudio

Nombre cebador	Vector	5' Composición 3'	T <sup>a</sup> de uso	Localización
CSpLA	pLA2917	gactgggcggtttatgg	56	Diana <i>Bgl</i> III del vector
RpLA	pLA2917	ccatctgttcaatcatgca	58	Diana <i>Bgl</i> III del vector
T3	pBCSK	aattaaccctcactaaaggg	56	Lugar de clonación del vector
M13 for	pBCSK	tgtaaacgacggccagt	54	Lugar de clonación del vector
Sp6	pGEMT-easy	tatttaggtgacctatag	50	Lugar de clonación del vector
M13 for	pGEMT-easy	tgtaaacgacggccagt	54	Lugar de clonación del vector
PRBF	pACYC	tcctgctcgttcgctac	58	Diana <i>Bam</i> HI del vector
PRBR	pACYC	agccccgacttccccatc	58	Diana <i>Bam</i> HI del vector

### 2.3.2 Cebadores en el transposón mini-Tn5::Km

Nombre cebador	5' composición 3'	T <sup>a</sup> de uso	Localización
ISI	agatctgatcaagagacag	50	Extremo I
ISO	acttgtgtataagagtcag	50	Extremo O

### 2.3.3 Cebadores de la secuencia de la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3 y de parte del inserto del clon pCOS-AHU, ambas incluidas en el anexo.

Nombre	5'composición 3'	Posición en la secuencia	T <sup>a</sup> de uso	Localización
<b>Agrupación génica sideróforos cepa AH-3 (clon pCOS-SID/1)</b>				
SIDE-D	ttgaaatcacccggtcaatg	754	58	<i>amlA</i> <sup>a</sup>
SIDE-C	gctctgtaccgaaatgacc	1194	58	<i>amlA</i>
SIDE-B	taggattggcggaatgac	1627	58	<i>amlA</i>
SIDE-A	cctccagatccagaccaag	2011	59	<i>amlA</i>
EntE-2	atttgttcggcgtaagaggc	2394	59.5	<i>amlE</i>
EntE-1	tggccttctccagctctc	2620	59.5	<i>amlE</i>
768CS-F	tcgaacacaccgagcgcc	2795	62	<i>amlE</i>
768CS-E	gttgacctgttgcccttc	3775	58	<i>amlB</i>
768CS-A	ctcatacgtcagcaacgg	4379	56	<i>amlB</i>
768CS-B	aaactccccttcgtcctc	4430	56	<i>amlB</i>
768CS-1	tatcgcttcgatggcaag	4722	58	<i>amlF</i>
768CS-C	cgccaaaggatttcactc	5224	58	<i>amlF</i>
768CS-2	gcaacaacggttgcttg	5403	54	<i>amlF</i>
768CS-3	tgcagatgaacatcacc	5471	58	<i>amlF</i>
768CS-4	agaagcccgttcagctac	6039	58	<i>amlF</i>
768CS-5	aatcaccacctcgatctg	6660	58	<i>amlF</i>
768CS-6	gtcctgtatcgacagg	7103	60	<i>amlF</i>
768CS-8	ccatcgtcaccatagctc	8140	58	<i>amlA</i>
768CS-9	atttcccagtcgagcaagg	8600	56	<i>amlG</i> <sup>a</sup>
768CS-10	acacgtactgctgatcacc	9112	58	<i>amlG</i>
768CS-11	ttcgatcaccagctctacc	9695	58	<i>amlG</i>
768CS-12	ccactggctgcaatcctg	10231	58	<i>amlG</i>

768CS-13	aacatgacgacctgctg	10712	56	<i>amlG</i>
768-13	tgtattcgggcaggcattc	11456	58	<i>amlG</i>
768-12	atcgtggtgatggcgcag	11975	58	<i>amlG</i>
768-11	cgtggtctccttgtccag	12473	58	<i>amlG</i>
768-10	acagcagtgatccactagc	13072	58	<i>amlG</i>
768-9	tcagggattgatagcagcg	13637	56	<i>amlG</i>
768-8	ttccaccttccaccac	14285	56	<i>amlG</i>
768-7	caactcccgatgggcttcc	14811	60	<i>amlH</i>
768-6	cgggtggtgataaagagc	15459	58	<i>amlH</i>
768-3	cttctcgcccagtatgac	16901	58	<i>fapB</i>
768-1	aaagtcaaaatagcgcccc	18114	56	<i>amlD</i>
768A	agtatgtccacgtcggctctg	18427	60	<i>fapC</i>
768C	gcagtatctcaccggattg	18971	58	<i>fapC</i>
768D	acgaagttgcccattgtcc	19592	58	<i>fapG</i>
768E	agcgttcagcagatgtgttc	20188	58	<i>fapG</i>
FEPD-REV	ttccgttttatcgctcgc	21270	56	<i>fapA<sup>a</sup></i>
768E1	ttgatcaccactcgtcgc	22019	56	<i>fapA</i>
768H	tgatagccttccaccacc	22649	56	<i>fapA</i>
768I	tcattctgtccagatcggc	23100	58	<i>fapA</i>
768K	ttgctggctgttctggacc	24289	58	<i>Mrp</i>
768L	cgctcttttagctcgca	24685	52	<i>exc<sup>a</sup></i>
MRP-REV	caacgccaccttttcatctc	24839	60	<i>exc</i>
768M	ctatcagccggtcaccttc	25267	58	<i>exc</i>
768N	agtttgctgataggtgccg	25823	51.2	<i>Hipo</i>
<b>Cebadores de la secuencia del clon pCOS-AHU</b>				
C3bg 3	atcagccagctctgcattc	132	58	<i>orf1</i>
C3bg 4	agatcaggctctgttcac	508	54	<i>orf1</i>
C3bg 5	atccgatggctccatttc	994	58	<i>orf2</i>
C3bg 6	tggctactatgtgctcatc	1446	56	<i>orf3</i>
C3bg 7	ttttattgcgtgcacc	1903	54	<i>orf4</i>
C3bg F	gccaccgattttgcgctc	2587	56	<i>orf5</i>
C3bg E	tcgtgccagagacagaac	3104	56	<i>orf6</i>
C3bg D	cggacgccgacatagtag	3740	58	<i>orf6</i>
HemR Z	agcagagccagagccatac	3936	60	<i>ahuR<sup>a</sup></i>
C3bg C	atattactcagcccgaac	4051	56	<i>ahuR<sup>a</sup></i>
C3bg B	tcttgacgcggttctcac	4391	56	<i>ahuR</i>
HemR U	ccagagctattttgacacc	4461	60.6	<i>ahuR</i>
C3bg A	cagcaggttctcgaactc	4684	56	<i>ahuR</i>
HemR T	tgtgctcactactccagacc	5176	60.6	<i>ahuR</i>
C2bg1	tctaccaccagtgcagcag	5272	58	<i>ahuR</i>
C2bg2	cggtttcagctacgaagtg	5640	58	<i>ahuR</i>
C2bg3	gccagttcaagccgatg	6031	58	<i>ahuR</i>
C6b out	gcccatagacgaagtag	6522	54	<i>orf8</i>
C6B 1	ttaccggctgctctgtc	6689	58	<i>orf8</i>
C6B A	ttgagggtatcaagcaggg	7052	58	<i>orf8</i>
C5B 1	gtgcccgtttcttctctg	7570	56	<i>orf8</i>
Phe R	aacgccatcaccgtacc	7860	58	<i>orf8<sup>b</sup></i>

**Cebadores para la construcción de mutantes por recombinación en un punto**

EntA FOR	cagactaccctatgccac	7894	50.2	<i>amlA</i>
EntA REV	gaagagcactgtattggcg	8420	50.2	<i>amlA</i>
PVD-FOR	aaggcatgagtgagcaaggc	14948	62	<i>amlH</i>
768-5	gaaaaccgcgagcttgac	16081	62	<i>amlH</i>
FecB FOR	ccagtcaccgtccagcag	16676	60.5	<i>fapB</i>
FecB REV	gtgccaccaaccaag	17261	60.5	<i>fapB</i>
YUSB1	atgaggggcttggtcaccac	18460	60	<i>fapC</i>
YUSB2	gacatctccttcaccattccc	19074	60	<i>fapC</i>
768B	aattcagcctgggggatctg	22123	64	<i>fapA</i>
768G	ttccagaatgaagtggcg	21361	64	<i>fapA</i>
768J	agctcagtgccatgaagag	23661	58	<i>mrp</i>
MRP-1	tgctgatgctgttcatactg	24268	58	<i>mrp</i>
EXC-FOR	ccgaggtcaaggtgatcc	24906	58	<i>exc</i>
EXC-REV	ctcactteggtggcggttc	25432	58	<i>exc</i>
HemR 6	tcagccgatcaccgacaag	4902	60	<i>ahuR</i>
HemR 7	agcgccgtgttgatgttcc	5921	60	<i>ahuR</i>

**Cebadores utilizados para amplificar genes y realizar complementaciones**

768CS-7	tccgatgtgttcgaccac	7648	56	<i>amlA</i>
768CS-D	tgctcgataaaccagagcc	8760	56	<i>amlA</i>
CIRA-REV	gccgcctcatgtcttttc	23583	56	<i>fapA</i>
768F	accacctgttgagagc	20728	56	<i>fapA</i>
FecB-1	gctgccactgcctgaatag	16353	60.1	<i>fapB</i>
768-2	tgatagcataagtccgcc	17442	60.1	<i>fapB</i>
PVD-1	ccagaccgatgagatgag	14460	60	<i>amlG</i>
768-4	tggtgataggcaccctgag	16656	58	<i>fapB</i>

a/secuencia intergénica anterior al gen señalado

b/secuencia intergénica posterior al gen señalado

**2.3.4 Cebadores de *E. coli* utilizados para amplificar genes y realizar complementaciones**

Nombre cebador	5' Composición 3'	T <sup>a</sup> uso	Localización
FepDGC-ECOLIFOR	cgatggcatccagaaaacag	60.2	<i>fepD-fepC</i>
FepDGC-ECOLIREV	atgaaacgagcgaggaatac	60.2	<i>fepD-fepC</i>
FepB-COLIFOR	acattttcgccagacgcc	57.5	<i>fepB</i>
FepB-COLIREV	atttgcattacgcccttaacc	57.5	<i>fepB</i>
CitratB-COLIFOR	gtgtgaaaaacatcttcgacc	57.5	<i>fecB</i>
CitratB-COLIREV	gtagcaaaacagactcagcc	57.5	<i>fecB</i>

## 2.4. Medios de cultivo y tampones

Los crecimientos de todas las cepas de *Aeromonas* se realizaron, si no se indica lo contrario, en medio rico TSB a 30°C y en agitación a 200 r.p.m. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio rico LB a 37°C y en agitación a 200 r.p.m. En el caso del estudio de las proteínas de membrana externa de elevado peso molecular se utilizó el caldo nutritivo suplementado con 2,2'-dipiridil como agente quelante del hierro soluble de cultivo. Se utilizaron varias concentraciones, dependiendo de la capacidad de crecimiento de cada cepa en presencia de dicho agente quelante.

En el caso del estudio de la secreción de sideróforos de tipo catecolato mediante el Test de Arnou, se empleó el Medio Mínimo Davis suplementado con 2-2'-dipiridil.

A continuación se presenta la composición de estos medios de cultivo, en la preparación de placas se añadió agar-agar al 1,5%.

Medio LB	Medio Mínimo Davis (MM)	Caldo Nutritivo (NB)	Caldo de triptona y soja (TSB)
5g/l de extracto de levadura	3g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g/l triptona	10g/l peptona de caseína
10g/l de peptona triptica de caseína	7g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g/l extracto de carne	3g/l peptona de soja
10g/l de NaCl	1 g/l (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	5 g/l cloruro sódico	5g/l cloruro sódico
	0,05 g/l MgSO <sub>4</sub>		2,5g/l fosfato monopotásico
			2,5g/l dextrosa

Los principales antibióticos y suplementos empleados fueron: Ampicilina (Amp), 50 µg/ml; Cloramfenicol (Cm), 25 µg/ml; Estreptomina (Sm), 50 µg/ml; Kanamicina (Km), 50 µg/ml; Rifampicina (Rif), 50 µg/ml; Tetraciclina (Tc), 20 µg/ml; Espectinomicina (Sp), 50 µg/ml; Isopropil-B-D-tiogalactopiranosidasa (IPTG), 0,5 mM; 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido (X-Gal), 80 µg/ml, Hemina (cloruro) de origen bovino (disuelta en 20mM de NaOH), 50 µg/ml; Hemoglobina de origen humano, 50 µg/ml; ácido δ-aminolevulínico, 37,5 µg/ml.

## 2.5 Extracción del hierro del material de laboratorio

El vidrio es una importante superficie de intercambio de hierro. Los problemas aparecen a largo término por el intercambio de iones desde las capas más profundas, contaminando de forma continuada la superficie con hierro. Así pues, periódicamente es necesario un tratamiento de cuatro horas con ácido nítrico concentrado seguido de un extensivo lavado con agua destilada y desionizada.

## **2.6 Extracción del hierro del agua**

El agua bidestilada se almacenó en recipientes de plástico durante un período máximo de una semana. El proceso de destilación se llevó a cabo mediante un sistema de intercambio de iones, Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

## **2.7 Extracción intrínseca del hierro de los medios de cultivo**

Para capturar el hierro presente en los medios de cultivo, utilizamos el 2,2'-dipiridil, un agente bacteriostático con capacidad de unión a iones ferrosos. La actividad de éste compuesto se sometió a controles, como por ejemplo la reversión de la inhibición del crecimiento producida por la adición de hierro al medio de cultivo.

## **2.8 Crecimiento en condiciones de limitación de hierro**

Para cultivar las células en condiciones de limitación de hierro, se hicieron dos pases en Caldo nutritivo (NB) suplementado con la cantidad necesaria del agente quelante 2,2'-dipiridil, determinada empíricamente para cada cepa en concreto. De este modo aseguramos el completo consumo de los depósitos intracelulares de hierro. Las células se cultivaron en aireación a la temperatura óptima de crecimiento, hasta que alcanzaron la fase estacionaria. Las condiciones de limitación de hierro, necesarias para la inducción de la producción de sideróforos y para la expresión de proteínas de membrana externa de elevado peso molecular, se confirmaron monitorizando la absorbancia del cultivo durante el crecimiento. Dichas condiciones se reflejaron en una menor tasa de crecimiento del cultivo y una menor densidad celular final, en comparación con un cultivo duplicado que contenía exceso de hierro.

## **2.9 Detección de sideróforos**

### **2.9.1. Test de CAS.**

El test de CAS desarrollado por Schwyn y Neilands, utiliza un complejo ferri-cromogénico que cambia de color como consecuencia de la pérdida de hierro. Los sideróforos, que tienen más afinidad por el hierro que el cromógeno, pueden capturar el hierro del complejo ferri-cromógeno, resultando en un cambio del color del colorante de azul a amarillo-anaranjado.

Este método, basado en las propiedades funcionales de los sideróforos, es el más universal elaborado hasta la fecha para la detección de sideróforos, porque únicamente depende de la habilidad de un compuesto para unir el hierro con una afinidad relativamente elevada. El complejo ferri-cromógeno utilizado para la detección de sideróforos se puede incorporar al medio sólido o puede utilizarse en un test líquido. A continuación se expone el procedimiento utilizado para la elaboración del medio CAS agar.

**Agar CAS:**

5,3 g NaOH (disueltos en agua)  
30,24 g PIPES  
100 ml 10x MM9  
ajustar el pH a 6,8  
750,0 ml H<sub>2</sub>O  
15,0 g agar

Autoclavar y enfriar hasta 50°C.

**Añadir:**

30 ml Cas aminoácidos al 10% desferrados  
10 ml de glucosa al 20% (u otra fuente de carbono)  
1 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>  
1 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>  
4 ml tiamina 500 µg/ml  
4 ml ácido nicotínico 500 µg/ml  
se puede suplementar con otras vitaminas, aminoácidos y antibióticos cuando sea necesario.

Mezclar y añadir 100 ml de la solución CAS-HDTMA. Mezclar abundantemente evitando la formación de burbujas.

Plaquear. Las colonias de bacterias productoras de sideróforos crecidas en este medio estarán envueltas de un halo amarillo-anaranjado.

**Componentes del medio:****•10x MM9**

3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
5g NaCl  
10g NH<sub>4</sub>Cl  
1litro H<sub>2</sub>O  
autoclavar.

**•CAS-HDTMA**

60,5 mg Chrome Azurol S  
50 ml H<sub>2</sub>O

Disolver y añadir 10ml de 1mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O en 10 mM HCl.

Añadir lentamente a la solución de HDTMA (72,9 mg HDTMA en 40 ml de H<sub>2</sub>O).

Autoclavar.

**•Cas aminoácidos al 10% desferrados**

Disolver 10 g de Cas aminoácidos en 100 ml de agua bidestilada.

Para desferrar la solución de Cas aminoácidos se mezcla con un volumen equivalente de una solución al 3% de 8-hidroxiquinolina en cloroformo, y se agita hasta que el color azul intenso del complejo férrico del agente quelante desaparece de la capa de cloroformo. El proceso se repite únicamente con cloroformo para eliminar las cantidades traza de 8-hidroxiquinolina.

### 2.9.2 Detección de sideróforos de tipo catecolato. Test de Arnow.

El test de Arnow se basa en las propiedades químicas de los sideróforos, y detecta únicamente los sideróforos de tipo catecolato presentes en los sobrenadantes bacterianos. Las bacterias se cultivaron en medio mínimo Davis suplementado con la concentración de 2,2'-dipiridil necesaria para simular las condiciones de privacidad de hierro. Se utilizó el medio mínimo Davis para evitar las interferencias que otros medios de cultivo pueden producir en la valoración colorimétrica (Arnow, 1937).

Procedimiento: Añadir a 1 ml de sobrenadante bacteriano, en el siguiente orden, los diferentes reactivos, mezclando entre los diferentes pasos: 1 ml HCl 0,5 N, 1 ml del reactivo nitrito-molibdato, (en este punto la presencia de catecolatos produce un color amarillento), y 1 ml NaOH 1 N (el color tendría que virar a rojo). El color es estable como mínimo durante una hora, y la solución tiene una absorción máxima de 510 nm.

#### •Reactivo nitrito-molibdato

10 g NaNO<sub>2</sub>  
10 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O  
100 ml H<sub>2</sub>O

### 2.9.3 Bioensayos

Los bioensayos son los análisis más sensibles para la detección de sideróforos. La especificidad de los bioensayos viene determinada por la elección de las cepas indicadoras.

Se centrifugaron 50-100 µl de un cultivo exponencial de la cepa indicadora y se lavó el sedimento en PBS y se resuspendió en este mismo tampón, para añadir posteriormente 2ml de NB-agar blando (0,6% agar) suplementado con la cantidad necesaria de agente quelante y antibióticos u otros suplementos. La cantidad de agente quelante y el número de microorganismos sembrados en el agar se determinó empíricamente para cada cepa. Una vez mezclado, se extendió sobre placas de NB-agar sólido suplementado con la cantidad necesaria de agente quelante y antibióticos. Tras la solidificación del agar blando, se depositaron discos estériles de papel de filtro y se aplicaron 10 µl de los sobrenadantes bacterianos previamente filtrados que procedían de cultivos en condiciones de privacidad de hierro de la cepa a ensayar. En ocasiones, los sobrenadantes bacterianos fueron concentrados mediante un proceso de liofilización. Tras 16-18 horas de incubación a la temperatura adecuada (30°C en *Aeromonas* spp. y 37°C en *E. coli* AN346), la presencia de una zona de crecimiento de la cepa indicadora alrededor del disco estéril impregnado con el sobrenadante bacteriano a ensayar, es un hecho indicativo de la capacidad de la cepa indicadora de captar el hierro del ferri-sideróforo contenido en el sobrenadante bacteriano. El tamaño de la zona de crecimiento de la cepa indicadora es proporcional a la concentración de sideróforo.

Para evaluar la capacidad de utilización de hemo y hemoglobina como fuente de hierro, los discos de papel de filtro se impregnaron con 10  $\mu$ l de una solución 5mg/ml de hemina clorohidratada bovina disuelta en 20mM de NaOH, o con 10  $\mu$ l de una solución de 5mg/ml de hemoglobina humana. Como control positivo utilizamos 10  $\mu$ l de cloruro férrico 100 mM y como control negativo agua bidestilada.

## **2.10 Determinación de la dosis letal $_{50}$ .**

La dosis letal  $_{50}$  (DL $_{50}$ ) fue calculada por el método de Reed y Muench, 1938, e indica la mínima cantidad de bacterias que después de la administración de una única dosis, provocan la muerte de la mitad de la población animal del estudio. El estudio se realizó con truchas arco iris de 12 a 20 g que se mantenían en tanques de agua a 17-18°C.

Las truchas fueron inoculadas con inyección intraperitoneal de 0.05 ml de suspensión bacteriana inicial conteniendo aproximadamente 10<sup>9</sup> células viables. Durante dos semanas se realizó el recuento de los animales muertos.

## **2.11 Estudios de la superficie celular**

### **2.11.1 Obtención de proteínas 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).

Con esta finalidad se obtuvieron crecimientos en fase estacionaria de las células a estudiar, que fueron lavados con Tris-Mg pH 7,3 (Tris 10mM y MgCl<sub>2</sub> 5mM). Posteriormente, fueron lisados mediante el uso de *French Press* a 16000 lb/in<sup>2</sup>. Subsiguientemente se eliminaron las células no lisadas mediante un proceso de 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 2 horas. Este paso permitió precipitar las membranas totales, que fueron resuspendidas con SLS al 0,5%, con la finalidad de solubilizar las proteínas de membrana citoplasmática. Seguidamente se centrifugaron a 100000 x g durante 2 horas para obtener un precipitado que contenía las membranas externas y un sobrenadante que contenía las membranas internas.

Por último, tras asegurar la máxima eliminación del sobrenadante, se resuspendieron las membranas externas en Tris-Mg pH 7,3 aplicando breves intervalos de sonicación y se conservaron a -20 °C para su posterior análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para realizar la electroforesis, se determinó el volumen adecuado de cada una de las muestras según la eficiencia de la extracción de proteínas, y se mezcló con un volumen igual de tampón de muestras. La mezcla fue incubada a 100°C durante ocho minutos. La composición del tampón de muestras es

Glicerol	5g
Dodecil sulfato sódico	1,15 g
Tris	0,38 g
B-mercaptoetanol	2,5 ml
Azul de bromofenol 0,1%	30µl
H <sub>2</sub> O bidestilada	hasta 50 ml

### **2.11.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida. Tinción.**

El estudio del perfil electroforético de las proteínas de la membrana externa bacteriana y del LPS se realizó en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli modificado por Ames (Laemmli, 1970; Ames *et al.*, 1974). Se utilizó un porcentaje de acrilamida del 5% en la fase de compactación del gel y un 12% de acrilamida en la fase de resolución. En ocasiones, para obtener una mejor resolución de las proteínas de elevado peso molecular, se utilizó un porcentaje de acrilamida del 5% en la fase de compactación y del 7,5% en la fase de resolución. La electroforesis se realizó a 10 mA (60V) en la fase de compactación y a 20 mA (150V) durante el paso de las muestras por la fase de resolución.

En los análisis de proteínas, los geles fueron fijados y teñidos con azul de Coomassie R-250 siguiendo las condiciones de Fairbanks (Fairbanks *et al.*, 1971).

## **2.12 Técnicas inmunológicas**

### **2.12.1 Obtención de suero inmune.**

Se inmunizaron conejos hembra tipo *White Newzealand* de un peso aproximado de 1.5kg (suministrados por Isoquimem) con la proteína de 70 kDa de peso molecular aparente, aislada a partir de las proteínas de membrana externa extraídas del mutante AH-768 con pACYC-FapA crecido en caldo nutritivo.

Para la obtención del antisuero se utilizaron 50 µg de FapA purificada que fue inyectada al conejo en una primera dosis junto con adyuvante de Freund completo.

Posteriormente, se realizó una segunda y una tercera inmunización con adyuvante de Freund incompleto, en dos intervalos sucesivos de quince días. Después de dos semanas de haberse realizado la última inmunización, se extrajeron 20 ml de sangre a partir de la vena marginal de la oreja del animal. Tras incubar la sangre 1 hora a 37°C para facilitar la formación de coágulos, se dejó a 4°C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se centrifugó durante 20

minutos a 4000 r.p.m para eliminar la fracción celular. Del sobrenadante obtenido, que fue utilizado como antisuero, se realizaron partes alícuotas que fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para eliminar los posibles anticuerpos creados contra otras proteínas de *A. hydrophila* que pudieran estar presentes en nuestra muestra, se absorbieron dichos anticuerpos con células del mutante AH-768 con el plásmido pACYC184. La especificidad de los anticuerpos obtenidos se analizó mediante Western-blot.

### 2.12.2 Inmunotransferencia (Western-blot)

Tras realizar electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) con las diferentes muestras de proteínas de membrana externa, estas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de  $0,45\mu\text{M}$  de poro mediante el sistema Semi-Dry Dot en presencia de tampón de transferencia durante 30 minutos a 30V en frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) (Towbin *et al.*, 1979).

Una vez finalizada la transferencia, se realizaron a temperatura ambiente dos lavados de cinco minutos con tampón NET y se bloquearon los lugares de unión inespecífica agitando la membrana durante 1 hora con el tampón NET 1% BSA (albúmina sérica bovina).

La incubación con el anticuerpo primario se realizó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Dicho anticuerpo fue previamente sometido a un proceso de absorción con células de la cepa AH-768 (con el plásmido pACYC184) y se diluyó 1:1000 en tampón NET con 1% de BSA y 0'5% de Tween-20. Después de la incubación, se eliminó el anticuerpo sobrante mediante tres lavados de 10 minutos con el tampón NET con un 0,5% de Tween-20. A continuación se sumergió el filtro en una solución que contenía el anticuerpo secundario, inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugada con fosfatasa alcalina, diluido 1:1000 en NET con 0,5% Tween-20 y 1% BSA. De nuevo, el anticuerpo sobrante se eliminó mediante 3 lavados de 10 minutos con el mismo tampón utilizado para eliminar el anticuerpo primario.

Por último, se realizaron tres lavados de cinco minutos con tampón 3 para alcalinizar el medio y se revelaron las membranas con una solución formada por 10 ml de tampón 3, 33  $\mu\text{l}$  de solución 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y 44  $\mu\text{l}$  de solución disodio-nitrozul tetrazolio (NBT), para provocar la reacción cromática de la fosfatasa alcalina.

La reacción de revelado se paró mediante la adición de Tampón de parada.

A continuación se indica la composición de los principales tampones y soluciones utilizados en esta técnica.

<b>Tampón de transferencia</b>	<b>Tampón NET</b>	<b>Tampón 3</b>	<b>Tampón de parada</b>
25mM Tris	0,15 M NaCl	0,1 M Tris-HCl pH 9,5	20 mM Tris-HCl pH 7,5
190mM glicina	5mM EDTA,	0,1 M NaCl	5 mM EDTA
20 % metanol	50mM Tris pH 7,4 Ajustar pH a 7,4	0,05 M MgCl <sub>2</sub>	

**Solución NBT:** 75 mg/ml de NBT en dimetilformamida al 70%.

**Solución BCIP:** 50 mg/ml de BCIP en H<sub>2</sub>O bidestilada.

## 2.13 Técnicas de genética molecular

### 2.13.1 Aislamiento y purificación de ADN genómico

Para la obtención de ADN genómico se utilizó el método descrito por Marmur (Marmur *et al.*, 1961) basado en la lisis de células bacterianas con SDS y la posterior precipitación de ADN con perclorato sódico 5M. Alternativamente, en función de la cantidad y el grado de pureza necesario, se utilizó el *kit* de Invitrogen para el aislamiento de ADN genómico (*Easy-DNA Kit, Genomic DNA Isolation*) siguiendo las condiciones recomendadas por la casa comercial.

### 2.13.2 Aislamiento de ADN plasmídico

El método empleado fue distinto en función de la cepa hospedadora, del número de copias del plásmido y del grado de pureza requerido para los procedimientos posteriores.

Para aislar el ADN plasmídico de *Aeromonas* utilizamos el método basado en la lisis alcalina de Birnboim y Doly, 1979, descrito por Maniatis (Maniatis *et al.*, 1982) y modificado por Martínez y de la Cruz, 1988. Este protocolo también fue utilizado para la obtención del ADN plasmídico de otras cepas, cuando los procedimientos posteriores no requerían un elevado grado de pureza.

Para las extracciones de elevada pureza, empleamos frecuentemente a *E. coli* como cepa hospedadora, se utilizaron columnas de purificación de ADN plasmídico. En el caso de plásmidos de bajo número de copias o cuando deseábamos obtener una gran cantidad de ADN, utilizamos *Qiagen plasmid midi-prep preparations*. En el caso de plásmidos de medio o alto número de copias empleamos GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences).

### 2.13.3 Purificación del ADN por extracción fenólica

La fenolización del ADN fue empleada para extraer la contaminación proteica de las preparaciones de ADN. Para ello, se resuspendieron las muestras con tampón TE y se añadió el mismo volumen de fenol equilibrado, agitando suavemente hasta la obtención de un emulsionado. Tras separar las dos fases mediante centrifugación, recuperamos la fase acuosa a la que se añadió igual volumen de fenol:cloroformo (cloroformo:isoamilalcohol 1:24) y se volvieron a separar las fases mediante centrifugación. Después de recuperar la fase acuosa repetimos el proceso añadiendo cloroformo. La última fase acuosa se sometió a un proceso de precipitación.

#### Tampón TE

10 mM Tris-HCl pH 8

1 mM EDTA

### 2.13.4 Precipitación del ADN

La precipitación de ADN se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Maniatis *et al.*, 1982. Se añadió acetato sódico en una proporción 1:10 y al volumen resultante se le añadió etanol 98% frío en una relación 2:1. Se mezcló suavemente y se mantuvo durante 2 horas a una temperatura de -20°C. A continuación se centrifugó a 10000 x g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Se descartó el sobrenadante para realizar dos lavados de diez minutos con etanol 70 % frío. La muestra se secó en el *Speed-Vac* (Savant).

### 2.13.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para la electroforesis de ADN utilizamos geles con un porcentaje del 0,5 al 2% de agarosa, en función del tamaño de los fragmentos de ADN (Maniatis *et al.*, 1982). La agarosa se disolvió en tampón TAE y se le añadió bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. Las muestras de ADN se mezclaron en una proporción 1:5 con el tampón de muestra x 6. La electroforesis se realizó en cubetas horizontales Mini de Ecogen aplicando voltajes de entre 5 y 10 V/cm (Lewis, 1986). Los geles se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta ( $\lambda = 302$  nm; *Image Master VDS* de Pharmacia Biotech).

#### Tampón TAE

Tris 242 g/l

EDTA 0,05 M pH 8

ácido acético glacial 57,1 ml/l

#### Tampón de muestra 6x

sacarosa 40%,

azul de bromofenol 0,25%

### **2.13.6 Cuantificación del ADN**

La cuantificación del ADN se realizó a partir de la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio, intercalado entre las bases del ADN, cuando es irradiado con luz ultravioleta. La emisión es directamente proporcional a la masa total de ADN. En un mismo gel se cargaron las muestras de ADN a cuantificar y 1 µg de ADN del fago λ digerido con *Hind*III. El ADN fue cuantificado por comparación entre la intensidad de las bandas de las muestras respecto al patrón.

### **2.13.7 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

Tras la electroforesis en geles de agarosa, recortamos las bandas deseadas y purificamos el ADN mediante el sistema *QIAEX* (Qiagen), según las recomendaciones del fabricante.

### **2.13.8 Métodos de transferencia de ADN plasmídico**

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.

#### **2.13.8.1 Conjugación**

La conjugación triparental se llevó a cabo mezclando en una placa de LB, crecimientos en fase estacionaria de la cepa donadora, la cepa receptora y la cepa facilitadora de la conjugación, generalmente *E. coli* con el plásmido pRK2073 (Ditta *et al.*, 1985) en una proporción 1:5:1. La placa se incubó un mínimo de 6 horas a 30°C. Posteriormente, se recogió el resultado de la conjugación con 1 ml de LB y se sembraron diversas diluciones en placas suplementadas con los antibióticos necesarios para la selección de los transconjugantes, que fueron incubadas a la temperatura óptima de la cepa receptora.

#### **2.13.8.2 Transformación por electroporación**

Las cepas bacterianas se prepararon para ser electrotransformadas mediante el procedimiento descrito por Dower (Dower *et al.*, 1988). Para la electroporación utilizamos entre 0,3 y 0,4 µg de ADN.

Las condiciones de electroporación fueron la aplicación de un voltaje de 2kV, con una resistencia de 129 Ω durante 5 milisegundos. El aparato utilizado fue *BTX ElectroCell Manipulator*® 600 con cubetas *BTX* de 2mm. (Biotechnologies & Experimental Research Inc.). Seguidamente, se recuperaron las células mediante la adición de 1 ml de LB y se incubaron 1 hora, a la temperatura óptima de la cepa transformada, para facilitar la expresión

fenotípica. A continuación, se realizaron diferentes diluciones en placas de LB con los antibióticos y suplementos necesarios para la selección de las células transformantes.

### **2.13.9 Procesamiento enzimático del ADN**

#### **2.13.9.1 Restricciones**

La mayoría de enzimas de restricción y tampones fueron suministrados por Amersham Biosciences. En cada caso se siguieron las condiciones de restricción e inactivación recomendadas por la casa comercial. En general, el ADN a digerir se resuspendió en agua bidestilada y se añadió el tampón de restricción a la concentración indicada por la casa comercial. Después, se incubó a la temperatura adecuada, generalmente 37°C, durante 2 horas.

#### **2.13.9.2 Defosforilación**

Para aumentar la eficiencia de obtención de clones recombinantes en los procesos de clonación y subclonación, las reacciones de ligación se realizaron usando vectores previamente defosforilados. Eliminamos los grupos fosfato terminales mediante un tratamiento con fosfatasa alcalina, suministrada por Amersham Biosciences. Las condiciones de defosforilación empleadas fueron las descritas por Sambrook (Sambrook, 1989), modificando el tiempo de incubación a 90 minutos y añadiendo nueva enzima cada 30 minutos.

#### **2.13.9.3 Ligación**

En general, las reacciones de ligación se realizaron en una relación molar de 3:1 (inserto:vector), relación que aumentaba con el tamaño del inserto o en el caso de tratarse de fragmentos de ADN con extremos romos. En general, para las reacciones de ligación entre moléculas con extremos cohesivos, se tomaron entre 10 ng y 100 ng de ADN total (vector y inserto) y se añadió la cantidad de agua bidestilada, la mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C para permitir que todos los extremos de restricción se encontraran libres, y posteriormente se sumergió la mezcla en hielo. Finalmente, se añadió la T4 ADN-ligasa y el tampón de ligación, ambos fueron suministrados por Invitrogen. La incubación se realizó toda la noche a 16-20°C.

En el caso de tratarse de fragmentos de ADN con extremos romos, se aumentó la cantidad de ADN y de enzima, y las incubaciones se realizaron a 4°C durante 48h.

Las reacciones de ligación a pGEM-T easy se realizaron según las instrucciones elaboradas por la casa comercial (Stratagene).

#### **2.13.9.4 Obtención de extremos romos**

Para obtener extremos romos a partir de moléculas de ADN con extremos 5' protuberantes, se utilizó la acción polimerasa 5'→3' de la enzima *Klenow* polimerasa, suministrada por Boehringer Mannheim, según las indicaciones de la casa comercial.

#### **2.13.10 Elaboración de una genoteca**

Para realizar la digestión del ADN cromosómico de la cepa *A. hydrophila* AH-3, se utilizó la enzima de restricción *Sau3A*. Esta endonucleasa presenta una diana de restricción de cuatro pares de bases, de manera que la frecuencia de restricción es elevada. Los extremos cohesivos que genera son compatibles con *Bam*HI, *Bg*III, *Mbo*I y *Xho*I. Se digirió parcialmente el ADN cromosómico con esta enzima, utilizando la misma cantidad de ADN y diluyendo la unidad de enzima a la mitad de manera seriada. Tras una electroforesis en geles de agarosa, se escogieron aquellos fragmentos cuyo tamaño estaba comprendido entre 15-20kb y se ligaron al cósmido pLA2917 digerido con *Bg*III. El empaquetamiento *in vitro* en el fago  $\lambda$  y la posterior infección de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  se llevó a cabo según el protocolo descrito por la casa suministradora del kit de empaquetamiento (*Gigapack III Gold Packaging Extract* de Stratagene).

#### **2.13.11 Detección de fragmentos de ADN conocidos.**

##### **2.13.11.1 Preparación de las sondas**

Para el marcaje de sondas se realizó una PCR utilizando dNTPs marcados con digoxigenina, suministrados por Roche. El producto de PCR se sometía a una electroforesis en geles de agarosa y a una posterior purificación del ADN a partir del gel de agarosa.

##### **2.13.11.2 Transferencia de puntos (*Dot blot*)**

El ADN se desnaturalizó con un tratamiento de 5 minutos a 100°C y se mantuvo en hielo otros 5 minutos antes de pipetear la muestra sobre membranas de nylon de 0,45  $\mu$ m de poro, Hybond-N<sup>+</sup> de Amersham Pharmacia Biotech. Las membranas se dejaron secar al aire 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 Amersham Pharmacia Biotech.

##### **2.13.11.3 Transferencia de colonias (*Colony blot*)**

Se sembraron las colonias procedentes de una genoteca, de manera ordenada, en placas de LB y se incubaron a 37°C durante un mínimo de 5 horas. Después de mantener las placas 30 minutos a 4°C, para facilitar la posterior transferencia, las colonias se transfirieron, por simple contacto (1 minuto) a membranas de nylon de 82 mm de diámetro y 1,2  $\mu$ m de poro,

suministradas por Boehringer Mannheim. Después de secar las membranas a temperatura ambiente durante 15 minutos, se realizaron, de forma secuencial, incubaciones de 3 minutos en SDS 10%, 15 minutos en solución desnaturalizante, 15 minutos en solución neutralizante y 10 minutos en SSC X 2. 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. Se añadió sobre cada membrana una solución de 2 mg/ml de proteinasa k en SSC X 2 y se incubaron 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 Amersham Pharmacia Biotech.

<b>solución desnaturalizante</b>	<b>solución neutralizante</b>	<b>SSC X 2</b>
0,5 M NaOH	1,5 M NaCl	3 M NaCl
1,5 M NaCl	1 M Tris-HCl	0,3 M Na-citrato
	ajustar a pH 7,4	ajustar a pH 7,0

#### **2.13.11.4 Transferencia Southern (*Southern blot*)**

Los ADNs que se pretendían hibridar con las sondas previamente preparadas se sometieron, en primer lugar, a una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% en tampón TBE X 1. 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<sup>+</sup> de Amersham Pharmacia Biotech, se llevó a cabo mediante el *Vacuum blotting System* de Pharmacia Biotech, según las instrucciones facilitadas 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 Amersham Pharmacia Biotech; las moléculas marcadas se detectan mediante inmunoensayo, utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina que da lugar a una reacción cromática por la adición de los sustratos NBT y X-fosfato.

##### **Tampón TBE x1**

Tris 0,89M  
 ácido bórico 0,89M  
 EDTA 0,02M  
 Ajustar pH a 8,3

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

### 2.13.12.1 Amplificación de fragmentos de ADN

Para amplificar fragmentos de ADN se utilizó generalmente la *taq DNA polymerase* proporcionada por Invitrogen, y se usó el kit acompañante así como las indicaciones del mismo (5 µl del tampón para PCR (X10), 1 µl de una mezcla de nucleótidos 10 mM, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,5 µM de cada cebador, 2,5 U de enzima Taq polimerasa y el ADN que queríamos amplificar disuelto en agua desionizada, hasta conseguir un volumen final de reacción de 50 µl. La concentración de MgCl<sub>2</sub> se optimizó en algunas ocasiones.

La PCR se realizó en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* de Perkin Elmer. Se llevó a cabo un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C durante 3 minutos, para posteriormente realizar 25-30 ciclos de: 94°C - 45 segundos, temperatura de hibridación ADN/cebador - 30 segundos, 72°C - tiempo de elongación (1kb ≈ 1 minuto). Finalmente se realizó un ciclo de 72°C - 10 minutos para completar la amplificación del fragmento.

También de manera alternativa se usó la *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen), que por indicación del fabricante necesita MgSO<sub>4</sub> en lugar de MgCl<sub>2</sub>, además de funcionar según un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos y 25-30 ciclos de: 94°C - 30 segundos, temperatura de hibridación ADN/cebador - 30 segundos, 68°C - tiempo de elongación (1kb ≈ 1 minuto). Esta enzima está especialmente indicada para aumentar la fidelidad de amplificación y para la amplificación de fragmentos mayores de 4 kb.

### 2.13.12.2 Secuenciación de fragmentos de ADN

Para la secuenciación de fragmentos de ADN, ya fuesen insertos de vectores o bandas amplificadas mediante PCR, se utilizó el protocolo descrito en el sistema *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* de Perkin Elmer, que se basa en el método de los dideoxinucleótidos terminales de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), mezclando 2 µl del kit con 0,25 µg de ADN y 3,2 pmoles del cebador en un volumen final de reacción de 10 µl.

Se realizó la secuenciación en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* de Perkin Elmer. Se llevó a cabo un ciclo inicial de 96°C durante 4 minutos, 25 ciclos de: 96°C - 30 segundos, temperatura hibridación ADN/cebador - 15 segundos y 60°C - 4 minutos. La temperatura de hibridación ADN/cebador se determinó generalmente según la siguiente fórmula:  $[2 \times (A+T)] + [(G+C) \times 4]$ .

La obtención de la secuencia correspondiente fue llevada a cabo por los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona en un secuenciador *ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer*. El cromatograma se visualizó con el programa Chromas (versión 1.43).

### **2.13.13 Técnicas de mutagénesis**

#### **2.13.13.1 Por inserción de transposón Mini-Tn5::km1**

Para la obtención de mutantes por transposición se utilizó el transposón mini-Tn5::Km1 siguiendo el método descrito por De Lorenzo. La transferencia del mini-Tn5 se realizó mediante conjugación triparental entre la cepa portadora de dicho transposón, *S<sub>17-1</sub>λpir* mini-Tn5::Km1 (De Lorenzo *et al.*, 1990), la cepa receptora, AH-405 (mutante espontáneo de AH-3 resistente a la rifampicina) (Merino *et al.*, 1996c) y la cepa portadora del plásmido facilitador de la conjugación (HB101 con pRK2073; Ditta *et al.*, 1985).

La selección de los mutantes se produjo a 30°C en placas de LB agar con rifampicina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml).

La posterior secuenciación a partir de cebadores diseñados en dicho transposón, permiten identificar el gen mutagenizado por este método. El ADN flanqueante al mini-Tn5Km1 de cada uno de los mutantes fue recuperado mediante digestiones *EcoRI* (una diana en un extremo del transposón), *PstI* (una diana en el otro extremo del transposón) o *EcoRV* (el transposón no posee dianas). Tras la restricción, el ADN fue ligado al vector pBCSK en las mismas dianas, para secuenciarlo con cebadores de cada uno de los extremos del plásmido, M13 for y T3, así como de los extremos del transposón, ISI e ISO.

#### **2.13.13.2 Por recombinación en un punto**

La obtención de mutantes por recombinación en un punto, se realizó utilizando el vector suicida pFS100 según el protocolo descrito por Rubires *et al.*, 1997. Con esta finalidad se clonó un fragmento interno del gen deseado, obtenido por PCR usando los oligonucleótidos detallados en el apartado 2.3.3 de Material y Métodos. Los productos de amplificación fueron clonados al vector pGEM-T y se descartó mediante secuenciación la posible introducción de mutaciones durante la reacción de amplificación. Los fragmentos clonados fueron liberados mediante digestión con *EcoRI* y se clonaron en la misma diana del vector suicida pFS100 (Rubires *et al.*, 1997), un derivado Km<sup>r</sup> del plásmido pGP704 (Miller y Mekalanos, 1988). El origen de replicación R6K del plásmido pFS100 es dependiente del producto del gen  $\pi$  que contiene el fago  $\lambda$ pir, por ello utilizamos de forma rutinaria para propagar dicho plásmido y sus derivados, la cepa MC1061, una *E. coli* lisogeneizada con el

fago lambda. Además, el plásmido pFS100 codifica para la región *mob* del plásmido pRP4, y por lo tanto se puede ser movilizado mediante conjugación.

Se llevo a cabo una conjugación triparental entre la cepa hospedadora de la construcción en pFS (detalladas en la tabla 2.2) y un derivado rifampicina resistente de la cepa de *Aeromonas* spp. a mutar , usando el plásmido pRK2073 (Ditta *et al.*, 1985) como vector movilizador. La recombinación en un punto de dicha construcción en el cromosoma genera dos copias truncadas del gen deseado.

#### **2.13.14 Complementación**

Tras llevar a cabo las construcciones necesarias con los genes salvajes, éstas se transfirieron mediante conjugación triparental al mutante de *Aeromonas* spp. en cuestión, y se seleccionaron los transconjugantes con la ayuda de antibióticos. El ADN plasmídico aislado a partir de algunos transconjugantes, se sometió a restricciones enzimáticas para verificar la presencia del plásmido con el inserto deseado y se procedió a pruebas fenotípicas para determinar si los transconjugantes recuperaban el fenotipo salvaje.

#### **2.13.14 Programas informáticos empleados para el análisis de secuencias**

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

Se utilizó el programa informático *GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetic Computer Group, Madison Wisconsin)* para la detección de pautas abiertas de lectura, localización de dianas para enzimas de restricción, traducción de secuencias de ADN a proteína, detección de secuencias terminadoras y diseño de cebadores, o bien se empleó indistintamente el *Seqaid 3.81* (D. D. Rhoads y D. J. Roufa, Molecular Genetics Laboratory, Center for basic Cancer Research, Kansas State University, 1991) o *Vector NTI 8.0* (Informax, Inc.).

La búsqueda de secuencias de ADN y proteínas homólogas en las bases de datos GenBank, EMBL y *Protein Identification Resource* se realizó mediante el programa *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). Las secuencias de aminoácidos también se compararon frente a bases de datos de Pirprot y Swiss-prot mediante el programa *FASTA* (Pearson y Lipman, 1988).

Los alineamientos entre secuencias se llevaron a cabo mediante el programa *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994) o *AlignX* (un componente del *Vector NTI 8.0*). Los perfiles de hidrofobicidad se calcularon de acuerdo al método de Kyte y Doolittle, 1982, gracias a los programas *PSORT* (Grandy *et al.*, 2003) y *TMHMM* (Krogh *et al.*, 2001), ambos de ExPASy,

que detectaban la localización celular de la proteína y sus posibles regiones transmembrana, respectivamente. Con los programas *Prot Param* y *Prot Scale* de ExPASy analizamos las principales características de las proteínas. La agrupación de las proteínas en familias según sus dominios conservados se llevó a cabo con el programa PFAM de Sanger Center. La búsqueda de dominios conservados se realizó mediante el programa PROSITE. Para localizar las regiones núcleo de los diferentes dominios catalíticos de las sintetasas de péptidos no ribosomales, se realizaron diferentes alineamientos con las proteínas de función conocida más similares de las bases de datos y paralelamente se realizaron búsquedas con la aplicación Búsqueda de dominio del programa informático *Vector NTI 8.0*.

La búsqueda del código no ribosomal de las sintetasas de péptidos no ribosomales se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Stachelhaus *et al.*, 1999 y Challis *et al.*, 2000. Brevemente, se alinearon las secuencias de los diferentes dominios de adenilación con la secuencia del dominio de adenilación de GrsA utilizando el alineamiento Gapped *ClustalW* y se identificaron los putativos residuos que delimitan el bolsillo de unión a sustratos. Paralelamente, también se realizó una búsqueda en la base de datos que contiene los códigos no ribosomales de más de 150 dominios de adenilación cuya especificidad de sustrato ha sido determinada experimentalmente. Dicha base de datos está hospedada en el servidor NRPS de la Universidad Johns Hopkins.

La búsqueda de putativos promotores procarióticos  $\sigma 70$  se llevó a cabo principalmente con el programa para la predicción de promotores basado en el método NNPP (*Neural Network Promoter Prediction* (Reese M.G., 2001) o con el algoritmo BROM de Softberry (Softberry, Inc.).

Para buscar las posibles cajas Fur dentro de las regiones promotoras de la agrupación génica de sideróforos se utilizó la aplicación búsqueda de motivos del programa informático Vector NTI 8.0. Se consideraron todas las secuencias con un umbral mínimo de similitud del 60% a la consensus GATAATGATAATCATTATC, establecida por Stojiljkovic a partir de 33 secuencias de cajas Fur de *E. coli*, *S. marcescens* y *Y. enterocolitica* (Stojiljkovic *et al.*, 1994). Los mismos autores también elaboraron la matriz de peso que se expone en la Figura 2.1.

G (17, 4, 0, 0, 0, 0, 10, 3, 6, 0, 1, 4, 1, 4, 0, 0, 4, 5, 2)  
 A (5, 10, 12, 27, 33, 3, 6, 26, 7, 22, 25, 0, 5, 29, 3, 1, 14, 0, 1)  
 T (5, 5, 20, 6, 0, 28, 3, 0, 20, 11, 4, 22, 7, 0, 29, 32, 12, 27, 6)  
 C (6, 4, 1, 0, 0, 1, 4, 4, 0, 0, 3, 7, 19, 0, 1, 0, 0, 1, 26)

**Figura 2.1. Matriz de peso elaborada a partir de las secuencias de 33 cajas Fur de *E. coli*; *S. marcescens* y *Y. enterocolitica*.** Las cajas Fur de *E. coli* son de los siguientes genes: *cir*, *aerD*, *entC*, *entF*, *fepB*, *exbBD*, *fecA*, *fecIR*, *fepA*, *slt-I*, *fepD*, *sodA*, *fhuA*, *tonB*, *fhuE*, *fur*, *colla*, *collb*, *cvicolV*, *gene64*, *ø80*, *fes*, *purR* y *cyoA*. *S. marcescens*: caja Fur de *sfuA*. *Y. enterocolitica*: *hemP*, *foxA* y *fcuA*. Tomado de Stojiljkovic *et al.*, 1994.

Esta matriz de peso fue utilizada en el servidor PRODORIC (Münch *et al.*, 2003) con los mismos resultados que los obtenidos con la aplicación búsqueda de motivo del programa informático Vector NTI 8.0.

**3.**

**Caracterización del sistema de captación de hierro de elevada afinidad de la cepa de *Aeromonas hydrophila* AH-3.**

**Contribución a la virulencia.**

### **3 Caracterización del sistema de captación de hierro de elevada afinidad de la cepa de *Aeromonas hydrophila* AH-3. Contribución a la virulencia.**

#### **3.1 Precedentes**

Tal y como hemos comentado, existen diferentes trabajos que describen la caracterización química de los diferentes sideróforos secretados por *Aeromonas* spp., así como la caracterización de los genes que intervienen en los pasos iniciales de la biosíntesis de dichos sideróforos. Sin embargo, no han sido caracterizados los genes cuyos productos intervienen en los pasos posteriores de la ruta biosintética, ni los genes cuyos productos median los procesos de transporte y secreción. La ratificación de la teoría del intercambio de ligando, propuesta para explicar la peculiar multifuncionalidad del receptor de amonabactina de la cepa de *A. hydrophila* 495A2, está limitada por la necesidad de caracterizar genéticamente dicho receptor, aumentando el atractivo de la descripción de los genes que median el transporte de la amonabactina.

#### **3.2 Caracterización preliminar de la presencia de un sistema de captación de hierro de elevada afinidad en diferentes cepas de *Aeromonas* spp. mesófilas**

Aunque la mayoría de *Aeromonas* spp. mesófilas producen un único sideróforo, algunas cepas no producen niveles detectables de los mismos (Barghouthi *et al.*, 1989; Zywno *et al.*, 1992). Para verificar la presencia de un sistema de captación de hierro de elevada afinidad se realizó el ensayo CAS, (del inglés *Chrome Azurol Sulfonate assay*), a cada una de las cepas enumeradas en la tabla 3.2. Dicho análisis está basado en las propiedades funcionales de los sideróforos y no permite determinar la naturaleza química de los mismos. La utilidad de este ensayo colorimétrico reside en la generalizada capacidad de los sideróforos, sea cual fuere su estructura, de extraer el hierro del sustrato cromogénico adicionado al medio de cultivo. Las colonias que sintetizan y secretan sideróforos producen un halo anaranjado (color del deferri-cromógeno) que contrasta con el color azulado del medio de cultivo (color del ferri-cromógeno) (Schwyn y Neilands, 1987).

Para detectar la secreción al medio de cultivo de sideróforos con grupos ligando del tipo catecolato, se realizó el Test de Arnow a partir de los sobrenadantes de las cepas AH-3 y AH-1 crecidas en condiciones de disponibilidad y limitación de hierro. Se utilizó el medio mínimo Davis debido a la interferencia del color de los otros medios de cultivo con la lectura colorimétrica del ensayo. Ambas cepas crecidas en condiciones de limitación de hierro, mostraron un resultado positivo en el Test de Arnow, hecho indicativo de la secreción al medio de cultivo de un sideróforo de tipo catecolato, en respuesta a las condiciones de limitación de hierro (Arnow, 1937).

### **3.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de dipiridil de diferentes cepas de *Aeromonas* spp. mesófilas**

Para simular las condiciones de limitación de hierro características de los sistemas huésped, fue necesario determinar la concentración mínima inhibitoria de dipiridil de cada una de las cepas de *Aeromonas* mesófilas incluidas en este estudio. El dipiridil es un agente quelante de iones ferrosos frecuentemente empleado para disminuir la biodisponibilidad del hierro presente en los medios de cultivo. Así pues, se realizó el análisis de las curvas de crecimiento de las diferentes cepas, crecidas en caldo nutritivo suplementado con concentraciones crecientes de 2,2'-dipiridil, para finalmente seguir la densidad óptica del cultivo a 600nm. Los resultados que se muestran en la tabla 3.2 representan la concentración de dipiridil utilizada en el laboratorio para inducir las condiciones de limitación de hierro.

### **3.4 Determinación del tipo de sideróforo secretado por varias cepas de *Aeromonas* spp. mediante la técnica del bioensayo con cepas indicadoras**

Como ya hemos comentado anteriormente, la gran mayoría de *Aeromonas* mesófilas producen un único sideróforo que puede ser enterobactina o amonabactina (Zywno *et al.*, 1992; Barghouthi *et al.*, 1989). La técnica del bioensayo permite discriminar si una cepa de *Aeromonas* produce amonabactina o enterobactina, pero para ello es ineludible seleccionar correctamente las cepas indicadoras. Seleccionamos la cepa *A. hydrophila* SB22::*amoA* como indicadora de la producción de amonabactina, porque utiliza la amonabactina como fuente de hierro de forma mucho más eficiente que la enterobactina (Rabsch y Winkelmann, 1991). La cepa de *E. coli* AN346 fue utilizada como cepa indicadora de la producción de enterobactina, porque en nuestro laboratorio esta cepa se mostró incapaz de utilizar la amonabactina como fuente de hierro, en cambio utilizó la enterobactina muy eficientemente. Es importante tener en mente que las cepas indicadoras seleccionadas son capaces de utilizar otros sideróforos además de los anteriormente mencionados y que no todas las *Aeromonas* spp. producen amonabactina o enterobactina; con lo cual los estudios de bioensayo realizados no nos permitieron identificar el sideróforo secretado por una cepa en concreto, únicamente nos permitieron descartar la secreción de un sideróforo en concreto por una cepa determinada.

Realizamos los bioensayos con las cepas indicadoras anteriormente mencionadas y con los sobrenadantes de nueve cepas de *Aeromonas* mesófilas crecidas en condiciones de limitación de hierro, que fueron clasificadas según los resultados expuestos en la tabla 3.1., como pertenecientes al grupo 1 o al grupo 2.

Para verificar la capacidad de utilización de sideróforos de las cepas indicadoras, utilizamos los sobrenadantes de seis cepas de *Aeromonas* productoras de amonabactina y de

diferentes bacterias productoras de enterobactina (tres cepas de *Aeromonas*, *E. coli* HB101 y *K. pneumoniae* C3).

Las cepas de *Aeromonas* del grupo 1 se comportaron en el análisis de bioensayo del mismo modo que las cepas productoras de amonabactina, de modo que podemos afirmar que las cepas del grupo 1 no son cepas secretoras de enterobactina y que probablemente sean cepas secretoras de amonabactina. Las cepas de *Aeromonas* del grupo 2 se comportaron como las cepas de *Aeromonas* productoras de enterobactina, de modo que podemos afirmar que no son cepas secretoras de amonabactina, y que probablemente sean cepas secretoras de enterobactina.

**Tabla 3.2. Caracterización preliminar de los sistemas de captación de hierro de elevada afinidad de diferentes *Aeromonas* spp. mesófilas y capacidad de crecimiento en presencia del agente quelante 2-2'-dipiridil.**

Cepa	[2,2'-dipiridil]	Fenotipo en Cas agar	sideróforo secretado
<i>A. hydrophila</i> AH-3	250µM	+	Amonabactina <sup>a,c</sup>
<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> AH-1	285µM	+	Amonabactina <sup>a,c</sup>
<i>A. hydrophila</i> A19	250µM	+	Amonabactina <sup>b,c</sup>
<i>A. hydrophila</i> A34	250µM	+	Amonabactina <sup>b,c</sup>
<i>A. hydrophila</i> A82	250µM	+	Amonabactina <sup>b,c</sup>
<i>A. hydrophila</i> A145	250µM	+	Amonabactina <sup>b,c</sup>
<i>A. hydrophila</i> A162	250µM	+	Amonabactina <sup>b,c</sup>
<i>A. hydrophila</i> A167	250µM	+	Amonabactina <sup>b,c</sup>
<i>A. hydrophila</i> 495A2::amoA (SB22::amoA)	175µM	-	Mutante con alteraciones en la ruta de biosíntesis de Amonabactina
<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> A11	200 µM	+	Enterobactina <sup>b,c</sup>
<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> A151	200 µM	+	Enterobactina <sup>b,c</sup>
<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> A66	200 µM	+	Enterobactina <sup>b,c</sup>
<i>A. caviae</i> A1	275µM	+	desconocido <sup>b</sup>
<i>A. caviae</i> A261	185µM	+	desconocido <sup>b</sup>
<i>A. caviae</i> A20	165µM	-	No productor <sup>d</sup>
O:37	250µM	+	Amonabactina <sup>c</sup>
O:42	250µM	+	Amonabactina <sup>c</sup>
O:21	250µM	+	Amonabactina <sup>c</sup>
O:4	250µM	+	Enterobactina <sup>c</sup>
O:5	250µM	+	Enterobactina <sup>c</sup>
O:20	200µM	+	Enterobactina <sup>c</sup>
O:30	200µM	+	Enterobactina <sup>c</sup>
O:15	175µM	-	No productor <sup>d</sup>

A/ secreción de un sideróforo de tipo catecolato, determinado en este trabajo mediante el Test de Arnou.

B/determinado por Zywno *et al.*,1992 mediante cromatografía de capa fina

C/ determinado en este estudio mediante bioensayo, es importante destacar que los bioensayos realizados solo permiten una presunción del sideróforo secretado.

d/ determinado mediante el test de CAS. +, presencia de halo anaranjado alrededor de las colonias; -, ausencia de halo anaranjado alrededor de las colonias.

**Tabla 3.1.** Determinación del tipo de sideróforo secretado por diferentes *Aeromonas* spp. mediante la técnica del bioensayo.

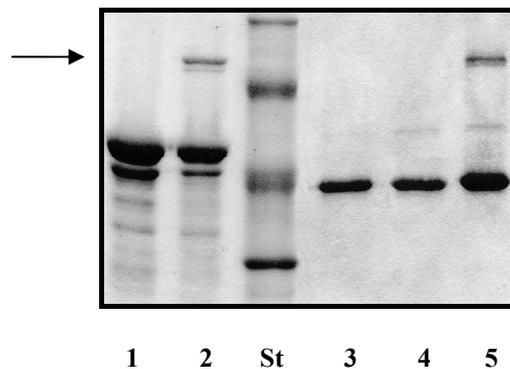
Sobrenadantes de las cepas		* Sobrenadantes obtenidos a partir de	Concentración de los sobrenadantes empleada	SB22:: <i>amoA</i>	E. coli:: <i>entA</i>
A M O N A B A C T I N A	A19	NB 250µMdip	1X	+	-
			20X	+	-
	A34	NB 250µMdip	1X	+	-
			20X	ND	ND
	A82	NB 250µMdip	1X	+	-
			20X	ND	ND
	A145	NB 250µMdip	1X	+	-
			20X	ND	ND
	A162	NB 250µMdip	1X	+	-
			20X	ND	ND
	A167	NB 250µMdip	1X	+	-
			20X	ND	ND
E N T E R O B A C T I N A	A11	NB 200 µMdip	1X	-	+
			20X	+	+
	A151	NB 200µMdip	1X	-	+
			20X	+	+
	A66	NB 200µMdip	1X	-	+
			20X	+	+
	HB101	TSB 300µMdip	1X	-	+
			20X	-	+
	C3	TSB 300µMdip	1X	-	+
			20X	-	+
G R U P O 1	AH-3	NB 250µMdip	1X	+	-
			20X	+	-
	O:37	NB 250µMdip	1X	+	ND
			20X	ND	ND
	O:42	NB 250µMdip	1X	+	-
			20X	ND	ND
	O:21	NB 250µMdip	1X	+	-
			20X	ND	ND
	A1	NB 275µMdip	1X	+	ND
			20X	ND	ND
G R U P O 2	O:4	NB 250µMdip	1X	-	+
			20X	+/-	+
	O:5	NB 250µMdip	1X	-	+
			20X	+	+
	O:20	NB 200µMdip	1X	-	-
			20X	+	+
	O:30	NB 200µMdip	1X	-	-
			20X	+	+
CONTROL NEGATIVO	TSB 300µMdip	1X	-	-	
		20X	-	-	
CONTROL NEGATIVO	NB 200µMdip	1X	-	-	
		20X	-	-	
CONTROL POSITIVO	FeCl <sub>3</sub>			+	+

\* concentración de dipiridil empleada para simular las condiciones de limitación de hierro. ND, no determinado.

### 3.5 Efecto de las condiciones de limitación de hierro en la expresión de proteínas de membrana externa de las cepas AH-3 y AH-1.

Diversas evidencias experimentales demuestran la expresión regulada por hierro de proteínas de membrana externa durante el crecimiento *in vivo* de diferentes patógenos. Entre dichas evidencias se puede destacar la detección en suero humano y animal de anticuerpos naturales que reaccionan con algunas de las proteínas de diferentes patógenos reguladas por hierro y la visualización de las mismas en patógenos aislados directamente a partir de infecciones clínicas humanas.

La comparación del patrón de proteínas de membrana externa, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE), de las cepas AH-3 y AH-1 cultivadas en condiciones de disponibilidad y de limitación de hierro, reveló la expresión regulada por hierro de varios componentes de la membrana externa.



**Figura 3.1.** SDS-PAGE en gel de acrilamida/bisacrilamida 12% (Coomasie-Blue). Carriles: **1**, AH-1 cultivada en caldo nutritivo; **2**, AH-1 cultivada en condiciones de limitación de hierro (285  $\mu\text{M}$  dip); **St**, estándar de pesos moleculares, 94kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa; **3**, AH-3 crecida en caldo nutritivo; **4**, AH-3 (165  $\mu\text{M}$  dip); **5**, AH-3 crecida en condiciones de limitación de hierro (250  $\mu\text{M}$  dip). La flecha indica la posición de las proteínas de membrana externa reguladas por hierro.

### 3.6 Obtención de mutantes por inserción mini-Tn5::Km con alteraciones en la producción de sideróforos.

El siguiente paso fue la obtención de mutantes incapaces de crecer en condiciones de limitación de hierro. Nuestra estrategia se basó en la obtención de un banco de aproximadamente 1.500 mutantes por la inserción del elemento de transposición mini-Tn5::Km (De Lorenzo, 1990) en un derivado rifampicina resistente de la cepa de *A. hydrophila* AH-3 (Merino *et al.*, 1996c) y posterior selección, mediante el test de CAS, de los mutantes que presentaban alteraciones en el sistema de captación de hierro mediado por sideróforos. Se seleccionaron dos mutantes, denominados AH-777 y AH-768, por presentar alteraciones en el sistema de captación de hierro mediante sideróforos y se procedió al estudio fenotípico de los mismos.

### 3.6.1 Análisis fenotípico de los mutantes en el sistema de transporte de sideróforos por inserción de un elemento de transposición.

Los mutantes AH-768 y AH-777 presentaron un fenotipo sobreproductor de sideróforos en el test de CAS (figura 3.2.). En general, los mutantes deficientes en alguno de los componentes del sistema de transporte de sideróforos presentan un aumento notable de los niveles de producción de sideróforos como efecto secundario al déficit nutricional de hierro al que se hallan sometidos (Schwyn y Neilands, 1987). En concordancia con esta hipótesis, ambos mutantes mostraron una disminución de la capacidad de crecimiento en presencia del agente quelante 2-2'-dipiridil. Estas características fenotípicas fueron clasificadas por J.B. Neilands como hechos indicativos de alteraciones en el sistema de transporte de sideróforos (Neilands, 1994). Además de las evidencias anteriormente expuestas, ninguno de los dos mutantes se mostró capaz de utilizar como fuente de hierro la amonabactina o la enterobactina en los estudios de bioensayo realizados (ver apartado 3.15.4 de la presente memoria).

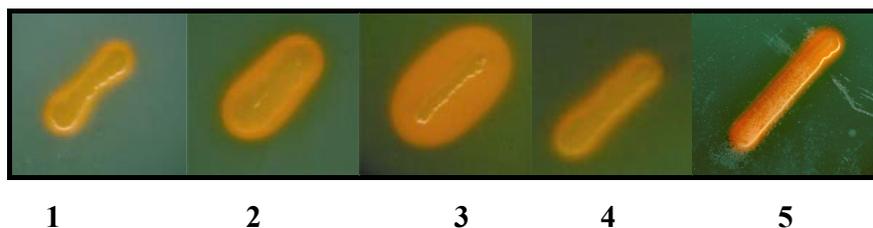
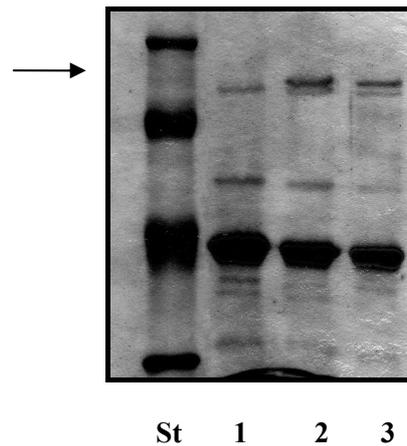


Figura 3.2. Test de CAS. 1, AH-3; 2, AH-768; 3, AH-777; 4, AH-768 con pCOS-SID/1; 5, AH-777 con pCOS-SID/1.

El sistema de transporte de ferri-sideróforos tiene un componente de membrana externa, por lo que nos pareció oportuno estudiar el perfil de proteínas de membrana externa de ambos mutantes crecidos en condiciones de disponibilidad y de limitación de hierro. Después de una electroforesis en geles SDS-PAGE con un porcentaje del 7,5% de acrilamida/bisacrilamida, pudimos observar la presencia en la cepa parental, y en el mutante AH-777, de dos proteínas de elevado peso molecular cuya expresión está inducida por las condiciones de limitación de hierro. Comparando el perfil electroforético del mutante AH-768 respecto a la cepa parental, ambas crecidas en condiciones de limitación de hierro, se observa la pérdida de una banda que presentaba un peso molecular aparente de 70 kDa.



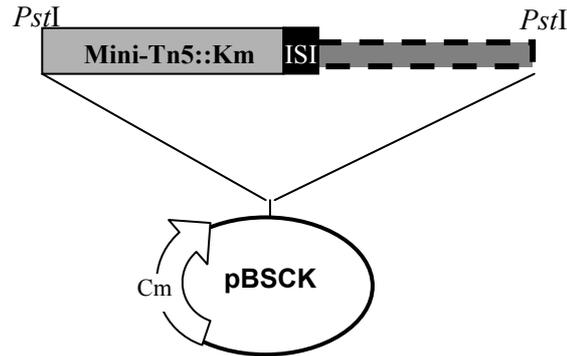
**Figura 3.3.** SDS-PAGE en gel de acrilamida/bisacrilamida 7,5% (Coomasie-Blue) de las proteínas de membrana externa extraídas de cultivos en condiciones de limitación de hierro. **St**, estándar de pesos moleculares, 94kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa; **1**, AH-768; **2**, AH-3; **3**, AH-777. La flecha indica la proteína de un peso molecular aparente de 70 kDa no detectada en el mutante AH-768.

### 3.6.2 Caracterización genética de los mutantes AH-768 y AH-777

Para realizar el clonaje del mini-Tn5::Km de los diferentes mutantes se realizó una digestión total del material genómico con las enzimas de restricción *EcoRV*, *EcoRI* y *PstI*, dianas elegidas por su presencia en el poliunidor del vector de clonación y por no presentar lugar de restricción dentro del transposón (*EcoRV*), permitiendo entonces el clonaje de las dos zonas adyacentes al lugar de inserción del transposón o bien por tener una única diana en un extremo del transposón, permitiendo la clonación de una única zona adyacente al lugar de inserción (*EcoRI* y *PstI*). En el segundo caso, es imprescindible para la posterior clonación que la diana sea externa al determinante de resistencia a la kanamicina.

Se realizó la técnica de transferencia Southern-blot de las diferentes digestiones genómicas y posterior hibridación con una sonda, marcada con digoxigenina, de la región correspondiente al determinante de resistencia a la kanamicina del mini-Tn5::km, para confirmar la inserción del elemento de transposición en un único punto del cromosoma de los mutantes. En todos los casos, el tamaño de las bandas que reaccionaron con la sonda en las digestiones *EcoRV* y *EcoRI* resultó ser demasiado grande para su clonaje, o demasiado pequeño en el caso de *EcoRI* del mutante AH-768, de modo que nos centramos en las digestiones *PstI*, para la posterior clonación del transposón en el vector pBCSK.

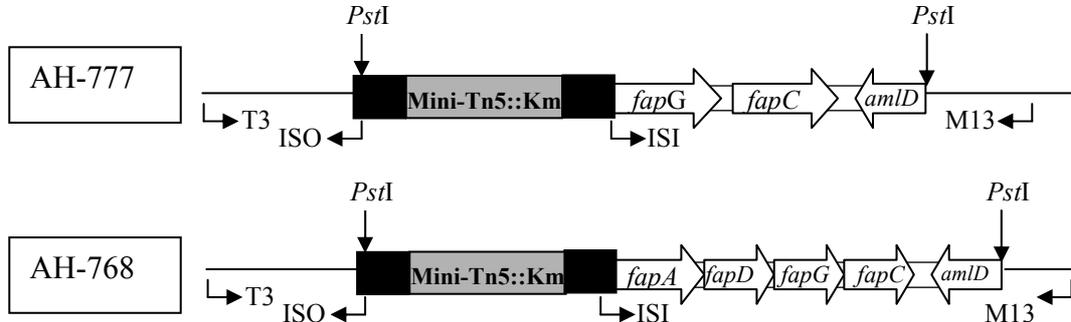
Así pues, el producto de las digestiones con *PstI* del ADN genómico de los mutantes se ligó al vector pBCSK, cortado con dicho enzima y defosforilado para evitar la formación de religados del vector, y se electrotransformó la cepa *E. coli* XL1-Blue con el producto de la ligación. La selección de las células transformadas que contenían el mini-Tn5::km y sus extremos adyacentes, se realizó suplementando las placas de LB agar con cloramfenicol y kanamicina.



**Figura 3.4.** Esquema del clonaje del mini-Tn5::km de los mutantes AH-768 y AH-777.

### 3.6.3 Secuenciación de los fragmentos de ADN adyacentes al transposón

Después de confirmar la presencia de inserto en los putativos clones recombinantes mediante digestión del ADN plasmídico purificado, se procedió a la secuenciación de la zona genómica adyacente al transposón, utilizando el oligonucleótido ISI del extremo del transposón y dos cebadores convergentes cercanos al polilizador del vector de clonación. Como cabía esperar, dos de las tres secuencias contenían pautas abiertas de lectura que presentaban homología con diferentes proteínas de la base de datos cuya función estaba relacionada con el sistema de captación de hierro mediante sideróforos.



**Figura 3.5.** Esquema del lugar de inserción del mini-Tn5::km en los mutantes AH-777 y AH-768. Los nombres de las diferentes pautas abiertas de lectura fueron asignados por homología con el sistema transportador de sideróforos de tipo catecolato de *E. coli*.

#### Lugar de inserción del mini-Tn5::Km en el mutante AH-777

Los oligonucleótidos ISI y M13 nos permitieron empezar a secuenciar una de las zonas adyacentes al lugar de inserción del transposón, la secuenciación del fragmento de 2 kb se completó diseñando nuevos oligonucleótidos a partir de la secuencia obtenida. La inserción del transposón se había producido en un gen cuyo producto presentó similitud con el componente permeasa de diferentes sistemas de transporte de sideróforos.

### Lugar de inserción del mini-Tn5::Km en el mutante AH-768

La secuencia obtenida se comparó con las introducidas en los bancos de datos y se encontró que los productos de traducción de las cinco pautas abiertas de lectura detectadas, presentaron una elevada similitud con proteínas que median el transporte de ferri-sideróforos a través de membrana externa (FapA) e interna (FapDGC), y con proteínas que intervienen en la biosíntesis de muchos sideróforos (AmID). La secuencia aminoacídica inferida a partir del gen mutado por el transposón se denominó FapA por presentar una elevada similitud con CirA, una proteína ubicada en la membrana externa de *E. coli*, que actúa como receptor de sideróforos de tipo catecolato (amonabactina, dihidroxidobenzoilserina) y cuya funcionalidad está sometida al complejo TonB-Exb (Hantke, 1990; Rabsch y Winkelmann, 1991).

Para determinar la secuencia completa del presunto gen que codifica para el receptor de ferri-sideróforos de membrana externa, y al mismo tiempo caracterizar el resto de genes pertenecientes a la agrupación génica del sistema de sideróforos de la cepa AH-3, fue necesaria la búsqueda de clones en una librería genómica de dicha cepa.

### **3.7 Clonaje de la agrupación génica de biosíntesis, transporte y secreción de sideróforos de la cepa AH-3.**

#### **3.7.1 Obtención de una sonda específica**

La sonda empleada para la hibridación con los clones de la librería genómica se elaboró haciendo uso de los cebadores 768B y 768E, diseñados a partir de la secuencia adyacente al lugar de inserción del mini-Tn5::Km en el mutante AH-768, que amplificaron un fragmento de aproximadamente 2kb que contenía parte de la secuencia del gen *fapA* y la secuencia completa del gen *fapD*. La reacción de amplificación con dNTP marcados con digoxigenina se llevó a cabo a una temperatura de hibridación ADN/cebador de 60 °C y un tiempo de extensión de dos minutos.

#### **3.7.2 Hibridación de la librería genómica con la sonda específica para el sistema de captación de hierro mediado por sideróforos.**

El escrutinio en búsqueda de clones recombinantes que contuvieran la secuencia que interesaba recuperar se llevó a cabo mediante la transferencia de colonias de una genoteca de 1200 clones, en la que estaba representado el genomio completo de *A. hydrophila* AH-3. Dicha genoteca se construyó en  $\lambda$ pLA2917 para ser posteriormente insertada en *E. coli* DH5 $\alpha$  tal y como se describe en el apartado 2.13.10 de Material y Métodos. Como control positivo del proceso de hibridación se utilizaron colonias de la cepa AH-3 y como control negativo colonias de la bacteria hospedadora en la que se construyó la genoteca.

El revelado de la transferencia de colonias permitió detectar dos clones, con reacción positiva frente la sonda utilizada, que se denominaron pCOS-SID/1 y pCOS-SID/8. Se

seleccionaron los presuntos clones y se verificó la naturaleza específica de la hibridación mediante aislamiento del ADN plasmídico y posterior amplificación utilizando el mismo par de cebadores empleados para la elaboración de la sonda. De nuevo, se utilizó el material genómico de la cepa representada en la genoteca a modo de control positivo y el ADN del vector utilizado para construir la genoteca a modo de control negativo. Los dos clones amplificaron un producto de PCR del tamaño esperado.

### **3.8 Complementación de los mutantes AH-777 y AH-768 con los plásmidos pCOS/SID-1 y pCOS/SID-8**

Sendos plásmidos se movilizaron a los respectivos mutantes mediante procesos independientes de conjugación triparental utilizando el vector pRK2073, un derivado de pRK2013 (Ditta *et al.*, 1985), como facilitador de la conjugación. Se seleccionaron los transconjugantes resistentes a la rifampicina, kanamicina y tetraciclina y se confirmó la presencia de ADN plasmídico con el inserto esperado mediante extracción y análisis de restricción del mismo.

Para comprobar el efecto de la presencia de los clones recombinantes en los mutantes, se realizó el test de Cas y se evaluó la capacidad de crecimiento en presencia del agente quelante 2-2'-dipiridil. Ambos mutantes, independientemente de si hospedaban el plásmido pCOS/SID-1 o pCOS/SID-8, recuperaron la capacidad de crecimiento en condiciones de limitación de hierro y el fenotipo en el test de CAS característico de la cepa parental (figura 3.2.). Estos resultados no fueron obtenidos con los mutantes que únicamente contenían el vector de clonación sin presencia de inserto. Así pues, todo parecía indicar que ambos plásmidos contenían los genes implicados en el sistema de transporte de sideróforos de la cepa AH-3.

El tamaño de los plásmidos pCOS/SID-1 y pCOS/SID-8 resultó ser de unas 26Kb y 22Kb, respectivamente, por lo que cabía la posibilidad que además de codificar para los componentes del sistema de transporte de sideróforos, codificaran también para los componentes de secreción y biosíntesis de sideróforos. Procedimos a la secuenciación del clon pCOS/SID-1, por ser mayor el tamaño de su inserto.

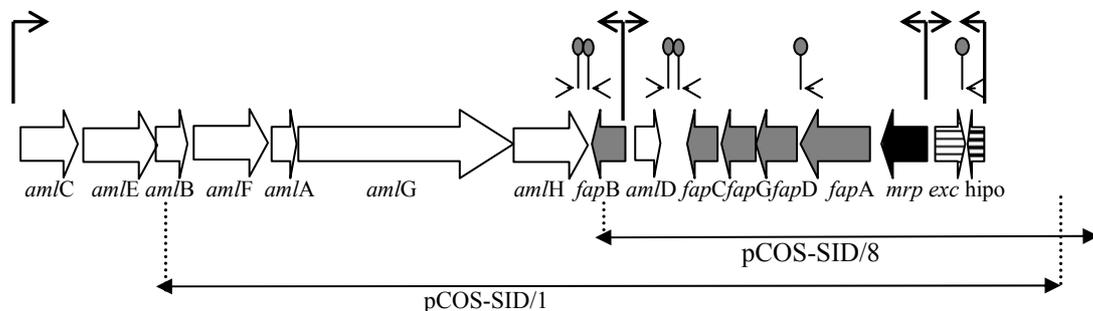
### **3.9 Complementación de una cepa no productora de sideróforos con el clon pCOS/SID-1**

El test de CAS realizado a la cepa de *Aeromonas* A20HG4 no detectó niveles significativos de sideróforos. Dicha cepa se mostró capaz de utilizar el hierro de la ferri-amonabactina y de la ferri-enterobactina en los análisis de bioensayo realizados, demostrando que no presenta alteraciones en el sistema de transporte de ferri-sideróforos.

Decidimos transferir el plásmido pCOS/SID-1 a la cepa A20HG4 para comprobar si era capaz de restablecer la capacidad de síntesis o de secreción de sideróforos de dicha cepa. En este contexto, se obtuvo un derivado rifampicina resistente de la cepa A20HG4 y se procedió a la movilización del plásmido pCOS/SID-1 mediante conjugación triparental. Se seleccionaron las colonias resistentes a la rifampicina y tetraciclina y se confirmó la presencia del plásmido deseado. Los estudios del fenotipo del test de CAS del transconjugante seleccionado evidenciaron el restablecimiento de la capacidad de síntesis y secreción de sideróforos. Esta complementación parece indicar que dicho plásmido codifica para genes que intervienen en la biosíntesis o en la secreción de sideróforos, además de los genes de transporte anteriormente citados.

### 3.10 Secuenciación del clon pCOS/SID-1

Se procedió a la secuenciación de los extremos del inserto de ambos clones a partir de los cebadores convergentes CspLA y RpLA, complementarios a las secuencias que flanquean la diana *Bgl*III del cósmido pLA2917, y a la confirmación de los mismos secuenciando con uno de los cebadores utilizados para la elaboración de la sonda. De los tramos de secuencia obtenidos, se diseñaron nuevos cebadores, que nos permitieron continuar con la secuenciación en ambas direcciones del inserto de pCOS-SID/1. Los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación se pueden encontrar en el apartado 2.3.3 de Material y Métodos.

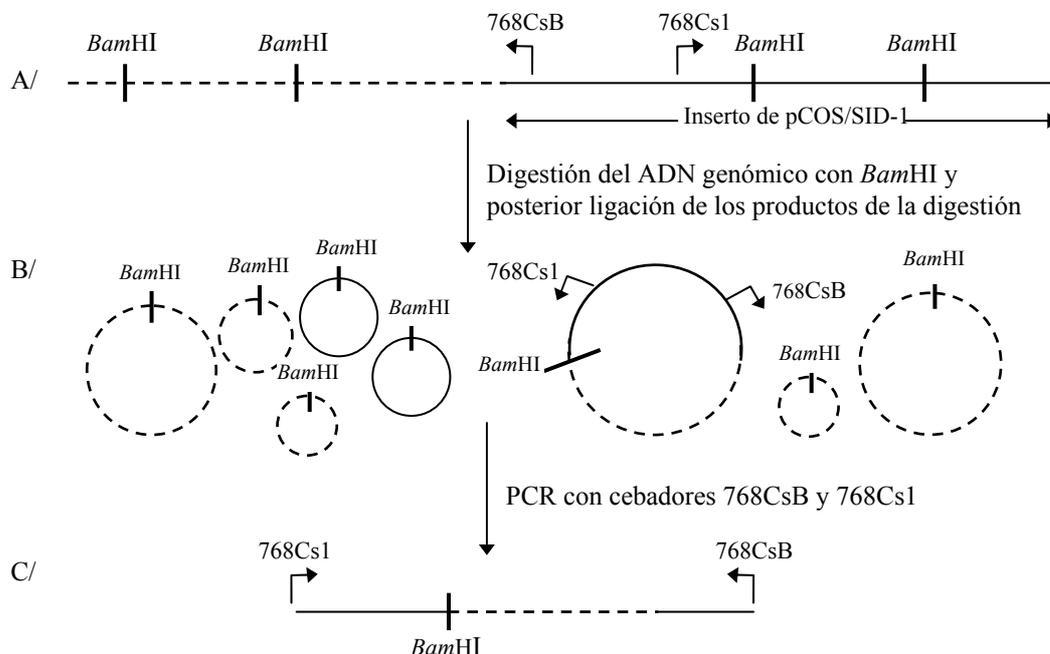


**Figura 3.6.** Esquema de la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3. Las ORFs blancas intervienen en el proceso de biosíntesis de sideróforos, las ORFs grises en el proceso de transporte, la ORF negra es un putativo componente del sistema de secreción y las ORFs ralladas no pertenecen a dicha agrupación. Se indica la región incluida en el inserto de los clones pCOS/SID-1 y pCOS/SID-8. En el esquema también se muestran las regiones promotoras detectadas (flechas encima de las ORFs) y las putativas estructuras de finalización de la transcripción (agujas encima de las ORFs).

El inserto clonado en pCOS-SID/1 no contenía todos los genes esperados en una agrupación génica de sideróforos de tipo catecolato, por lo que se intentó hacer un paseo cromosómico con una nueva sonda, amplificada por PCR con dNTP marcados con digoxigenina, a partir de cebadores específicos que amplifican un fragmento interno del gen *amI F* de la cepa AH-3. Tras el revelado de la transferencia de colonias, se detectaron dos colonias con reacción positiva a la sonda utilizada. Después del respectivo aislamiento del ADN plasmídico, se validó la especificidad de la hibridación mediante amplificación con los mismos cebadores utilizados para la elaboración de la sonda. También por PCR se comprobó si

los nuevos clones contenían las secuencias nucleotídicas en sentido 5' del gen *amlB*. Con esta intención, se realizó una primera amplificación con un cebador complementario al gen *amlB* y un cebador cercano a la diana *Bgl*II del vector de clonación (CspLA), una segunda amplificación con un cebador diseñado a partir de la cadena que codifica para el gen *amlB* y el cebador CspLA. El hecho de desconocer la orientación del inserto en los presuntos clones hizo necesarias dos amplificaciones adicionales, utilizando los mismos cebadores del inserto, pero empleando esta vez un cebador del lado opuesto a la diana *Bgl*II del vector de clonación (RpLA). Lamentablemente, ninguno de los clones contenía secuencias vecinas al inserto del clon pCOS-SID/1, tal y como se deduce del hecho que ambos clones amplificaran un producto del mismo tamaño que el amplificado con el clon pCOS-SID/1.

La secuenciación de los genes *amlCEB* se llevó a cabo mediante una técnica conocida en nuestro grupo de investigación como secuenciación por religados, figura 3.7. Dicha técnica se basa en la secuenciación de fragmentos no clonados de material genómico, a partir del producto de amplificación obtenido, utilizando como molde material genómico digerido con un enzima de restricción y ligado sobre si mismo. En este contexto, es imprescindible que la secuencia interna a los oligonucleótidos divergentes seleccionados (768CsB y 768Cs1), no contenga ninguna diana de restricción para el enzima utilizado durante la restricción del material genómico.



**Figura 3.7. Esquema de la estrategia utilizada para la secuenciación de los genes *amlCEB*.** **A/** A partir de la región de secuencia conocida, ilustrada como una línea continua, se diseñaron cebadores divergentes teniendo en cuenta la posición de las dianas de restricción elegido, *Bam*HI. Es imprescindible para este tipo de técnica que entre los dos cebadores no haya ninguna diana de restricción para el endonucleasa elegida. **B/** Esquema que ilustra el producto de ligación obtenido a partir de la restricción con *Bam*HI del ADN genómico de la cepa AH-3 y la posterior autoligación del producto de restricción. **C/** Esquema del producto de PCR con los cebadores seleccionados. Seguidamente, se secuenció el producto de PCR. Las líneas discontinuas representan la región de ADN adyacente al inserto del clon pCOS-SID/1.

Después de la digestión del ADN genómico de la cepa AH-3 con el enzima *Bam*HI, se procedió a la precipitación del mismo y a la posterior autoligación del producto de digestión. De nuevo, se precipitó el producto de ligación y se determinó la cantidad de ADN idónea para servir de molde en la reacción de amplificación con la *Platinum taq DNA polymerase* en las condiciones específicas mencionadas en el apartado 2.13.12.1 de Material y Métodos. En esta ocasión, se utilizaron los cebadores 768Cs1 y 768CsB, a una temperatura de hibridación de 56°C y el máximo tiempo de extensión, 10 minutos, puesto que desconocíamos la longitud del fragmento amplificado. Obtuvimos un producto de PCR de 2144 pares de bases, de las cuales ya conocíamos casi la mitad, que fue purificado y secuenciado con los cebadores internos 768CsA y 768Cs3 a unas temperaturas de hibridación de 56°C y 58°C, respectivamente.

La técnica se fue repitiendo con diferentes productos de restricción del material genómico de la cepa AH-3 y diferentes cebadores, hasta secuenciar las 4kb de la agrupación génica del sideróforo de la cepa AH-3, no contenidas en el inserto de pCOS/SID-1.

### 3.11 Análisis de la secuencia nucleotídica

La secuencia nucleotídica, incluida en el Anexo de la presente memoria, se analizó con profundidad mediante aplicaciones informáticas, detalladas en el apartado 2.13.14 de Material y Métodos. Se analizaron todas las pautas de lectura abierta de más de cien nucleótidos. Se identificaron quince pautas de lectura abierta que permitieron deducir las estructuras primarias de quince proteínas, que fueron comparadas una a una con las ya introducidas en las bases de datos, Tabla 3.3.

Las presuntas unidades transcripcionales se determinaron a partir de la localización de putativas regiones promotoras y de posibles estructuras de finalización de la transcripción. De las quince pautas abiertas de lectura, seis estaban transcritas en el sentido contrario al resto. La localización de presuntos promotores y terminadores Rho-independientes nos presentó una agrupación génica compuesta por cuatro putativas unidades transcripcionales, formadas por las siguientes pautas abiertas de lectura (*Open Reading Frames*): ORF1-ORF7, ORF 9, transcritas en un sentido y ORF 8, ORF14-ORF10 transcritas en el sentido opuesto.

Los sistemas de captación de hierro de *A. hydrophila* están regulados por un represor similar, como mínimo, a nivel de estructura primaria y a nivel de función, a la proteína Fur de *E. coli* (Sha *et al.*, 2001). Por ello, se estudiaron las diferentes regiones operadoras para intentar identificar alguna secuencia que pudiera estar relacionada con el control de la expresión génica mediada por Fur.

**Tabla 3.3.** Análisis de las quince ORFs detectadas en el análisis de la agrupación génica de sideróforos de AH-3.

O.R.F.	Proteína homóloga (aa) (identidad%, similaridad%)	posición	pauta	G+C <sup>c</sup> (%)	tamaño (aa)	P.M. <sup>a</sup> (kDa)	pI <sup>a</sup>	GRAVY <sup>b</sup>
1	Isocorismato sintasa AmoA, <i>A. hydrophila</i> 495A2 (396) (75,82) EntC, <i>Chromobacterium violaceum</i> (392) (49,63) DhbC, <i>Brucella melitensis</i> (418) (44,56) EntC, <i>E. coli</i> (395) (46,59)	847-2040	+1	65,33	397	42,4	6,02	-0,014
2	2,3-dihidroxidobenzoato-AMP ligasa, EntE, <i>C. violaceum</i> (535) (59,69) EntE, <i>Photobacterium luminescens</i> (539) (55,67) Ent E, <i>E. coli</i> (536) (56,68)	2037-3710	+3	65,59	557	59,7	5,73	-0,098
3	2,3-dihidro-2,3-dihidroxidobenzoato sintasa, Ent B, <i>E. coli</i> (285) (57,71) EntB, <i>Shigella flexneri</i> (285) (57,71) EntB, <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium (285) (56,71)	3734-4636	+2	62,24	300	33,6	5,06	-0,127
4	Sintetasa de péptidos no ribosomales, MxcG, <i>Stigmatella aurantiaca</i> (1456) (35,49) putativa, <i>Streptomyces avermitilis</i> (1440) (37,49) EntF <i>C. violaceum</i> (1080) (39,51) DhbF, <i>B. subtilis</i> (2378) (28,44)	4633-7746	+1	66,66	1037	112	5,13	-0,005
5	2,3-dihidro-2,3-dihidroxidobenzoato deshidrogenasa, PhbA, <i>Photobacterium luminescens</i> (252) (58,68) AgbA, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (251) (56,67) EntA, <i>E. coli</i> (248) (54,65)	7767-8516	+3	68,26	249	25,8	5,12	0,359
6	Sintetasa de péptidos no ribosomales, Avin4433, <i>Azotobacter vinelandii</i> (2878) (34,48) Pflu4385, <i>Pseudomonas fluorescens</i> (4501) (34,48) Pvdl, <i>P. aeruginosa</i> (5149) (34,49)	8675-14776	+2	67,11	2033	223	5,67	-0,067
7	Sintetasa de péptidos no ribosomales, Componente B, <i>Nostoc</i> spp. (1086) (38,54) McyE, <i>R. palustris</i> (2682)(41,56) Pflu3534, <i>P. fluorescens</i> (3270) (38,55)	14773-16374	+1	67,98	533	57,3	6,54	0,011
8	Componente periplasmático transportador ABC BA0615, <i>B. anthracis</i> (321) (33,52) Proteína de unión a dicitrato, <i>B. cereus</i> (322) (52,31) FecB, <i>Synechocystis</i> spp. (315) (30,50)	16454-17398	-1	65,29	314	33,6	5,45	-0,198
9	Fosfopanteteinil transferasa, YbtD, <i>Y. pestis</i> (218) (40,53) NgrA, <i>P. luminescens</i> (247) (34,48) VibD, <i>V. cholerae</i> (261) (34,47)	17557-18282	+1	66,66	241	26,2	7	0,159
10	Componente hidrolasa transportador ABC, FecE, <i>P. luminescens</i> (255) (40,60) PvuE, <i>V. parahaemolyticus</i> (254) (38,60) YusB, <i>B. subtilis</i> (275) (37,58)	18351-19223	-3	63,23	290	32,2	6,71	-0,240
11	Componente permeasa transportador ABC, Tfus2633, <i>Thermobifida fusca</i> (442) (30,49) SCO1786, <i>S. coelicolor</i> (375) (29,53) FepG, <i>Y. enterocolitica</i> (347) (29,48)	19240-20223	-2	66,06	327	34,3	9,66	0,907
12	Componente permeasa transportador ABC, NCg10484, <i>C. glutamicum</i> (348) (36,54) SCO1787, <i>S. coelicolor</i> (348) (33,49) FepD, <i>Y. enterocolitica</i> (355) (33,50)	21325-23301	-2	65,68	338	35,6	9,54	1,106
13	Receptor de membrana externa, CirA, <i>E. coli</i> (663) (32,50) CirA, <i>Salmonella enterica</i> (663) (31,48) CirA, <i>S. enterica</i> sv Typhimurium (663) (31,48)	20238-21254	-3	61,9	658	72,2	5,28	-0,046
14	Putative multidrug resistance protein, <i>A. hydrophila</i> (409) (25,39) AdmQ, <i>Pantoea agglomerans</i> (402) (24,36) AvxA, <i>A. vinelandii</i> (407) (25,36)	23359-24588	-2	65,36	409	42,9	9,59	0,893
15	Proteína hipotética PA2633 <i>P. aeruginosa</i> (273) (28,41) Avin3536 <i>A. vinelandii</i> (305) (27,41)	24731-25597	+2	64,36	288	31,2	9,07	-0,196

a: Punto isoeléctrico y peso molecular de la proteína calculado usando el programa ProtParam de ExPASy.

b: Promedio de hidrofobicidad de la proteína usando el método descrito por Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle 1982).  
c: El porcentaje de G+C de esta región está comprendido en el rango que se ha descrito para el material genético de *Aeromonas*, 57-64%.

En el caso de las proteínas con similitud a las sintetasas de péptidos no ribosomales, se procedió a identificar los diferentes dominios catalíticos mediante la localización de regiones similares a cada una de las subregiones de los dominios catalíticos descritos hasta la fecha (Schwarzer *et al.*, 2003). Los resultados se muestran en las tablas 3.4.-3.8.

**Tabla 3.4. Dominios de adenilación activadores de grupos aril.**

	Región A1	Región A2	Región A3	Región A4	Región A5
<b>AmlE</b>	FSYREL	LKAGIAPVNAL	FFQLSGGSTG	ALPA	AEGLVNYT
<b>EntE</b>	LSYREL	LKLGVAPVLAL	YFQLSGGTTG	AIPA	AEGLVNYT
<b>DhbE</b>	WSYREL	FRLGALPVFAL	FLQLSGGSTG	ALPM	AEGLVNYT
<b>MxcE</b>	WSYREL	FRLGALPVFAL	FFQLSGGSTG	ALPA	AEGLVNYT

	Región A6	Región A7	Región A8	Región A9	Región A10
<b>AmlE</b>	HTRGPYTFRGYY	YCSGDL	GRLKQINRGGEKIAAEEVE	VADFKLP	VGK
<b>EntE</b>	MTRGPYTFRGYY	YCSGDL	GREKQINRGGEKIAAEEIE	IAEFKLP	VGK
<b>DhbE</b>	LTRGPYTIRGYY	YRTGDI	GRAKQINRGGEKVAAEEVE	LAAYKIP	VGK
<b>MxcE</b>	LTRGPYTIRGYY	YCTGDL	GRAKQINRGGDKIAAEEVE	LAAYKIP	VGK

AmlE, probable enzima de arilación de amonabactina-like sintetasa, *A. hydrophila* AH-3 (este trabajo); EntE, enzima de arilación de enterobactin sintetasa, *E. coli*; DhbE, enzima de arilación de bacilbactina sintetasa, *B. subtilis*; MxcE, enzima de arilación de mixoquelina sintetasa, *S. aurantiaca*.

**Tabla 3.5 Dominios de adenilación activadores de aminoácidos:**

	Región A1	Región A2	Región A3	Región A4	Región A5
	LSYxEL T	LKAGxAYLPID V L	LAYXXYTSGTTGXPKG S	FDxS	NxYGPTE
<b>AmlF</b>	FSYEAL	LLAGAVYVPLD	VAYLMFTSGSTGLPKG	FDAS	NTYGPTE
<b>MxcG</b>	MSYREL	LFSGAGYLPD	LAYVIYTSGSTGQPNG	FDAS	NTYGPTE
<b>DhbF M1</b>	VNYRKL	LKTGAAYLPD	PAYIIYTSGSTGRPKG	FDIS	NLYGPTE
<b>EntF</b>	FSYREM	VEAGAAYLPD	TAYIIYTSGSTGVPKG	FDVS	NLYGPTE
<b>AmlG</b>	LSYGEL	WKAGAAYVPLD	LAQVIYTSGSTGLPKG	FDAG	NMYGPTE
<b>AmlH</b>	LNYGEL	LRLGLTFVPLE	AAYMMFTSGSTGEPKG	FDIS	NCYGPTE
<b>PvdI M1</b>	LDYDEL	LKAGGAYVPD	LAYVIYTSGSTGKPKG	FDVS	NLYGPTE
<b>PvdI M3</b>	LDYDEL	LKAGGAYVPD	LAYVIYTSGSTGKPKG	FDVS	NLYGPTE

	Región A6	Región A7	Región A8	Región A9	Región A10
	GELxIxGxGLARGYL V K	YRTGDL	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE	LPxYMVP I	NGKVDR L
<b>AmlF</b>	GELVLLGPQLANGYA	YRTGDR	GRRDNEFKISGYRIQPGEVE	LPAAMIP	SNKLDL
<b>MxcG</b>	GELYLLGGGLARGYL	YRTGDK	GRVDEDFKISGHRIDPTEIE	LPAAMVP	TGKLDL
<b>DhbF M1</b>	GELYIAGTGLARGYF	YRTGDK	GRADHQIKIRGFRIELGEID	LPDYMVP	NGKLDL
<b>EntF</b>	GDLYLTGIQLAQGYL	YRTGDL	GRSDQLKIRGQRIELGEID	LPPHMVP	NGKLDL
<b>AmlG</b>	GELCISGLGLARGYL	YRTGDR	GRIDEQIKLRGYRIEPEIE	LPEYMVP	NGKLDL
<b>AmlH</b>	GELCIESPALCEGYW	YRTGDR	GRRDQVKLRGFRIELGEVE	LPHYMVP	SGKLDL
<b>PvdI M1</b>	GELYLAGRGLARGYH	YRTGDL	GRIDHQVKLRGLRIELGEIE	LPEYMVP	NGKLDL
<b>PvdI M3</b>	GELYLAGRGLARGYH	YRTGDL	GRIDHQVKLRGLRIELGEIE	LPEYMVP	NGKLDL

AmlF, probable enzima activador de lisina, *A. hydrophila* AH-3; AmlG, probable enzima activador de L-PheAla o L-Trp, *A. hydrophila* AH-3; AmlH, probable enzima activador de glicina, *A. hydrophila* AH-3; MxcG, probable enzima activador de lisina, *S. aurantiaca*; DhbF M1, probable enzima activador de glicina, *B. subtilis*; EntF, enzima activador de serina, *E. coli*; PvdI M1, enzima activador de serina, *P. aeruginosa*; PvdI M3, enzima activador de serina, *P. aeruginosa*.

**Tabla 3.6 Dominios transportadores**

Dominios transportadores precedentes a un dominio de condensación o a un dominio tioesterasa		Dominios transportadores precedentes a un dominio de epimerización		Dominios transportadores de ácidos aril		Dominios de tiolación	
	Región Ppant DxFFxLGGHSLK		Región Ppant DxFFxLGGDSIK		Región Ppant DLxxxGLDSXR N		LGGDSL H
<b>AmlF</b>	DNFFELGGQSLQ	<b>AmlG (1)</b>	DDFFRLGGDSIL	<b>AmlB</b>	NLIDYGLDSVR	<b>AmlG (2)</b>	LGVD <sub>S</sub> V
<b>MxcG</b>	DDFFELGGQSLQ	<b>PvdI M3</b>	DNFFALGGDSIV	<b>MxcF</b>	NLLECGLDSIR		
<b>DhbF</b>	DSFFELGGHSLL	<b>PvdI M1</b>	DNFFSLGGDSIV	<b>DhbB</b>	DLLDRGLDSVR		
<b>M1</b>							
<b>EntF</b>	ADFFALGGHSLL	-	-	<b>EntB</b>	NLIDYGLDSVR		
-	-	-	-	<b>VibB</b>	NLLFLGLDSIR		

La serina subrayada en estas secuencias es el probable sitio de adición del grupo fosfopanteteinil (von Döhren *et al.*, 1997).

**Tabla 3.7. Dominios de epimerización:**

Región E1	Región E2	Región E3	Región E4	Región E5	Región E6	Región E7	
PIQxWF	HHxISDGWS V	DxLLxAXG	EGHGRE	RTVGWFTxxYPYPFE V	PxxGxGYG	FNYLGQ R	
<b>AmlG</b>	PIQHWf	HHLVIDAVS	DLLLAALT	EGHGRE	RTLGWFTSTYPLALA	PDKGVGFN	FNYLGV
<b>PvdI M3</b>	PFQRLF	HHLVVDGVS	DLLLTALA	EGHGRE	RTVGWFTSLFPVRLS	PDKGLGYG	FNYLGQ
<b>PvdI M1</b>	FVQRWF	HHLAVDGVs	DLLLTALA	EGHGRE	RTVGWFTSLFPLRLT	PDKGVGYG	FNYLGR

AmlG dominio de epimerización de una L-PheAla o L-Trp, *A. hydrophila* AH-3; PvdI M3 y PvdI M1, dominios de epimerización de L-serina, *P. aeruginosa*.

**Tabla 3.8. Dominios de condensación:**

Región C1	Región C2	Región C3**	Región C4	Región C5	Región C6	
SxAQxRLWxL MY	RHExLRTxL	MHHxISDGWS V	YxDFAVW y	VGxFVNTLQxR I QA	NQDYPFE H Y	
<b>AmlF</b>	TIPQQGLWSG	ECEALKGHF	VHHIALDGFG	AAARsFW	PCMqMNIPLA	HQHRYE
<b>MxcG</b>	SAAQHGIWLG	EAEALHVRf	IHHIAMDGFG	ELDRTFW	PCMAMNIVPLR	HLRYE
<b>DhbF M1</b>	TGAQTGIWFA	EAESLHVRf	IHHIAIDGFG	EKDRQFW	PAMVMNLLPLR	HHKYRHE
<b>EntF</b>	VAAQPGIwMA	QADTLRMRF	YHLLVDGFS	QRDAAFW	TGPVLNVPLG	HQRYDAE
<b>AmlI (C1)</b>	SSSQSGLWFI	RHPSMRTRf	QHIIISDGWS	YIDYARW	VGFFVNTLVLR	HQLYRFE
<b>PvdI M1</b>	SYAQQRWwFL	RHETLRTVf	LHHIVSDGWS	YADYALW	IGLFVNTQVLR	HQDLPF
<b>PvdI M3</b>	SHAQQRWwFL	RHETLRTVf	QHIIIVSDGWS	YADYAAW	IGFFVNTQVLR	HQDLPF
<b>AmlI (C2)</b>	TSLQQSMLYH	RWPALRSEL	AHHGVLDGWS	RASEAYW	VGLYINSLPLI	HGTQSLA
<b>PvdI M2</b>	SPMQQGMFLH	AHEILRSGF	YHHILMDGWS	YRDYIGW	IGLFINTLPVI	HEHTPLY
<b>PvdI M4</b>	SPMQQGNLFH	RHAILRSGF	HHIILLDGWS	YSDYIAW	VGLFINTLPVV	QEHTPLF

\*La región C7 del dominio de condensación (RDxSRNPL) únicamente fue detectada en AmlG (C1) con secuencia RTTAINPI, PvdI (M1) con secuencia RSLSHSPL y PvdI (M3) con secuencia RNLSHSPL.

AmlF, MxcG, DhbF(M1) y EntF, carecen de dicha región. Tampoco se detectó dicha región en AmlG (C2) ni PvdI (M2) o PvdI (M4).

\*\* La histidina subrayada de la secuencia de la región núcleo 3 es el residuo catalítico (Wyckoff *et al.*, 2001).

### ORF1-amlC

La pauta abierta de lectura anterior a ORF1, se transcribe en sentido contrario y codifica para una proteína de función desconocida. La búsqueda en las bases de datos reveló similitud con una familia de lipoproteínas bacterianas conocidas como YceB (PF07273). Estos

datos nos indujeron a pensar que esta proteína no pertenecía a la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3.

La ORF1 codifica para una proteína de 397 aminoácidos, cuya secuencia primaria obtuvo un 86% de similitud con la proteína AmoA de una cepa de *A. hydrophila* productora de amonabactina. Hace más de una década, Barghouthi y colaboradores clonaron el gen *amoA* mediante complementación interespecífica de un mutante *entC* de *E. coli*. Los genes *amoA* de *A. hydrophila* y *entC* de *E. coli* codifican para isocorismato sintetasas, enzimas que intervienen en el primer paso de la vía biosintética del 2,3-DHBA, precursor común de todos los sideróforos de tipo catecolato (Ozenberger *et al.*, 1989). Los mutantes de *A. hydrophila* carentes de AmoA pierden la capacidad de sintetizar 2,3-DHBA y en consecuencia no pueden ensamblar ni secretar amonabactina, viéndose afectada en última instancia la capacidad de crecimiento en ambientes con baja disponibilidad de hierro (Barghouthi *et al.*, 1991).

La proteína codificada por la ORF1 se denominó AmlC (*Amonabactin-likeC*) y pertenece a la familia de enzimas de unión a ácido corísmico, que como bien indica su nombre, tienen como característica común la utilización de corismato como sustrato (PF00425, aminoácidos 125-389 de AmlC).

Se identificaron dos potenciales cajas Fur solapadas entre ellas y con la región consenso -10 del presunto promotor localizado en la región 5' de *amlC*. La primera presunta caja Fur, CAAATTGATAATCATTATC, entre las posiciones -46 y -22 respecto al codón de inicio de traducción, mostró un 84,2% de similitud con la consensus de *E. coli* y la segunda, GATAATCATTATCATTTTG, localizada entre las posiciones -40 y -22 respecto al inicio de traducción, un 78,9% de similitud. También se detectó una región GAGG, similar al lugar de unión de ribosomas, que finaliza siete nucleótidos en sentido 5' al inicio de traducción de AmlC.

### **ORF2-*amlE***

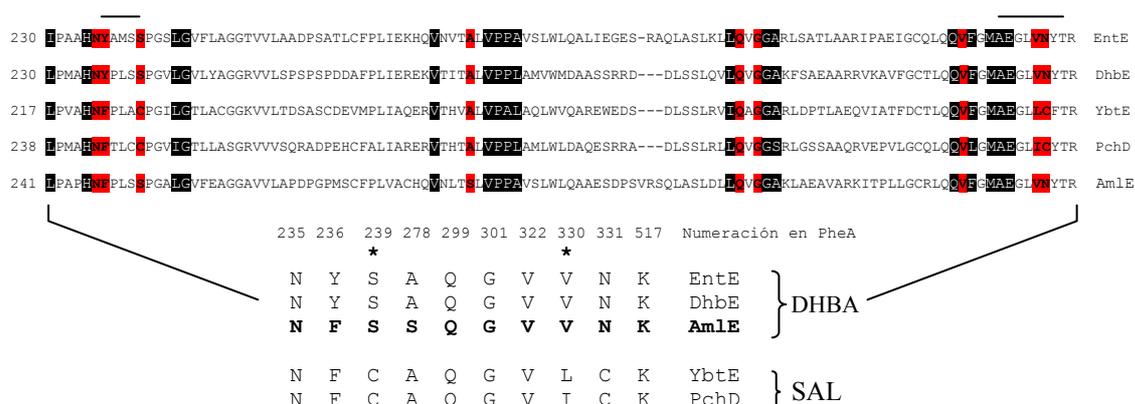
La ORF2 está localizada en dirección 3' de la ORF1; ambas están codificadas por la misma cadena y además tienen los respectivos codones de terminación e iniciación solapados, sugiriendo que pueden estar cotranscritas y traduccionalmente acopladas. Se localizó una secuencia similar a la Shine-Dalgarno, GGAGG, interna a la pauta abierta de lectura *amlC* y que termina 8 nucleótidos en dirección 5' del codón metionina de inicio de la ORF2. La secuencia aminoacídica inferida a partir de la ORF2 se denominó AmIE por mostrar un grado significativo de similitud con el componente E de la enterobactina sintetasa de *E. coli* y con otras enzimas de arilación de péptidos no ribosomales de diferentes microorganismos. Estas enzimas pertenecen a la superfamilia de enzimas formadores de adenilatos (PF00501) y se caracterizan por la presencia de un motivo de unión a AMP (aminoácidos 198-209 de AmIE,

PS00455). Este motivo también es conocido como motivo WalkerA y está presente muchas proteínas de unión a AMP, aunque en el caso de los dominios de adenilación de las SPNR es también denominado subdominio A3, residuos 195-210 de AmIE).

Los enzimas de arilación de péptidos están formados por un dominio de adenilación que cataliza la formación de ariladenilatos (aril-AMP) y se diferencian de los dominios de adenilación formadores de aminoaciladenilatos por la secuencia del subdominio A5, que es “QQVFXMAEGL” en los dominios activadores de grupos aril y “xNxYGPTExx” en los dominios activadores de aminoácidos (May *et al.*, 2002). La proteína AmIE tiene el motivo A5 característico de los enzimas de adenilación de grupos aril (<sup>341</sup>QQVFGMAEGL350) y el resto de subdominios característicos de los dominios de adenilación (A1-A4 y A6-A10) que se han detallado en la tabla 3.4.

La dilucidación de la estructura cristalina de DhbE de *B. subtilis* permitió discriminar los residuos que intervienen en el reconocimiento y selección de los grupos aril. Estos estudios establecieron un método que permite diferenciar, en términos de secuencia primaria, los enzimas que activan DHBA (por ejemplo EntE de *E. coli*) de los enzimas que activan salicilato (por ejemplo YbtE de *Y. pestis*) (May *et al.*, 2002). Figura 3.8.

Brevemente, la posición 239 (según la numeración de PheA, el primer módulo de la gramicidina S sintetasa de *B. brevis*) es una serina en los enzimas activadores de DHBA y una cisteína en los enzimas activadores de salicilato. El primer aminoácido adyacente al dominio A5 es una valina en los enzimas activadores de DHBA y una cisteína en los enzimas activadores de salicilato (May *et al.*, 2002). Según este método, el sustrato activado por la proteína AmIE es probablemente el ácido dihidroxidobenzoico.



**Figura 3.8. Predicción de la especificidad de los dominios de adenilación activadores de grupos aril, basada en la estructura de DhbE.** La región mostrada es un alineamiento parcial de diferentes dominios de adenilación y pertenece a la región entre los motivos núcleo A4 y A5, que comprende los nueve aminoácidos que forman el sitio de unión a sustrato (remarcados en rojo) y los aminoácidos que intervienen en el anclaje estructural (cajas negras). La extracción de éstas nueve posiciones lleva al código no ribosomal para los dominios de activación del 2,3-DHBA y del salicilato, que permite la predicción de la especificidad de sustrato del dominio de adenilación de AmIE. La décima posición no está incluida en la región comprendida entre los subdominios A4 y A5.

### **ORF3-*amlB***

La ORF3 tiene dos potenciales codones de inicio de traducción a una distancia de 16 y 24 nucleótidos del codón final de lectura de la ORF2 y se ha detectado una secuencia de unión a ribosomas, a una distancia de 3 y 11 nucleótidos, respectivamente, en sentido 5' de los dos posibles codones de inicio. La presencia de múltiples codones de inicio potenciales no es extraña en los genes de biosíntesis de sideróforos. La proteína codificada por la ORF3 se designó AmlB por presentar similitud de secuencia con EntB de *E. coli* y con otras isocorismatas bacterianas.

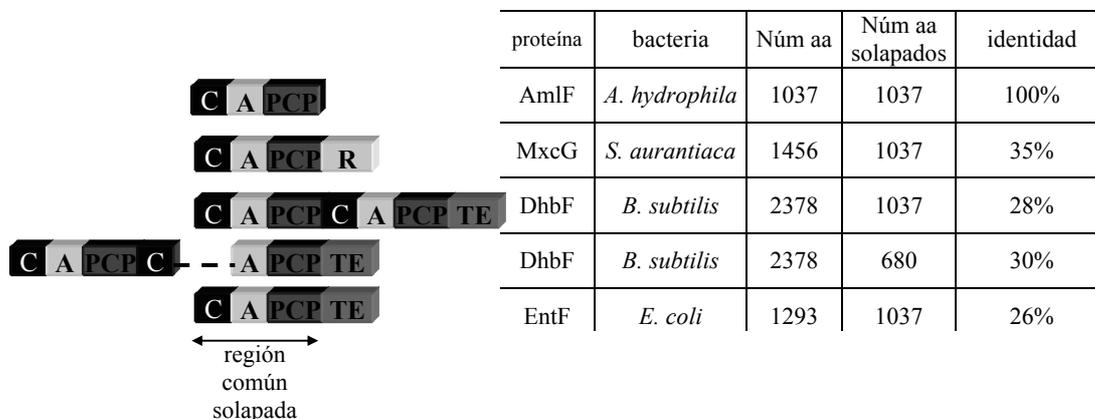
EntB de *E. coli*, es un enzima bifuncional, que además de intervenir en la biosíntesis de 2,3-DHBA con actividad isocorismatasa, interviene en la segunda etapa de biosíntesis de enterobactina con función transportadora de grupos aril (Earhart, 1996). En concordancia, el extremo amino-terminal de AmlB (residuos 24-206) mostró semejanza con los enzimas de la familia isocorismatasa (PF00857) y en el extremo carboxilo-terminal se detectó una región similar a la secuencia consensus de los dominios de tiolación transportadores de grupos aril (AmlB, <sup>244</sup>NLIDYGLDSVR254), tabla 3.6. (May *et al.*, 2001). Las bases de datos PROSITE y PFAM no diferencian entre la naturaleza del sustrato transportado por los dominios de tiolación, y agrupan todos estos dominios con el nombre de dominios transportadores de acil (PS50075, residuos 220-288 de AmlB) o con el nombre de sitio de unión de fosfopanteteinil (PF00550, residuos 222-287 de AmlB).

### **ORF4-*amlF***

La ORF4 se transcribe en la misma cadena que la ORF3 y tienen los respectivos codones de inicio y terminación solapados, insinuando así la presencia de ambos genes en el mismo transcrito. Se detectó una región GGAG, similar a la Shine-Dalgarno, que termina 8 nucleótidos en dirección 5' al codón de inicio de la ORF4.

AmlF presentó un elevado porcentaje de similitud con varios enzimas implicados en la biosíntesis de sideróforos y de antibióticos peptídicos, pero en la mayoría de los casos no se encontró similitud con la totalidad de la secuencia aminoacídica de las diferentes proteínas. Tal y como se muestra en la figura 3.9., se observó que las diferentes proteínas se alineaban con AmlF en función de su composición en dominios catalíticos. El dominio de condensación de AmlF presentó un grado de similitud elevado con dominios de condensación presentes en el extremo amino-terminal de diferentes sintetisas de sideróforos de tipo catecolato (MxcG, primer módulo de Dhbf, EntF).

Todos estos dominios de condensación se encargan de condensar el 2,3-DHBA con diferentes aminoácidos. Probablemente, ésta es la causa de la baja similitud del dominio de condensación de AmlF con el dominio de condensación perteneciente al segundo módulo de DhbF (que se encarga de catalizar el enlace peptídico entre dos aminoácidos).

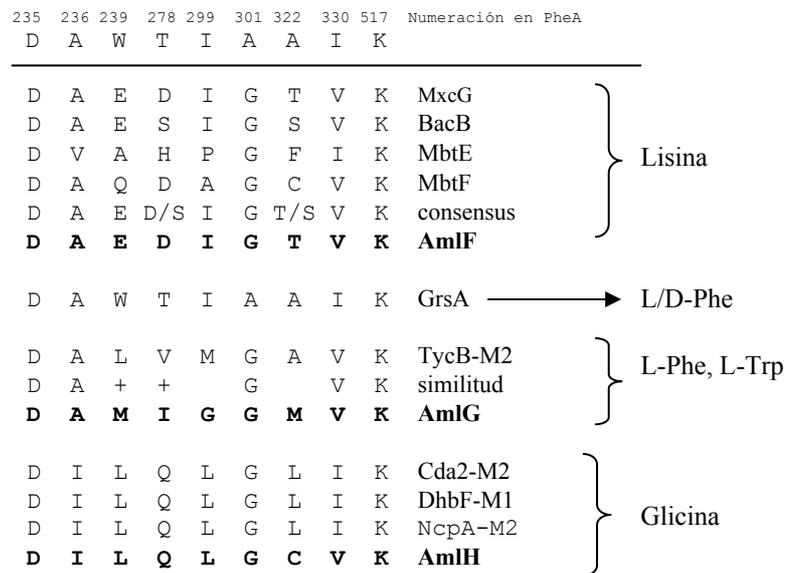


**Figura 3.9. AmlF se alinea con las proteínas más similares de las bases de datos en función de la composición de dominios catalíticos.** A/ AmlF se alinea con los tres primeros dominios del enzima MxcG (número de acceso AAG31130.1). B/ AmlF se alinea con los dominios C-A-PCP del primer módulo de DhbF y C/ con los dominios A, PCP del segundo módulo de DhbF (AAD56240.1). D/ AmlF se alinea con los tres primeros dominios catalíticos de EntF (AAN79148.1).

AmlF es un enzima unimodular compuesto por tres dominios catalíticos: un dominio de condensación de unos 400 aminoácidos del extremo amino-terminal (PF00668, aminoácidos 2-293), seguido por un dominio de adenilación de unos 450 aminoácidos con una región interna de unión a AMP equivalente al núcleo A3 del dominio de adenilación (PS00455, <sup>591</sup>LmfTSGSTGIPK602; PFAM00501 aminoácidos 475-878), y por un dominio transportador del subgrupo de dominios transportadores precedentes a un dominio de condensación (PS50075, aminoácidos 956-1023; PF00550 aminoácidos 958-1022). De nuevo, la búsqueda manual nos aportó más información que la búsqueda en PROSITE o PFAM, porque nos reveló que el dominio de transporte de AmlF precede a otro dominio de condensación (el de la proteína codificada por la ORF6, AmlG). Los resultados de la búsqueda manual de dominios catalíticos se muestran en las tablas 3.5., 3.6. y 3.8.

Se procedió a determinar la especificidad de selección de sustrato del dominio de adenilación de AmlF según el método de Challis (Challis *et al.*, 2000). El código no ribosomal de AmlF presenta un elevado grado de similitud con la secuencia consensus de los residuos aminoacídicos que forman el sitio de unión específico para la lisina, presente en diferentes dominios de adenilación que seleccionan y activan este aminoácido (May *et al.*, 2001; Silakowski *et al.*, 2000). (Figura 3.10.)

GrsA **FDASVW**EMFMALLTGASLYIILKDTINDVFKFEQYINQK-EITVITLPPYTVVHLDPE-----RILS-IQT-LITAGSATSPSLVNKWKKEK-----VTYINAYGPTETTCAT  
MxcG **FDASV**EEIFLTLTGAGAKLVLRTTEMLQSVSRLLDACAHEH-GITVLDLPTAFWHELAYSVSTGAARLPSSIRL-VIIGGEAALPERVARWRSVAVS-PEVLLLNITYGPTTEATVVAT  
BacB **FD**AFSEEVYPILACSGRLVIRSKVSDLNIDELVKITIGKY-RVTLVSCPLLNEIDKNQ-----HLTFHPQMKFISGGDVLKFEYVENI IKG-----ADVYNSYGPTEATVCAT  
MbtE **FDV**SI**A**EIFGTACGARMVPIPRGGGLTDIGYLTALLRDE-GITAMHFVPSLLGLFLSLPGVS--QWRT-LQR-VP**I**GGEP-LPGEVADKFHAT--FDALLHN**F**YGPTEATVINAS  
MbtF **FD**A**A**WQPLVALLDGHAVHIVDDHRQR-DAGALVEAIDRF-GLDMIDTTPSMFAQLHNAG-----LLDRAPLAVL**A**LGGEALGAATWRMIQNCARTAMTAFNCYGPTEETTVEAV  
AmlF **FD**ASIEEVFATLSAGATLVLRDALLESMAAFAAGVEQM-EITHLDLPTAFWNEWVALTAGQAHIPASLAT-VIIGGEAVYPEQLAQWQRQGR-HDVRLFN**T**YGPTEETT**V**VVT  
TycB **FD**A**F**ALTFFTLIVSGSTVVLMPEAKDPIALRNLI**A**AW-ECSYV**V**FVPSMFQALLECSTP--ADIRS-IQA-V**M**LGGEKLS-P-KLVQLCKAMH-PQMSVMN**A**YGPTESSV**M**AT  
AmlG **FD**AGN**M**TTLLPLYCGAALHFGEPEV---AITA**A**IN-C-GASH**M**ILPTALLANLPP-T----DLGS-LRA-IG**F**GGEACPPSSILVERWGER-----VALY**N**M**Y**GPTECT**V**TAL  
Cda2 **FD**IAGLEIFLPLLHGAVLVLDADEETARDPHALLHRVSAS-GIT**M**QATPSLWQVAAVAGD---ELAG-VR--V**L**VGGEA-LPSELARALTDRA-RSVT--N**L**YGPTEATI**W**AT  
DhbF **FD**ISALELYLPLISGAQIVIAKKETIREPQAL**A**QMIENF-DIN**I**MQATPTLWHALVTSEPE---KLRG-LR--V**L**VGGEA-LPSGLLQELQDLH-CSVT--N**L**YGPTE**T**I**W**SA  
AmlH **FD**ISLLEMLGPLWGGGRLTVAGGEHNDPLGMVALLEADPSIN**F**LQATPACWRMLLKAG-----WQGRERL**T**AL**C**GGEALDLSGLAEQLCSR---TQRLW**N**CYGPTEAT**V**WSL



**Figura 3.10. Predicción de la especificidad de los dominios de adenilación activadores de aminoácidos basada en la estructura de PheA.** La región mostrada es un alineamiento parcial de diferentes dominios de adenilación y pertenece a la región entre los motivos núcleo A4 y A5, que comprende ocho de los nueve aminoácidos que forman el sitio de unión a sustrato (remarcados en negrita) y los aminoácidos que intervienen en el anclaje estructural (no señalados en el esquema). La extracción de estas nueve posiciones lleva al código no ribosomal para los dominios de activación de los diferentes aminoácidos, que permite la predicción de la especificidad de sustrato de los dominios de adenilación: AmlF (lisina), AmlG (L-fenilalanina o L-triptófano) y AmlH (glicina). El aminoácido número nueve del código no ribosomal no se ha representado en el esquema por ser el único externo a la región alineada. El número de aminoácidos que forman el sitio depende del método empleado. MxcG, mixoquelina sintetasa *S. aurantiaca*; Acmb, actinomicina sintetasa II *S. chrysomallus*; MbtE/F, micobactina sintetasa *M. tuberculosis*; GrsA, gramicidina S sintetasa *B. brevis*; TycB-M2, segundo módulo de la tirocidina sintetasa, *B. brevis*; Cda2-M2, segundo módulo de la sintetasa de péptidos *S. coelicolor*; Dhbf-M1, primer módulo de la bacilibactina sintetasa, *B. subtilis*; NcpA-M2, segundo módulo de la nostociclopéptido sintetasa, *Nostoc* spp.

### ORF5-amlA

La ORF5 se transcribe en la misma cadena que la ORF4, la corta distancia intergénica (21 nucleótidos) y la ausencia de posibles estructuras de finalización de la transcripción sugiere que ambas ORFs están presentes en la misma unidad transcripcional. Se identificó un posible sitio de unión a ribosomas, AAGGAG, que finaliza nueve nucleótidos en sentido 5' del codón de inicio de la ORF5. Las proteínas de función conocida más similares a la secuencia

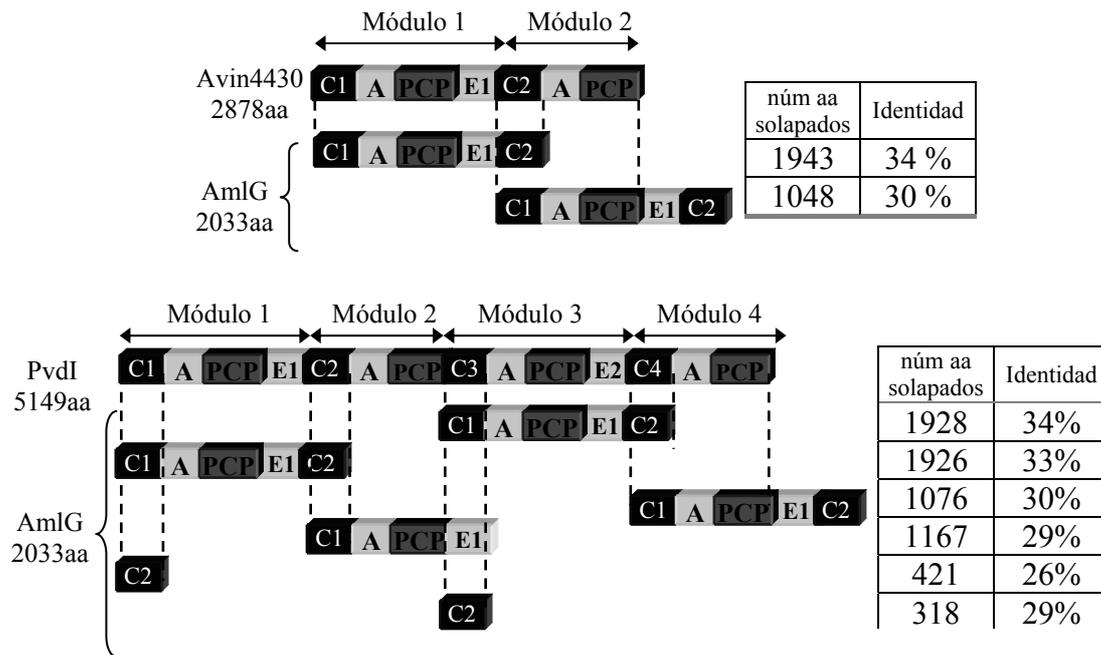
aminoacídica deducida a partir de la ORF5 son, EntA de *E. coli* (65% similitud), su homólogo en diferentes entéricas y MxcC de *S. aurantiaca* (65% similitud). En *E. coli*, EntA interviene en la biosíntesis del precursor catecolato de la enterobactina, con actividad 2,3-dihidro-2,3-dihidroxidobenzoato deshidrogenasa (Earhart, 1996). La búsqueda en las bases de datos de Prosite reveló que los aminoácidos 132-160 de AmlA concuerdan con el patrón de las deshidrogenasas de alcoholes de cadena corta (PS00106). Estos datos sugieren que AmlA es también un miembro de esta familia.

### ORF6-amlG

La ORF6 empieza a una distancia de 117 nucleótidos en sentido 3' de la pauta anterior y en la misma cadena. No se detectó ningún terminador Rho-independiente ni ninguna región promotora en la región intergénica precedente a la ORF6. Se detectó una región similar al sitio de unión de ribosomas, AAGGA, que termina 8 nucleótidos en sentido 5' del codón valina de inicio. La proteína de 2033 aminoácidos codificada por la ORF6 mostró similitud en las bases de datos con diferentes sintetasas de péptidos no ribosomales, muchas de ellas encargadas de ensamblar el esqueleto peptídico de sideróforos de tipo pioverdina, sintetizados por *Pseudomonas* spp. Se observó una relación entre la composición de dominios catalíticos y el alineamiento de AmlG con las proteínas más similares de las bases de datos (Figura 3.11.). Se detectaron en la estructura primaria de AmlG seis dominios catalíticos característicos de las SPNR: C1-A-PCP-E-C2-PCP (Tablas 3.5.,3.6.,3.7. y 3.8.). La tabla 3.9. muestra que la detección manual de las regiones núcleo es el método más adecuado para la identificación de los dominios catalíticos de las SPNR.

**Tabla 3.9. Comparación de los diferentes métodos empleados para la determinación de los dominios catalíticos de AmlG.**

Búsqueda de las regiones núcleo manualmente	PFAM	PROSITE
Dominio de condensación (aa 1-500)	PF00668 dominio de condensación (aa 18-322)	No detectado
Dominio de adenilación (aa 500-990)	PF00501 Enzima de unión a AMP (aa 508-898)	PS00455 dominio de unión a ATP (aa 630-641)
Dominio de tiolación precedente a un dominio de epimerización. (aa 995-1006).	PF00550 sitio de unión de grupo fosfopanteteinil. (aa 977-1039)	PS50075 dominio de proteína transportadora de acil (aa 971-1040). PS00012 Sitio de unión de fosfopanteteinil. (aa 999-1014).
Dominio de epimerización (aa 1050-1510)	PF00668 dominio de condensación (aa 1054-1345)	No detectado
Dominio de condensación (aa 1510-1900)	PF00668 dominio de condensación (aa 1504-1804)	No detectado
Dominio de tiolación (aa 1981-1986)	No detectado	PS50075 dominio de proteína transportadora de acil (aa 1980-2025). (posible falso positivo) PS00012 Sitio de unión de fosfopanteteinil. (aa 1980-1995).



**Figura 3.11. Correlación entre la composición de dominios catalíticos y las regiones de alineamiento de AmlG con las proteínas más similares de las bases de datos.** La proteína AmlG se alineó con dos regiones diferentes de una SPNR de *A. vinelandii* (número de acceso ZP\_00092688.1). El primer alineamiento se produjo entre casi la totalidad de AmlG y los dominios C-A-PCP-E-C de *A. vin* 4430. El segundo alineamiento se produjo entre los tres primeros dominios de AmlG y el segundo módulo de *A. vin* 4430.

La proteína AmlG también mostró similitud de secuencia con diferentes regiones del enzima tetramodular PvdI de *P. aeruginosa* (número de acceso F83345). En la figura se muestran los diferentes dominios catalíticos de PvdI y las regiones correspondientes a los diferentes alineamientos entre PvdI y AmlG. Es importante destacar que el dominio C1 de AmlG se alinea preferentemente con aquellos dominios de condensación de PvdI que no están implicados en la condensación de un aminoácido epimerizado (C1 y C3 de PvdI).

Lamentablemente, el complejo multienzimático de *A. vinelandii* responsable de la biosíntesis de sideróforos no ha sido caracterizado todavía con profundidad. Se desconoce la especificidad de sustrato de cada módulo y no se ha propuesto siquiera ninguna ruta de biosíntesis. En el caso de la biosíntesis de pioverdina en *P. aeruginosa* mucho queda también por hacer. PvdI es una SPNR tetramodular, los diferentes módulos de PvdI se encargan de activar secuencialmente una Ser (A1, dominio de adenilación del módulo 1), Arg (A2), Serina (A3) y N<sup>5</sup>-formil-N<sup>5</sup>-hidroxiornitina (A4). Antes de la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos, las L-serinas son epimerizadas por los dominios de epimerización E1 (módulo 1) y E2 (módulo 3) (Ravel y Cornelis, 2003). El mutante *pvdI* de *P. aeruginosa* pierde la capacidad de sintetizar pioverdina y se mostró atenuado en su virulencia (Lehoux, 2000).

Tal y como se muestra en la figura 3.10., el código no ribosomal del dominio de adenilación de AmlG mostró un 50% de identidad y un 75% de similitud con el código no ribosomal del dominio de adenilación del segundo módulo de la sintetasa de tirocidina TycB de *B. brevis*, que selecciona y activa indistintamente una L-Phe o L-Trp (Mootz y Marahiel, 1997).

### **ORF7-*amlH***

La ORF7 se transcribe en la misma cadena que la ORF6 y es destacable el solapamiento del inicio de traducción de la ORF7 y el codón de final de lectura de la ORF6. Se detectó una putativa secuencia de unión a ribosomas, AGGAG, que termina seis nucleótidos en sentido 5' del inicio de traducción de la ORF7. El producto de traducción de la ORF7 mostró similitud con la proteína NcpA de *Nostoc* spp, una SPNR trimodular (C-A1-PCP-C-A2-PCP-C-A3-PCP-E), que interviene en la biosíntesis de un heptapéptido llamado nostociclo péptido, catalizando el ensamblaje de la unidad tripéptido Tyr-Gly-DGln. AmlH mostró similitud únicamente con las regiones correspondientes a los dominios de adenilación de NcpA (54% similitud con NcpA2 (segundo dominio de adenilación de NcpA), 49% de similitud con NcpA3 y 47% de similitud con NcpA1) (Becker *et al.*, 2004)

La búsqueda de dominios conservados mostró que la proteína codificada por la ORF7 tiene todas las regiones núcleo características de los dominios de adenilación de las SPNR. El dominio de adenilación fue el único dominio catalítico identificado en AmlH. (Tabla 3.5.)

El código no ribosomal de AmlH mostró un 75% de identidad y un 85% de similitud con el código de diferentes dominios de adenilación con especificidad para la glicina (entre ellos, el dominio de adenilación del primer módulo del enzima DhbF implicado en la biosíntesis de bacilibactina (un trímero cíclico de DHB-Gly-Thr), (May *et al.*, 2001); el dominio de adenilación del segundo módulo de la sintetasa de péptidos Cda2 de *S. coelicolor* y con el segundo dominio de adenilación de NcpA. En la figura 3.10. se muestran los códigos no ribosomales de los dominios de adenilación anteriormente mencionados.

### **ORF8-*fapB***

En sentido 3' de *amlH* hay una repetición invertida que podría formar un terminador Rho-independiente, seguido de la ORF8 transcrita en sentido contrario a *amlH*. Se detectó una secuencia GCAAATGACAATTTTATC, con un 73,7% de similitud a la caja Fur de *E. coli*, localizada entre las posiciones -95 y -77 respecto al codón de inicio de traducción de la ORF8. También se detectó un sitio de unión de ribosomas, AAGGA, que finaliza 8 nucleótidos antes del inicio de traducción de la ORF8. Estos datos parecen indicar que la ORF8 forma parte de una unidad transcripcional monocistrónica regulada por Fur. Dicha ORF fue denominada *fapB* por presentar similitud en las bases de datos con el componente periplasmático del sistema de transporte de sideróforos de diferentes bacterias. Las proteínas de función conocida más similares a FapB son la lipoproteína SirA de *S. aureus* (48% de similitud), probable transportadora del sideróforo staphilobactina (Dale *et al.*, 2004), CbrA de *E. crhysanthemi* (45% de similitud) que es el componente periplasmático transportador del sideróforo

achromobactina y FecB de *E. coli* (45% de similitud), transportadora de dicitrato férrico (Staudenmaier *et al.*, 1989).

Se detectó un sitio de corte para la peptidasa señal I entre los aminoácidos 23 y 24 del producto de traducción de *fapB*, que liberaría un péptido señal formado por los aminoácidos 1-23; la localización más probable de FapB es el periplasma. FapB presentó similitud con la familia de proteínas periplasmáticas de unión a ferri-sideróforos, incluyendo el dominio conservado en esta familia de proteínas (PF01497, aminoácidos 44-280). Además, FapB contiene la secuencia señal compuesta por tres aminoácidos descrita para las proteínas de unión a complejos férricos (FapB, 97 NPNLERLIDLEPDLIL 112) (Tam y Saier, 1993).

#### **ORF9-*amlD***

La ORF9 se transcribe en sentido contrario a *fapB*. En la región 5' de la ORF9 se detectó una putativa región promotora y una secuencia operadora TCAAATGATAAAAATTGTC situada entre las posiciones -88 y -70 respecto al codón de inicio de traducción de la ORF9 y con un 68.4% de similitud a la caja Fur de *E. coli*. Se detectó un putativo sitio de unión a ribosomas a 11 nucleótidos en sentido 5' de la metionina de inicio de la ORF9, cuyo producto presentó similitud con fosfopanteteinil transferasas de diferentes sistemas de biosíntesis de sideróforos (aminoácidos 129-192 de AmlD, PF01648). Dichos enzimas catalizan la transferencia de un grupo fosfopanteteinil a una serina conservada presente en los dominios de tiolación (tabla 3.6); una modificación postraducciona común en el proceso de biosíntesis de muchos péptidos no ribosomales.

A 27 nucleótidos en sentido 3' del codón final de lectura se detectó un putativo terminador Rho-independiente. Estos datos sugieren que AmlD se transcribe a partir de un operón monocistrónico cuya expresión está regulada por Fur.

#### **ORF10-*fapC***

La ORF10 se transcribe en sentido contrario a *amlD* y codifica para una proteína denominada FapC, por presentar similitud con diferentes componentes ATPásicos de transportadores del tipo ABC, como por ejemplo FecE de *P. luminescens* (determinado a partir de secuenciación genómica), PvuE de *V. parahaemolyticus* y YusB de *B. subtilis*.

Fap C contiene un motivo WalkerA (58 GPNGGGKS 65, PS00017) y un motivo WalkerB (182 IILLDEPT 189), ambos conservados en las proteínas de unión a nucleótidos, indicando que probablemente FapC es el componente que une y hidroliza ATP, con el fin de aportar la energía necesaria para el transporte a través de la membrana interna (Walker *et al.*, 1982). Además, FapC también contiene la secuencia señal característica de la familia de transportadores ABC dependientes (162 LSGGQAQRVWLAMVL 176, PS00211).

FapC tiene en su globalidad un carácter hidrofílico y no se detectaron franjas hidrofóbicas suficientemente largas como para atravesar la bicapa lipídica. Estos datos y la aparente carencia de secuencias señal de exportación, sugieren que FapC es una proteína citoplasmática soluble. Aunque, de todos modos, las evidencias experimentales con otros sistemas ABC transportadores sugieren que los componentes citoplasmáticos están asociados con la membrana interna y que, a pesar de su generalizado carácter hidrofílico, forman complejos con los componentes permeasas del sistema de transporte ABC (Boos y Lucht, 1996).

### **OFF11-*fapG***

La ORF 11 se transcribe en la misma cadena que la ORF10 y la distancia intergénica entre ambas es de 17 nucleótidos. El producto de traducción de la ORF11 fue denominado FapG por su similitud en las bases de datos con diferentes componentes permeasa de diferentes transportadores ABC dependientes. En concreto, las proteínas más similares fueron obtenidas a partir de los proyectos de secuenciación de *T. fusca* y *S. coelicolor*. FapG también mostró similitud con FepG de *Y. enterocolitica*, el componente permeasa de un transportador de sideróforos de tipo catecolato.

El perfil de hidropaticidad de FapG indica que es una proteína extremadamente hidrofóbica, ubicada en la membrana interna mediante ocho regiones transmembrana (aminoácidos 35-51, 88-104, 124-140, 145-161, 170-186, 216-232, 267-283, 299-315). Se detectó una región muy conservada entre los componentes permeasa de los transportadores ABC, denominada bucle EAA (aminoácidos 237-266 de FapG). Se piensa que dicha región, presuntamente localizada en el espacio citoplasmático, es el lugar de interacción entre el componente permeasa y el componente hidrolasa del transportador (Boos y Lucht, 1996). Staudenmaier identificó siete dominios de los componentes permeasa con una especialmente elevada conservación a nivel de secuencia aminoacídica. (Staudenmaier *et al.*, 1989) FapG carece del dominio conservado número 7.

### **ORF12-*fapD***

En sentido 5' de *fapD* se detectó un putativo terminador Rho-independiente pero no se identificó ningún promotor entre la secuencia delimitada por el presunto terminador y el presunto codón de inicio de la ORF12. Se identificó una secuencia similar al sitio de unión de ribosomas, TAAGGAG, que finaliza ocho nucleótidos en sentido 5' del codón valina de inicio de *fapD*. La ORF12 mostró similitud en las bases de datos con putativos componentes permeasa de transportadores ABC de *C. glutamicum* y *S. coelicolor*, además de un 48% de similitud con FepD de *Y. enterocolitica*.

Igual que FapG, FapD cumple con las características de las permeasas de membrana citoplasmática. Dichas proteínas tienen un notable grado de similitud entre ellas (26% identidad, 44% similitud entre FapD y FapG), puntos isoeléctricos muy bajos y un índice de hidrofobicidad extremadamente alto (tabla 3.3.). Se detectaron ocho posibles regiones en la secuencia primaria de FapD que podrían atravesar la membrana citoplasmática (aa 65-81, 93-109, 126-142, 148-164, 194-210, 238-254, 283-299, 310-326). Todas estas características son comunes entre los componentes permeasa de los transportadores de tipo ABC, formados por una o dos proteínas integrales de membrana interna. FapD contiene las siete regiones conservadas propuestas por Staudenmaier y también se detectó una región con similitud al bucle EAA (aminoácidos 205-234 de FapD).

### **ORF13-*fapA***

La ORF13 codifica para una proteína semejante a CirA de *E. coli* (32% identidad, 50% similitud) y otras entéricas. CirA es un receptor de ferri-sideróforos de tipo catecolato ubicado en la membrana externa (Griggs *et al.*, 1987). No se detectó ninguna secuencia promotora delante de la ORF13, pero sí se identificó una secuencia similar al sitio de unión de ribosomas, GGAG, que finaliza nueve nucleótidos en sentido 5' al putativo codón metionina de inicio. La ORF *fapA* codifica para una proteína de 658 aminoácidos con un presunto péptido señal compuesto por 28 aminoácidos del extremo amino-terminal. La proteína madura tendría un peso molecular de 69'2 y un punto isoeléctrico de 5'23. El perfil de hidropaticidad global indica que la proteína es bastante hidrofílica y carente de los segmentos transmembrana característicos de las proteínas de membrana citoplasmática.

Detectamos una región similar a la secuencia consenso (D/E)TxxVxA(A/S), establecida para la caja TonB (aminoácidos 35-42 de la proteína no procesada, ETMVVTAT) (Lundrigan y Kadner, 1986). La búsqueda en las bases de datos PROSITE reveló un patrón característico de los receptores TonB-dependientes (PS00430, aminoácidos 1-42 de FapA) y la base de datos PFAM identificó a FapA como perteneciente a la familia de receptores TonB-dependientes (aminoácidos 49-658, PF00593).

Diferentes evidencias sugieren que CirA de *E. coli* es un transportador de baja especificidad; se ha demostrado que es capaz de transportar un amplio rango de antibióticos  $\beta$ -lactámicos conjugados con grupos catecolato, además de transportar el sideróforo amonabactina y productos de degradación de la enterobactina (2,3-DHBA, dihidroxidobenzoilserina). (Nikaido y Rosenberg, 1990; Hantke, 1990; Rabsch y Winkelmann, 1991; Stintzi *et al.*, 2000).

### ORF14-*mrp*

Se detectaron dos regiones solapadas, ambas internas al posible promotor de *mrp* y ambas con un 63,2% de similitud con la caja Fur de *E. coli*; la primera situada entre las posiciones -82 y -64 respecto al codón de inicio de traducción de la ORF14 y de secuencia ACAATAAAAATGATTACC y la segunda situada entre las posiciones -76 y -58 respecto a la metionina de inicio y de secuencia AAAAATGATTACCATTTGT.

La proteína codificada por la ORF14 se denominó Mrp por presentar similitud con el producto del gen F106, una putativa proteína de resistencia a múltiples agentes antibióticos de *A. hydrophila* (Zhang *et al.*, 2000). Las proteínas de función conocida más estrechamente relacionadas con Mrp son AvxA o CbsX de *A. vinelandii* (Page *et al.*, 2003) y MxcK de *S. aurantiaca* (Silakowski *et al.*, 2000). El mutante de *A. vinelandii* carente de AvxA pierde la capacidad de exportar protoquelina y únicamente excreta compuestos intermediarios de la biosíntesis de protoquelina: que son la azotoquelina y la aminoquelina (Page *et al.*, 2003). Los sideróforos producidos por *S. aurantiaca*, *A. vinelandii* y *A. hydrophila* (mixoquelina, protoquelina y amonabactina, respectivamente) tienen como característica estructural común la presencia de grupos catecolato unidos a lisina, de modo que parece razonable que sean exportados por proteínas similares.

Con un punto isoelectrico y un grado de hidrofobicidad bastante alto, se cree que la proteína codificada por *mrp* atraviesa la membrana interna nueve veces (aa 49-65, 78-94, 103-119, 140-156, 165-181, 209-225, 271-287, 291-307, 371-387). La proteína Mrp tiene los seis motivos característicos de los transportadores MFS (del inglés *Major Facilitator Superfamily*).

**Tabla 3.10 Motivos característico de los transportadores MFS.**

	Motivo A xxxGxLADRxGRKxxxL	Motivo B LxxxRxxQGxGAA	Motivo D2 LGxxxxxPVxP	Motivo A2 GxLADRxGRKxxxL	Motivo C xGxxxGPxxGGxL	Motivo G GxxxGPL
F106	75 LLCARYIDRFDRKQVAL	LEFFTRLLAGIFAG	LDFMMIMPLGP	GYWMDRVGPMRITM	LSAIAGVPLGLEL	TDVDGHL
Mrp	62 LIAAPWLDVRNRPALL	LLMLFILSGCVAG	GSMVMPLGP	GGWIDQGRALAIL	LAAIIVVPIALVL	SDNTGAL
CbsX	76 LFTVPRLDRFDRKALL	LLLGRAVAGLCAA	LDFMLVPLGP	GRLGDRHGHWLPGV	IATIAGIPLALEL	GGGDGPL
MxcK	65 LLGVLWLDRFDRKRTLL	LLVARTLAGACAG	MDFMIVMPLGP	GRMTDRHGPRVLA	LSAVVGVPLGLGL	TATGGAL

F106 (número de acceso AF146029); Mrp (ORF 14 de este estudio); CbsX o AvxA (AAN04042.1); MxcK (AAG31134.1).

### ORF15-*exc*

La ORF15 se transcribe en sentido contrario a la pauta anterior, se detectó una región promotora RpoD dependiente en la región 5' a la metionina de inicio y una región terminadora de la transcripción en la región 3' de la ORF15. Las proteínas más similares en las bases de datos son proteínas de *P. aeruginosa* y *A. vinelandii* de función desconocida. El producto de

traducción de la ORF15 se denominó *exc* por presentar un dominio conservado entre las proteínas que forman parte de los sistemas de secreción de tipo II y de tipo III (PF00263).

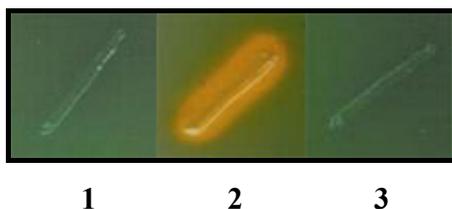
En resumen, las actividades enzimáticas propuestas mediante comparación de secuencias para la agrupación de genes secuenciada, coinciden con las requeridas para la biosíntesis de un sideróforo de tipo catecolato (genes *aml*) y para un sistema de transporte (genes *fap*) y un posible componente del sistema de secreción (gen *mrp*).

Pero es importante tener en mente que la homología sugiere, pero no proporciona, una prueba definitiva de una actividad bioquímica en particular. En este contexto, consideramos oportuno demostrar la función del producto de algunos de los genes de la agrupación presentada, mediante complementación interespecífica de mutantes de *E. coli* deficientes en algunos de los componentes que median la biosíntesis o el transporte de la enterobactina.

### 3.12 Complementación del mutante de *E. coli* AN346.

Con el fin de asignar una función concreta del producto del gen *amlA*, en la ruta de biosíntesis del sideróforo de la cepa AH-3, decidimos complementar el mutante de *E. coli* AN346, deficiente en el enzima EntA, con el gen *amlA* clonado a pGEMT.

Así pues, amplificamos el gen *amlA* con los oligonucleótidos 768Cs7 y 768CsD a una temperatura de hibridación cebador/ADN de 56°C y un tiempo de extensión de 80 segundos. El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEMT y se purificó el plásmido de varios transformantes para seleccionar tras una digestión con *ApaI*, el recombinante con el gen *amlA* bajo el control del promotor del gen *lacZ*. Dicha construcción se transfirió por electroporación a la cepa de *E. coli* AN346 y se seleccionaron los transformantes en placas de LB suplementadas con ampicilina. Se seleccionó un transformante al azar, se secuenció el inserto con los cebadores Sp6 y M13For para descartar la introducción de mutaciones durante la reacción de amplificación y se procedió al estudio fenotípico de dicho transformante. Observamos una clara restitución de la capacidad de producción de sideróforos del mutante AN346 con el gen *amlA* clonado a pGEMT, a diferencia del mutante transformado únicamente con el vector de clonación. Así pues, podemos afirmar que el gen *amlA* codifica para una proteína que complementa funcionalmente la proteína EntA de *E. coli*, una 2,3-dihidro-2,3-dihidroxidobenzoato deshidrogenasa.

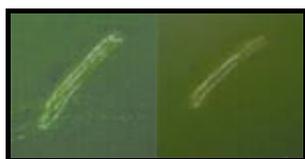


**Figura 3.12.** Test de CAS. **1,** *E. coli* AN346 ; **2,** *E. coli* AN346 con pGEMT-AmlA ; **3,** *E. coli* AN346 con pGEM-T.

### 3.13. Complementación del mutante de *E. coli* AN117

La cepa de *E. coli* AN117 no secreta enterobactina debido a la inactivación del gen *entF* por la inserción de un elemento de transposición y en consecuencia no mostró niveles detectables de sideróforos mediante el test de CAS. Los estudios de complementación llevados a cabo por otros grupos de investigación, demostraron que la inserción del elemento de transposición en el gen *entF* no tenía efectos polares sobre la expresión del siguiente gen en sentido 3' (Schmitt y Payne, 1988).

Así pues, se transfirió el plásmido pCOS-SID/1 a la cepa AN117 mediante electroporación y después de seleccionar los transformantes tetraciclina resistentes se procedió a la purificación del ADN plasmídico y posterior análisis de restricción para comprobar la presencia de un plásmido con el inserto esperado. Ninguno de los transformantes seleccionados recuperó la capacidad de secretar concentraciones apreciables de sideróforos por el test de CAS.



1 2

**Figura 3.13.** Test de CAS. 1, *E. coli* AN117; 2, *E. coli* AN117 con pCOS-SID/1.

### 3.14. Complementación del mutante de *E. coli* DK214

Se intentó complementar el mutante de *E. coli* DK214, deficiente para la proteína FepB, con el sistema de transporte de la cepa AH-3, para valorar si los componentes de dicho sistema de transporte pueden mediar la internalización de la enterobactina sobreproducida en dicho mutante. El fenotipo de complementación se tendría que evidenciar en el test de CAS con una disminución de los niveles de enterobactina producidos por dicho mutante, como consecuencia de la restauración de la capacidad de utilizar el hierro de la ferri-enterobactina.

Escogimos el plásmido pCOS-SID/8 porque, a pesar de no codificar para el gen *fapB*, no codificaba tampoco para ninguna de las proteínas de la ruta de biosíntesis de sideróforos de la cepa AH-3 que pudieran interferir en el entorno de *E. coli*, biosintetizando un sideróforo híbrido no internalizable por la propia bacteria e interfiriendo en la valoración del fenotipo de complementación.

Se procedió a transferir los plásmidos pCOS-SID/8 y la construcción pACYC-FapB, a la cepa *E. coli* DK214 mediante electroporación. Se seleccionaron los transformantes resistentes al cloramfenicol y a la tetraciclina y se aseguró mediante purificación de ADN plasmídico y restricción con *SaI*I la presencia de ambos plásmidos no deleccionados.

Finalmente, se examinó el fenotipo de los transformantes en placas de CAS agar y se observó la presencia de un halo anaranjado del mismo tamaño que el mutante *fepB* de *E. coli*, evidencia indicativa de un fenotipo de no complementación. No se muestran los resultados.

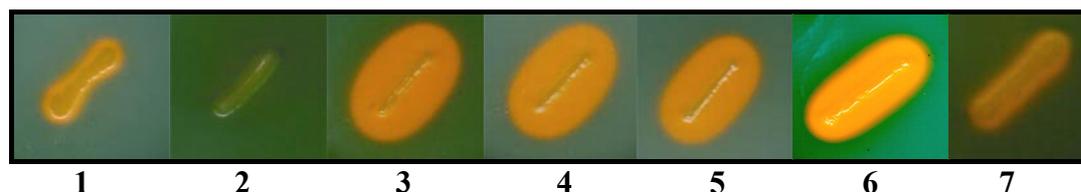
Al transferir todos los componentes del sistema de transporte del sideróforo de la cepa AH-3, conseguimos excluir la posibilidad de que el fenotipo de no complementación fuera debido a la incapacidad de la proteína FapB de la cepa AH-3, de formar los contactos proteína-proteína adecuados con las proteínas FepDGC de *E. coli*. Las evidencias experimentales obtenidas no nos permitieron plantear afirmaciones irrevocables. El fenotipo de no complementación podría ser debido a la diferente especificidad de transporte de ambos sistemas o podría ser consecuencia de la incapacidad de *E. coli* de ensamblar correctamente el complejo de proteínas foráneas.

### **3.15. Construcción y determinación de algunas características fenotípicas de los mutantes de diversos genes de la agrupación de sideróforos de la cepa AH-3**

Se construyeron mutantes mediante mutagénesis dirigida en los genes *amlA*, *amlH*, *fapB*, *fapC*, *mrp* y *exc* (ver apartado 2.13.13.2 de Material y Métodos). Estas mutaciones eran debidas a la inserción de un plásmido suicida en el cromosoma bacteriano, mediante un proceso de recombinación en un punto. En todos los casos se ratificó la presencia del plásmido suicida en el locus deseado mediante la técnica de transferencia de Southern-blot. Algunas de estas inserciones podrían tener efectos polares sobre la expresión del resto de los genes de la agrupación génica. Este aspecto será tratado específicamente para cada mutante en el apartado de discusión de este capítulo.

#### **3.15.1 Determinación de la capacidad de los diferentes mutantes de biosintetizar sideróforos mediante el test de CAS.**

En la bibliografía hay innumerables estudios que han utilizado el test de CAS desarrollado por Schwyn y Neilands para la detección de los sistemas de captación de hierro de elevada afinidad. El test de CAS, además de ser un método rápido y sencillo, permite diferenciar entre los mutantes de biosíntesis y transporte de sideróforos, en base al tamaño del halo anaranjado alrededor de las colonias.



**Figura 3.14.** Test de CAS de diferentes mutantes de la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3. **1,** *A. hydrophila* AH-3; **2,** AH-1789 (*amlA*); **3,** AH-1790 (*amlH*); **4,** AH-1791 (*fapB*); **5,** AH-1792 (*fapC*); **6,** AH-1793 (*mrp*); **7,** AH-1794 (*exc*).

Tal y como se puede observar en estas fotografías (figura 3.14.), la mayoría de mutaciones produjeron un aumento de los niveles de sideróforos presentes en el medio extracelular, que se detectaron por el aumento del halo anaranjado. El mutante *amlA* no produjo niveles de sideróforos detectables, y sorprendentemente el mutante *amlH* presentó un fenotipo sobreproductor de sideróforos. Los mutantes *fapB* y *fapC*, deficientes en la producción del componente periplasmático y citoplasmático, respectivamente, del sistema de transporte de sideróforos, presentaron un aumento evidente de los niveles de sideróforos en el exterior celular. El mutante *mrp* presentó un fenotipo sobreproductor de sideróforos y no se detectaron alteraciones en la producción y secreción de sideróforos del mutante *exc*.

### **3.15.2. Determinación de la presencia sideróforos de tipo catecolato en el sobrenadante de los diferentes mutantes mediante el Test de Arnou**

Con el fin de determinar la presencia de sideróforos con grupos catecolato en el medio de cultivo se realizó un test de Arnou a partir de los sobrenadantes de los diferentes mutantes crecidos en condiciones de limitación de hierro. En esta ocasión dichos cultivos fueron obtenidos adicionando el agente quelante dipiridil al medio mínimo Davis. Todos los mutantes, a excepción del mutante *amlA*, dieron un resultado positivo en el test de Arnou. Estos resultados se hallan detallados en la tabla 3.14., con la intención de sintetizar las características fenotípicas de los mutantes analizados en este estudio.

### **3.15.3. Determinación de la capacidad de crecimiento en presencia del agente quelante dipiridil**

Procedimos a valorar la capacidad de crecimiento en condiciones de limitación de hierro mediante la determinación de la máxima concentración de dipiridil suplementado al caldo nutritivo que permite el crecimiento de los diferentes mutantes. En todos los mutantes analizados, a excepción del mutante *exc*, se observó una clara dificultad de crecimiento en presencia de dipiridil.

**Tabla 3.11 Máxima concentración de dipiridil añadida al caldo nutritivo que permite el crecimiento de las diferentes cepas.**

	AH-3	AH-1789	AH-1790	AH-1791	AH-1792	AH-1793	AH-1794	AH-777	AH-768
[dip.]	250µMdip	175µMdip	165µMdip	150µMdip	150µMdip	165µMdip	250µMdip	150µMdip	175µMdip

### 3.15.4. Análisis de la captación de hierro mediante la técnica del bioensayo

Se procedió a evaluar la capacidad de captación de hierro del mutante AH-1789, deficiente en la producción de sideróforos y de los mutantes deficientes en alguno de los componentes del sistema de transporte de sideróforos, mediante la técnica del bioensayo, descrita en el apartado 2.9.3 de Material y Métodos.

Utilizamos como fuente de hierro, los sideróforos presentes en los sobrenadantes de diferentes cultivos bacterianos. Para ello, se cultivaron en condiciones restrictivas de hierro diferentes cepas de *A. hydrophila* productoras de amonabactina (A19, A34, A82, A145, A162 y A167) y tres cepas de *Aeromonas* spp. productoras de enterobactina (A11, A66, A151). Además, se incluyeron en el estudio otras especies productoras de enterobactina (*E. coli* HB101 y *K. pneumoniae* C3) y otras cepas de *Aeromonas* spp. clasificadas en esta memoria como pertenecientes al grupo 1 o al grupo 2 ( ver apartado 3.4).

Para verificar la presencia de sideróforos utilizables en los sobrenadantes bacterianos, realizamos en paralelo dos bioensayos con las cepas *E. coli* AN346 y SB22::amoA, indicadoras de la presencia de enterobactina y amonabactina, respectivamente.

La capacidad de utilización del sideróforo presente en un determinado sobrenadante bacteriano se infirió a partir de la aparición de un halo de crecimiento de la cepa indicadora alrededor del punto de aplicación del sobrenadante.

Los resultados se muestran en la tabla 3.12 y permiten afirmar que los mutantes AH-768, AH-777, AH-1791 y AH-1792 han perdido la capacidad de utilizar el hierro de la amonabactina y de la enterobactina; mientras que el mutante AH-1789 utiliza la amonabactina de forma mucho más eficiente que la enterobactina.

**Tabla 3.12 Determinación de la capacidad de utilización de sideróforos mediante la técnica de bioensayo.**

Sobrenadantes de las cepas	Sobrenadantes obtenidos a partir de	Concentración de los sobrenadantes empleada	Cepas indicadoras								
			AH-1789	AH-1791	AH-1792	AH-777	AH-768	SB22:: <i>amoA</i>	Ecoli:: <i>entA</i>		
AH-3	NB 250µM dip	1X	+	-	-	-	-	+	-		
		20X	+	-	-	-	-	+	-		
A M O N A B A C T I N A	A19	NB 250µM dip	1X	+	-	-	-	-	+	-	
		20X	+	-	-	-	-	+	-		
	A34	NB 250µM dip	1X	+	-	-	-	-	+	-	
			20X	ND	-	-	-	-	ND	ND	
	A82	NB 250µM dip	1X	+	-	-	-	-	+	-	
			20X	ND	-	-	-	-	ND	ND	
	A145	NB 250µM dip	1X	+	-	-	-	-	+	-	
			20X	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	A162	NB 250µM dip	1X	+	-	-	-	-	+	-	
			20X	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	A167	NB 250µM dip	1X	+	-	-	-	-	+	-	
			20X	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	E N T E R O B A C T I N A	A11	NB 200 µM dip	1X	-	-	-	-	-	-	+
			20X	+	-	-	-	-	+	+	
A151		NB 200µM dip	1X	-	-	-	-	-	-	+	
			20X	+	-	-	-	-	+	+	
A66		NB 200µM dip	1X	-	-	-	-	-	-	+	
			20X	+	-	-	-	-	+	+	
HB101		TSB 300µM dip	1X	-	-	-	-	-	-	+	
			20X	-	-	-	-	-	-	+	
C3		TSB 300µM dip	1X	-	-	-	-	-	-	+	
			20X	-	-	-	-	-	-	+	
G R U P O 1	O:37	NB 250µM dip	1X	+	-	-	-	-	+	ND	
		20X	ND	-	-	-	-	ND	ND		
	O:42	NB 250µM dip	1X	+	-	-	-	-	+	ND	
			20X	ND	-	-	-	-	ND	ND	
	O:21	NB 250µM dip	1X	+	ND	ND	ND	ND	+	-	
			20X	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	AH-1	NB 250µM dip	1X	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	
			20X	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
G R U P O 2	O:4	NB 250µM dip	1X	-	ND	ND	ND	ND	-	+	
		20X	+	ND	ND	ND	ND	+/-	+		
	O:5	NB 250µM dip	1X	-	ND	ND	ND	ND	-	+	
			20X	+	ND	ND	ND	ND	+	+	
	O:20	NB 200µM dip	1X	-	-	-	-	-	-	-	
			20X	+/-	-	-	-	-	+	+	
	O:30	NB 200µM dip	1X	-	-	-	-	-	-	-	
			20X	+	-	-	-	-	+	+	
CONTROL NEGATIVO	TSB 300µM dip	1X	-	-	-	-	-	-	-		
		20X	-	-	-	-	-	-	-		
CONTROL NEGATIVO	NB 200µM dip	1X	-	-	-	-	-	-	-		
		20X	-	-	-	-	-	-	-		
CONTROL POSITIVO	-	FeCl <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+		

### 3.15.5 Evaluación de la relevancia del sistema de captación de hierro mediante sideróforos en la virulencia de la cepa AH-3.

Con el fin de determinar el papel que desempeña el sistema de captación de hierro mediante sideróforos en el proceso infeccioso llevado a cabo por la cepa AH-3, se determinó la dosis letal<sub>50</sub> de la cepa salvaje, así como del mutante AH-1789, no secretor de sideróforo ni de 2,3-DHBA y del mutante AH-768, incapaz de captar el hierro del ferri-sideróforo que hipersecretora. Se utilizaron truchas para medir el grado de virulencia de las diferentes cepas, tal y como se describe en el apartado 2.10 de Material y Métodos. Los resultados se muestran en la tabla 3.13.

**Tabla 3.13. Implicación en la virulencia de la cepa AH-3, del sistema de captación de hierro mediante sideróforos.**

cepa	DL <sub>50</sub>
AH-3	10 <sup>5.5</sup>
AH-1789	10 <sup>7</sup>
AH-1789+ pCOS-SID/1	10 <sup>5.5</sup>
AH-768	10 <sup>7</sup>
AH-768+ pACYC-FapA	10 <sup>5.5</sup>

Los valores son la media de tres experimentos independientes y la máxima desviación estándar fue siempre menor a 10<sup>0.2</sup>.

La tabla anterior resume los resultados obtenidos y muestra una clara disminución en la DL<sub>50</sub> en aquellas cepas con alteraciones en el sistema de captación de hierro mediante sideróforos. Ambos mutantes presentan una DL<sub>50</sub> un logaritmo y medio inferior a la cepa parental. Así pues, 2x10<sup>6</sup> células de la cepa parental mataban a diez truchas de las diez inoculadas, mientras que la misma cantidad de células de los mutantes con alteraciones en el sistema de sideróforos sólo mataban a dos de las diez truchas inoculadas.

### 3.15.6. Implicación de los componentes del sistema de transporte de ferri-sideróforos en la captación de hierro a partir de las hemoproteínas del huésped.

Además de los bioensayos que valoran la capacidad de utilización de diferentes sideróforos como fuente de hierro, se evaluó en paralelo y con la misma técnica, la capacidad de los diferentes mutantes de utilizar como fuente de hierro diferentes hemoproteínas, cuya presencia es característica de los sistemas huésped. Los resultados que se muestran en la tabla 3.14., permiten afirmar que ni el sideróforo ni el sistema de transporte de ferri-sideróforos de la cepa AH-3, intervienen en el proceso de captación de hierro a partir de la hemoglobina o del grupo hemo.

### 3.15.7. Visión global de las características fenotípicas de los diferentes mutantes de la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3.

Tabla 3.14. Resumen de las principales características fenotípicas de los mutantes estudiados.

cepa	CAS	Test Arnow	máxima [dip.]*	Capacidad de utilización del hierro de				
				amonabactina 1x	enterobactina 20x	FeCl <sub>3</sub>	hemoglobina	hemo
<i>A. hydrophila</i> AH-3	+	+	250µM	+	+	+	+	+
AH-1789 ( <i>amlA</i> )	-	-	175µM	+	+	+	+	+
AH-1790 ( <i>amlH</i> )	+++	+	165µM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AH-1791 ( <i>fapB</i> )	+++	+	150µM	-	-	+	+	+
AH-1792 ( <i>fapC</i> )	+++	+	150µM	-	-	+	+	+
AH-777 ( <i>fapG</i> )	+++	+	150µM	-	-	+	+	+
AH-768 ( <i>fapA</i> )	++	+	175µM	-	-	+	+	+
AH-1793 ( <i>mrp</i> )	+++	+	165µM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AH-1794 ( <i>exc</i> )	+	+	250µM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

\* concentración máxima de dipiridil añadida al caldo nutritivo que permite el crecimiento. N.D., no determinado.

### 3.16. Análisis de complementación de los mutantes

El plásmido pCOS-SID/1 fue movilizado a los mutantes *amlA*, *amlH*, *fapB*, *fapC* y *mrp*, mediante procesos independientes de conjugación triparental. Los transconjugantes fueron seleccionados por su resistencia a rifampicina, kanamicina y tetraciclina, mostrando todos ellos un aumento en la capacidad de crecimiento en presencia de dipiridil y unos niveles de producción y secreción de sideróforos, inferidos a partir del tamaño del halo anaranjado de los diferentes transconjugantes en placas de CAS agar, cercanos a los de la cepa parental. En todos los casos se realizó un análisis de restricción del plásmido purificado para verificar la presencia del plásmido con el inserto no modificado.

Para comprobar que la recuperación fenotípica era realmente debida a la introducción del gen mutado propiamente dicho, se realizaron construcciones con los genes *amlH*, *fapB* y *fapA* colocados en el vector de clonaje pACYC184. (figura 3.16.; figura 3.18.). No se complementaron las mutaciones *amlA*, *fapG* ni *mrp* por no hallarse estos genes al final de una unidad transcripcional.

#### 3.16.1 Complementación del mutante AH-768

Para relacionar las alteraciones que el mutante AH-768 presenta en el sistema de captación de hierro mediante sideróforos, con la deficiencia de una proteína de membrana externa de 70 kDa de peso molecular aparente, decidimos clonar y sobreexpresar el gen *fapA* en dicho mutante. Así pues, amplificamos la región genómica correspondiente al gen *fapA* mediante los oligonucleótidos CirARev y 768F a una temperatura de hibridación ADN/cebador de 56 °C y un tiempo de extensión de tres minutos. El producto de PCR fue clonado a PGEMT y se liberó mediante doble digestión con *ScaI* y *NotI* para ser clonado al vector pACYC184

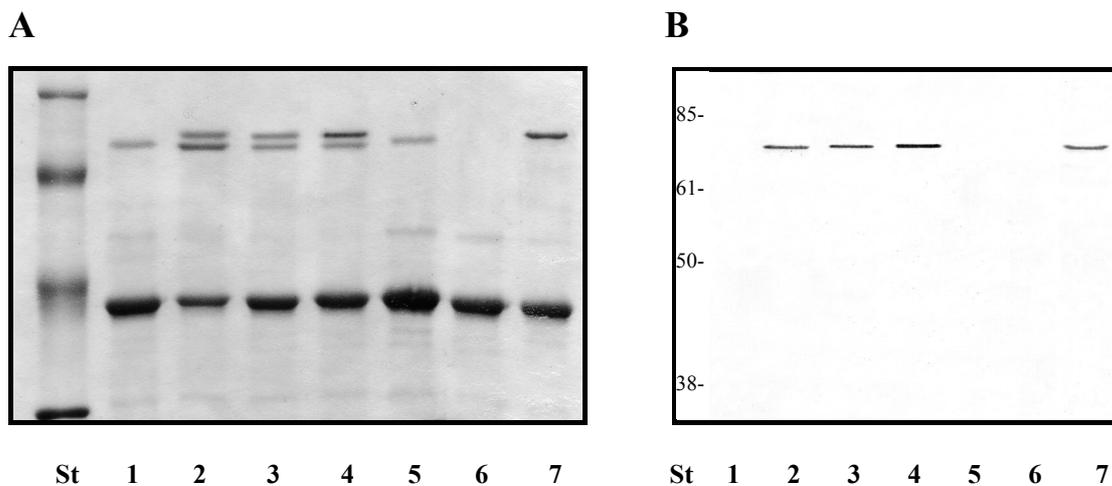
digerido con *EagI*. Los clones recombinantes con el gen *fapA* sometido al control del promotor del determinante de resistencia a la tetraciclina se propagaron en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se movilizaron al mutante AH-768 mediante conjugación triparental. Se seleccionaron cinco transconjugantes oxidasa positivos y resistentes a la rifampicina, kanamicina y al cloramfenicol y se cercioró, mediante extracción de ADN plasmídico y posterior restricción, la presencia del plásmido recombinante no deleccionado. Seleccionamos uno de los candidatos para los posteriores análisis fenotípicos.

La presencia en *trans* del gen *fapA*, restablece la capacidad del mutante AH-768 de crecer en condiciones de limitación de hierro (NB 250  $\mu$ M de dipiridil), y también restablece la capacidad de internalización del sideróforo secretado, tal y como se deduce de la reversión del fenotipo sobreproductor de sideróforos en el test de CAS.

Además, el transconjugante seleccionado también mostró una recuperación de los valores de la dosis letal<sub>50</sub>. (tabla 3.13.).

Se procedió al estudio de los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana externa del transconjugante, para determinar si la presencia de dicho gen era capaz de restablecer la expresión de la proteína de 70 kDa ausente en el mutante. Los estudios de electroinmunotransferencia de las diferentes proteínas de membrana externa, con posterior inmunodetección con anticuerpos específicos para la proteína FapA, demuestran la ausencia de dicha proteína en la membrana externa de la cepa AH-768 y la capacidad de dicha proteína clonada de ser exportada correctamente hasta la membrana externa de la cepa AH-768.

Estos estudios evidenciaron además que FapA es una proteína de membrana externa cuya expresión está regulada por las condiciones restrictivas de hierro y que el mutante AH-768 con el gen *fapA* clonado, expresa la proteína FapA constitutivamente.



**Figura 3.15.** (A), SDS-PAGE en gel de acrilamida/bisacrilamida 7.5% (Coomasie-Blue), Carriles 1-5 provienen de cultivos en condiciones de limitación de hierro, Carriles 6 y 7 provienen de cultivos en caldo nutritivo. St, estándar de pesos moleculares, 94kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa; (B), inmunotransferencia realizada con antisuero específico contra FapA de *A. hydrophila* AH-3. St, se indica el peso molecular (kDa); 1, AH-768; 2, AH-3; 3, AH-768 con pCOS/SID-1; 4, AH-768 con pACYC-FapA; 5, AH-768 con pACYC sin inserto; 6, AH-768; 7, AH-768 con pACYC-FapA.

### 3.16.2. Complementación del componente periplasmático del transportador ABC.

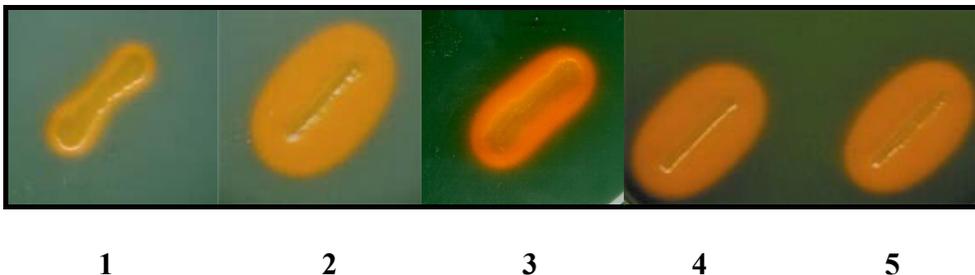
Para demostrar que el fenotipo del mutante AH-1791 era exclusivamente debido a su deficiencia en la proteína FapB, decidimos observar el fenotipo de dicho mutante con el gen *fapB* clonado y sobreexpresado en el vector de clonación pACYC184. Para ello, amplificamos el gen *fapB* de la cepa AH-3 utilizando los oligonucleótidos FecB-1 y 768-2 a una temperatura de hibridación ADN/cebador de 60'1°C y un tiempo de extensión de 1 minuto 10 segundos. El producto de PCR clonado a pGEMT y liberado mediante restricción con *NotI*, fue clonado al vector pACYC184 digerido con *EagI*. Tras comprobar mediante restricción con *EcoRV* que la expresión del gen *fapB* estuviera sometida al control del promotor del determinante de resistencia a la tetraciclina de dicho plásmido, se movilizó el plásmido recombinante al mutante AH-1791 mediante conjugación triparental. Se seleccionaron las colonias resistentes a la rifampicina, kanamicina y cloramfenicol y después de la extracción plasmídica de varios de los transconjugantes, se verificó mediante análisis de restricción que el inserto del plásmido hospedado no hubiera padecido procesos de modificación. Finalmente, se seleccionó uno de los transconjugantes y se procedió a su estudio fenotípico. Dicha cepa mostró en el test de CAS el mismo fenotipo que la cepa parental, además de un aumento de la capacidad de crecimiento en presencia del agente quelante dipiridil. Estos resultados no fueron reproducidos con la cepa AH-1791 que hospedaba el vector pACYC184. Estos ensayos de complementación nos permitieron inferir que las alteraciones fenotípicas en el sistema de transporte de sideróforos del mutante AH-1791 son únicamente debidas a la carencia de la proteína FapB. (figura 3.16.)

Para demostrar que los componentes periplasmáticos de diferentes sistemas de transporte de *E. coli* eran capaces de sustituir funcionalmente la proteína FapB de la cepa AH-3, decidimos clonarlos y sobreexpresarlos en el entorno FapB deficiente del mutante AH-1791. En este contexto, creímos oportuno clonar el componente periplasmático del sistema de transporte de sideróforos de tipo catecolato de *E. coli* (FepB) y en paralelo el componente periplasmático del sistema de transporte de dicitrato férrico de *E. coli* (FecB).

Procedimos a la clonación de ambos genes en el vector de clonación pACYC184. Amplificamos el gen *fepB* de *E. coli* mediante los oligonucleótidos FepB-coliFor y FepB-coliRev a una temperatura de hibridación ADN/cebador de 57.7 °C y un tiempo de extensión de 1 minuto 20 segundos. Paralelamente amplificamos el gen *fecB* de *E. coli* mediante los oligonucleótidos CitratB-coliFor y CitratB-coliRev en las mismas condiciones que la PCR anterior. Sendos productos de PCR fueron clonados a pGEMT y se recuperaron los fragmentos mediante digestión con *EcoRI* para ser clonados en el vector pACYC184 digerido con el mismo enzima y convenientemente defosforilado.

Sendos productos de ligación se transfirieron a *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación y se seleccionaron, en ambos casos mediante doble digestión con *ScaI* y *PstI*, los clones recombinantes con la expresión de los respectivos genes sometida al control del promotor del determinante de resistencia al cloramfenicol del vector pACYC184. Ambas construcciones fueron transferidas en paralelo al mutante AH-1791 mediante conjugación triparental y se seleccionaron los transconjugantes en placas de TSA suplementadas con rifampicina, kanamicina y tetraciclina. Se validó, mediante extracción de ADN plasmídico de varios candidatos y posterior digestión del mismo con una batería de enzimas de restricción, que los transconjugantes no contuvieran un plásmido con inserto deleciónado o modificado. Procedimos entonces a evaluar el fenotipo de sendos transconjugantes en placas de CAS agar suplementadas con los antibióticos necesarios. Todas las colonias analizadas presentaron un fenotipo sobreproductor de sideróforos en el Test de CAS (figura 3.16.).

Cabe decir que la construcción del gen *fepB* de *E. coli* clonado a pACYC184 sí restableció la capacidad de internalización de enterobactina de la cepa de *E. coli* DK214, un mutante deficiente en el componente periplasmático del sistema transportador de sideróforos de tipo catecolato. En esta ocasión, la capacidad de internalización de enterobactina se valoró mediante el test de CAS.



**Figura 3.16.** Test de CAS. 1, AH-3 ; 2, AH-1791 (*fapB*) ; 3, AH-1791 con pACYC-FapB ; 4, AH-1791 con pACYC-FepB ; 5, AH-1791 con pACYC-FecB.

Los análisis de complementación anteriormente expuestos nos permitieron afirmar que ninguno de los componentes periplasmáticos de *E. coli* estudiados, es capaz de sustituir funcionalmente el componente periplasmático de la cepa AH-3. Esta incapacidad de sustitución funcional puede ser el reflejo de una incapacidad de interacción entre los diferentes componentes periplasmáticos de *E. coli* estudiados con el resto de componentes del sistema transportador de tipo ABC de la cepa AH-1791, o puede ser un reflejo de la incapacidad de las proteínas periplasmáticas FepB y FecB de *E. coli* de unir el sideróforo producido por la cepa AH-1791 o puede ser un reflejo de la incapacidad de la cepa AH-1791 de ubicar en su espacio periplasmático las proteínas FepB y FecB de *E. coli*.

### 3.16.3. Complementación del mutante carente del componente citoplasmático y del mutante carente del componente permeasa del transportador de sideróforos de la cepa AH-3.

Debido al efecto polar que podría tener la inserción de un transposón en el gen *fapG* sobre la expresión del gen *fapC*, y teniendo en cuenta que ambos mutantes presentaron el mismo fenotipo en placas de CAS agar, la misma interrupción de la capacidad de crecimiento en condiciones de limitación de hierro e idéntica incapacidad de utilización de amonabactina y enterobactina en el test de bioensayo; decidimos intentar complementar ambos mutantes con los genes *fepDGC* de *E. coli* clonados a pACYC184.

Así pues, amplificamos la región *fepDGC* de *E. coli* utilizando los oligonucleótidos FepDGC-EcoliFor y FepDGC-EcoliRev a una temperatura de hibridación ADN/cebador de 60'2 °C y un tiempo de extensión de 3 minutos. El producto de amplificación fue clonado a pGEMT y liberamos el fragmento deseado mediante una doble restricción con *EcoRI* y *SalI*. La banda de aproximadamente 3 kb con extremos *EcoRI* fue ligada a pACYC184 y se transfirió el producto de la ligación a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación. Se purificó el ADN plasmídico para poder seleccionar mediante digestión con *EcoRV* los transformantes que hospedaban los plásmidos recombinantes con el inserto orientado correctamente. Dichas construcciones se transfirieron, mediante procesos independientes de conjugación triparental, a los mutantes AH-1792 y AH-777. Tras la selección de los transconjugantes y la verificación de la presencia del plásmido recombinante no modificado, se procedió al estudio fenotípico de los mismos (figura 3.17.).



1 2 3 4 5

**Figura 3.17.** Test de CAS. 1, AH-3 ; 2, AH-1792 (*fapC*) ; 3, AH-1792 con pACYC-FepDGC ; 4, AH-777 ; 5, AH-777 con pACYC-FepDGC.

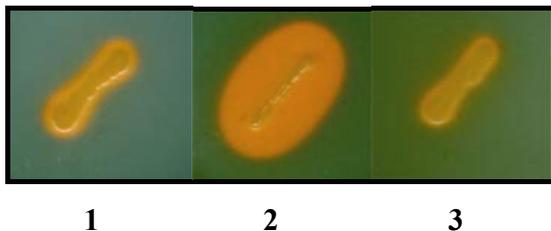
Observamos, en el test de CAS, que el producto de los genes *fepDGC* de *E. coli* clonado y sobreexpresado en el entorno FapC deficiente del mutante AH-1792, restituye la capacidad de captación del hierro del sideróforo endógeno secretado al medio de cultivo. En cambio, dicha construcción no restablece el fenotipo en placas de CAS agar del mutante AH-777, de nuevo constatamos el déficit de substitución funcional entre los componentes del sistema de transporte de sideróforos de tipo catecolato de *E. coli* y los componentes del sistema de transporte de sideróforos de la cepa AH-3.

### 3.16.4. Análisis de complementación del mutante AH-1790.

Para demostrar que el fenotipo del mutante AH-1790 era exclusivamente debido a su deficiencia en la proteína AmlH, decidimos observar el fenotipo de dicho mutante con el gen *amlH* clonado y sobreexpresado en el vector de clonación pACYC184.

Para ello, amplificamos dicho gen utilizando los oligonucleótidos pvd-1 y 768-4 a una temperatura de hibridación ADN/cebador de 59'5 °C y un tiempo de extensión de 1 minuto 20 segundos. El producto de PCR, clonado a pGEMT y liberado mediante restricción con *EcoRI*, fue clonado al vector pACYC184 digerido con el mismo enzima. Tras comprobar mediante restricción que la expresión del gen *amlH* estuviera sometida al control del promotor del determinante de resistencia al cloramfenicol de dicho plásmido, se movilizó el plásmido recombinante al mutante AH-1790 mediante conjugación triparental. Se seleccionaron las colonias resistentes a la rifampicina, kanamicina y tetraciclina y después de la extracción plasmídica de varios de los transconjugantes, se verificó mediante análisis de restricción que el inserto del plásmido hospedado no hubiera padecido procesos de modificación.

Finalmente, se seleccionó uno de los transconjugantes y se procedió a su estudio fenotípico. Dicha cepa mostró en el test de CAS el mismo fenotipo que la cepa parental además de un aumento de la capacidad de crecimiento en presencia del agente quelante dipiridil (figura 3.18.). Estos resultados no fueron reproducidos con la cepa AH-1790 que hospedaba el vector pACYC184.



**Figura 3.18.** Test de CAS. **1**, *A. hydrophila* AH-3; **2**, AH-1790; **3**, AH-1790 con pACYC-AmlH.

Estos ensayos de complementación nos permitieron inferir que las alteraciones fenotípicas en el sistema de transporte de sideróforos del mutante AH-1790 son únicamente debidas a la carencia de la proteína AmlH.

### 3.17. Distribución de los genes *aml* y *fap* en *Aeromonas* mesófilas.

#### 3.17.1 Distribución poblacional mediante dot-blot.

Para valorar la distribución poblacional de los genes que codifican para el sistema de captación de hierro mediante sideróforos de la cepa AH-3, procedimos a realizar hibridación del ADN genómico de diferentes especies de *Aeromonas* mesófilas, entre las que se incluyen *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bv *sobria*.

Con este fin, elaboramos tres sondas de ADN marcadas con digoxigenina, correspondientes a fragmentos internos de los genes *amlF*, *amlH* y *fapA*. Para ello se amplificaron dichos fragmentos a partir de ADN genómico de la cepa AH-3 y se amplificaron respectivamente con los oligonucleótidos 768Cs1 y 768CsC (58 °C, 30 segundos), 768-5 y Pvd-For (62 °C, 1 minuto 20 segundos), 768B y 768G (64 °C, 50 segundos). Entre paréntesis se indican las condiciones de temperatura de hibridación de ADN/oligonucleótico y el tiempo de extensión utilizado.

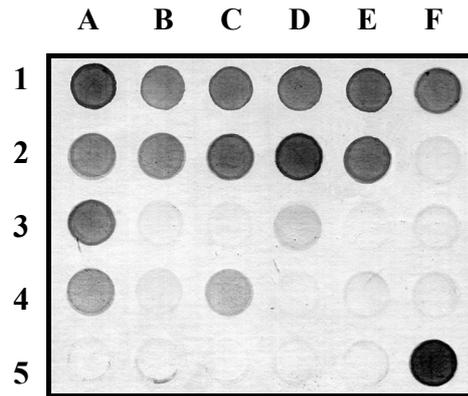
Las 23 cepas analizadas presentaron el mismo patrón, independientemente de la sonda utilizada. Los resultados obtenidos muestran una relación entre la presencia de los genes *amlF*, *amlH* y *fapA* y el sistema de captación de hierro de *Aeromonas* mesófilas mediado por el sideróforo amonabactina.

Las siete cepas productoras de amonabactina (incluimos en el estudio la cepa SB22::*amoA*) y las cuatro cepas del grupo 1, hibridaron positivamente con las sondas de la cepa AH-3. Las tres cepas productoras de enterobactina y las cuatro cepas del grupo 2 no reaccionaron con ninguna de las sondas utilizadas.

Como ya hemos comentado anteriormente, mediante los análisis de bioensayo se determinó que las cepas del grupo 1 probablemente secretan amonabactina y las del grupo 2 probablemente secretan enterobactina.

El resto de cepas analizadas eran productoras de un sideróforo no determinado: dos de ellas mostraron hibridación positiva y dos de ellas no hibridaron. Por último, la cepa O:15 no productora de sideróforos, no presentó hibridación con las sondas utilizadas.

La figura 3.19. muestra el resultado de la hibridación con la sonda *fapA*, en ésta hibridación se incluyeron además tres cepas productoras de un sideróforo desconocido que no es amonabactina ni enterobactina, en dos de ellas se detectó el gen *fapA*.



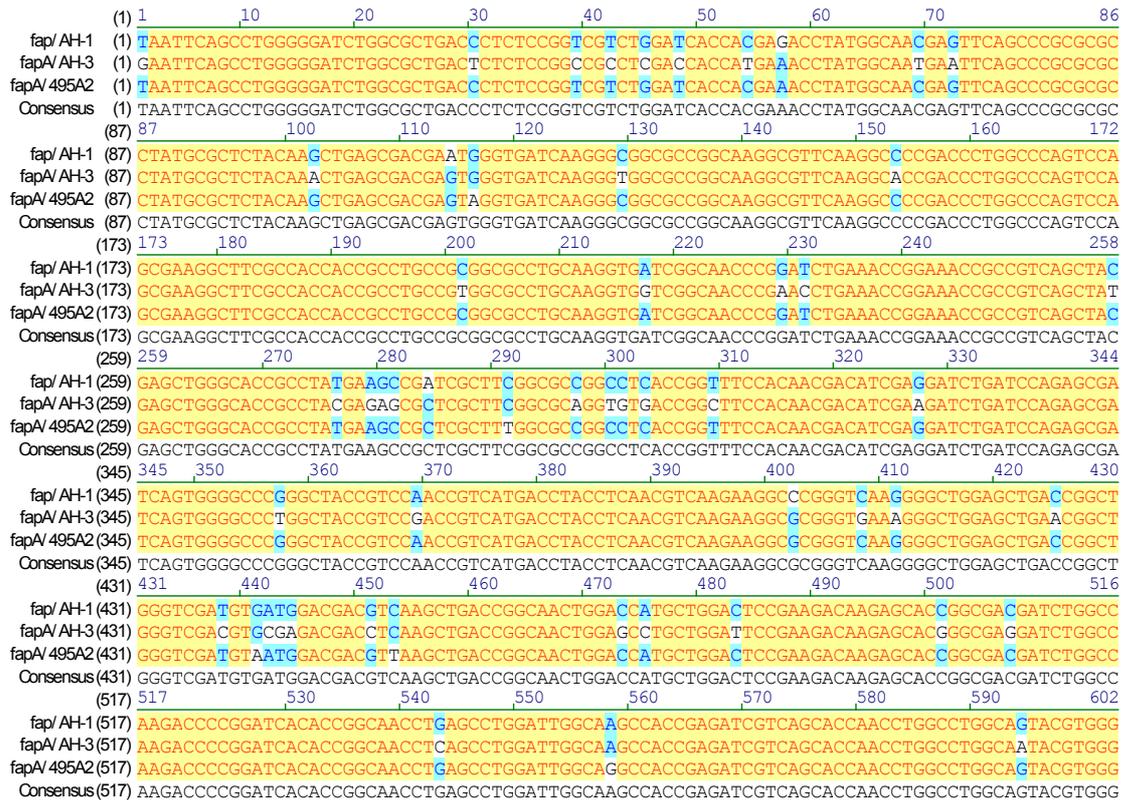
**Figura 3.19.** Determinación de la presencia del gen *fapA* en distintas cepas de *Aeromonas* spp., mediante la técnica de la transferencia de puntos (*dot-blot*) en condiciones de alta estringencia. Cepas productoras de amonabactina y cepas del grupo 1: A1, A19; B1, A34; C1, A82; D1, A145; E1, A162; F1, A167; A2, O:37; B2, O:42; C2, AH-1; D2, SB22::*amoA*; A3, O:21. Cepas productoras de enterobactina y cepas del grupo 2: B3, A11; C3, A66; D3, A151; E3, O:20; F3, O:30; D4, O:5; E4, O:19; F4, O:4. Cepas productoras de un sideróforo desconocido: A4, A1HG4; B4, A59HG4; C4, A261HG5A. Cepas no productoras de sideróforos: A5, O:15. Cepas productoras de un sideróforo no determinado: E2, O:33; F2, O:32; B5, O:6; C5, O:10. Las posiciones D5 y E5 son controles negativos en los que se fijó una gota de agua y 1 µg de ADN genómico de una cepa de *E. coli*, respectivamente. La posición F5 es el control positivo (AH-3).

Para demostrar el grado de conservación del gen *fapA*, amplificamos con los oligonucleótidos utilizados para la elaboración de la sonda, un fragmento interno de dicho gen en el mutante *amoA* de *A. hydrophila* 495A2 y en *A. veronii* bv *sobria* AH-1. Los fragmentos internos fueron clonados al vector pGEMT y secuenciados con los oligonucleótidos SP6 y M13For. Tal y como se muestra en la figura 3.20., las secuencias obtenidas presentan unos porcentajes de identidad muy elevados.

### 3.17.2. Distribución de FapA en *Aeromonas* mesófilas

Se ha descrito en la bibliografía que las proteínas de membrana externa reguladas por hierro son inmunogénicas y además confieren protección heteróloga (Ruffolo *et al.*, 98). Esto solo es posible si la proteína está presente tanto en el serotipo usado para el diseño de la vacuna como en el serotipo del posterior enfrentamiento.

Se inspeccionó un panel de diferentes cepas de *Aeromonas* mediante la técnica de la transferencia Western, con el fin de identificar proteínas de membrana externa estructuralmente relacionadas con FapA, el receptor de ferri-sideróforos de *A. hydrophila* AH-3.

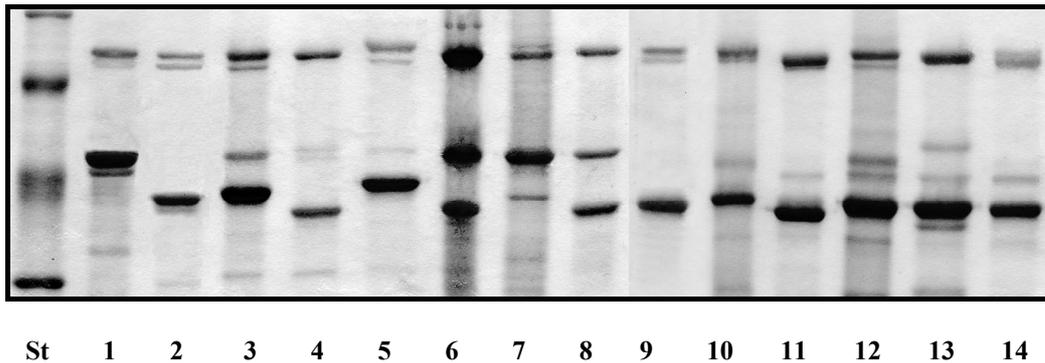


**Figura 3.20.** Alineamiento de una región interna del gen *fapA* de *A. veronii* bv *sobria* AH-1, *A. hydrophila* AH-3 y *A. hydrophila* 495A2. Los porcentajes de identidad de secuencia son muy elevados (alrededor del 92% entre AH-3 y AH-1 o AH-3 y 495A2; y del 98'1% entre AH-1 y 495A2).

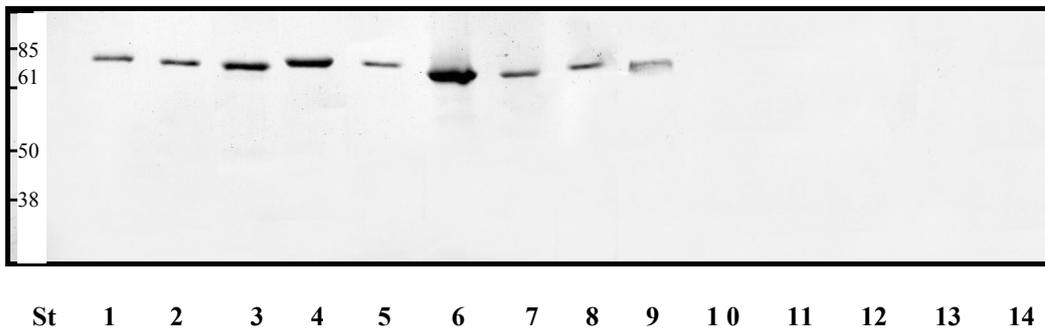
Así pues, se realizaron extracciones de proteínas de membrana externa de diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas crecidas en condiciones de limitación de hierro y tras una electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida 7,5%, se realizó una electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa y una posterior inmunodetección con los anticuerpos policlonales específicos contra la proteína FapA. Tal y como se ha descrito en trabajos anteriores (Wilcox *et al.*, 1992), las distintas cepas de *Aeromonas* presentan una amplia variabilidad respecto al patrón electroforético de las proteínas de membrana externa.

Los anticuerpos contra la proteína FapA detectaron específicamente una proteína de elevado peso molecular en todas las *Aeromonas* productoras de amonabactina analizadas, en dos cepas productoras de un sideróforo no caracterizado que no es amonabactina ni enterobactina y en la cepa A20HG4 no productora de sideróforos. No se observó reacción con ninguna de las proteínas de membrana externa extraídas de las cepas productoras de enterobactina. (Figura 3.20.).

A



B



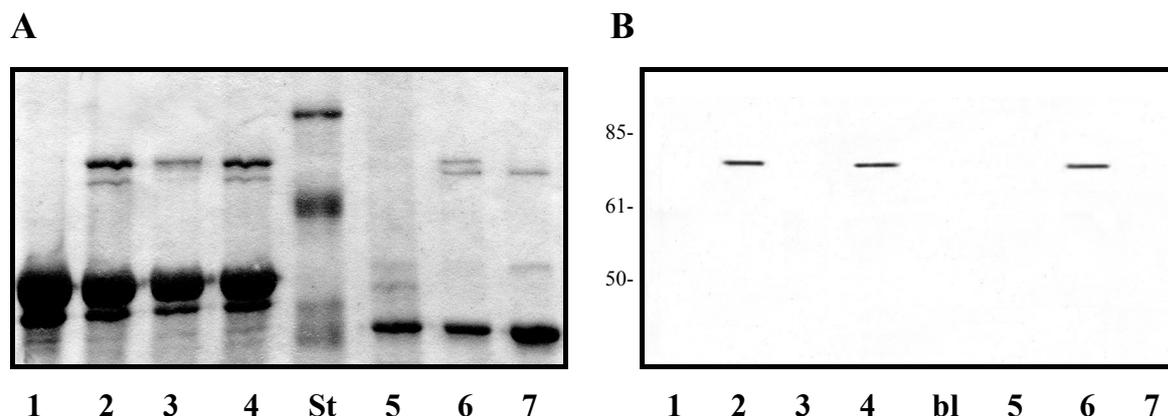
**Figura 3.20.** (A) SDS-PAGE en gel de acrilamida/bisacrilamida 7.5% (Coomassie-Blue); (B) inmunotransferencia realizada con antisuero específico contra FapA. Carriles: **1**, AH-1; **2**, AH-3; **3**, A19; **4**, A34; **5**, SB22::amoA; **6**, A1HG4; **7**, A261; **8**, A20HG4; **9**, AH-3; **10**, A11; **11**, A66; **12**, A151; **13**, O:4; **14**, O:5.

Para demostrar que la proteína detectada por los anticuerpos específicos contra FapA, interviene en el transporte de sideróforos de las diferentes cepas analizadas, procedimos a generar un mutante de la cepa AH-1 carente de dicha proteína. Dicho mutante se construyó mediante la inserción de un plásmido suicida en el gen homólogo a *fapA* de la cepa *A. veronii* bv *sobria* AH-1, tal y como se describe en el apartado 2.13.13.2 de Material y Métodos. Es importante destacar que para amplificar el fragmento interno del gen *fapA* de la cepa AH-1 se utilizaron los oligonucleótidos 768B y 768G, elaborados a partir de la secuencia del gen *fapA* de la cepa AH-3.

Dicho plásmido fue movilizado mediante conjugación triparental a un derivado rifampicina resistente de la cepa AH-1 y se seleccionaron los transconjugantes resistentes a la rifampicina y kanamicina.

El mutante AH-1796 mostró un halo anaranjado en placas de CAS agar de tamaño mucho más grande que la cepa parental, y una disminución de la concentración mínima inhibitoria de dipiridil. Estos resultados indican que el producto del gen analizado es un componente del sistema de transporte de sideróforos de la cepa AH-1. Tal y como muestra la figura 3.21., no se detectó la proteína FapA en la electroforesis de las membranas externas de dicho mutante crecido en condiciones de limitación de hierro o en el análisis de

inmunotransferencia utilizando dichas membranas externas y los anticuerpos específicos para la proteína FapA.



**Figura 3.21.** (A), SDS-PAGE en gel de acrilamida/bisacrilamida 7.5% (Coomasie-Blue), Carriles 2,3,4 y 6,7 provienen de cultivos en condiciones de limitación de hierro, Carriles 1 y 5 provienen de cultivos en caldo nutritivo. **St**, estándar de pesos moleculares, 94 kDa, 67 kDa, 43 kDa; Carriles: **1**, AH-1; **2**, AH-1; **3**, AH-1796, **4**, AH-1796 con pCOS-SID/1; **5**, AH-3; **6**, AH-3 (control positivo); **7**, AH-768 (control negativo). (B), inmunotransferencia realizada con antisuero específico contra FapA, los números del lateral izquierdo de la figura B hacen referencia al peso molecular (kDa) del estándar utilizado en la inmunotransferencia.

Procedimos a determinar la dosis letal<sub>50</sub> de la cepa AH-1 y del mutante AH-1796, para determinar el papel de la proteína FapA, y por extensión la relevancia del sistema de captación de sideróforos, en la virulencia de la cepa AH-1. Los resultados se muestran en la tabla 3.15. y evidencian un descenso de casi tres órdenes de magnitud en la dosis letal<sub>50</sub> del mutante con alteraciones en el sistema de transporte de sideróforos.

Tabla 3.15. **Implicación del sistema de captación de hierro mediante sideróforos en la virulencia de la cepa AH-1 de *A. veronii* bv *sobria*.**

cepa	DL <sub>50</sub>
AH-1	10 <sup>4.6</sup>
AH-1796	10 <sup>7.5</sup>

Los valores son la media de tres experimentos independientes y la máxima desviación estándar fue siempre menor a 10<sup>0.2</sup>.

### 3.18. Discusión

Estudios anteriores demostraron que la mayoría de cepas de *Aeromonas* spp. mesófilas, producen un único sideróforo de tipo catecolato, principalmente enterobactina o amonabactina (Zywno *et al.*, 1992; Barghouthi *et al.*, 1989). Recientemente, se han caracterizado cuatro formas estructurales de amonabactina, que se diferencian en base a dos parámetros: la presencia en el extremo carboxilo-terminal de un D-aminoácido aromático, que puede ser D-fenilalanina o D-triptófano y la presencia de una glicina opcional unida al N<sup>ε</sup> de la lisina del extremo amino-terminal. Cualquiera de las cuatro formas estructurales de la amonabactina es capaz de promover el crecimiento en condiciones de limitación de hierro, *in vitro* y en suero (Telford y Raymond, 1997; Telford y Raymond, 1998).

En este estudio, no se ha demostrado inapelablemente que las cepas de *A. hydrophila* AH-3 y *A. veronii* bv *sobria* AH-1 sean cepas secretoras de amonabactina, pero numerosas rutas experimentales independientes, que se exponen a continuación, convergen hacia esta hipótesis.

En primer lugar, los estudios de bioensayo realizados demuestran que el sideróforo producido por ambas cepas es capaz de ser utilizado por el mutante *amoA* de *A. hydrophila* 495A2, cepa indicadora de la producción de amonabactina. Este efecto positivo sobre la capacidad de crecimiento en condiciones de limitación de hierro no fue observado en los bioensayos realizados con el mutante *entC* de *E. coli*, cepa indicadora de la producción de enterobactina.

En segundo lugar, los intentos de complementación interespecífica del mutante *entF* de *E. coli* con el plásmido pCOS-SID/1 fueron infructuosos, probablemente debido a que la sintetasa de péptidos no ribosomales de la cepa AH-3, codificada por los genes *amlDEFGHB*, biosintetiza un sideróforo estructuralmente diferente a la enterobactina. Cabe recordar que ninguno de los dominios de adenilación de la SPNR de la cepa AH-3 mostró especificidad de sustrato para la serina y que la secuencia de dominios C-A-PCP-TE, indispensable para la formación del triéster de DHBA-serina, no fue detectada en ninguno de los módulos de la SPNR codificada por la agrupación génica de la cepa AH-3.

En tercer lugar, los estudios de distribución poblacional de los genes *amlF* y *amlH* mediante sondas de ADN, mostraron que únicamente las cepas productoras de amonabactina analizadas contenían dichos genes. Estudios anteriores habían demostrado la divergencia a nivel genético entre los genes de *Aeromonas* spp. que codifican para los enzimas que intervienen en la biosíntesis del 2,3-DHBA, precursor común de ambos sideróforos (Massad *et al.*, 1994).

En concreto, Massad no detectó hibridación entre los equivalentes funcionales que median la biosíntesis del 2,3-DHBA: *E. coli entC*, *amoA* de las *Aeromonas* spp. productoras de amonabactina y *aebC* de las *Aeromonas* productoras de enterobactina. Massad postuló la existencia de un mínimo de dos operones 2,3-DHBA diferentes, aunque funcionalmente equivalentes; uno de ellos presente en las *Aeromonas* productoras de amonabactina y el otro presente en las *Aeromonas* productoras de enterobactina (Massad *et al.*, 1994; Byers y Arceneaux, 1994).

En cuarto lugar, la especificidad de los dominios de adenilación de la sintetasa de péptidos no ribosomales, codificada por la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3, inferida a partir del método de Challis (Challis *et al.*, 2000), concordó con todos los aminoácidos presentes en las diferentes formas estructurales de la amonabactina (lisina, fenilalanina, triptófano y glicina). Y lo que es más interesante, en el módulo AmlG de la sideróforo sintetasa de la cepa AH-3, se detectó una región que mostró todos los subdominios característicos de un dominio de epimerización, en concordancia con la presencia de aminoácidos epimerizados en el extremo carboxilo-terminal de las cuatro formas estructurales de la amonabactina. Además, el retardo en el crecimiento y en la producción de amonabactina, derivado de la adición de R-(D)-triptófano o R-(D)-fenilalanina al medio de cultivo de *Aeromonas* spp., es una observación, hecha en 1997 por los investigadores Telford y Raymond, que parece dar peso a la presencia de un dominio de epimerización en el módulo encargado de incorporar el aminoácido D-aromático a la cadena peptídica creciente, además de dar soporte a la predicción de selección de sustrato del módulo de adenilación de AmlG que se expone a continuación.

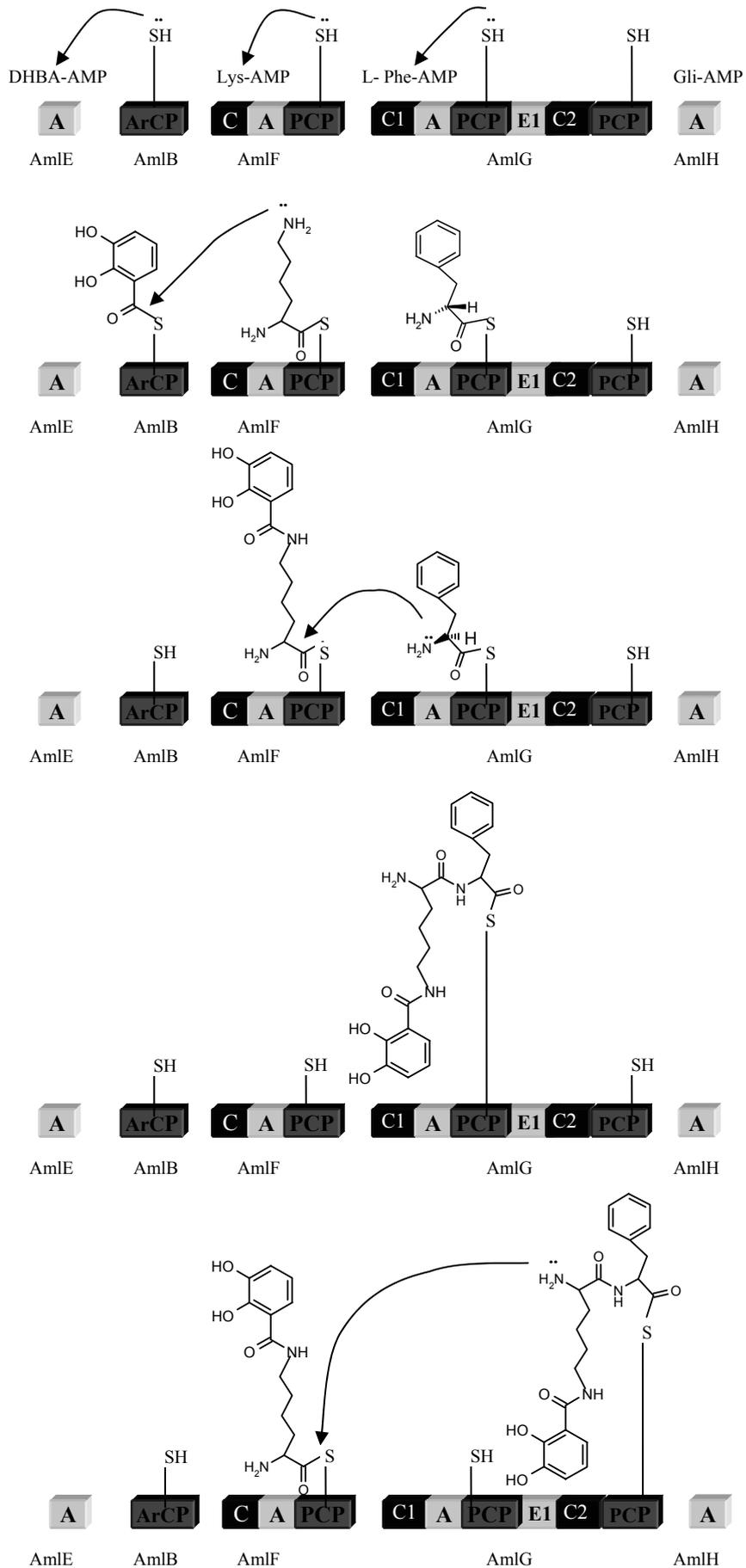
El código no ribosomal del dominio de adenilación de AmlG mostró similitud con el dominio de adenilación del segundo módulo de TycB, la tirocidina sintetasa de *B. brevis*, que es el único dominio de adenilación específico para la L-Phe y el L-Trp descrito hasta la fecha (Challis *et al.*, 2000). La tirocidina es una mezcla de cuatro decapeptidos cíclicos, llamados tirocidina A, B, C y D. En el caso de la amonabactina (Barghouthi, 1989) y de la tirocidina (Mootz y Marahiel, 1997), se puede alterar la cantidad relativa de las cuatro formas estructurales, añadiendo L-fenilalanina o L-triptófano al medio de cultivo. Éstas evidencias acentúan la semejanza entre la especificidad de sustrato de este par de dominios de adenilación.

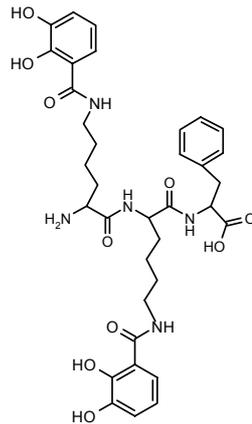
Esta es la memoria del primer estudio en términos de biología molecular que presenta los genes que median el segundo paso de la formación de un sideróforo estructuralmente muy similar a la amonabactina, es decir, el ensamblaje del 2,3-DHBA con los diferentes aminoácidos que constituyen las diferentes formas estructurales de la amonabactina. Clonamos y analizamos los genes implicados en la biosíntesis del ácido dihidroxibenzoico, y podemos afirmar que en la cepa AH-3 no existe una redundancia funcional de la ruta de biosíntesis de grupos catecolato.

Toda vez expuestas las razones que nos indujeron a pensar que la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3, codificaba para la sintetasa de amonabactina, nos dispusimos a proponer una posible ruta de biosíntesis de amonabactina, esquematizada en la figura 3.22. Tres enzimas (AmlC, AmlB, AmlA) intervendrían en la formación del 2,3-DHBA a partir del ácido corísmico, con actividad isocorismato sintasa, isocorismatasa y 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa, respectivamente. Ésta primera etapa es compartida por muchos sideróforos cuyo grupo funcional es de tipo catecolato. En contraste con la primera etapa, hay algunas lagunas en la segunda etapa de la biosíntesis de amonabactina. En esta segunda etapa intervendría un complejo multienzimático llamado amonabactina sintetasa, formado por los enzimas AmlD, AmlE, AmlF, AmlG, AmlH y por el extremo carboxilo-terminal de AmlB. La funcionalidad de estos enzimas, a excepción de AmlH, se asignó en términos de su composición en dominios y de su homología de secuencia, asumiendo el riesgo que esto puede comportar.

El primer paso de la segunda etapa es catalizado por AmlD, que transfiere el grupo fosfopanteteinil a los dominios de tiolación presentes en AmlF, AmlG y AmlB. La modificación postraducciona de los dominios de tiolación es imprescindible para su funcionalidad. A continuación, los diferentes dominios de adenilación seleccionan, fijan y activan un aminoácido o un grupo aril. El estudio del código no ribosomal de los diferentes dominios de adenilación nos proporcionó información sobre su especificidad de sustrato. AmlE es un enzima activador de grupos aril con especificidad para el 2,3-DHBA y en consecuencia media la formación del ariladenilato. Simultáneamente AmlF media la formación de lisil-AMP, AmlG forma indistintamente L-fenilalanil-AMP o L-triptofanil-AMP y AmlH forma glicil-AMP.

A continuación se produce la transferencia del ariladenilato al dominio de tiolación de AmlB, y la transferencia de los diferentes aminoaciladenilatos al grupo de tiolación anexo al dominio de adenilación que catalizó su selección y activación. Este paso es crítico, porque media la formación de los complejos DHBA-S-AmlB, L-lisil-S-AmlF, L-fenilalanil-S-AmlG ó L-triptofanil-S-AmlG.





**Figura 3.22.** Posible ruta de biosíntesis de AmonabactinaP693, el nombre hace referencia al peso molecular y al aminoácido aromático ( fenilalanina). En el esquema se ha representado la activación de una L-PheAla por parte del dominio de adenilación de AmlG, pero dicho dominio también puede activar indistintamente un L-Trp. Amonabactina P693 es una forma estructural de la amonabactina carente de glicina.

Desconocemos el destino del gliciladenilato, porque no se detectó ningún dominio de tiolación en AmlH.

La elevada similitud del dominio de condensación de AmlF con diferentes dominios de condensación que median la formación del enlace amídico entre grupos aril y aminoácidos, en contraste de la baja similitud con dominios de condensación que median la formación del enlace amídico entre dos aminoácidos, nos indujo a pensar que AmlF es el primer módulo de la amonabactina sintetasa. Además, en muchas líneas de ensamblaje de péptidos no ribosomales se ha observado una colinealidad entre el orden de los genes (*amlFGH*) y el orden de los aminoácidos del producto peptídico final (Schwarzer *et al.*, 2003). Así pues, en el siguiente paso interviene el dominio de condensación de AmlF, catalizando la formación del enlace amídico entre el 2,3-DHBA y la lisina, que quedará unido al dominio de tiolación de AmlF en forma de 2,3-DHBA-lisil-S-AmlF. Simultáneamente, el L-aminoácido aromático unido al módulo de tiolación de AmlG, es epimerizado por el dominio de epimerización de AmlG, catalizando la formación de D-aro-S-AmlG. A continuación, el primer dominio de condensación de AmlG cataliza la formación del enlace peptídico entre la lisina y el aminoácido D-aromático y se produce la transferencia de la cadena al segundo dominio de tiolación de AmlG, es decir se ha catalizado la formación de DHBA-lisil-D-aro-S-AmlG.

Creemos que, subsiguientemente, el nitrógeno alfa de dicha lisina podría actuar en este punto como nucleófilo para atacar un segundo DHBA-lisil-S-AmlF, formado en un segundo ciclo de actuación de los enzimas AmlE, AmlB, AmlF y que sería condensado, por el segundo dominio de condensación de AmlG.

En este segundo ciclo de AmlEBF es cuando se podría formar alternativamente DHBA-glicil-lisil-S-AmlF, pero desconocemos el enzima que podría transferir y condensar la glicina.

Algunos autores han destacado la ausencia de una de las regiones núcleo, concretamente la número siete, entre los dominios de condensación que realizan más de un ciclo de condensación (Silakowski *et al.*, 2000). Entre ellos, EntF (enterobactina sintetasa de *E. coli*), DhbF (bacilibactina sintetasa de *B. subtilis* y MxcG (mixoquelina sintetasa de *S. aurantiaca*). Este tipo de dominios de condensación son inusuales, porque generalmente cada uno de los dominios de condensación es responsable de una única reacción. Los dominios de condensación embebidos en dichos enzimas, al igual que el dominio de condensación de AmlF, carecen de la región núcleo número siete. Nosotros pensamos que AmlF cataliza dos ciclos de condensación: el primero entre el N<sup>o</sup> de la segunda lisina y el DHBA, y el segundo menos específico, entre el N<sup>o</sup> de la lisina amino-terminal y la glicina del N-(2,3-dihydroxidobenzoil)-glicina o simplemente con una molécula de 2,3-DHBA.

En resumen, pensamos que el dominio de condensación de AmlF se encarga de condensar los N<sup>o</sup> de las lisinas, el primer dominio de condensación de AmlG cataliza la formación del enlace peptídico entre el N<sup>o</sup> de el D-aminoácido aromático y el grupo carboxilo de la segunda lisina; y el segundo dominio de condensación de AmlG se encarga de condensar el N<sup>o</sup> de la segunda lisina con el grupo carboxilo de la lisina amino-terminal (la primera lisina).

Una explicación alternativa es que el dominio de condensación C1 de AmlG catalizara dos enlaces peptídicos, el primero entre una lisina y un D-aro y el segundo entre dos lisinas y que el dominio de condensación C2 de AmlG interviniera en la formación del enlace peptídico entre el DHBA y la glicina, esta última activada por AmlH y transferida al segundo dominio de tiolación de AmlG.

No se detectó ningún dominio tioesterasa que pudiera mediar la liberación del sideróforo del complejo enzimático.

Se ha demostrado que en *E. coli* y en muchos otros microorganismos, entre ellos *A. hydrophila*, la expresión de los genes que intervienen en los mecanismos de captación de hierro está sometida al control de la proteína Fur (Sha *et al.*, 2001; Escolar *et al.*, 1999). En la agrupación génica de sideróforos de la cepa AH-3 detectamos cuatro putativas cajas Fur en sentido 5' del inicio de traducción de *amlC*, *fapB*, *amlD* y *mrp*.

Decidimos mutageneizar un gen cuyo producto estuviera implicado en los pasos iniciales de la biosíntesis de sideróforos de tipo catecolato por varias razones. Entre las cuales, porque si el fenotipo de este mutante fuera negativo en el test de CAS, que detecta la presencia de sideróforos independientemente de la estructura química de los mismos, nos estaría

indicando que la cepa AH-3 únicamente produce sideróforos de tipo catecolato y que no hay producción adicional de un segundo sideróforo con un grupo funcional de tipo hidroxamato o ácido carboxílico. Dicho mutante produce en placas de CAS agar, unas colonias verdosas carentes del halo anaranjado fácilmente observable en la cepa parental, evidencia indicativa de una alteración en los pasos iniciales de la ruta de biosíntesis de sideróforos, porque los quelantes de iones férricos relativamente débiles, como por ejemplo el 2,3-DHBA, son detectables en el test de CAS (Neilands, 1994). Si asociamos estos datos con el resultado negativo de dicho mutante en el Test de Arnou, se demuestra inapelablemente que las alteraciones de este mutante en la ruta de biosíntesis de sideróforos son previas a la formación del 2,3-DHBA. En concordancia, se observó una disminución de la capacidad de crecimiento en ambientes con baja disponibilidad de hierro, situación simulada en el laboratorio adicionando un quelante de hierro al medio de cultivo. La inactivación del gen *amlA* podría tener efectos polares sobre la expresión de los genes *amlG* y *amlH*, pero estos efectos polares no afectarían al fenotipo del mutante, porque cabía esperar que los productos de estos genes interviniesen en la segunda etapa de la biosíntesis del sideróforo de la cepa AH-3.

Decidimos obtener una cepa deficiente en alguno de los enzimas que intervienen en la segunda etapa de la biosíntesis de sideróforos y escogimos el último gen de la posible unidad transcripcional *amlCEBFGH* para evitar los efectos polares en la expresión génica característicos de las inserciones de plásmidos suicidas en el cromosoma bacteriano. Sorprendentemente, observamos un fenotipo sobreproductor de sideróforos en el test de CAS. Pensamos que el mutante *amlH* secreta un sideróforo medio ensamblado que no puede ser internalizado por el sistema de transporte de ferri-sideróforos. La inactivación del gen *amlH* disminuye la capacidad de crecimiento en presencia del agente quelante dipiridil.

Los mutantes que están bloqueados en la biosíntesis de su propio sideróforo, son cepas indicadoras idóneas para realizar estudios de bioensayo, en la medida que excluyen los posibles procesos de intercambio de hierro entre el sideróforo exógeno y el sideróforo endógeno, y por lo tanto permiten una clara interpretación de la captación de hierro a partir de un determinado sideróforo exógeno (Rabsch y Winkelmann, 1991).

A partir de los resultados obtenidos en los estudios de bioensayo realizados utilizando el mutante *amlA* como cepa indicadora, podemos afirmar que dicho mutante no presenta alteraciones en la capacidad de internalización de sideróforos, y que es capaz de utilizar la amonabactina y la enterobactina para superar las dificultades de crecimiento en condiciones de limitación de hierro.

Es importante destacar que el mutante *amlA* y el mutante *amoA* de *A. hydrophila* 495A2 deficiente en la producción de amonabactina, mostraron una capacidad de captación de hierro muy similar. Ambos mutantes utilizaron la amonabactina de forma mucho más eficiente que la enterobactina, tal y como se deduce de la necesidad de concentrar 20 veces el sobrenadante de las cepas productoras de enterobactina, para que dicho sideróforo sea utilizado como fuente de hierro. Esto no es debido a un diseño erróneo del protocolo de obtención de sobrenadantes, porque la cepa indicadora de la captación de enterobactina se comportó como esperábamos, es decir utilizó el sobrenadante de las cepas productoras de enterobactina como fuente de hierro sin necesidad de un tratamiento previo de concentración. La importancia de que la cepa *A. hydrophila* 495A2 y la cepa AH-3 presenten una capacidad de utilización de sideróforos similar, reside en que estudios previos habían demostrado el funcionamiento singular, sin previa identificación genética, del receptor de amonabactina de la cepa *A. hydrophila* 495A2. El déficit de especificidad del receptor de amonabactina fue inicialmente postulado para explicar la utilización de las diferentes formas estructurales de la amonabactina (Telford y Raymond, 1997). Dicho receptor se mostró capaz de internalizar una gran variedad de sideróforos estructuralmente diferentes. La multifuncionalidad del receptor de amonabactina de la cepa 495A2 se determinó mediante estudios de competición y se explicó en términos de intercambio de ligando (Stintzi *et al.*, 2000). En este sentido, esta memoria presenta un receptor de ferri-sideróforos al que denominamos FapA, cuya presencia fue detectada mediante anticuerpos policlonales en cinco cepas de *Aeromonas* productoras de amonabactina, incluida la cepa 495A2. No se detectó la presencia de FapA en las proteínas de membrana externa reguladas por hierro de las cepas productoras de enterobactina analizadas. Los estudios de bioensayo de la cepa *A. hydrophila* AH-3 deficiente en el receptor de ferri-sideróforos FapA, demuestran que dicho receptor media la internalización de la amonabactina y de la enterobactina, apuntando de este modo a la multifuncionalidad del receptor. No se determinó la capacidad de utilización de ferri-sideróforos de la cepa *A. veronii* bv *sobria* AH-1 deficiente en el homólogo de FapA, por los posibles efectos polares de la inserción de un plásmido suicida en la expresión de los demás genes de la agrupación. Este no es el caso del mutante *fapA* de la cepa AH-3, obtenido por inserción de un transposón y en el que se demostró, mediante estudios de complementación, que la presencia del gen *fapA* clonado y sobreexpresado era capaz de restablecer el fenotipo de la cepa parental.

Los estudios de distribución poblacional mediante dot-blot utilizando una sonda específica del gen *fapA*, correlacionaron su presencia con las cepas que presentan un sistema de captación de hierro mediante amonabactina. Amplificamos y secuenciamos un fragmento interno del gen *fapA* de las cepas *A. hydrophila* AH-3, *A. veronii* bv *sobria* AH-1 y *A.*

*hydrophila* 495A2 y observamos una elevada identidad de secuencia. En los tres casos, la secuencia aminoacídica inferida obtuvo una similitud significativa con la proteína CirA de diferentes enterobacterias, receptor que en *E. coli* había sido relacionado con la internalización de la amonabactina (Rabsch y Winkelmann, 1991).

Además, los mismos autores que postularon la teoría del intercambio de ligando basándose en el receptor de amonabactina de *A. hydrophila*, la hicieron extensiva a CirA de *E. coli*. No parece ser casualidad pues, que Nikaido y Rosenberg observaran que dicho receptor fuera capaz de internalizar un rango tan amplio de conjugados de antibióticos con grupos catecolato (Nikaido y Rosenberg, 1990).

Caracterizamos también un sistema de transporte ABC dependiente de proteína periplasmática, cuyos componentes están codificados por la misma agrupación génica que codifica para la biosíntesis del sideróforo y para el receptor de membrana externa de la cepa AH-3. Todos los mutantes deficientes en alguno de los componentes de dicho sistema de transporte, *fapB*, *fapG*, *fapC*, presentaron el mismo fenotipo que el mutante *fapA*, es decir una dificultad de crecimiento en presencia del agente quelante 2-2'-dipiridil, un fenotipo sobreproductor de sideróforos en medio CAS y una pérdida de la capacidad de utilización de amonabactina y enterobactina en los respectivos estudios de bioensayo realizados. De este modo demostramos que el sistema transportador de tipo ABC interviene en la internalización de ambos sideróforos. Los componentes hidrolasa son los más conservados entre todos los transportadores de tipo ABC, y es muy probable que las características estructurales y el mecanismo de energización sea muy similar en todos los sistemas (Köster, 2001). Quizá esta sea la causa de que dicho componente fuera el único que pudo ser sustituido funcionalmente por el sistema ABC transportador de sideróforos de tipo catecolato de *E. coli*.

El gen *fapB* se transcribe a partir de una unidad transcripcional monocistrónica y es el último gen de su unidad transcripcional, descartando efectos polares de la inactivación insercional de estos locus sobre la expresión de otros genes de la agrupación.

Varios autores han evidenciado recientemente la implicación de las proteínas de resistencia a múltiples antibióticos, frecuentemente codificadas en las agrupaciones de sideróforos, como mediadores en el proceso de secreción de sideróforos. Para corroborar el papel del producto del gen *mrp* en el sistema de captación de hierro mediante sideróforos de la cepa AH-3, decidimos mutageneizar dicho gen, aunque es preciso tener en cuenta el posible efecto polar de la inserción del plásmido suicida en el locus *mrp*, sobre la expresión de otros componentes del sistema de transporte. Para verificar la intervención del locus *mrp* en el proceso de secreción de los sideróforos de la cepa AH-3, sería necesario examinar la estructura del sideróforo que dicho mutante hipersecreta al medio de cultivo. Si dicho mutante secretara

un sideróforo con la misma estructura química que la cepa parental, podríamos deducir que o bien el locus *mrp* no interviene en la secreción de dicho sideróforo o bien existe una redundancia funcional en los sistemas de secreción de sideróforos.

El análisis informático de los dominios conservados de la proteína codificada por el gen *exc* detectó un dominio característico de las proteínas que pertenecen al sistema de secreción de tipo II y III. Dada la proximidad de este locus con la agrupación génica de sideróforos de la cepa estudiada, decidimos verificar la posible implicación de este gen con el mecanismo de captación de hierro mediante sideróforos.

El mutante AH-1794 se comportó en el test de CAS del mismo modo que la cepa parental y no observamos una disminución significativa de la capacidad de crecimiento en presencia del agente quelante 2-2'-dipiridil. A partir de estos datos descartamos la intervención del producto del gen *exc* en el sistema de secreción de sideróforos de la cepa AH-3.

Por último, el mutante de *A. hydrophila* AH-3 incapaz de producir sideróforos y los mutantes de *A. hydrophila* AH-3 y *A. veronii* bv *sobria* AH-1 incapaces de captar el hierro del ferri-sideróforo secretado al medio de cultivo, se mostraron profundamente atenuados en su virulencia; evidenciando la contribución de los mecanismos de captación de hierro mediante sideróforos en el proceso infeccioso llevado a cabo por *Aeromonas* spp. Tanto la capacidad de virulencia como la capacidad de crecimiento en condiciones de limitación de hierro, son recuperadas por los mutantes cuando expresan en *trans* las copias salvajes de los genes afectados por la mutación, con lo que de nuevo se demuestra la importancia del sistema de captación de hierro mediante sideróforos en la virulencia de las cepas *A. hydrophila* AH-3 y *A. veronii* bv *sobria* AH-1.

La cepa AH-3 se mostró capaz de utilizar diversas hemoproteínas del huésped como fuente de hierro. No se observaron alteraciones en los mutantes *amlA*, *fapA*, *fapB*, *fapG* y *fapC* en la capacidad de adquisición del hierro de la hemoglobina ni del grupo hemo. Podemos afirmar que ni el sideróforo de la cepa AH-3 ni el sistema de transporte de ferri-sideróforos de la cepa AH-3 intervienen en la captación de hierro a partir de las hemoproteínas del huésped. De estos resultados se desprende la hipótesis de la presencia de un sistema de captación de hierro por contacto directo o quizás mediado por hemóforos. La independencia de ambos sistemas había sido anteriormente expuesta a partir de mutantes de *Aeromonas* spp. con alteraciones en los pasos iniciales de la biosíntesis de amonabactina y enterobactina (Massad *et al.*, 1991), y nuestro estudio los ha extendido en el sentido de demostrar que la multifuncionalidad de FapA no incluye la captación de hierro a partir de las diferentes hemoproteínas del huésped, y que el sistema ABC transportador tampoco interviene en dicho mecanismo.

**4.**

**Sistema de captación de hierro de las hemoproteínas  
del huésped  
en *A. hydrophila* AH-3.**

## Capítulo 4: Sistema de captación del hierro de las hemoproteínas del huésped en *A. hydrophila* AH-3.

### 4.1 Precedentes

El crecimiento de *A. hydrophila* AH-3 en condiciones de limitación de hierro (por ejemplo NB agar + 250  $\mu$ M de dipiridil), puede ser estimulado suplementando dicho medio con discos de papel de filtro impregnados con hemo. En el capítulo anterior de la presente memoria hemos demostrado la independencia entre el sistema de captación del hierro de la hemoglobina o del grupo hemo y el sistema de captación de hierro mediante sideróforos. Para profundizar en la naturaleza del sistema de captación de hemo como fuente de hierro, realizamos estudios de complementación con una cepa de *E. coli* cuya membrana externa es impermeable al grupo hemo.

### 4.2 Clonación del receptor de grupo hemo y hemoglobina de *A. hydrophila* AH-3

La clonación del gen que codifica para el receptor de hemo de *A. hydrophila* AH-3 se realizó en base a su habilidad de conferir a la cepa de *E. coli* EB53 la capacidad de utilizar hemo como fuente de porfirina.

La cepa de *E. coli* K-12 EB53 es un mutante *hemA* (o *gtrA*) incapaz de sintetizar hemo porque carece del enzima Glutamil-tRNA reductasa. Dicho enzima interviene en la ruta C<sub>5</sub> de biosíntesis de ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA), el precursor de la biosíntesis bacteriana de hemo (Panek y O' Brian, 2002). En consecuencia, dicho mutante no puede ensamblar correctamente los citocromos que median el proceso de respiración aeróbica y presenta una disrupción de la capacidad de crecimiento en condiciones de aerobiosis, a no ser que se suplementen las placas de LB con  $\delta$ -aminolevulínico (Eberspächer y Braun, 1980).

La membrana externa de la cepa *E. coli* K-12 es impermeable al hemo extracelular, o a su precursor protoporfirina IX, razón por la cuál el medio rico suplementado con hemo no permite el crecimiento del mutante *hemA* de *E. coli* K-12 (Stojiljkovic y Hantke, 1992).

Además, la cepa EB53 no puede biosintetizar el ácido corísmico, precursor de la biosíntesis de enterobactina, debido a una mutación *aroB*. En consecuencia, la suplementación con  $\delta$ -ALA no puede paliar las dificultades de crecimiento que esta cepa presenta en condiciones de limitación de hierro, siendo necesario un aporte externo de hierro para permitir su crecimiento en dichas condiciones (Eberspächer y Braun, 1980).

Así pues, dadas las características fenotípicas de la cepa EB53, había dos posibles procesos válidos para la clonación del gen del receptor de hemo de *A. hydrophila*.

El primero era clonarlo en base a su capacidad de utilización de hemo como fuente de hierro, seleccionando los transconjugantes en placas suplementadas con  $\delta$ -ALA, hemo y dipiridil. Este procedimiento hubiera seleccionado también los clones que complementarían la mutación *aroB*, los cuales hubieran permitido el crecimiento de la cepa EB53 en condiciones de limitación de hierro independientemente de la presencia de hemo.

El segundo procedimiento, se basa en la pérdida de impermeabilidad al hemo característica de la cepa EB53 y en la habilidad del receptor clonado de transportar el hemo al citoplasma para ser posteriormente incorporado a los apocitocromos bacterianos. Debido a que la síntesis de apocitocromos en *E. coli* no está acoplada con la biosíntesis de hemo, dicha molécula, toda vez internalizada, puede ser utilizada como fuente de porfirina (Stojiljkovic y Hantke, 1992). Aunque no se sabe con precisión si el grupo hemo se incorpora directamente a los citocromos o si previamente es necesario un proceso de degradación. Éste método de clonación podría tener como falsos positivos a los clones que contuvieran el gen *hemA* (*gtrA*) de *A. hydrophila*, los cuales conferirían a la cepa EB53 la capacidad de crecer en LB en ausencia de  $\delta$ -ALA o hemo.

Con el fin de seleccionar los clones que permitieran el transporte del grupo hemo para su posterior utilización como anillo porfirínico, transferimos mediante conjugación triparental 1200 clones de una genoteca de *A. hydrophila* AH-3 a la cepa de *E. coli* EB53. La selección se realizó en placas suplementadas únicamente con hemo y los antibióticos necesarios. La mayoría de transconjugantes formaron microcolonias, pero en tres de las conjugaciones aparecieron colonias grandes de un tamaño similar a las colonias de la cepa EB53 cuando crecía en medio suplementado con  $\delta$ -ALA.

Siendo conscientes que podríamos estar seleccionando genes que participaran en la biosíntesis del ácido  $\delta$ -amoniévulínico, en lugar de genes que participaran en el transporte del hemo, y/o posibles revertientes de la mutación *hemA* de la cepa EB53, valoramos la capacidad de los tres transconjugantes de crecimiento en LB suplementado únicamente con los antibióticos necesarios. Uno de los transconjugantes presentó graves dificultades de crecimiento en estas condiciones, y se purificó el clon que hospedaba, denominado COS-AHU, para posteriores estudios.

### 4.3 La reconstitución en *E. coli* del sistema de captación de hemo y hemoglobina de *A. hydrophila* es un proceso TonB dependiente.

A continuación, para demostrar la implicación de un receptor de membrana externa TonB dependiente en la capacidad de utilización de hemo como fuente de porfirina que había adquirido la cepa EB53 con el clon COS-AHU, movilizamos dicho clon mediante conjugación triparental a la cepa IR754, un mutante *tonB* derivado de la cepa EB53 (Stojiljkovic *et al.*, 1995).

El clon COS-AHU, que confirió a la cepa EB53 la capacidad de crecer en presencia de hemo y hemoglobina como fuente de porfirina, no tuvo el mismo efecto en la cepa IR754 (Tabla 4.1.). El hecho de que el fenotipo de complementación fuera dependiente de la presencia de la proteína TonB, aumentaba la probabilidad de que el clon COS-AHU codificara para un receptor de membrana externa relacionado con el transporte de hemo.

**Tabla 4.1. Evaluación de la capacidad de utilización de hemo y hemoglobina como fuente de porfirina mediante la técnica del bioensayo.**

Cepa indicadora	hemo	hemoglobina	$\delta$ -ALA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>E. coli</i> EB53	-	-	+	-
<i>E. coli</i> IR754	-	-	+	-
<i>E. coli</i> EB53 con COS-AHU	+	+	+	-
<i>E. coli</i> EB53 con pLA2917	-	-	+	-
<i>E. coli</i> IR754 con COS-AHU	-	-	+	-
<i>E. coli</i> IR754 con pLA2917	-	-	+	-

\*Para evaluar la utilización de hemo y la hemoglobina como fuente de porfirina realizamos el bioensayo en placas de NB suplementado con los antibióticos necesarios. -, ausencia de crecimiento; +, > de 10 mm de crecimiento alrededor del disco.

Para demostrar que el clon COS-AHU confería a la cepa EB53 la capacidad de utilizar el hemo como fuente de hierro, realizamos un bioensayo en condiciones de privación de hierro y esta vez sí, suplementamos las placas con  $\delta$ -ALA. Valoramos también la capacidad de utilización de hemoglobina como fuente de hierro. Para demostrar que el proceso de captación de hemo como fuente de hierro era también un proceso TonB dependiente, realizamos en paralelo un bioensayo utilizando la cepa IR754 como hospedadora del plásmido COS-AHU.

Los resultados del bioensayo, ilustrados en la tabla 4.2., demuestran que el clon COS-AHU contiene los genes que permiten que la cepa EB53 utilice el grupo hemo y la hemoglobina como fuente de hierro y que en este proceso interviene un receptor de membrana externa TonB dependiente.

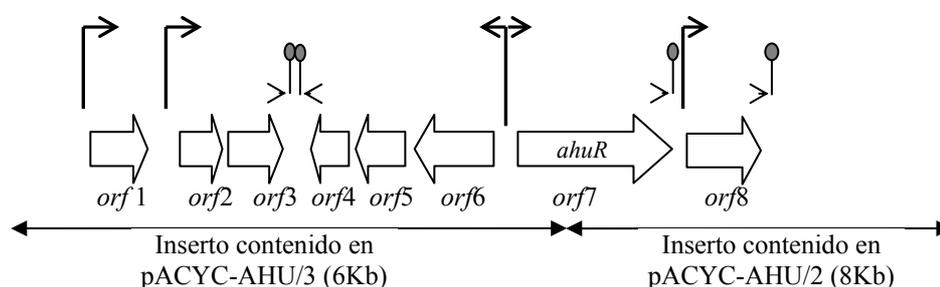
**Tabla 4.2. Evaluación de la capacidad de utilización de hemo y hemoglobina como fuente de hierro mediante la técnica del bioensayo.**

Cepa indicadora	hemo	hemoglobina	FeCl <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>E. coli</i> EB53	-	-	+	-
<i>E. coli</i> IR754	-	-	+	-
<i>E. coli</i> EB53 con COS-AHU	+	+	+	-
<i>E. coli</i> EB53 con pLA2917	-	-	+	-
<i>E. coli</i> IR754 con COS-AHU	-	-	+	-
<i>E. coli</i> IR754 con pLA2917	-	-	+	-

\* Para evaluar la captación de hemo y hemoglobina como fuente de hierro realizamos los diferentes bioensayos en placas de NB suplementadas con 2,2'-dipiridil, 37,5 µg/ml de ácido δ-aminolevulínico y los antibióticos necesarios. -, ausencia de crecimiento; +, > 10mm de crecimiento alrededor del disco.

#### 4.4 Subclonación del clon COS-AHU.

Se subclonó COS-AHU en DH5α utilizando el plásmido pACYC184. Con la enzima *Bgl*III se clonaron fragmentos de unas 8 kb, 6 kb, 4 kb y 1 kb. Ninguno de los citados subclones confirió a la cepa EB53 la capacidad de utilizar el hemo como fuente de hierro o como fuente de porfirina. La secuenciación del inserto contenido en los diferentes clones confirmó que la ausencia de complementación podría ser debida a la presencia de una diana *Bgl*III en la secuencia del gen que codifica para el presunto receptor de hemo. La secuencia de ADN se inició con los cebadores PRBF y PRBR, que hibridan a ambos lados de la diana de restricción *Bam*HI del plásmido pACYC184, lugar donde se clonaron los insertos de los respectivos subclones. Se secuenció parte del inserto de los dos clones en cuyo extremo se había detectado una secuencia con similitud en las bases de datos con diferentes receptores de membrana externa implicados en los sistemas de captación de hemo como fuente de hierro.



**Figura 4.1. Esquema de las ORFs detectadas en la región secuenciada del inserto clonado en COS-AHU de la cepa AH-3.** En el esquema también se muestran las regiones promotoras detectadas (flechas encima de las ORFs) y las putativas estructuras de finalización de la transcripción (agujas encima de las ORFs).

#### 4.5 Análisis de la secuencia nucleotídica

La secuencia nucleotídica del receptor de hemo y de su entorno en el genoma está incluida en el anexo de la presente memoria. Se analizaron todas las pautas abiertas de lectura de más de 100 nucleótidos y se detectaron ocho pautas abiertas de lectura que se han representado en la figura 4.1.

**Tabla 4.3. Principales características de las ocho ORF's detectadas en la secuencia nucleotídica, y de sus secuencias aminoacídicas deducidas.**

P.A.L.	Proteína homóloga (aa) (identidad%, similaridad%)	Posición Pauta	G+C (%) <sup>c</sup>	tamaño (aa)	P.M. <sup>a</sup> (kDa)	pI <sup>a</sup>	GRAVY <sup>b</sup>	
1	Fumarate and nitrate reduction regulatory protein Fnr, <i>V. parahaemolyticus</i> (248) (84, 92) Fnr, <i>V. cholerae</i> (250) (84, 92) Fnr, <i>V. fischeri</i> (250) (82,92)	60- 641	+3	55,5	193	21,3	8,22	-0,279
2	Putative heme iron utilization protein VV21616, <i>V. vulnificus</i> (167) (54, 72) HuvX, <i>Listonella anguillarum</i> (171) (56, 71) HutX, <i>Photobacterium damsela</i> (148) (57, 69)	791- 1303	+2	61,2	170	19,0	5,89	-0,215
3	HutZ, <i>P. damsela</i> (185) (64, 79) HugZ, <i>Plesiomonas shigelloides</i> (185) (69, 79) HuvZ, <i>L. anguillarum</i> (176) (60, 76)	1300- 1857	+1	62,9	185	20,7	5,32	-0,303
4	Proteína hitpotética Mdeg2008 <i>Microbulbifer degradans</i> (156) (25,41)	2355- 1906	-2	61,3	149	16,4	7,84	-0,458
5	BCE3002 Acetiltransferasa, <i>B. cereus</i> (359) (41,60) BCE2947 Isocorismatasa, <i>B. cereus</i> (176) (40, 62) BA_3470 Isocorismatasa, <i>B. anthracis</i> (176) (41,60)	2922- 2371	-2	62,1	183	20,2	5,20	-0,168
6	Conserved hypothetical protein VC2004, <i>V. cholerae</i> (325) (36, 52) VP2161 <i>V. parahaemolyticus</i> (315) (38,51) Iron regulated protein, VV12020 <i>V. vulnificus</i> (297) (43, 55)	3920- 2943	-3	65,3	325	35,4	6,10	-0,426
7	Putative outer membrane heme receptor, <i>A. salmonicida</i> (697) (88,92) Heme receptor, <i>P. damsela</i> (718) (29,48) HutR, <i>V. cholerae</i> (698) (29, 49)	4108- 6201	+1	60,6	697	76,7	5,12	-0,436
8	MFS permeasa BdhT, <i>A. hydrophila</i> (380) (69,75) Permeasa, <i>V. parahaemolyticus</i> (396) (38, 56) PnuD, <i>S. enterica</i> sv Typhimurium (379) (38, 56)	6388- 7620	+3	64,6	410	44,3	9,55	0,915

a: Punto isoeléctrico y peso molecular de la proteína calculado usando el programa ProtParam de ExPASy.

b: Promedio de hidrofobicidad de la proteína usando el método descrito por Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982).

c: El porcentaje de G+C de esta región está comprendido en el rango que se ha descrito para el material genético de *Aeromonas*, 57-64%.

De las ocho pautas abiertas de lectura, tres de ellas se transcriben en sentido contrario a las cinco restantes. La localización de los presuntos promotores  $\sigma 70$  y de las presuntas estructuras de finalización de la transcripción, parecen indicar que el gen que presuntamente codifica para el receptor de hemo se transcribe a partir de una unidad monocistónica. Las dos unidades transcripcionales restantes estarían formadas por la ORF2-ORF3, y por las ORF4, ORF5 y ORF6, respectivamente. Localizamos una, en ocasiones dos cajas Fur solapadas, en sentido 5' de la ORF2, de la ORF6 y de la ORF7.

### **ORF1**

El producto de traducción de la ORF1 presentó los mayores porcentajes de similitud con el regulador fumarato nitrato reductasa (Fnr) de diferentes especies del género *Vibrio*. Este regulador ha sido sucesivamente relacionado con el control de la síntesis de los citocromos que intervienen en la anaerobiosis pero no ha sido relacionado con los sistemas de captación del hierro de las hemoproteínas del huésped.

### **ORF2**

En sentido 5' de la ORF2 detectamos un putativo promotor  $\sigma 70$  precedido por dos cajas Fur solapadas, la primera de secuencia gagaatgaaagcgattatc, a 80 nucleótidos de distancia del codón de inicio de la ORF2 y con un 73'7% de similitud con la secuencia consensus de *E. coli*; y la segunda caja Fur, gaaagcgattatcaattgc, a 74 nucleótidos en sentido 5' de la metionina de inicio y con un 63'2% de similitud a la secuencia consensus de *E. coli*. Detectamos también una secuencia Shine-Dalgarno (GGAG) que finaliza seis nucleótidos en sentido 5' al codón de inicio de traducción de la ORF2.

La proteína de 170 aminoácidos codificada por la ORF2 presentó similitud con el componente X de los sistemas de captación de hemo de *Listonella anguillarum* (Mazoy *et al.*, 2003), de *P. shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001), de *S. dysenteriae* (Wyckoff *et al.*, 1998). Todos estos componentes X, pertenecen a una familia de proteínas de función desconocida (PFAM 06228, DUF 1008), y frecuentemente están codificados por las agrupaciones génicas de los sistemas de captación de hemo a través de la interacción directa con un receptor de membrana externa.

El producto de los genes *hugWXZ* se mostró imprescindible para la reconstitución en *E. coli* del sistema de utilización de hemo como fuente de hierro de *P. shigelloides* y se relacionó dicha dependencia con la supuesta intervención de las citadas proteínas en los mecanismos de prevención a la toxicidad del grupo hemo. Esta dependencia no se hizo evidente cuando el hemo era utilizado como fuente de porfirina (Henderson *et al.*, 2001).

**ORF3**

El solapamiento del codón de terminación de la ORF2 y del codón de inicio de traducción de la ORF3, parece indicar que ambos genes se transcriben a partir de la misma unidad transcripcional, presuntamente regulada por Fur. La secuencia de 185 aminoácidos inferida a partir de la ORF3 presentó similitud en las bases de datos con el componente Z de diferentes sistemas de utilización de hemo como fuente de hierro, entre ellos HugZ de *P. shigelloides* (Henderson *et al.*, 2001) y HuvZ de *L. anguillarum* (Mazoy *et al.*, 2003). Del mismo modo que el componente X, se desconoce la función del componente Z, aunque se piensa que está relacionada con la utilización de hemo. Los aminoácidos 12-104 de la ORF3, se alinearon adecuadamente con proteínas con actividad 5'-fosfato piridoxamina oxidasas, involucradas en la biosíntesis de vitamina B6 y del piridoxal fostato (PF01243). Se localizó un terminador Rho-independiente a 25 nucleótidos en sentido 3' del codón final de lectura de la ORF3.

**ORF4**

La corta distancia intergénica entre la ORF4 y la ORF5, junto con la ausencia de estructuras de terminación de la transcripción, parecen indicar que ambas pautas abiertas de lectura forman parte de la misma unidad transcripcional.

La proteína de 149 aminoácidos codificada por la ORF4 no presentó similitud significativa con ninguna de las proteínas de las bases de datos. Se detectó un sitio de corte para la peptidasa señal de lipoproteínas (PS II) entre los aminoácidos 26 y 27 y el aminoácido S en la posición +2 después del sitio de corte (PS00013).

**ORF5**

No se detectó ninguna región promotora en sentido 5' de la ORF5, pero si se detectó una secuencia similar a la Shine-Dalgarno (TCCTTA) que finaliza siete nucleótidos en sentido 5' del codón inicio de traducción de la ORF5. El producto de traducción inferido a partir de la ORF5 presentó similitud con diferentes proteínas de función desconocida, pero todas ellas pertenecientes a la familia de proteínas con actividad isocorismatasa (PF00857). Los porcentajes de similitud más elevados se obtuvieron con isocorismatasas del género *Bacillus*.

**ORF6**

La ORF6 está precedida por un presunto promotor  $\sigma 70$ , en cuya caja -35 se solaparon dos regiones similares a la caja Fur de *E. coli*. La región cggaaatcattctcattttc tiene un 63'2 % de similitud con la caja Fur de *E. coli* y, finaliza 95 nucleótidos en sentido 5' del inicio de traducción de la ORF6; la segunda región aataaacggaatcattctc, con un 68'4% de similitud a la caja Fur de *E. coli*, finaliza 101 nucleótidos en sentido 5' del inicio de traducción. El producto

de traducción de la ORF6 presentó los mayores porcentajes de similitud en las bases de datos con diferentes proteínas de función desconocida producidas por especies del género *Vibrio*. Todas ellas, incluida la ORF6, presentaron un dominio conservado PhuW (COG3016) y se alinearon correctamente con las proteínas que pertenecen a las familias PF04187 y DUF399. Se detectó un sitio de corte para la peptidasa señal de lipoproteínas (PS II) entre los aminoácidos 16 y 17 de la proteína codificada por la ORF6 (PS00013).

### **ORF7-*ahuR***

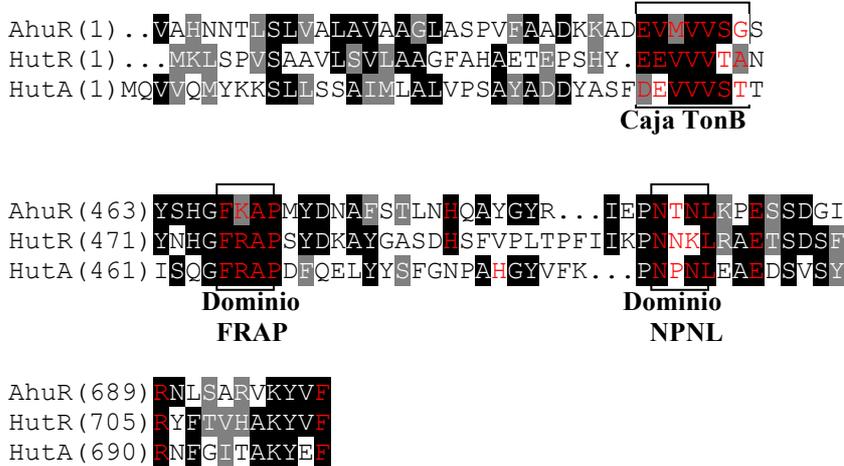
La ORF7 está precedida por una putativa región promotora  $\sigma 70$  dependiente, cerca de la cuál se solapan dos cajas Fur. La primera, con secuencia gaaaatgagaatgattccg (68'4% de similitud a la consensus establecida), se localiza a 73 nucleótidos en sentido 5' del codón de iniciación, y la segunda, gagaatgattccggtttatt con un 63'2% de similitud a la consensus, se sitúa 67 nucleótidos delante del codón de iniciación.

El producto de traducción de la ORF7 presentó similitud con receptores TonB dependientes que intervienen en el transporte de hemo, como por ejemplo, HupA de *A. salmonicida*, 92% identidad (Ebanks *et al.*, 2004); HutR de *V. cholerae*, 28% identidad (Mey y Payne, 2001); HutA de *V. cholerae*, 29% identidad (Henderson y Payne, 1994); HupA de *V. vulnificus*, 29% identidad (Litwin y Byrne, 1998); ChuA de *E. coli* O157:H7, 24% identidad; y ShuA de *S. dysenteriae*, 24% identidad (Wyckoff *et al.*, 1998). En concordancia, el producto de traducción de la ORF7, pertenece a la familia de receptores TonB dependientes (PF00593) relacionados con el transporte de hemo/hemoglobina (TIGR01785).

Se detectó un péptido señal compuesto por los primeros 24 aminoácidos del extremo amino-terminal, en consonancia con la probable exportación de AhuR a la membrana externa, el punto de corte para la peptidasa señal I está entre los aminoácidos 24 y 25. La proteína madura de 673 aminoácidos tendría un pM de 74,5 kDa y un punto isoeléctrico de 5,08. El análisis de la secuencia reveló que dicha proteína reúne muchas de las características conservadas de los receptores TonB dependientes, incluida una región EVMVVS GS (aminoácidos 31-38 de la proteína no procesada), con similitud a la secuencia consensus de la Caja TonB, (D/E)TxxVxA(A/S), donde la x es un aminoácido variable (Lundrigan y Kadner, 1986). La homología significativa con los receptores TonB dependientes también fue detectada en el extremo carboxilo-terminal de AhuR: se cree que el residuo de fenilalanina terminal es necesario para la adecuada incorporación a la membrana externa, del mismo modo que la arginina invariante en la posición 11 a partir del extremo carboxilo-terminal, figura 4.2. (Struyve *et al.*, 1991).

Además, el producto de traducción de la ORF7 también presenta los dominios conservados entre la mayoría de receptores de membrana externa específicos para el hemo y

hemoglobina, incluyendo dos regiones con homología parcial a la caja FRAP y a la caja NPNL (figura 4.2.). AhuR también presenta uno de los dos glutámicos conservados en el extremo carboxilo-terminal de la capa NPNL y una de las dos histidinas importantes en *Y. enterocolitica* para la unión específica del hemo (Bracken *et al.*, 1999).



**Fig 4.2. Alineamiento de AhuR, HutR** (*V. cholerae*, número acceso AAF95978) y **HutA** (*V. cholerae*, número acceso AAF96478). Los números hacen referencia a la posición del aminoácido de la proteína no procesada. La flecha indica el putativo sitio de AhuR reconocido por la peptidasa señal I. Los residuos conservados están marcados por cajas negras y los residuos similares por cajas grises. La caja TonB y los dominios conservados FRAP y NPNL están enmarcados. También se ha destacado la histidina y el glutámico conservados en los receptores de hemo.

## ORF8

La ORF8 está precedida por presunto promotor  $\sigma 70$ , la proteína de 410 aminoácidos codificada por dicha ORF presentó similitud en las bases de datos con permeasas de la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*), como por ejemplo BdHT de *A. hydrophila* (69% identidad) cuya putativa actividad transportadora parece estar asociada a una butanol deshidrogenasa llamada BdHA; PnuD de *S. enterica* sv Typhimurium (38% identidad) y HcaT de *E. coli* (37% identidad), un putativo transportador de ácido 3-fenilpropiónico, un compuesto derivado de la putrefacción de proteínas en ambientes terrestres o de la degradación de la lignina (Díaz *et al.*, 1998).

El estudio de la secuencia aminoacídica permitió detectar doce segmentos transmembrana (aminoácidos 37-59, 69-88, 95-117, 121-143, 163-185, 189-211, 235-257, 267-284, 296-313, 318-340, 352-374 y 378-400). La proteína presentó una elevada probabilidad de estar localizada en la membrana citoplasmática.

#### 4.6 Obtención de un mutante de *A. hydrophila* AH-3 incapaz de utilizar hemo y hemoglobina como fuente de hierro.

Con la finalidad de demostrar la especificidad de sustrato del receptor AhuR de *A. hydrophila* AH-3, y determinar la posible redundancia funcional de los sistemas de captación de hemo y hemoglobina de dicha cepa, inactivamos el locus *ahuR* mediante la inserción de un plásmido suicida por recombinación en un punto. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento interno del gen *ahuR* están detallados en el apartado 2.3. de Material y Métodos y la metodología empleada para la construcción del mutante es la descrita en el apartado 2.13.13.2 de Material y Métodos.

Evaluamos la capacidad de captación del hierro del hemo y la hemoglobina mediante la técnica del bioensayo. El transconjugante resistente a la kanamicina y a la rifampicina se mostró incapaz de utilizar hemo y hemoglobina como fuente de hierro, a diferencia de la cepa parental, para revertir las condiciones de limitación de hierro (tabla 4.4.). Pero no pudimos relacionar estas alteraciones con la carencia de ninguna de las proteínas de elevado peso molecular características de la cepa parental en condiciones de limitación de hierro (no se muestran resultados).

**Tabla 4.4. Evaluación de la capacidad de utilización de hemo y hemoglobina como fuente de hierro mediante la técnica del bioensayo.**

Cepa indicadora	hemo	hemoglobina	FeCl <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>A. hydrophila</i> AH-3	+	+	+	-
AH-1795 ( <i>ahuR</i> )	-	-	+	-
AH-1795+COS-AHU	+	+	+	-
AH-1795+pLA2917	-	-	+	-

\* Para evaluar la captación de hemo y hemoglobina como fuente de hierro realizamos los diferentes bioensayos en placas de NB dipiridil suplementadas con los antibióticos necesarios. -, ausencia de crecimiento; +, > 10mm de crecimiento alrededor del disco.

#### 4.7 Estudio de la presencia del gen *ahuR* en diferentes serotipos de *Aeromonas* mesófilas.

Diversos estudios sugieren que las proteínas de membrana externa reguladas por hierro ofrecen inmunoprotección profiláctica, sugiriendo que son inmunogénicas y que ofrecen protección heteróloga. Por lo tanto, las proteínas más ampliamente distribuidas entre los diferentes serotipos son mejores candidatas para ensayar una vacuna, puesto que podrían conferir protección frente a un amplio rango de serotipos distintos.

En este sentido, se estudió la presencia del gen que codifica para la proteína AhuR en diferentes especies de *Aeromonas* mesófilas mediante la técnica de la transferencia de puntos (*dot blot*). El estudio de distribución poblacional se realizó con un panel de 30 cepas de *Aeromonas* mesófilas, siete de las cuales eran productoras de amonabactina y tres productoras de enterobactina.

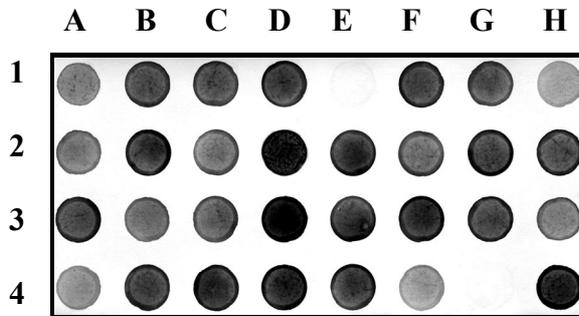


Figura 4.3. Determinación de la presencia del gen *ahuR* en distintas cepas de *Aeromonas*, mediante la técnica de la transferencia de puntos (*dot-blot*) en condiciones de alta estringencia. La posición G4 es el control negativo en la que se fijó una gota de agua y la posición H4 es el control positivo (AH-3).

Detectamos el gen *ahuR* en 29 de la 30 cepas de *Aeromonas* spp. analizadas, independientemente del tipo de sideróforo producido. Estos resultados sugieren la existencia en las cepas de *Aeromonas* mesófilas estudiadas, de un sistema de captación del hierro de la hemoglobina y del hemo relacionado con el caracterizado en la cepa de *A. hydrophila* AH-3.

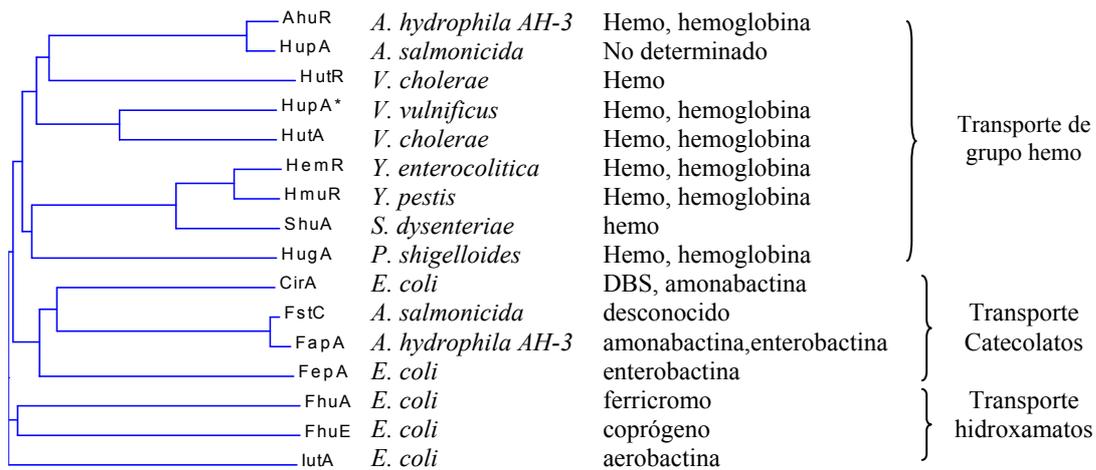
## Discusión

Aislamos un clon que codificaba para un gen presuntamente regulado por Fur, cuyo producto presentó un elevado porcentaje de similitud con diferentes receptores de hemo del género *Vibrio*, mediante estudios de complementación de un mutante de *E. coli* defectivo en la biosíntesis de porfirina. El mutante de *E. coli* *hemA aroB* que hospedaba el plásmido COS-AHU, se mostró capaz de utilizar la hemoglobina y el hemo suplementados exógenamente como fuente de hierro y como fuente de porfirina.

Innumerables estudios coinciden en la necesidad de la disociación del hemo de las hemoproteínas a nivel de superficie celular para que este sea utilizado como fuente de hierro y/o como fuente de porfirina. Subsiguientemente, el hemo puede ser transportado al interior celular o de forma alternativa, puede producirse la extracción del hierro del hemo a nivel de superficie celular y el posterior transporte del hierro liberado. En este sentido, el receptor AhuR media la internalización de la molécula de hemo a citoplasma, tal y como se deduce del hecho de que dicho receptor fuera capaz de mediar la utilización de la hemoglobina y del hemo como fuente de porfirina en la cepa de *E. coli* EB53.

En bacterias Gram-negativas, incluida *A. hydrophila*, los ferri-sideróforos y el grupo hemo, son transportados activamente al interior celular mediante receptores de membrana externa ligando específicos (Van der Helm, 1998). Las proteínas TonB ExbB ExbD intervienen en este proceso transduciendo la energía producida por la membrana interna hacia los receptores de membrana externa, para que el proceso de translocación de sustrato pueda tener lugar. El dominio amino-terminal caja TonB ha sido sucesivamente implicado en este proceso. Se detectó una caja TonB bien conservada en el extremo amino-terminal de la proteína codificada por *ahuR* (aminoácidos 31-38 de la proteína no procesada). La caja TonB de AhuR es idéntica a la del putativo receptor de hemo de *A. salmonicida* y comparte cuatro de los siete aminoácidos de la caja TonB de FapA de *A. hydrophila* AH-3. La dependencia de TonB del receptor AhuR se sustenta además en la elevada similitud a nivel de estructura primaria del receptor AhuR con varios receptores TonB-dependientes de diferentes bacterias Gram-negativas (figura 4.4.). Por último, el transporte de hemo mediado por AhuR (codificado en el inserto del clon COS-AHU) fue dependiente en *E. coli* de la presencia de una proteína TonB funcional.

A



B

AhuR	(31)	EVMVSGS
HupA	(31)	EVMVSGS
HutR	(29)	EEVVITAN
HutA	(28)	DEVVSTT
HupA*	(28)	DEVVVSAT
HemR	(44)	DTMVVTAT
HmuR	(44)	DTMVVTAT
ShuA	(32)	ETMTVTAT
HugA	(58)	NEVLVTAT
CirA	(58)	ETMVVTAS
FstC	(35)	ETMVVTAT
FapA	(35)	ETMVVTAT
FepA	(34)	DTLVVTAA
IutA	(31)	ETTFVVSAN

**Figura 4.4.** A/ **Árbol filogenético hipotético derivado de la similitud entre las secuencias aminoacídicas de diferentes receptores TonB dependientes.** El alineamiento se realizó utilizando la aplicación AlignX del programa informático Vector NTI 8.0 (Informax, Inc.) que se basa en el algoritmo Clustal W y para la elaboración del árbol filogenético utiliza el Algoritmo NJ de Saitou y Nei, 1987. B/ **Alineamiento correspondiente a la caja TonB de diferentes receptores TonB dependientes.** Hup A (número acceso AAS13462, Ebanks *et al.*, 2004); HutR (AAF95978, Mey y Payne, 2001), HupA\* (BAC15762, Litwyn y Byrne, 1998); HutA (AAF96478, Henderson y Payne, 1994), HemR (P31499, Stojiljkovic y Hantke, 1992); HmuR (Q56989, Thompson *et al.*, 1999), ShuA (AAC27809, Mills y Payne, 1995); HugA (AAG23395, Henderson *et al.*, 2001); CirA (P17315, Griggs *et al.*, 1987); FepA (P05825); FhuA (AAC73261); FhuE (AAC74186); IutA (AAS66997).

La inactivación insercional del gen *ahuR* de *A. hydrophila* tuvo como consecuencia una disrupción de la capacidad de utilización de hemo y hemoglobina como fuente de hierro. Nuestros resultados indican que no existe una redundancia funcional en los sistemas de captación del hierro de la hemoglobina y del hemo en *A. hydrophila*, a pesar que la presencia de múltiples receptores de hemo y hemoglobina no sea extraña en bacterias patógenas, como por ejemplo *Pasteurella multocida* (Bosch *et al.*, 2002) y *V. cholerae* (Mey y Payne, 2001). Desconocemos las razones por las cuales la incapacidad de utilización de hemo y hemoglobina del mutante *ahuR*, no pudo ser correlacionada con el déficit de ninguna de las dos proteínas de membrana externa que la cepa parental expresa *in vitro* en condiciones de privación de hierro. Aunque cabe decir que el mutante de *V. cholerae* deficiente en HutR, una de las proteínas en las bases de datos más similares a AhuR, tampoco presentó alteraciones en el patrón

electroforético de proteínas de membrana externa extraídas de células crecidas en condiciones de privación de hierro (Mey y Payne, 2001).

Muchos receptores de hemo bacterianos están codificados por agrupaciones génicas dedicadas al transporte de hemo (Genco y Dixon, 2001), pero no podemos presentar evidencias de que las demás ORFs caracterizadas en este estudio participen en el transporte o mecanismo de adquisición de hemo. De todas formas, la función de estos genes podría no tener relación alguna con la adquisición de hierro, a pesar de que parecen estar reguladas por las condiciones de limitación de hierro y en algunos casos, como por ejemplo la ORF2 y la ORF3, frecuentemente presentes en las agrupaciones génicas dedicadas al transporte de hemo. Generalmente las agrupaciones génicas que codifican para el receptor de hemo, codifican también para el sistema transportador ABC dependiente encargado de mediar su internalización hacia citoplasma y en ocasiones también se han detectado los genes que codifican para el complejo TonBExbBExbD (Occhino *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 2001). Nosotros no detectamos la presencia de ninguno de estos genes en la secuencia estudiada, de modo que el sistema de captación de hierro del hemo en *A. hydrophila* AH-3 está codificada como mínimo en dos agrupaciones génicas distintas.

La habilidad de utilizar los reservorios de hemo del huésped ha sido relacionada con la virulencia en varios patógenos humanos, incluyendo *N. meningitidis* (Stojiljkovic 1995), y los auxótrofos de hemo *H. influenzae* (Jarosik 94) y *H. ducreyi* (Stevens, 1996). La capacidad de captar hierro del hemo y de la hemoglobina es una característica casi universal entre las diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas, independientemente del tipo de sideróforo producido y a pesar de no tener un requerimiento absoluto para el hemo exógeno (Massad *et al.*, 1991). El gen *ahuR* de *A. hydrophila* fue detectado en todas las cepas de *Aeromonas* mesófilas estudiadas, independientemente del tipo de sideróforo producido y a pesar del elevado grado de heterogeneidad de secuencias génicas de *Aeromonas*. El mutante de *A. hydrophila* AH-3 incapaz de utilizar hemo y hemoglobina como fuente de hierro, no mostró afectada su capacidad de crecimiento en presencia del agente quelante de hierro 2,2'-dipiridil, en concordancia con la presencia de un sistema funcional de captación de hierro mediante sideróforos. Probablemente, la contribución a la virulencia de estos dos sistemas de captación de hierro oscila durante las diferentes etapas del proceso infeccioso.

La producción de amonabactina ha sido relacionada en varias ocasiones con la capacidad de captación del hierro de la transferrina (Stinzti y Raymond, 2000; Massad *et al.*, 1991). Ante las presentes observaciones no sería de extrañar que el sistema de captación de hierro mediante amonabactina fuera crucial en la etapa septicémica del proceso infeccioso. Pero la habilidad de captar el hierro del hemo también es importante en la etapa septicémica

de la infección, porque durante la infección, la respuesta hipoferranémica disminuye la cantidad total de hierro unido a la transferrina hasta en un 70%. El grupo hemo derivado de la hemoglobina intracelular del huésped es el principal reservorio de hierro en células mamíferas y se convierte en disponible como fuente de hierro después de la lisis de eritrocitos. En este contexto, no es sorprendente que se haya evidenciado la actividad hemolítica de *A. hydrophila* AH-3, de otras cepas del serogrupo O:34 (Merino *et al.*, 1992; Merino *et al.*, 1995), así como la elevada prevalencia de la actividad  $\beta$ -hemolítica en las cepas clínicas de *Aeromonas* (Chacón *et al.*, 2003). La haptoglobulina, un bacteriostático natural debido a su capacidad de unir y transportar hemoglobina al hígado, es una pobre defensa contra muchas de las cepas de *Aeromonas* mésofilas, porque estas bacterias pueden utilizar los complejos de haptoglobulina-hemoglobina como fuente de hierro (Massad *et al.*, 1991).

La lisis de las células del huésped libera hemoproteínas y hierro. Las hemoproteínas pueden ser degradadas por las proteasas bacterianas y el hierro puede ser capturado por los sideróforos. Quizás ésta sea una de las razones por la cual la fosfolipasa C, con actividad citotóxica, se mostró un importante factor de patogenicidad de la cepa AH-3 (Merino *et al.*, 1999).

El sistema de captación de hemo podría ser muy importante cuando las bacterias crecen en superficies de mucosas, porque allí hay una gran cantidad de hemo debido a la descamación de las células epiteliales, y en estos sitios los sistemas de retención de hemo del huésped no son muy eficientes. Se ha demostrado además que las cepas productoras de amonabactina pueden capturar el hierro de la lactoferrina, frecuentemente asociada a mucosas, mediante un mecanismo sideróforo dependiente (Stintzi y Raymond, 2000).

Por último, la habilidad de captar el hemo liberado y acumular hierro antes de abandonar el huésped puede ayudar en la supervivencia del patógeno en el ambiente externo y por lo tanto aumentar la probabilidad de ganar acceso a un nuevo huésped. El sistema de captación de hierro mediante sideróforos contribuye también a la habilidad de supervivencia en el ambiente.

## **5. CONCLUSIONES**

- El sistema de captación de hierro de elevada afinidad es un importante factor de virulencia de *A. hydrophila* AH-3 y de *A. veronii* bv *sobria* AH-1.
- La técnica del bioensayo con las cepas indicadoras *A. hydrophila*::*amoA* y *E. coli* *entC*, es un buen método para diferenciar la producción de enterobactina o de amonabactina, y permite determinar presuntivamente el sideróforo producido por *Aeromonas*.
- La agrupación génica relacionada con la captación de hierro de elevada afinidad en *A. hydrophila* AH-3 es la responsable de la biosíntesis y transporte de un sideróforo estructuralmente similar a la amonabactina y consta de catorce genes entre los cuales se localizan genes que codifican para la biosíntesis del ácido dihidroxidobenzoico (genes *amlABC*), genes que codifican para una sintetasa de péptidos no ribosomales (genes *amlDEFGHB*), para un receptor de ferri-sideróforos de membrana externa (denominado *fapA*), para un sistema transportador ABC dependiente de proteína periplasmática (genes *fapBDGC*) y para un putativo componente del sistema de secreción de sideróforos (*gen mrp*).
- La predicción de la funcionalidad de la sintetasa de péptidos no ribosomales de la cepa *A. hydrophila* AH-3 a partir de su composición en dominios catalíticos, concuerda con las actividades catalíticas necesarias para la formación de amonabactina. A destacar, la presencia de un dominio de epimerización y la presencia de dominios de adenilación específicos para la activación de L-Lisina, L-aminoácido aromático (L-triptófano o L-fenilalanina) y L-glicina.
- Se observó una relación entre la presencia de los genes *amlF*, *amlH* y *fapA* y el sistema de captación de hierro en cepas de *Aeromonas* mesófilas cuyo sideróforo había sido caracterizado como amonabactina mediante la técnica del bioensayo.
- FapA, el receptor del sideróforo producido por la cepa *A. hydrophila* AH-3, es una proteína de membrana externa cuya expresión está regulada *in vitro* por las condiciones de limitación de hierro, que interviene además en la captación del hierro de la ferri-amonabactina y de la ferri-enterobactina, siendo un importante factor de virulencia de dicha cepa.
- Los estudios de inmunoensayo con anticuerpos policlonales contra FapA detectaron específicamente dicha proteína en la membrana externa de todas las cepas de *Aeromonas* productoras de amonabactina analizadas, así como en algunas de las cepas de *Aeromonas* productoras de un sideróforo desconocido, pero no se observó reacción alguna con las cepas productoras de enterobactina.
- El sistema transportador de sideróforos ABC dependiente de proteína periplasmática de *A. hydrophila* AH-3, codificado por los genes *fapB* y *fapDGC*, interviene en la captación del hierro del sideróforo secretado por *A. hydrophila* AH-3, de la ferri-amonabactina y de la ferri-

enterobactina. Los mutantes deficientes en alguno de los componentes del sistema transportador de sideróforos, presentan un fenotipo deficiente en el transporte de sideróforos y un aumento notable de los niveles de producción de los mismos, como efecto secundario al déficit nutricional de hierro al que se hallan sometidos.

- El mecanismo de captación de hierro de elevada afinidad no interviene en la utilización de compuestos que presentan grupo hemo como fuente de hierro.
- El gen *ahuR* está ampliamente distribuido en *Aeromonas* mesófilas, igual que la capacidad de utilización del grupo hemo y hemoglobina como fuente de hierro. AhuR es una proteína con elevada similitud con diversos receptores TonB dependientes, cuya funcionalidad es imprescindible para la utilización del grupo hemo y de la hemoglobina como fuente de hierro en *A. hydrophila* AH-3.
- La reconstitución en *E. coli* del sistema de utilización del grupo hemo y de la hemoglobina como fuente de hierro y como fuente de porfirina, mediada por el gen *ahuR* y su entorno en el genoma, es un proceso TonB dependiente.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- **Albrecht-Gary, A. M., and A.L. Crumbliss.** 1998. Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release. *Met Ions Biol Syst* **35**:239-316.
- **Abrami L., M. Firaz, E. Decroly, N. Seidah, J. Jean and G. Thomas.** 1998. The pore forming toxin aerolisyn is activated by furin. *J Bio Chem* **271**:32656-32661.
- **Aguilar A., S. Merino, X. Rubires, and J. M. Tomás.** 1997. Influence of osmolarity on lipopolysaccharide and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37°C. *Infect Immun* **65**:1245-1250.
- **Allen L. N. and R. S. Hanson.** 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.
- **Altschul S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Bacteriol* **215**:403-410.
- **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.
- **Ames G. F. L., E. N. Spudich and H. Nikaido.** 1974. Protein composition of outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **117**:406-416.
- **Andrews, S.C., A.C. Robinson and F. Rodríguez-Quiñones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215-237.
- **Arnou, L. E.** 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J Biol Chem* **118**:531-537.
- **Baichoo, N., and J. Helmann.** 2002. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**:5826-32.
- **Baker H. M., B. F. Anderson and E. N. Baker.** 2003. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:3579-3583.
- **Barghouthi, S., R. Young, M. Olson, J. Arceneaux, L. Clem and B. Byers.** 1989. Amonabactin, a novel tryptophan- or phenylalanine-containing phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol* **171**:1811-1816.
- **Barghouthi, S., S. Payne, J. Arceneaux and B. Byers.** 1991. Cloning, mutagenesis, and nucleotide sequence of a siderophore biosynthetic gene (*amoA*) from *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol* **173**:5121-5128.

- **Becker, J. E., R. E. Moore and B. S. Moore.** 2004. Cloning, sequencing and biochemical characterization of the nostocyclopeptide biosynthetic gene cluster: molecular basis for imine macrocyclization. *Gene* **325**:35-42.
- **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-1523.
- **Boos, W., and J. M. Lucht.** 1996. Periplasmic binding protein-dependent ABC transporters. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, Vol 1. Neidhardt, F.C., Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., *et al.* (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp.1175-1199.
- **Borrell, N., S.G. Acinas, M.-J. Figueras and A. J. Martínez-Murcia.** 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J Clin Microbiol* **35**:1671-1674.
- **Bosch, M., M. E. Garrido, M. Llagostera, A. M. Pérez de Rozas, I. Badiola and J. Barbé.** 2002. Characterization of the *Pasteurella multocida hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infect Immun* **70**:5955-5964.
- **Boukhalfa, H., and A. Crumbliss.** 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Bio Metals* **15**:325-339.
- **Bracken, C., M. Baer, A. Abdur-Rashid, W. Helms and I. Stojiljkovic.** 1999. Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *J Bacteriol* **181**:6063-6072.
- **Braun, M., F. Endriss, H. Killmann and V. Braun.** 2003. In Vivo reconstitution of the FhuA transport protein of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **185**:5508-5518.
- **Braun, V., K. Hantke and W. Köster.** 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics and regulation. *Met Ions Biol Syst* **35**:67-145.
- **Braun, V.** 1999. Active transport of siderophore-mimicking antibacterials across the outer membrane. *Drug Res Updates* **2**:363-369.
- **Braun, V. and M. Braun.** 2002. Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **529**:78-85.
- **Bruckner D. A., P. Colonna and B. L. Bearson.** 1999. Nomenclature for aerobic and facultative bacteria. *Clin Infect Dis* **29**:713-723.
- **Buchanan, S., B. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm and J. Deisenhofer.** 1999. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**:56-63.

- **Byers B. R., and J. E. L. Arceneaux.** 1994. Iron acquisition and virulence of the bacterial genus *Aeromonas*. In J. A. Manthey, D. E. Crowley, and D. G. Luster (ed.), *Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.
- **Byers B. R., and J. E. L. Arceneaux.** 1998. Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms. *Met Ions Biol Syst* **35**:38-66.
- **Chacón M. R., M. -J. Figueras, G. Castro-Escarpulli, L. Soler and J. Guarro.** 2003. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**:269-278.
- **Challis, G., J. Ravel and C. Townsend.** 2000. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* **7**:211-224.
- **Chang, A. C., and S. N. Cohen.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**:1141-1156.
- **Chasteen, N. D.** 1998. Ferritin. Uptake, storage and release of iron. *Met Ions Biol Syst* **35**:480-505.
- **Chenault, S., and C. F. Earhart.** 1991. Organization of genes encoding membrane proteins of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease. *Mol Microbiol* **5**:1405-1413.
- **Chopra, A. K., and C. W. Houston.** 1999. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microb Infect* **1**:1129-1137.
- **Clarke, T.E., L. W. Tari and H. J. Vogel.** 2001. Structural biology of bacterial iron uptake systems. *Curr Top Med Chem* **1**:7-30.
- **Collins, M. D., A. J. Martínez-Murcia and J. Cai.** 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., M. T. McDonell and J. De Ley.** 1986. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* **36**:473-477.
- **Cornelissen, C.N., and P.F. Sparling.** 1994. Identification of receptor-mediated transferrin-iron uptake mechanism in *Neisseria gonorrhoeae*. *Methods Enzymol* **235**:356-363.
- **Crosa, J.** 1980. A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature* **284**:566-568.
- **Crosa, J.** 1997. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:319-336.

- **Crosa, J. and C. Walsh.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:223-49.
- **Dale, S. E., A. Doherty-Kirby, G. Lajoie and D. E. Heinrichs.** 2004. Role of siderophore biosynthesis in virulence of *Staphylococcus aureus*: identification and characterization of genes involved in production of a siderophore. *Infect Immun* **72**:29-37.
- **De Lorenzo, V., M. Herrero, F. Giovannini and J. Neilands.** 1988. Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of fur gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **173**:537-46.
- **De Lorenzo, V., M. Herreo, U. Jakubkiz and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative Eubacteria. *J Bacteriol* **172**:6568-6572.
- **Díaz, E., A. Fernández and J. L. García.** 1998. Characterization of the *hca* cluster encoding the dioxigenolytic pathway for initial catabolism of 3-phenylpropionic acid in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **180**:2915-2923.
- **Ditta G., T. Schmidhauser, E. Yakobson, P. Lu, X-W. Liang, D. R. Finlay, D. Guiney, D. R. Helinski.** 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. G., and T. J. Trust.** 1988. Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* virulent for fish: identification of an S-layer protein. *J Bacteriol* **170**:499-506.
- **Dower J. W., J. F. Miller and C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformants of *E. coli* by high voltage electroporation. *Research* **16**:6127-6145.
- **Earhart, C. F.** 1996. Uptake and metabolism of iron and molybdenum. In *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology, Vol 1. Neidhardt, F.C., Curtiss, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., *et al.* (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 1075-1090.
- **Ebanks, R. O., A. Dacanay, M. Goguen, D. M. Pinto and N. W. Ross.** 2004. Differential proteomic analysis of *Aeromonas salmonicida* outer membrane proteins in response to low iron and *in vivo* growth conditions. *Proteomics* **4**:1074-1085.
- **Eberspächer, B., and V. Braun.** 1980. The involvement of cytochromes in the uptake of ferrichrome by *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* **7**:61-64.
- **Escolar, L., J. Pérez-Martín and V. de Lorenzo.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**:6223-6229.

- **Esteve, C., M. C. Gutiérrez and A. Ventosa.** 1995. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int J Syst Bacteriol* **45**:462-466.
- **Fairbanks, G., T. L. Sleek and D. W. Wallach.** 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem* **10**:2606-2617.
- **Faraldo-Gómez, J., and M. Sansom.** 2003. Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:105-116.
- **Farnaud S., and R.W. Evans.** 2003. Lactoferrin- a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* **40**:395-405.
- **Ferguson, A. D., E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs and W. Welte.** 1998. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**:2215-2220.
- **Figueras, M. -J., J. Guarro and A. J. Martínez-Murcia.**2000a. Clinically relevant *Aeromonas* species. *Clin Infect Dis* **30**:988-989.
- **Figueras M. -J., L. Soler, M. R. Chacón, J. Guarro and A. J. Martínez-Murcia.** 2000b. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp, by 16S rRNA RFLP analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**:2069-2073.
- **Filip C., G. Fletcher, J. L. Wulff and C. F. Earhart.** 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium lauryl sarcosinate. *J Bacteriol* **115**:715-722.
- **Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:136-169.
- **Furrer, J., D. Sanders, I. Hook-Barnard and M. McIntosh.** 2002. Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Mol Microbiol* **44**:1225-34.
- **Gardy, J. L., C. Spencer, K. Wang, M. Ester, G. E. Tusnády, I. Simon, S. Hua, K. deFays, C. Lambert, K. Nakai and F. S. L. Brinkman.** 2003. PSORT-B: improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res* **31**:3613-3617.
- **Garrote, A., R. Bonet, S. Merino, M. D. Simon-Pujol and F. Congregado.** 1992. Occurrence of a capsule in *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol Lett* **74**:127-131.
- **Gavín, R., A. A. Rabaan, S. Merino, J. M. Tomás, I. Gryllos and J. G. Shaw.** 2002. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol Microbiol* **43**: 383-397.

- **Genco, C. A., and D. W. Dixon.** 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* **39**:1-11.
- **Griggs, D., B. Tharp and J. Konisky.** 1987. Cloning and promoter identification of the iron-regulated *cir* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**:5343-5352.
- **Guerinot, M.L.** 1994. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* **48**:743-772.
- **Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol* **166**:557-580.
- **Hantke, K.** 1990. Dihydroxybenzoylserine--a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* **55**:5-8.
- **Hantke, K.** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**:172-177.
- **Hantke, K.** 2003. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol* **11**:192-195.
- **Henderson, D., and S. Payne.** 1994. Characterization of the *Vibrio cholerae* outer membrane heme transport protein HutA: sequence of the gene, regulation of expression, and homology to the family of TonB-dependent proteins. *J Bacteriol* **176**:3269-3277.
- **Henderson, D. P., E. E. Wyckoff, C. E. Rashidi, H. Verlei, and A. L. Oldham.** 2001. Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. *J Bacteriol* **183**:2715-2723.
- **Hirono, I., T. Aoki, T. Asao and S. Kozaki.** 1992. Nucleotide sequences and characterization of haemolysin genes from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *Microb Pathog* **15**:269-282.
- **Ho, A. S. Y., T. A. Mietzner, A. J. Smith and G. K. Schoolnik.** 1990. The pili of *Aeromonas hydrophila*: identification of an environmentally regulated "mini pilin." *J Exp Med* **172**:795-806.
- **Hokama, A., and M. Inawaga.** 1991. Purification and characterization of *Aeromonas sobria* pili: a possible colonization factor. *Infect Imm* **59**:3478-3483.
- **Honma, Y., and N. Nakasone.** 1990. Pili of *Aeromonas hydrophila*: purification, characterization, and biological role. *Microbiol Immunol* **34**:83-98.
- **Ishiguro, E. E., W. W. Kay, T. Ainsworth, J. B. Chamberlain, J. T. Buckley and T. J. Trust.** 1981. Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. *J Bacteriol* **148**:333-340.

- **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., S. L. Abbott, S. Kashe, G. H. Kellogg and T. Shimada.** 1996. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J Clin Microbiol* **34**:1930-1933.
- **Janda, J. M., and S. L. Abbott.** 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* **27**:332-344.
- **Jarosik, G. P., J. D. Sanders, L. D. Cope, U. Muller-Eberhard and E. J. Hansen.** A functional *tonB* gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae type b*. *Infect Immun* **62**:2470-2477.
- **Kirov, S. M., B. C. Tassel, A. B. T. Semmler, L. A. O'Donovan, A. A. Rabaan and J. G. Shaw.** 2002. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J Bacteriol* **184**:547-555.
- **Konz, D., and M. Marahiel.** 1999. How do peptide synthetases generate structural diversity?. *Chem Biol* **6**:R39-48.
- **Köster, W.** 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B<sub>12</sub>. *Res Microbiol* **152**:291-301.
- **Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne and E. L. L. Sonnhammer.** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**:567-580.
- **Kyte J., and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**:105-132.
- **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**:680-685.
- **Larsen, R., D. Foster-Hartnett, M. McIntosh and K. Postle.** 1997. Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for in vivo physical interactions. *J Bacteriol* **179**:3213-3221.
- **Lavrrar, J. L., and M. A. McIntosh.** 2003. Architecture of Fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* **185**:2194-2202.
- **Lehoux, D., F. Sanschagrin and R. Levesque.** 2000. Genomics of the 35-kb *pvd* locus and analysis of novel *pvdIJK* genes implicated in pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **190**:141-146.

- **Létoffé, S., C. Deniau, N. Wolff, E. Dassa, P. Delepelaire, A. Lecroisey and C. Wandersman.** 2001. Haemophore-mediated bacterial haem transport: evidence for a common or overlapping site for haem-free and haem-loaded haemophore on its specific outer membrane receptor. *Mol Microbiol* **41**:439-450.
- **Lewis, K.** 1986. Anomalous mobilities of DNA restriction fragments on polyacrilamide gels. *Promega. Notes.* **6**:4-5.
- **Litwin, C.M. and S.B. Calderwood.** 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**:137-149.
- **Litwin, C. M., and B. L. Byrne.** 1998. Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization: regulation of expression and determination of the gene sequence. *Infect Immun* **66**:3134-3141.
- **Lundrigan, M. D., and J. Kadner.** 1986. Nucleotide sequence of the gene for ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB. *J Biol Chem* **261**:10797-10801.
- **Maniatis T., E. F. Fritsch and J. Sambrook.** 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- **Marmur, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *J Mol Biol* **3**:208-218.
- **Martínez, E., and F. De la Cruz.** 1988. Transposon Tn21 encodes RecA<sup>-</sup> independent site-specific integration system. *Mol Gen Genetics* **211**:320-335.
- **Martínez, M. J., D. S. Pujol, F. Congregado, S. Merino, X. Rubires and J. M. Tomás.** 1995. The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes O:11 and O:34. *FEMS Microbiol Lett* **128**: 69-74.
- **Martinez-Murcia, A.J., C. Esteve, E. Garay and M. D. Collins.** 1992. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* **91**:199-206.
- **Martinez-Murcia, A. J.** 1999. Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas* DNA hybridization group 11 and *Aeromonas* group 501. *Int J Syst Bacteriol* **49**:1403-1408.
- **Massad, G., J. Arceneaux and B. Byers.** 1991. Acquisition of iron from host sources by mesophilic *Aeromonas* species. *J Gen Microbiol* **137**:237-241.

- **Massad, G., J. Arceneaux and B. Byers.** 1994. Diversity of siderophore genes encoding biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Aeromonas* spp. *Biometals* **7**:227-236.
- **Massé, E., and S. Gottesman.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4620-4625.
- **May, J., T. M. Wendrich and M. Marahiel.** 2001. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem* **276**:7209-7217.
- **May, J., N. Kessler, M. Marahiel and M. Stubbs.** 2002. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:12120-12125.
- **Mazoy, R., C. R. Osorio, A. E. Toranzo and M. L. Lemos.** 2003. Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Arch Microbiol* **179**: 329-338.
- **Merino, S., and J. M. Tomás.** 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., S. Camprubí and J. M. Tomás.** 1991. The role of lipopolysaccharide in complement-killing of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *J Gen Microbiol* **137**: 1583-1590.
- **Merino, S., S. Camprubí and J. M. Tomás.** 1992. Effect of growth temperature on outer membrane componenets and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *Infect Immun* **60**:4343-4349.
- **Merino, S., S. Camprubí and J. M. Tomás.** 1993. Incidence of *Aeromonas* spp. serotypes O:34 and O:11 among clinical isolates. *Med Microbiol Lett* **2**:48-55.
- **Merino, S., X. Rubires, S. Kõnchel and J. M. Tomás.** 1995. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int J Food Microbiol* **28**:157-168.
- **Merino S., A. Aguilar, X. Rubires, D. Simón-Pujol, F. Congregado and J. M. Tomás.** 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., X. Rubires, A. Aguilar and J. M. Tomás.** 1996b. The O:34-antigen lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol Lett* **139**:97-101.
- **Merino S., X. Rubires, A. Aguilar, J. F. Guillot and J. M. Tomás.** 1996c. The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization *in vivo* of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. *Microb Path* **20**:325-333.

- **Merino S., A. Aguilar, J. M. Tomás, R. Bonet, M. J. Martínez, D. Simón-Pujol, F. Congregado.** 1997a. Complement resistance of capsulated strains of *Aeromonas salmonicida*. *Microb Path* **22**:315-320.
- **Merino S., A. Aguilar, X. Rubires, N. Abitiu, M. Regué and J. M. Tomás.** 1997b. The role of the capsular polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 in the adherence to and invasion of fish cell lines. *Res Microbiol* **148**:625-631.
- **Merino, S., X. Rubires, A. Aguilar and J. M. Tomás.** 1997c. 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., A. Aguilar, M. M. Noguerras, M. Regué, S. Swift and J. M. Tomás.** 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, R. Gavin, S. Vilches, J. G. Shaw and J. M. Tomás.** 2003. A colonization factor (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. is inactive in *Aeromonas salmonicida* strains. *Appl Environ Microbiol* **69**:663-667.
- **Mey, A. R., and S. Payne.** 2001. Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Mol Microbiol* **42**:835-849.
- **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in the construction of insertion mutations: osmoregulation of the outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* **170**:2575-2583.
- **Mills, M., and S. Payne.** 1995. Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **177**:3004-3009.
- **Moeck, G., and J. Coulton.** 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* **28**:675-681.
- **Moffitt, M., and B. Neilan.** 2000. The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. *FEMS Microbiol Lett* **191**:159-167.
- **Mootz, H. D., and M. Marahiel.** 1997. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* **179**:6843-6850.
- **Münch, R., K. Hiller, H. Barg, D. Heldt, S. Linz, E. Wingender, and D. Jahn.** 2003. PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Res* **31**:266-269.

- **Nau, C. D., and J. Konisky.** 1989. Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport proteins: nucleotide and amino acid sequences of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *J Bacteriol* **171**:1041-1047.
- **Neilands, J. B.** 1994. Identification and isolation of mutants defective in iron acquisition. *Methods Enzymol* **235**:352-356.
- **Neilands, J.** 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* **270**:26723-26726.
- **Nikaido, H., and E. Rosenberg.** 1990. Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with  $\beta$ -lactam antibiotics containing catechol and analogous groups. *J Bacteriol* **172**:1361-1367.
- **Occhino, D., E. E. Wyckoff, D. Henderson, T. Wrona and S. Payne.** 1998. *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol Microbiol* **29**:1493-1507.
- **Ozenberger, B. A., M. S. Nahlik and M.A. McIntosh.** 1987. Genetic organization of multiple *fep* genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**:3638-3646.
- **Ozenberger, B. A., T. J. Brickman, and M. A. McIntosh.** 1989. Nucleotide sequence of *Escherichia coli* isochorismate synthetase gene *entC* and evolutionary relationship of isochorismate synthetase and other chorismate-utilizing enzymes. *J Bacteriol* **171**:775-783.
- **Page, W. J., E. Kwon, A. S. Cornish and A. E. Tindale.** 2003. The *csbX* gene of *Azotobacter vinelandii* encodes an MFS efflux pump required for catechol siderophore export. *FEMS Microbiol Lett* **228**:211-216.
- **Panek, H., and M. R. O' Brian.** 2002. A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* **148**:2273-2282.
- **Pearson, W. R., and D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **85**:2444-2448.
- **Pemberton, J. M., S. P. Kidd and R. Schmidt.** 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* **152**:1-10.
- **Pierce, J. R., C. L. Pickett and C. F. Earhart.** 1983. Two *fep* genes are required for ferrienterochelin uptake in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **155**:330-336.
- **Poole, K., and G. McKay.** 2003. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front Biosci* **8**:d661-686.

- **Popoff, M.** 1984. Genus III. *Aeromonas* Kluyver and Van Niel 1936, 398 AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1 Section 5<sup>a</sup>, ed. Krieg, N. R. and Holt, J.J. IX Edn, pp. 545-547. Baltimore/London: Williams and Wilkins.
- **Quadri, L.** 2000. Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases. *Mol Microbiol* **37**:1-12.
- **Rabaan, A. A., I. Gryllos, J. M. Tomás and J. G. Shaw.** 2001. Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infect Immun* **69**: 4257-4267.
- **Rabsch, W., and G. Winkelmann.** 1991. The specificity of bacterial siderophore receptors probed by bioassays. *Biol Met* **4**:244-250.
- **Ratledge, C., and L. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**:881-941.
- **Ravel, J., and P. Cornelis.** 2003. Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol* **11**:195-200.
- **Raymond, K., E. Dertz and S. Kim.** 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3584-3588.
- **Reed L. J., and H. Muench.** 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am J Hyg* **27**:493-497.
- **Reese, M. G.** 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome". *Comput Chem* **26**:51-56.
- **Robins-Browne, R. M., and J. K. Prpic.** 1985. Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **47**:774-779.
- **Rubires, X., F. Saigí, N. Piqué, N. Climent, S. Merino, S. Albertí, J. M. Tomás and M. Regué.** 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.
- **Ruffolo, C. G., B. H. Jost and B. Adler.** 1998. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Vet Microbiol* **59**:123-127.
- **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**:406-425.
- **Sakazaki, R., and T. Shimada.** 1984. O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. *Jpn J Med Sci Biol* **37**:247-255.

- **Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- **Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA **74**:5463-5467.
- **Schalk, I., M. Abdallah and F. Pattus.** 2002. A new mechanism for membrane iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem Soc Trans **30**:702-705.
- **Schmitt, M., and S. Payne.** 1988. Genetics and regulation of enterobactin genes in *Shigella flexneri*. J Bacteriol **170**:5579-5587.
- **Schröder, I., E. Johnson and S. de Vries.** 2003. Microbial ferric iron reductases. FEMS Microbiol Rev **27**:427-447.
- **Schwarzer, D., R. Finking and M. A. Marahiel.** 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. Nat Prod Rep **20**:275-287.
- **Schwyn, B., and J. B. Neilands.** 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem **160**:47-56.
- **Sha, J., M. Lu and A. Chopra.** 2001. Regulation of the cytotoxic enterotoxin gene in *Aeromonas hydrophila*: characterization of an iron uptake regulator. Infect Immun **69**:6370-6381.
- **Shea, C., and M. McIntosh.** 1991. Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system: homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **5**:1415-1428.
- **Shimada, T., R. Sakazaki and K. Suzuki.** 1985. Peritrichous flagella in mesophilic strains of *Aeromonas*. Jpn. J Med Sci Biol **38**:141-145.
- **Silakowski, B., B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blöcker, G. Höfle and R. Müller.** 2000. The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. Eur J Biochem **267**:6476-6485.
- **Sprenkel, C., Z. Cao, Z. Qi, D. Scott, M. Montague, N. Ivanoff, J. Xu, K. Raymond, S. Newton and P. Klebba.** 2000. Binding of ferric enterobactin by the *Escherichia coli* periplasmic protein FepB. J Bacteriol **182**:5359-5364.
- **Stachelhaus, T., H. Mootz and M. Marahiel.** 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. Chem Biol **6**:493-505.
- **Staudenmaier, H., B. V. Hove, A. Yaraghi and V. Braun.** 1989. Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding protein

dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**:2626-2633.

- **Stephens, D., M. Choe and C. F. Earhart.** 1995. *Escherichia coli* periplasmic protein FepB binds ferrienterobactin. *Microbiology* **141**:1647-1654.
- **Stevens M. K., S. Porcella, J. Klesney-Tait, S. Lumbley, S. E. Thomas, M. V. Norgard , J. D. Radolf and E. J. Hansen.** A hemoglobin-binding outer membrane protein is involved in virulence expression by *Haemophilus ducreyi* in an animal model. *Infect Immun* **64**:1724-1735.
- **Stiefel, A., S. Mahren, M. Ochs, P.T. Schindler, S. Enz and V. Braun.** 2001. Control of the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*: mutation in region 2.1 of the FecI extracytoplasmic-function sigma factor suppress mutation in the FecR transmembrane regulatory protein. *J Bacteriol* **183**:162-170.
- **Stintzi, A., and K. Raymond.** 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.
- **Stintzi, A., C. Barnes, J. Xu and K. Raymond.** 2000. Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:10691-10696.
- **Stojiljkovic, I., and K. Hantke.** 1992. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria. *EMBO J* **11**: 4359-4367.
- **Stojiljkovic, I., A. J. Bäumlér, and K. Hantke.** 1994. Fur regulon in Gram-negative bacteria. *J Mol Biol* **236**:531-545.
- **Stojiljkovic, I., V. Hwa, L. Saint Martin, P. O'Gaora, X. Nassif, F. Heffron and M. So.** 1995. The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol Microbiol* **15**:531-541.
- **Struyve, M., M. Moons and J. Thommassen.** 1991. Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* **218**:141-148.
- **Tam, R., and M. H. Jr. Saier.** 1993. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev* **57**:320-346.
- **Telford, J. R., and K. Raymond.** 1997. Amonabactin: a family of novel siderophores from a pathogenic bacterium. *J Biol Inorg Chem* **2**:750-761.

- **Telford, J. R., and K. N. Raymond.** 1998. Coordination Chemistry of the Amonabactins, Bis(catecholate) Siderophores from *Aeromonas hydrophila*. *Inorg Chem* **37**:4578-4583.
- **Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson.** 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, J., H. Jones and R. Perry.** 1999. Molecular characterization of the hemin uptake locus (*hmu*) from *Yersinia pestis* and analysis of *hmu* mutants for hemin and hemoprotein utilization. *Infect Immun* **67**:3879-3892.
- **Thornley, J. P., J. G. Shaw, I. A. Gryllos and A. Eley.** 1997. Virulence properties of clinically significant *Aeromonas* species. *Rev Med Microbiol* **8**:61-72.
- **Tilbrook, G. S., and R. C. Hider.** 1998. Iron chelators for clinical use. *Met Ions Biol Syst* **35**:691-730.
- **Tomás J. M., V. J. Benedí, B. Ciurana and J. Jofre.** 1986. Role of capsule and O-antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. *Infect Immun* **54**:85-89.
- **Towbin H, T. Staehelin and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:4350-4354.
- **van der Helm, D.** 1998. The physical chemistry of bacterial outer-membrane siderophore receptor proteins. *Met Ions Biol Syst* **35**:355-401.
- **Vasil, M., and U. Ochsner.** 1999. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**:399-413.
- **Vipond, R., I. R. Bricknell, E. Durant, T. Bowden, A. E. Ellis and M. Smith.** 1998. Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Infect Immun* **66**:1990-1998.
- **Visca, P., L. Leoni, M. Wilson and I. Lamont.** 2002. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* **45**:1177-1190.
- **von Döhren, H., U. Keller, J. Vater and R. Zocher.** 1997. Multifunctional peptide synthetases. *Chem Rev* **97**:2675-2705.
- **Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick and N. J. Gay.** 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**:945-951.

- **Walsh, C., H. Chen, T. Keating, B. Hubbard, H. Losey, L. Luo, C. Marshall, D. Miller and H. Patel.** 2001. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol* **5**:525-534.
- **Wandersman, C., and I. Stojiljkovic.** 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* **3**:215-220.
- **Weber, T., and M. Marahiel.** 2001. Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure (Camb)* **9**:R3-9.
- **Whitfield, C., P. Amor and R. Köplin.** 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.
- **Wilcox, M. H., A. M. Cook, A. R. Eley and R. C. Spencer.** 1992. *Aeromonas* spp. as a potential cause of diarrhoea in children. *J Clin Pathol* **45**:959-963.
- **Williams, P. H.** 1979. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *E. coli*. *Infect Immun* **26**:925-932.
- **Wyckoff, E., A. Valle, S. Smith and S. Payne.** 1999. A multifunctional ATP-binding cassette transporter system from *Vibrio cholerae* transports vibriobactin and enterobactin. *J Bacteriol* **181**:7588-7596.
- **Wyckoff, E. E., D. Duncan, A. G. Torres, M. Mills, K. Maase and S. Payne.** 1998. Structure of the *Sigheilla dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria. *Mol Microbiol* **28**:1139-1152.
- **Wyckoff, E., S. Smith and S. Payne.** 2001. VibD and VibH are required for late steps in vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **183**:1830-1834.
- **Zhang, Y. L., C. T. Ong and K. Y. Leung.** 2000. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiol* **146**:999-1009.
- **Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider and G. Storz.** 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* **181**:4639-4643.
- **Zywno, S., J. Arceneaux, M. Altwegg and B. Byers.** 1992. Siderophore production and DNA hybridization groups of *Aeromonas* spp. *J Clin Microbiol* **30**:619-622.

## **7. ANEXO**

Secuencia de nucleótidos de la agrupación génica de sideróforos de *A. hydrophila* AH-3 y de las secuencias de aminoácidos deducidas de las diferentes pautas abiertas de lectura. Los codones de inicio de traducción se indican en negrita y los codones de final de lectura se indican en negrita y cursiva. Cuando estos son compartidos por dos pautas abiertas de lectura adyacentes, los nucleótidos están subrayados. Las flechas indican la dirección en la que se traducen las diferentes pautas abiertas de lectura. Los promotores se han subrayado con una línea continua, los nucleótidos correspondientes a las cajas Fur se han resaltado en negrita, y las secuencias de unión a ribosomas se han subrayado con una línea en acordeón.

Las regiones de las secuencias aminoacídicas con similitud a las diferentes secuencias consenso de las regiones núcleo de las sintetasas de péptidos no ribosomales, ilustradas en las tablas 3.4-3.8 del apartado 3.11 de Resultados y Discusión; se han marcado con diferentes colores: amarillo para las regiones núcleo de los dominios de adenilación (tabla 3.4 y 3.5), azul para los dominios transportadores (tabla 3.6), lila para el dominio transportador previo a un dominio de epimerización (tabla 3.6), verde para los dominios de condensación (tabla 3.8) y rojo para las regiones núcleo del dominio de epimerización (tabla 3.7).

1	CCC	GCTCCA	CCTT	GAGTGC	CTCT	ATCTTG	TCTTT	GATCC	TGGCTTCGTT
	GGG	CCGAGGT	GGA	ACTCACG	GAG	ATAGAAC	AGAA	ACTAGG	ACCGAAGCAA
51	TTT	GCGACTG	CCAT	CCAGCC	GGT	AGACGGG	GGTCT	GGGAG	AAGAACAGGG
	AAAC	GCTGAC	GGT	AGGTCGG	CCAT	CTGCC	CCAG	ACCCTC	TTCTTGTCCC
101	AGAG	GGACTG	GTT	GAAAGTG	GAG	AGCAGGG	GAGT	GAGGGC	TGCGCCACG
	TCT	CCCTGAC	CAAC	TTCCAC	CTCT	CGTCCC	CTCA	CTCCG	ACGCGGGTGC
151	TCGG	GCTGGCT	CCG	TCTTGAC	CGA	GACGAGC	TCC	AGATCGC	GCAGATAGAT
	AGCC	GACCGA	GGC	AGAACTG	GCT	CTGCTCG	AGG	CTAGCG	CGTCTATCTA
201	GGC	ACCCTGT	TCG	GCCACAT	AGT	CGGGGCG	GGC	GCTGAGG	GAGAAGCGGA
	CCG	TGGGACA	AGC	CGGTGTA	TCAG	CCCCGC	CCG	CGACTCC	CTCTTCGCCT
251	TCT	TATCTG	CTG	GCTGCCA	AGG	GGCTGC	TGAC	CTGCAG	ATCACCGGCA
	AGA	AGTAGAC	GAC	CGACGGT	TCC	CCGACG	ACT	GGACGTC	TAGTGGCCGT
301	GCAT	CCAGCT	CGAT	CCGATC	GGC	GCGGCTG	CGG	CCGATGC	GGCTCTGCAT
	CGT	AGGTCGA	GCT	AGGCTAG	CCG	CGCCGAC	GCC	GCTACG	CCGAGACGTA
351	CTCG	TCGAGA	CGA	ACCTTGC	TCG	ACATGAT	GCC	GGGGATC	CCCAGCTGTT
	GAG	CAGCTCT	GCT	TGGAACG	AGC	TGACTA	CGG	CCCCTAG	GGGTCGACAA
401	TCT	CGAAGGC	GACC	CTCTCT	TTG	AGGTATT	GGT	TGATTTT	GCCTTCGCTG
	AGAG	CTTCCG	CTG	GGAGAGA	AACT	CCATAA	CCA	ACTAAAG	CGGAAGCGAC
451	ACGT	TGTACT	GGT	GAGCGA	ACA	AGCTGCC	AGC	AGCAGGC	TGAGGGGGAG
	TGCA	ACATGA	CCC	ACTCGCT	TGT	TCGACGG	TCG	TCGTCCG	ACTCCCCCTC
501	CAGA	AGCAGG	TGCT	TTAACA	TCG	ACAGTTC	CGT	GAGTTGA	GAGAAGTGAC
	GTCT	TCGTCC	ACG	AAATTGT	AGC	TGCAAG	GCA	CTCAACT	CTCTTCACTG
551	CAAAA	AGATG	GCG	CCATCTT	AGG	GGGAAAT	ACCC	CTGGCT	GCCAGTCTGG
	GTTTT	TCTAC	CGC	GGTAGAA	TCCC	CCTTTA	TGG	GGACCGA	CGGTCAGACC
601	GCAC	GAGTT	CCC	ATTTTTG	TCG	CAGCCTC	ATAT	TGGGGTG	TGGGCTGCGT
	CGT	GCGTCAA	GGG	TAAAAAC	AGC	GTCGGAG	TATA	CCCCAC	ACCCGACGCA
651	CTTC	ATACGA	GTA	ACCCCTT	GGG	TGTCAAG	CAT	TGCAGGC	CGCCAGTGGC
	GAAG	TATGCT	CATT	GGGGAA	CCC	ACAGTTC	GTAC	CGTCCG	GCGGTCACCG
701	GCGG	CCTTGCC	CTAT	ACCCAC	AGAT	AAGTTC	CAG	TTTTATC	GATATAAAAA
	CGCC	GAACGG	GAT	ATGGGTG	TCT	ATTCAAG	GTCA	AAAATAG	CTATATTTTT

751 TCCCATTGAC CGGGTGATTT CAAAGCGAGT ATTTTACCGC CGCACAAATA  
 AGGGTAACTG GCCCACTAAA GTTTCGCTCA TAAAATGGCG GCGTGTTTAT

ValAsp·

801 **CAAATTGATA ATCATTATCA TTTTGAATCA** TGTTTGAGGG TGTAAC**GTGG**  
 GTTTAACTAT TAGTAATAGT AAAACTTAGT ACAA**ACTCCC** ACATTGCACC

·AThrLeuVal MetGluAsn SerAlaProAla GlnAlaAla SerProPro

851 ATACTCTTGT GATGGAAAAT AGCGCACCTG CCCAGGCTGC GTCCCCGCCC  
 TATGAGAACA CTACCTTTTA TCGCGTGAC GGTCCGACG CAGGGGCGGG

AspPheLeuPhe ThrSerGly GlnGlyThr IleSerAlaTyr AspLeuGly·

901 GATTTCTTGT TTACCTCAGG TCAGGGCACG ATCAGTGCCT ATGACCTGGG  
 CTAAAGAACA AATGGAGTCC AGTCCCGTGC TAGTCACGGA TACTGGACCC

·LysProIle ThrThrProAla CysGluTrp ProLeuLeu GluArgGlnIle·

951 CAAGCCTATC ACCACCCCG CCTGTGAATG GCCCTTGCTG GAGCGACAGA  
 GTTCGGATAG TGGTGGGGGC GGACACTTAC CGGGAACGAC CTCGCTGTCT

·IAlaArgAla LeuAlaAla AlaGluAlaAla GlyGlnAla AsnProLeu

1001 TTGCCCGGGC GCTGGCGGCG GCCGAGGCCG CAGGGCAAGC CAATCCGCTG  
 AACGGGCCCC CGACCGCCGC CGGCTCCGGC GTCCCGTTCG GTTAGGCGAC

LeuIleGlyAla PheAlaPhe AspProAla GluAlaSerCys LeuTyrVal·

1051 CTGATCGGAG CCTTCGCCTT CGATCCGGCC GAAGCCTCCT GCCTCTATGT  
 GACTAGCCTC GGAAGCGGAA GCTAGGCCGG CTTCGGAGGA CGGAGATACA

·ProGlyArg TyrGluArgGly ValArgMet AlaSerGlu ProMetThrPhe·

1101 GCCTGGCCGT TATGAGCGGG GCGTGCGCAT GGCCTCCGAG CCGATGACGT  
 CGGACCGCA ATACTCGCC CGCACGCGTA CCGGAGGCTC GGCTACTGCA

·PAlaValLys AlaAlaLeu AlaSerAlaPro AlaSerAsn GlnValIle

1151 TTGCAGTCAA AGCCGCCCTG GCCAGCGCAC CTGCGAGCAA CCAGGTCATT  
 AACGTCAGTT TCGGCGGGAC CGGTGCGGTG GACGCTCGTT GGTCCAGTAA

SerValGlnSer ThrProAla AlaAlaGlu PheLysAlaSer ValSerSer·

1201 TCGGTACAGA GCACACCAGC GGCGGCCGAG TTCAAAGCCT CGGTGAGCTC  
 AGCCATGTCT CGTGTGGTCG CCGCCGGCTC AAGTTTCGGA GCCAGTCGAG

·AlaLeuAsp AlaPheAlaGln GlyArgLeu SerLysVal ValLeuSerArg·

1251 GGCGCTGGAT GCGTTTGCAC AAGGTCGTCT CTCCAAGGTG GTGCTGTCGC  
 CCGCGACCTA CGCAAACGTG TTCCAGCAGA GAGGTTCCAC CACGACAGCG

·ALysLeuThr LeuThrLeu HisLysProAla AspProGlu GlnValLeu

1301 GCAAGCTGAC CCTCACGCTG CACAAGCCAG CCGATCCCGA GCAGGTGCTG  
 CGTTCGACTG GGAGTGCGAC GTGTTCGGTC GGCTAGGGCT CGTCCACGAC

AlaArgLeuMet SerGlnAsn ProHisAla PheHisPheSer LeuProLeu·

1351 GCCCGCCTGA TGAGCCAGAA CCCCATGCC TTCCACTTCT CCCTGCCGCT  
 CGGGCGGACT ACTCGGTCTT GGGGTACGG AAGGTGAAGA GGGACGGCGA

·GlyGlnAsp ArgArgLeuLeu GlyAlaSer ProGluLeu LeuLeuArgVal·

1401 CGGGCAAGAT CGCCGTCTGC TTGGGGCCAG CCCCAGCTG TTGCTGCGGG  
 GCCCGTTCTA GCGGCAGACG AACCCCGGTC GGGGCTCGAC AACGACGCC

·VSerGlyGly GluValPhe ThrHisProLeu AlaGlySer AlaLysArg

1451 TCAGCGGGGG AGAGGTGTTT ACTCACCCGC TGGCGGGCTC TGCCAAGCGC  
 AGTCGCCCC TCTCCACAAG TGAGTGGGCG ACCGCCGAG ACGGTTTCGG

1501 GlyAsnGluPro GluGlnAsp LysArgVal AlaArgAspLeu LeuAlaSer·  
 GGTAACGAGC CCGAACAGGA CAAACGGGTG GCCCGGGATC TGCTGGCCTC  
 CCATTGCTCG GGCTTGTCCT GTTTGCCAC CGGGCCCTAG ACGACCGGAG  
 ·ArgLysAsp GlnHisGluHis ArgLeuVal IleAspGlu IleArgArgVal·  
 1551 CCGCAAGGAT CAGCATGAAC ACCGCCTGGT GATCGACGAG ATCCGCCGGG  
 GGCGTTCCCTA GTCGTA CTG TGGCGGACCA CTAGCTGCTC TAGGCGGCC  
 ·VLeuThrPro HisCysArg GluLeuValIle ProAlaAsn ProThrLeu  
 1601 TGCTGACCCC CCATTGTCGC GAGCTGGTCA TTCCCGCCAA TCCTACCCTG  
 ACGACTGGGG GGTAACAGCG CTCGACCAGT AAGGGCGGTT AGGATGGGAC  
 MetSerThrAsp ThrLeuTrp HisLeuGly ThrProIleAla GlyGlnLeu·  
 1651 ATGAGCACGG ATACCCTCTG GCATCTGGGC ACGCCCATCG CCGGTCAGCT  
 TACTCGTGCC TATGGGAGAC CGTAGACCCG TGCGGGTAGC GGCCAGTCGA  
 ·HisAlaGly GlnAlaSerVal LeuSerLeu AlaCysGln LeuHisProThr·  
 1701 GCATGCGGGG CAGGCTTCTG TGCTCTCCCT GGCCTGCCAG CTGCATCCGA  
 CGTACGCCCC GTCCGAAGAC ACGAGAGGGA CCGGACGGTC GACGTAGGCT  
 ·TProAlaLeu CysGlyTyr ProThrGluLeu AlaArgGln PheIleArg  
 1751 CCCC GGCCCT GTGCGGTTAT CCCACAGAGC TGGCGCGCCA GTTCATCCGC  
 GGGGCCGGGA CACGCCAATA GGGTGTCTCG ACCGCGCGGT CAAGTAGGCG  
 GluGlnGluPro PheArgArg AlaLeuPhe SerGlyIleVal GlyTrpCys·  
 1801 GAGCAGGAAC CTTTACGGC TGCCCTGTTT AGCGGCATCG TCGGCTGGTG  
 CTCGTCTTTG GGAAGTCCGC ACGGGACAAG TCGCCGTAGC AGCCGACCAC  
 ·AspSerGln GlyAsnGlyGlu TrpAlaVal ValIleArg CysGlyValLeu·  
 1851 TGACAGCCAG GGCAATGGGG AGTGGGCCGT GGTGATCCGC TCGGCGGTGC  
 ACTGTGCGTC CCGTTACCCC TCACCCGGCA CCACTAGGCG ACGCCGCACG  
 ·LAspGlyHis GlnValGlu LeuPheAlaGly AlaGlyIle ValAlaGly  
 1901 TCGATGGCCA TCAGGTGGAG CTGTTTGGCG GCGCCGGCAT AGTGGCAGGC  
 AGCTACCGGT AGTCCACCTC GACAAACGGC CGCGCCGTA TCACCGTCCG  
 SerAspProAla MetGluTrp AlaGluThr GlyThrLysLeu GlyThrMet·  
 1951 TCGGATCCCG CCATGGAGTG GGCCGAGACC GGCACCAAGC TGGGTACCAT  
 AGCCTAGGGC GGTACCTCAC CCGGCTCTGG CCGTGGTTCG ACCCATGGTA  
*orf2 (amlE)* →  
 MetThr GlnAlaAsn·  
 ·LeuAsnAla LeuGlyLeuAsp LeuGluVal AlaGln\*\*\*  
 2001 GCTCAACGCT CTTGGTCTGG ATCTGGAGGT GGCGCAATGA CTCAGGCCAA  
 CGAGTTGCGA GAACCAGACC TAGACCTCCA CCGCGTTACT GAGTCCGGTT  
 ·ArgPheLeu ProTyrThrArg TrpProAla AlaLeuAla GluSerTyrArg·  
 2051 CCGCTTCTTG CTTTACACC GCTGGCCAGC TGCGCTGGCC GAGTCGTACC  
 GGCGAAGGAC GGAATGTGGG CGACCGGTCG ACGCGACCGG CTCAGCATGG  
 ·AAlaLysGly TyrTrpCys GlyGluProLeu ThrAlaMet LeuAspArg  
 2101 GAGCCAAGGG CTATTGGTGC GGCGAGCCGC TGACCGCCAT GCTGGATCGC  
 CTCGGTTCCC GATAACCAGC CCGCTCGGCG ACTGGCGGTA CGACCTAGCG  
 GlnCysAlaAla AlaProAsp AlaThrAla IleLeuCysGly GluArgSer·  
 2151 CAGTGTGCAG CGGCGCCAGA TGCCACCGCC ATCCTCTGCG GCGAACGCAG  
 GTCACACGTC GCCGCGGTCT ACGGTGGCGG TAGGAGACGC CGCTTGCGTC  
 ·PheSerTyr ArgGluLeuAsp AlaAlaSer SerGlnLeu AlaGlyArgLeu·  
 2201 CTTTAGTTAT CGCGAGCTGG ACGCTGCCTC GAGCCAGCTG GCCGGGCGCT  
 GAAATCAATA GCGCTCGACC TGCGACGGAG CTCGGTCGAC CGGCCCGCGA

2251	·LAlaLeuHis GlyLeuGly ValGlyAspThr AlaLeuVal GlnLeuPro TGGCCCTTCA CGGCCTGGGT GTGGGGGATA CCGCTCTGGT GCAGCTGCC ACCGGAAGT GCCGGACCCA CACCCCTAT GGCGAGACCA CGTCGACGG
2301	AsnValAlaGlu PheTyrLeu ValPhePhe AlaLeuLeuLys AlaGlyIle· AATGTGGCCG AATTCTATCT GGTGTTCTTC GCCCTGCTCA AAGCGGTAT TTACACCGGC TTAAGATAGA CCACAAGAAG CGGGACGAGT TTCGCCATA
2351	·AlaProVal AsnAlaLeuPhe SerHisAsn ArgLeuGlu LeuAlaSerTyr· AGCGCCGGTC AACGCCCTTT TTAGCCACAA CCGGCTGGAG CTGGCCTCTT TCGCGGCCAG TTGCGGGAAA AATCGGTGTT GGCCGACCTC GACCGGAGAA
2401	·TAlaGluGln IleGlnPro ArgLeuPheIle GlySerLeu AlaHisPro ACGCCGAACA AATCCAGCCC AGGCTCTTTA TCGGCTCGCT GGCCCATCCG TGCGGCTTGT TTAGGTCGGG TCCGAGAAAT AGCCGAGCGA CCGGGTAGGC
2451	LeuPheAlaSer GlyAspArg HisSerAsp LeuLeuArgGly IleGlyAla· CTGTTTGCAA GCGGGGATCG CCACAGTGAC CTGCTGCGAG GCATAGGCGC GACAAACGTT CGCCCTAGC GGTGTCACTG GACGACGCTC CGTATCCGGC
2501	·GluLeuVal LeuLeuAspGly GluSerGly GluLeuGly LeuThrHisTrp· CGAGCTGGTG TTGCTCGATG GCGAGAGCGG GGAAGTGGGG CTGACCCATT GCTCGACCAC AACGAGCTAC CGCTCTCGCC CCTTGACCC GACTGGGTAA
2551	·TLeuSerGlu LeuAlaLys ThrGluGlyLeu ValValPro AlaTyrGly GGCTGAGTGA GCTGGCCAAG ACCGAGGGAT TGGTCGTCCC CGCCTATGGC CCGACTACT CGACCGGTTT TGGTCCCTA ACCAGCAGGG GCGGATACCG
2601	ProSerProAla AspGluVal AlaPhePhe GlnLeuSerGly GlySerThr· CCGAGTCCGG CGGACGAGGT GGCCTTCTTC CAGCTCTCCG GCGGCAGCAC GGCTCAGGCC GCCTGCTCCA CCGAAGAAG GTCGAGAGGC CGCCGTCGTG
2651	·GlyThrPro LysLeuIlePro ArgThrHis AspAspTyr TyrTyrSerVal· AGGCACCCCC AAGCTGATCC CGCGCACCCA TGACGACTAC TACTACAGCG TCCGTGGGGG TTCGACTAGG GCGCGTGGGT ACTGCTGATG ATGATGTCGC
2701	·VArgArgSer AsnGluIle CysGluLeuGly ProHisThr ArgTyrLeu TGCGTCGCAG CAATGAGATC TGTGAATTGG GGCCCCACAC CCGTTATCTG ACGCAGCGTC GTTACTCTAG AACTTAACC CCGGGGTGTG GGCAATAGAC
2751	CysAlaLeuPro AlaProHis AsnPhePro LeuSerSerPro GlyAlaLeu· TGCGCCCTGC CGGCGCCCCA CAACTTCCCC CTGAGCTCCC CTGGGGCGCT ACGCGGGACG GCCGCGGGGT GTTGAAGGGG GACTCGAGGG GACCCCGCA
2801	·GlyValPhe GluAlaGlyGly AlaValVal LeuAlaPro AspProGlyPro· CGGTGTGTTT GAGGCGGGCG GCGCCGTGGT GCTGGCGCCG GATCCCGGCC GCCACACAAG CTCCGCCCGC CGCGGCACCA CGACCGCGGC CTAGGGCCGG
2851	·PMetSerCys PheProLeu ValAlaCysHis GlnValAsn LeuThrSer CCATGAGCTG TTTTCCGCTG GTGGCCTGCC ACCAGGTCAA CCTCACTTCA GGTACTCGAC AAAAGGCGAC CACCGGACGG TGGTCCAGTT GGAGTGAAGT
2901	LeuValProPro AlaValSer LeuTrpLeu GlnAlaAlaGlu SerAspPro· CTGGTGCCAC CGGCCGTCTC TCTCTGGTTG CAGGCGGCCG AATCTGACCC GACCACGGTG GCCGCGAGAG AGAGACCAAC GTCCGCCGGC TTAGACTGGG
2951	·SerValArg SerGlnLeuAla SerLeuAsp LeuLeuGln ValGlyGlyAla· GTCCGTCCGC AGTCAGCTCG CGAGCCTCGA CTTGCTGCAA GTAGGCGGCG CAGGCAGGCG TCAGTCGAGC GCTCGGAGCT GAACGACGTT CATCCGCCG
3001	·ALysLeuAla GluAlaVal AlaArgLysIle ThrProLeu LeuGlyCys CCAAGCTGGC CGAAGCGGTG GCCAGAAAGA TCACCCCGCT GCTCGGCTGC GGTTCGACCG GCTTCGCCAC CGGTCTTTCT AGTGGGGCGA CGAGCCGACG

3051 ArgLeuGlnGln ValPheGly MetAlaGlu GlyLeuValAsn TyrThrArg·  
 CGGCTGCAAC AGGTGTTTCGG CATGGCGGAG GGGCTGGTCA ACTACACCCG  
 GCCGACGTTG TCCACAAGCC GTACCGCCTC CCCGACCAGT TGATGTGGGC

3101 ·LeuSerAsp ProAspGluLys IleIleHis ThrGlnGly ArgProMetSer·  
 GCTCTCTGAC CCCGACGAGA AGATCATTCA CACCCAGGGC CGCCCCATGA  
 CGAGAGACTG GGGCTGCTCT TCTAGTAAGT GTGGGTCCCG GCGGGTACT

3151 ·SProAspAsp GluValArg IleLeuAspGlu AlaGlyAsn ProValVal  
 GCCCGGATGA CGAGGTGCGC ATTCTGGACG AGGCGGGCAA CCCGTCGTC  
 CGGGCCTACT GCTCCACGCG TAAGACCTGC TCCGCCCGTT GGGCCAGCAG

3201 ProGlyGlnPro GlyAlaLeu HisThrArg GlyProTyrThr PheArgGly·  
 CCGGGCCAGC CCGGCGCCCT GCACACCCGT GGCCCCTACA CCTTCCGTGG  
 GGCCCGGTTCG GGCCGCGGGA CGTGTGGGCA CCGGGGATGT GGAAGGCACC

3251 ·TyrTyrGln SerGlnAlaHis AsnAlaArg ValPheAsp AlaAspGlyPhe·  
 TTACTACCAG AGCCAGGCC ACAACGCCCG AGTGTTTCGAT GCCGATGGCT  
 AATGATGGTC TCGGTCCGGG TGTTGCGGGC TCACAAGCTA CGGCTACCGA

3301 ·PTyrCysSer GlyAspLeu ValValGlnAsp AlaAspGly TyrLeuThr  
 TCTACTGCTC CGGCGATCTG GTGGTGCAGG ATGCCGATGG CTACCTCACG  
 AGATGACGAG GCCGCTAGAC CACCACGTCC TACGGCTACC GATGGAGTGC

3351 ValValGlyArg LeuLysAsp GlnIleAsn ArgGlyGlyGlu LysIleAla·  
 GTCGTGGGGC GGCTAAAGGA TCAGATCAAC CGGGGCGGCG AGAAAATCGC  
 CAGCACCCCG CCGATTTCTT AGTCTAGTTG GCCCCGCCCG TCTTTTAGCG

3401 ·AlaGluGlu ValGluAsnGln LeuLeuHis HisProAla IleThrGlnAla·  
 GGCGGAAGAG GTGGAGAATC AGCTGCTGCA CCACCCGGCC ATCACCCAGG  
 CCGCCTTCTC CACCTCTTAG TCGACGACGT GGTGGGCCGG TAGTGGGTCC

3451 ·AAlaLeuVal SerMetPro AspSerAlaMet GlyGluLys SerCysAla  
 CGGCCCTGGT CTCCATGCC GACAGCGCCA TGGGGGAGAA GAGCTGCGCC  
 GCCGGGACCA GAGGTACGGG CTGTCCGCGT ACCCCCTCTT CTCGACGCGG

3501 PheIleValSer ThrAspPro AlaLeuLys ProLeuAlaLeu ArgLysPhe·  
 TTCATCGTCA GCACGGATCC CGCCTTGAAG CCGCTGGCCT TGCGCAAGTT  
 AAGTAGCAGT CGTGCCTAGG GCGGAAC TTC GCGACCGGA ACGGTTCAA

3551 ·LeuArgGlu ArgGlyValAla AspPheLys LeuProAsp ArgPheGluThr·  
 TCTGCGTGAG CGCGGCGTGG CGGATTTCAA GCTGCCCGAC CGTTTCGAAA  
 AGACGCACTC GCGCCGACC GCCTAAAGTT CGACGGGCTG GCAAAGCTTT

3601 ·TLeuAspAla LeuProMet ThrAlaValGly LysIleAsp LysGlnGlu  
 CCCTGGATGC CTGCCCCATG ACTGCGGTGG GCAAGATTGA CAAGCAGGAG  
 GGGACCTACG GGACGGGTAC TGACGCCACC CGTTCTAACT GTTCGTCTC

3651 LeuArgAlaGln IleAlaGlu LeuIleAla AlaGlyGlnPro LeuThrThr·  
 CTGCGCGCGC AAATCGCCGA GTTAATCGCC GCCGGCCAGC CCCTGACCAC  
 GACGCGCGCG TTTAGCGGCT CAATTAGCGG CGGCCGGTTCG GGGACTGGTG

orf 3 (amlB) →

3701 ·Ala\*\*\* MetAlaIlePro ThrLeuAsn·  
 AGCTTAAAC TAAAAGGAA TCATGACGTT ATGGCTATCC CAACCCTGAA  
 TCGAATTTTG ATTTTTCCTT AGTACTGCAA TACCGATAGG GTTGGGACTT

3751 ·AsnTyrAla MetProSerGln TrpLysAla AsnLysVal AsnTrpThrLeu·  
 CAATTACGCC ATGCCAGCC AGTGAAGGC CAACAAGGTC AACTGGACCC  
 GTTAATGCGG TACGGGTCGG TCACCTTCCG GTTGTTCAG TTGACCTGGG

3801 ·LAsnProLys ArgAlaAla LeuLeuIleHis AspMetGln GluTyrPhe  
TGAACCCCAA GCGCGCCGCC CTGCTGATCC ACGACATGCA GGAGTATTTT  
ACTTGGGGTT CGCGCGGCGG GACGACTAGG TGCTGTACGT CCTCATAAAG

3851 ThrAlaPheTyr GlyGluAsn SerProLeu IleGlnAlaLeu ThrGluArg·  
ACCGCCTTCT ACGGTGAGAA CAGCCCGCTG ATCCAGGCCT TGACCGAGCG  
TGGCGGAAGA TGCCACTCTT GTCGGGCGAC TAGGTCCGGA ACTGGCTCGC

3901 ·LeuAlaAla ValArgLysGln CysLysAla LeuGlyIle ProValPheTyr·  
GCTCGCCGCC GTGCGCAAGC AGTGCAAGGC CCTCGGCATT CCGGTCTTCT  
CGAGCGGCGG CACGCGTTCCG TCACGTTCCG GGAGCCGTAA GGCCAGAAGA

3951 ·TThrAlaGln ProLysAsp GlnSerProGlu AspArgAla LeuLeuAsn  
ACACGGCCCA GCCCAAGGAT CAATCCCCCG AAGATCGCGC CCTGCTCAAC  
TGTGCCGGGT CGGGTTCCTA GTTAGGGGGC TTCTAGCGCG GGACGAGTTG

4001 AspMetTrpGly ProGlyLeu AsnLysSer ProGluLeuLys GlnValVal·  
GACATGTGGG GCCCGGTCT GAACAAGAGC CCCGAGCTGA AACAGGTGGT  
CTGTACACCC CGGGCCAGA CTTGTTCTCG GGGCTCGACT TTGTCCACCA

4051 ·AlaGlyLeu ArgProGluArg AspAspThr ValLeuVal LysTrpArgTyr·  
GGCAGGGCTG CGCCCGGAGC GTGACGACAC AGTGCTGGTC AAGTGGCGCT  
CCGTCCCGAC GCGGGCCTCG CACTGCTGTG TCACGACCAG TTCACCGCGA

4101 ·TSerAlaPhe GlnArgSer GluLeuGluGln MetLeuLys AlaGlnGly  
ACAGTGCCTT CCAGCGCTCC GAACTCGAAC AGATGCTCAA AGCACAGGGG  
TGTCACGGAA GGTCGCGAGG CTTGAGCTTG TCTACGAGTT TCGTGTCCCC

4151 ArgAspGlnLeu IleIleGly GlyIleTyr GlyHisIleGly CysMetMet·  
CGGGATCAGC TCATCATAGG CGGCATCTAC GGCCATATCG GCTGCATGAT  
GCCCTAGTCG AGTAGTATCC GCCGTAGATG CCGGTATAGC CGACGTACTA

4201 ·ThrAlaCys AspAlaPheMet ArgAspIle GlnProPhe PheLeuAlaAsp·  
GACCGCCTGC GACGCCTTCA TGCGCGACAT CCAGCCCTTC TTCCTGGCAG  
CTGGCGGACG CTGCGGAAGT ACGCGCTGTA GGTCGGGAAG AAGGACCGTC

4251 ·AGlyIleAla AspPheSer LeuAlaAspHis GlnMetAla LeuAspTyr  
ACGGGATAGC GGA CTTCTCC CTGGCCGATC ACCAGATGGC GCTGGACTAT  
TGCCCTATCG CCTGAAGAGG GACCGGCTAG TGGTCTACCG CGACCTGATA

4301 ValAlaThrArg CysGlyLys ValIleLeu CysGluGluVal LeuThrLeu·  
GTTGCGACCC GCTGCGGCAA GGTGATCCTC TGCGAGGAGG TGCTGACACT  
CAACGCTGGG CGACGCCGTT CCACTAGGAG ACGCTCCTCC ACGACTGTGA

4351 ·AlaSerAla SerAlaSerGln ThrHisPro LeuLeuThr TyrGluGlyLeu·  
GGCATCAGCT TCTGCCTCC AGACCCATCC GTTGCTGACG TATGAGGGGC  
CCGTAGTCGA AGACGGAGGG TCTGGGTAGG CAACGACTGC ATACTCCCCG

4401 ·LLysAlaArg LeuLeuSer HisIleAspGlu AspGluGly GluPheAsp  
TCAAGGCGCG GCTGTTGAGC CATATCGATG AGGACGAAGG GGAGTTTGAC  
AGTTCCGCGC CGACAACCTCG GTATAGCTAC TCCTGCTTCC CCTCAAACCTG

4451 ProAspGluAsn LeuIleAsp TyrGlyLeu AspSerValArg IleMetSer·  
CCGGACGAGA ACCTCATCGA CTACGGCCTG GATTCCGGTGC GCATCATGTC  
GGCCTGCTCT TGGAGTAGCT GATGCCGGAC CTAAGCCACG CGTAGTACAG

4501 ·LeuLeuThr GluTrpArgAla AlaGlyVal GluLeuGly PheValAspLeu·  
CTTGCTCACC GAGTGGCGCG CCGCCGGGGT GGAGCTGGGC TTCGTGGACT  
GAACGAGTGG CTCACCGCGC GGCGGCCCA CCTCGACCCG AAGCACCTGA

4551 ·LAlaLysLeu ProThrLeu AsnGlyTrpTrp ArgLeuIle GluAlaLys  
TGGCCAAGTT GCCGACCCTC AATGGCTGGT GGCGTTTGAT CGAGGCCAAG  
ACCGTTCAA CGGCTGGGAG TTACCGACCA CCGCAAATA GCTCCGGTTC

LeuAlaAlaGln AlaLeuGlu ValThrPro \*\*\*

orf 4 (amlF) →

Met SerArgPhe ProLeuThr

4601 CTGGCAGCAC AGGCGCTGGA GGTGACGCCA **TGAGCCGCTT** CCCTCTGACC  
GACCGTCGTG TCCGCGACCT CCACTGCGGT ACTCGGCGAA GGGAGACTGG

**IleProGlnGln GlyLeuTrp SerGlyHis** LeuLeuAsnAsp AspLysAla·

4651 ATACCCCAAC AGGGGCTCTG GTCCGGTCAT TTGCTCAACG ACGACAAGGC  
TATGGGGTTG TCCCCGAGAC CAGGCCAGTA AACGAGTTGC TGCTGTTCG

·MetPheAsn ThrAlaGluCys IleAlaPhe AspGlyLys ValAspAlaAla·

4701 CATGTTCAAC ACCGCCGAGT GTATCGCCTT CGATGGCAAG GTCGACGCGG  
GTACAAGTTG TGGCGGCTCA CATAGCGGAA GCTACCGTTC CAGCTGCGCC

·AValLeuVal AlaAlaLeu ThrArgAlaVal Gly**GluCys GluAlaLeu**

4751 CCGTGCTGGT GGCTGCGCTC ACCCGGGCTG TGGGAGAGTG CGAGGCGCTC  
GGCACGACCA CCGACGCGAG TGGGCCCGAC ACCCTCTCAC GCTCCGCGAG

**LysGlyHisPhe** GluAlaAsp GlyGluVal ValCysPheVal SerAspGlu·

4801 AAGGGCCACT TCGAAGCCGA TGGGGAGGTG GTCTGCTTCG TCTCGGACGA  
TTCCCGGTGA AGCTTCGGCT ACCCCTCCAC CAGACGAAGC AGAGCCTGCT

·AlaProLeu AlaTyrGlyGlu ValAsnLeu GluSerAsp AspGluAlaAla·

4851 GGCACCACTC GCCTATGGCG AGGTGAACCT TGAAAGCGAT GACGAGGCTG  
CCGTGGTGAG CGGATACCGC TCCACTTGGA ACTTTCGCTA CTGCTCCGAC

·AAlaArgGly TrpAlaGly AlaAspLeuArg ArgProPhe AlaLeuThr

4901 CCGCCCGCGG CTGGGCCGGG GCCGATCTGC GCCGTCCGTT CGCATTGACC  
GGCGGGCGCC GACCCGGCCC CGGCTAGACG CGGCAGGCAA GCGTAACTGG

GluGluAlaPro CysArgPhe AlaLeuLeu ArgGlyProGly ArgAspTyr·

4951 GAGGAGGCTC CCTGCCGCTT CGCTTTGCTG CGCGGCCCCG GCCGGGATTA  
CTCCTCCGAG GGACGGCGAA GCGAAACGAC GCGCCGGGGC CGGCCCTAAT

·LeuTyrSer Cys**ValHisHis** IleAlaLeu AspGlyPhe GlyThrThrLeu·

5001 CCTCTACAGC TGC GTGCACC ACATAGCGCT GGACGGCTTT GGCACCACCT  
GGAGATGTCTG ACGCACGTGG TGTATCGCGA CCTGCCGAAA CCGTGGTGGA

·LLeuPheGln ArgIleAla GluLeuTyrGly GluGlyLeu AlaGlyAla

5051 TGCTGTTCCA GCGTATCGCC GAACTCTATG GCGAAGGGCT GGCAGGAGCT  
ACGACAAGGT CGCATAGCGG CTTGAGATAC CGCTTCCCGA CCGTCCCTCGA

ValProSerPro SerProPhe GlyLeuLeu AspGluValLeu AlaGluGlu·

5101 GTGCCGTCGC CATCGCCGTT TGGCCTGCTG GATGAGGTAC TGGCCGAAGA  
CACGGCAGCG GTAGCGGCAA ACCGGACGAC CTACTCCATG ACCGGCTTCT

·LeuThrArg GluGluSerGly LysAsn**Ala AlaAlaArg SerPheTrpGln**·

5151 GCTGACCCGC GAGGAGAGTG GCAAGAACGC TGCCGCCC GC AGCTTCTGGC  
CGACTGGGCG CTCCTCTCAC CGTTCTTGCG ACGGCGGGCG TCGAAGACCG

·GGluGlnLeu GlnAlaTrp ProGluValLys SerPheGly AspThrArg

5201 AGGAGCAATT GCAGGCCTGG CCCGAGGTGA AATCCTTTGG CGACACCCGC  
TCCTCGTTAA CGTCCGGACC GGGCTCCACT TTAGGAAACC GCTGTGGGCG

AlaProIleAla AlaGluPhe IleArgGlu SerArgProLeu ProAlaAla·

5251 GCCCCATCG CCGCCGAATT TATTCGCGAG AGCCGCCCCC TGCCGGCGGC  
CGGGGGTAGC GGCGGCTTAA ATAAGCGCTC TCGGCGGGG ACGGCCGCG

·LeuTrpGln SerLeuThrGly PheAlaAsp GluHisLys LeuGlyTrpPro·

5301 GCTGTGGCAA TCCCTGACCG GCTTTGCCGA CGAGCACAAG CTGGGTTGGC  
CGACACCGTT AGGGACTGGC CGAAACGGCT GCTCGTGTTC GACCCAACCG

5351 ·PAspLeuLeu LeuAlaGly LeuSerAlaGln LeuSerLeu AlaSerGly  
 CCGATCTGCT GCTGGCCGGC CTCTCGGCC AGCTCTCCCT TGCCAGTGGC  
 GGCTAGACGA CGACCGGCCG GAGAGCCGGG TCGAGAGGGA ACGGTCACCG

5401 GlnGlnGlnThr LeuLeuGly LeuMetMet MetAsnArgIle GlySerAla·  
 CAGCAACAAA CGTTGCTTGG CCTGATGATG ATGAACCGCA TCGGGTCTGC  
 GTCGTTGTTT GCAACGAACC GGACTIONTAC TACTTGGCGT AGCCCAGACG

5451 ·SerLeuThr ValProCysMet GlnMetAsn IleThrPro LeuAlaLeuAla·  
 CTCCCTGACA GTGCCCTGCA TGCAGATGAA CATCACCCCG TTGGCGCTGG  
 GAGGGACTGT CACGGGACGT ACGTCTACTT GTAGTGGGGC AACCGCGACC

5501 ·ALeuGlyGlu GluLeuAsp LeuAlaGlyAla AlaGlyAla ValAlaLys  
 CGCTCGGTGA AGAACTGGAT CTGGCGGGGG CGGCCGGCGC CGTGGCCAAG  
 GCGAGCCACT TCTTGACCTA GACCGCCCCC GCCGGCCGCG GCACCGGTTT

5551 AlaLysArgGly ValArgLys HisGlnHis TyrArgTyrGlu LeuLeuArg·  
 GCCAAGCGCG GGGTGCSCAA ACACCAACAC TACCGCTACG AACTGCTGCG  
 CGGTTCGCGC CCCACGCGTT TGTGGTTGTG ATGGCGATGC TTGACGACGC

5601 ·ArgAspLeu GlyLeuValGly GlyAspLys ArgLeuPhe GlyProLeuVal·  
 CCGCGACCTT GGCTTGGTGG GGGGCGACAA GCGATTGTTC GGCCCCCTGG  
 GGCGCTGGAA CCGGACCACC CCCCCTGTGTT CGCTAACAAAG CCGGGGGACC

5651 ·VAsnIleMet ProPheAsp HisAlaArgArg PheGlyPro LeuSerAla  
 TCAACATCAT GCCGTTTCGAT CACGCCCGCC GTTTCGGGCC GCTCAGTGCC  
 AGTTGTAGTA CCGCAAGCTA GTGCGGGCGG CAAAGCCCGG CGAGTCACGG

5701 HisIleLeuAsn IleSerAla GlyProVal GluAspLeuThr IleGluVal·  
 CATATCCTCA ACATCAGCGC CGGGCCGGTG GAGGATCTCA CCATAGAGGT  
 GTATAGGAGT TGTAAGTCGCG GCCCGGCCAC CTCCTAGAGT GGTATCTCCA

5751 ·GlnValGly AlaAspGlyGln ProArgLeu AspLeuAsp AlaAsnProGly·  
 GCAGGTCCGGC GCCGATGGTC AGCCCAGACT GGATCTGGAC GCCAACCCCG  
 CGTCCAGCCG CGGCTACCAG TCGGGTCTGA CCTAGACCTG CGGTTGGGGC

5801 ·GCysTyrGln HisAlaAsp LeuAlaThrIle AlaAspThr LeuPheAla  
 GCTGCTACCA GCATGCCGAT CTGGCTACCA TCGCCGATAC CCTGTTTCGCT  
 CGACGATGGT CGTACGGCTA GACCGATGGT AGCGGCTATG GGACAAGCGA

5851 LeuLeuGlyArg TrpLeuAla GlnProAla GlnThrLeuGly SerLeuLys·  
 CTGCTGGGCC GCTGGCTGGC CCAGCCCGCC CAGACCCTGG GCAGCCTCAA  
 GACGACCCCG CGACCGACCG GGTCGGGCGG GTCTGGGACC CGTCGGAGTT

5901 ·AlaAspTrp LeuAlaGluGln ArgLeuGly SerMetIle ThrAlaProAla·  
 GGCCGATTGG CTGGCCGAGC AGCGGCTGGG ATCCATGATC ACGGCTCCGG  
 CCGGCTAACC GACCGGCTCG TCGCCGACCC TAGGTACTAG TGCCGAGGCC

5951 ·AHisGluVal IleLysVal ArgProValLeu AspAlaLeu CysHisPhe  
 CTCACGAAGT GATCAAGGTG CGCCCCGTGC TGGACGCGCT CTGCCACTTC  
 GAGTGCTTCA CTAGTTCCAC GCGGGGCACG ACCTGCGCGA GACGGTGAAG

6001 AlaAlaGlnThr ProAsnLys IleAlaLeu GluGlnGlyGlu AlaArgPhe·  
 GCCGCCAGA CCCGAACAA GATTGCCCTG GAGCAGGGAG AAGCCCGCTT  
 CGGCGGTCT GGGGCTTGTT CTAACGGGAC CTCGTCCCTC TTCGGGCGAA

6051 ·SerTyrGlu AlaLeuLeuAla ArgCysGlu GlnMetAla AlaAlaLeuGln·  
 CAGCTACGAG GCGCTGCTGG CCCGCTGCGA GCAGATGGCG GCAGCCCTGC  
 GTCGATGCTC CGCGACGACC GGGCGACGCT CGTCTACCGC CGTCGGGACG

6101 ·GAlaSerGly ValGlnPro GlyAspArgVal GlyValMet LeuAlaArg  
 AGGCGTCCGG CGTGCAACCC GGGGACAGGG TCGGCGTCAT GCTGGCCCGC  
 TCCGACGGCC GCACGTTGGG CCCCTGTCCC AGCCGCAGTA GCACCGGGCG

SerProGlnAla IlePheAla GlnLeuAla ValLeuLeuAla GlyAlaVal·  
 6151 TCTCCCCAGG CCATCTTCGC CCAGCTGGCG GTGCTGCTGG CGGGCGCCGT  
 AGAGGGGTCC GGTAGAAGCG GGTCGACCGC CACGACGACC GCCCGCGGCA  
 ·TyrValPro LeuAspProGlu GlnProLeu GluArgGln GlyHisIleLeu·  
 6201 CTATGTGCCG CTCGACCCCG AGCAACCGCT GGAGCGTCAG GGCCACATAC  
 GATACACGGC GAGCTGGGGC TCGTTGGCGA CCTCGCAGTC CCGGTGTATG  
 ·LArgLeuGly GluValLys ThrLeuIleThr GlnAlaGlu TyrArgHis  
 6251 TGCGGCTGGG CGAGGTCAAG ACTCTGATCA CCCAGGCCGA GTACCGTCAC  
 ACGCCGACCC GCTCCAGTTC TGAGACTAGT GGGTCCGGCT CATGGCAGTG  
 LysLeuAlaSer LeuPheGlu GlyArgThr LeuLeuAlaGly AspLeuVal·  
 6301 AAGCTGGCCA GCCTGTTTGA GGGCCGCACT CTCCTGGCGG GGGATCTGGT  
 TTCGACCGGT CGGACAAACT CCCGGCGTGA GAGGACCGCC CCCTAGACCA  
 ·SerGlyAsp ArgLeuAsnGln SerAlaAla GlyArgAla ValAlaTyrLeu·  
 6351 GAGCGGCGAT CGGCTCAACC AGTCGGCCGC CGGTCGCGCC GTTGCCTACC  
 CTCGCCGCTA GCCGAGTTGG TCAGCCGGCG GCCAGCGCGG CAACGGATGG  
 ·LMetPheThr SerGlySer ThrGlyLeuPro LysGlyVal AlaValSer  
 6401 TGATGTTTAC CTCGGGCTCG ACCGGCCTGC CCAAGGGGGT GCGGTCAGC  
 ACTACAAGTG GAGCCCGAGC TGGCCGACG GGTTCGCCCA CCGCCAGTCG  
 HisGlyAlaLeu AspHisPhe AlaAlaAla AlaArgCysArg TyrHisLeu·  
 6451 CACGGGGCGC TGGATCACTT CGCCGCTGCC GCCCGCTGCC GCTATCACCT  
 GTGCCCGCG ACCTAGTGAA GCGGCGACGG CGGGCGACGG CGATAGTGGA  
 ·AsnGluGly AlaArgMetLeu GlnPheAla ProPheAsn PheAspAlaSer·  
 6501 GAACGAGGGC GCGCGGATGC TGCAATTTGC CCCCTTCAAT TTCGACGCCA  
 CTTGCTCCCG CGCGCCTACG ACGTTAAACG GGGGAAGTTA AAGCTGCGGT  
 ·SIleGluGlu ValPheAla ThrLeuSerAla GlyAlaThr LeuValLeu  
 6551 GCATAGAGGA GGTGTTTCGCC ACCCTGAGCG CCGGTGCCAC CCTGGTGTCTG  
 CGTATCTCCT CCACAAGCGG TGGGACTCGC GGCCACGGTG GGACCACGAC  
 ArgThrAspAla LeuLeuGlu SerMetAla AlaPheAlaAla GlyValGlu·  
 6601 CGCACCGACG CCCTGCTCGA ATCCATGGCC GCCTTTGCGG CCGGGGTAGA  
 GCGTGGCTGC GGGACGAGCT TAGGTACCGG CGGAAACGCC GGCCCCATCT  
 ·GlnMetGlu IleThrHisLeu AspLeuPro ThrAlaPhe TrpAsnGluTrp·  
 6651 GCAGATGGAA ATCACCACCC TCGATCTGCC CACCGCGTTC TGAACGAGT  
 CGTCTACCTT TAGTGGGTGG AGCTAGACGG GTGGCGCAAG ACCTTGCTCA  
 ·TValValAla LeuThrAla GlyGlnAlaHis IleProAla SerLeuAla  
 6701 GGGTGGTGGC GCTGACGGCG GGCCAGGCC ACATTCCGGC CTCCCTTGCC  
 CCCACCACCG CACTGCCGC CCGGTCCGGG TGTAAGGCCG GAGGGAACGG  
 ThrValIleIle GlyGlyGlu AlaValTyr ProGluGlnLeu AlaGlnTrp·  
 6751 ACCGTCATCA TAGGCGGCGA GGCTGTCTAC CCCGAGCAAC TGGCCCAGTG  
 TGGCAGTAGT ATCCGCCGCT CCGACAGATG GGGCTCGTTG ACCGGGTCAC  
 ·GlnArgGln GlyArgHisAsp ValArgLeu PheAsnThr TyrGlyProThr·  
 6801 GCAGCGCCAA GGTCGCCATG ACGTGCGCCT GTTCAACACC TACGGCCCCA  
 CGTCGCGGTT CCAGCGGTAC TGCACGCGGA CAAGTTGTGG ATGCCGGGGT  
 ·TGluThrThr ValValVal ThrThrGlnGlu LeuGlnGln GluAspPro  
 6851 CCGAGACCAC TGTGGTGGTC ACTACCAGG AGCTGCAGCA GGAAGACCCG  
 GGCTCTGGTG ACACCACCAG TGATGGGTCC TCGACGTCGT CCTTCTGGGC  
 AsnGlnAlaGln LeuProIle GlyLeuPro LeuProGlyMet GlnAlaLeu·  
 6901 AACCAGGCC AGCTGCCCAT CCGTCTGCCG CTGCCCGGCA TGCAGGCGCT  
 TTGGTCCGGG TCGACGGGTA GCCAGACGGC GACGGGCCGT ACGTCCGCGA

6951 ·IleLeuGly AlaGlyGluGln ProAlaSer GluGlyGlu LeuValLeuLeu·  
 CATTCTGGGG GCAGGGGAAC AGCCTGCCAG CGAGGGGGAG CTGGTGCTGC  
 GTAAGACCCC CGTCCCCTTG TCGGACGGTC GCTCCCCCTC GACCACGACG

7001 ·LGlyProGln LeuAlaAsn GlyTyrAlaGly SerAlaGln SerAlaAsn  
 TCGGCCACCA GCTTGCCAAC GGCTATGCGG GCAGTGCGCA GAGCGCGAAT  
 AGCCGGGTGT CGAACGGTTG CCGATACGCC CGTCACGCGT CTCGCGCTTA

7051 ValGlnSerAla GlnGlyGly PheAspThr LeuArgValGly AlaGlnAla·  
 GTGCAGAGTG CGCAGGGCGG TTTTGACACC CTTAGGGTCG GCGCCCAGGC  
 CACGTCTCAC GCGTCCCGCC AAAACTGTGG GAATCCCAGC CGCGGGTCCG

7101 ·LeuSerVal TyrArgThrGly AspArgVal ArgLeuAla AlaGlyArgLeu·  
 GCTGTCCGTC TATCGCACAG GCGATCGGGT GCGGCTGGCG GCCGGCCGGC  
 CGACAGGCAG ATAGCGTGTC CGCTAGCCCA CGCCGACCGC CGGCCGCGCG

7151 ·LValTyrLeu GlyArgArg AspAsnGluPhe LysIleSer GlyTyrArg  
 TGGTCTATCT GGGTCGGCGC GACAACGAAT TCAAGATAAG CGGCTATCGT  
 ACCAGATAGA CCCAGCCGCG CTGTTGCTTA AGTTCTATTC GCCGATAGCA

7201 IleGlnProGly GluValGlu AlaGlnLeu LeuAlaLeuPro GlyValAsp·  
 ATCCAGCCCC GCGAGGTGGA GGCCAGCTG CTGGCCCTGC CCGGGGTGGA  
 TAGGTCGGGC CGCTCCACCT CCGGGTCGAC GACCGGGACG GGCCCCACCT

7251 ·GluAlaCys ValGlnGlyVal SerIleGly SerValArg ArgLeuValAla·  
 CGAGGCCTGC GTGCAGGGAG TGAGCATCGG CAGCGTACGC CGGCTGGTGG  
 GCTCCGGACG CACGTCCCTC ACTCGTAGCC GTCGCATGCG GCCGACCACC

7301 ·APheValAla GlySerGlu ArgAspSerArg AlaIleLys AlaGlnLeu  
 CCTTCGTGGC CGGCTCCGAG CGCGACAGTC GGGCCATCAA GGCGCAGCTA  
 GGAAGCACCG GCCGAGGCTC GCGCTGTCAG CCCGGTAGTT CCGCGTCGAT

7351 AlaLysValLeu ProAlaAla MetIlePro ThrAspTyrArg HisTyrAsp·  
 GCCAAGGTGT TGCCCGCCGC CATGATCCCC ACCGACTATC GCCACTATGA  
 CGGTTCCACA ACGGGCGGCG GTACTAGGGG TGGCTGATAG CGGTGATACT

7401 ·GlnLeuPro ArgThrGlySer AsnLysLeu AspArgLys AlaLeuLeuAla·  
 CCAGCTGCCC CGCACCGGCT CCAACAAGCT GGATCGCAAG GCCCTGCTGG  
 GGTGACGGG GCGTGGCCGA GGTGTTCTGA CCTAGCGTTC CGGGACGACC

7451 ·AGlnTyrGln SerThrAsp GluAlaLeuThr LeuGlySer GluThrGlu  
 CTCAGTACCA GTCCACGGAT GAGGCACTGA CCCTCGGCAG TGAAACCGAG  
 GAGTCATGGT CAGGTGCCTA CTCCGTGACT GGGAGCCGTC ACTTTGGCTC

7501 AsnArgValGly AlaIleTrp GlnGlnIle LeuGlyLeuAla ThrMetAla·  
 AACCGGGTCG GCGCCATCTG GCAGCAGATC CTGGGGCTGG CCACCATGGC  
 TTGGCCCAGC CGCGGTAGAC CGTCGTCTAG GACCCCGACC GGTGGTACCG

7551 ·ProAlaAsp AsnPhePheGlu LeuGlyGly GlnSerLeu GlnThrIleGln·  
 GCCGGCGGAC AACTTCTTCG AGCTCGGGGG CCAGTCCCTG CAGACCATAAC  
 CGGCCGCCTG TTGAAGAAGC TCGAGCCCCC GGTCAGGGAC GTCTGGTATG

7601 ·GIleValAsn ArgLeuGly ValGluPheGly ValGlnVal LysValSer  
 AGATAGTGAA CCGGCTCGGC GTCGAGTTCG GGGTACAGGT CAAGGTATCC  
 TCTATCACTT GGCCGAGCCG CAGCTCAAGC CCCATGTCCA GTTCCATAGG

7651 AspValPheAsp HisProArg LeuAspAsp PheCysArgPhe LeuAspGly·  
 GATGTGTTTC ACCACCCCCG TCTGGACGAC TTCTGCCGCT TCCTCGATGG  
 CTACACAAGC TGGTGGGGGC AGACCTGCTG AAGACGGCGA AGGAGCTACC

7701 ·LysLeuThr GluAspGluGlu SerValGlu MetValTrp \*\*\*  
 CAAGCTGACC GAGGATGAAG AGAGCGTGGA GATGGTGTGG TGATGAGCAA  
 GTTCGACTGG CTCCTACTTC TCTCGCACCT CTACCACACC ACTACTCGTT

orf 5 (*amlA*) → MetAlaPhe AspPheSer GlyLysArg ValTrpValThr·  
 7751 GGAGCAACAA GCA**ATGG**CCT TTGATTTTCAG TGGCAAGCGG GTCTGGGTGA  
 CCTCGTTGTT CGTTACCGGA AACTAAAGTC ACCGTTTCGCC CAGACCCACT  
 ·TGlyAlaGly ArgGlyIle GlyArgGluVal AlaGluGln PheValAla  
 7801 CCGGGGCTGG CCGTGGCATA GGGCGCGAGG TGGCCGAGCA GTTCGTGGCC  
 GGCCCCGACC GGCACCGTAT CCCGCGCTCC ACCGGCTCGT CAAGCACCGG  
 AlaGlyAlaAla ValValGly LeuAspLeu AlaPheProGlu AlaAspTyr·  
 7851 GCCGGCGCCG CCGTGGTGGG GCTGGATCTG GCGTTCCCCG AGGCAGACTA  
 CGGCCGCGGC GGCACCACCC CGACCTAGAC CGCAAGGGGC TCCGTCTGAT  
 ·ProTyrAla ThrArgLeuLeu AspIleGly AspAlaAla AlaValAsnAla·  
 7901 CCCCTATGCC ACCCGGCTGC TCGACATCGG TGATGCCGCA GCGGTGAACG  
 GGGGATACGG TGGGCCGACG AGCTGTAGCC ACTACGGCGT CGCCACTTGC  
 ·ACysCysSer AlaLeuLeu AlaAspGlyGly LeuAspVal LeuValAsn  
 7951 CCTGCTGCTC CGCGCTGCTG GCGGACGGCG GGCTGGATGT GCTGGTCAAC  
 GGACGACGAG GCGCGACGAC CGCCTGCCGC CCGACCTACA CGACCAGTTG  
 GlyAlaGlyVal LeuArgLeu GlyProThr GluAsnLeuSer AspGlnAsp·  
 8001 GGGGCCGGGG TGCTGCGCCT CGGGCCCACC GAAAACTTGA GCGACCAGGA  
 CCCC GGCCCC ACGACGCGGA GCCCGGGTGG CTTTTGAACT CGCTGGTCCT  
 ·TrpHisAsp CysMetThrVal AsnAlaThr GlyValPhe TyrLeuLeuArg·  
 8051 TTGGCACGAC TGCATGACGG TCAACGCCAC CGGCGTCTTC TATCTGCTGC  
 AACCGTGCTG ACGTACTGCC AGTTGCGGTG GCCGCAGAAG ATAGACGACG  
 ·AAlaLeuVal ProHisPhe LysAlaGlnArg CysGlyAla IleValThr  
 8101 GGGCCCTGGT GCCCCACTTC AAGGCGCAGC GGTGCGGCGC CATCGTCACC  
 CCCGGGACCA CGGGGTGAAG TTCCGCGTCG CCACGCCGCG GTAGCAGTGG  
 IleGlySerAsn AlaAlaHis ValProArg MetGlnMetAla AlaTyrCys·  
 8151 ATAGGCTCCA ACGCGGCTCA TGTGCCGCGC ATGCAGATGG CGGCCTACTG  
 TATCCGAGGT TGCGCCGAGT ACACGGCGCG TACGTCTACC GCCGATGAC  
 ·AlaSerLys AlaAlaValThr SerLeuThr GlnThrVal GlyLeuGluLeu·  
 8201 CGCCTCCAAG GCGGCGGTCA CCAGCCTGAC CCAGACGGTG GGGCTGGAGC  
 GCGGAGGTTT CGCCGCCAGT GGTCGGACTG GGTCTGCCAC CCCGACCTCG  
 ·LAlaProPhe GlyGlyArg ValAsnLeuVal SerProGly SerThrAsp  
 8251 TGGCCCCCTT CGGCGGGCGG GTCAACCTGG TGTCGCCGGG CTCGACGGAT  
 ACCGGGGGAA GCCGCCCGCC CAGTTGGACC ACAGCGGCCC GAGCTGCCTA  
 ThrProMetLeu ArgGlyMet LeuProAsp GluGlyAlaMet ThrArgThr·  
 8301 ACCCCCATGT TGCGGGGCAT GCTGCCGGAC GAGGGGGCCA TGACCCGCAC  
 TGGGGGTACA ACGCCCCGTA CGACGGCCTG CTCCCCCGGT ACTGGGCGTG  
 ·IleAlaGly LeuProAspGln PheLysLeu GlyIlePro LeuArgLysIle·  
 8351 CATTGCCGGG CTACCGGATC AGTTCAAGCT CGGTATTCCC CTGCGCAAGA  
 GTAACGGCCC GATGGCCTAG TCAAGTTCGA GCCATAAGGG GACGCGTTCT  
 ·IAlaThrPro AlaGluIle AlaAsnThrVal LeuPheLeu AlaSerAsp  
 8401 TAGCCACCCC GGCGGAGATC GCCAATACAG TGCTCTTCCT GGCCTCGGAC  
 ATCGGTGGGG CCGCCTCTAG CGGTTATGTC ACGAGAAGGA CCGGAGCCTG  
 LeuAlaSerHis IleThrLeu GlnAspLeu ValValAspGly GlyAlaThr·  
 8451 TTGGCCAGCC ATATCACGCT GCAGGATCTG GTCGTCGATG GCGGCGCCAC  
 AACCAGTCCG TATAGTGC GA CGTCCCTAGAC CAGCAGCTAC CGCCGCGGTG  
 ·LeuSerAla \*\*\*  
 8501 CCTGAGCGCC **TGAGG**TAAAGT CATGAACAAT ATGATAACGC TGCTAAAACA  
 GGACTCGCGG ACTCCATTCA GTACTTGTTA TACTATTGCG ACGATTTTGT

8551 GCTGGAACGC CAGGGTGTCA GGCTGGCCCT CAACGAGAAA GGCAGCTAA  
 CGACCTTGCG GTCCACAGT CCGACCGGA GTTGCTCTTT CCCGTCGATT

8601 TTTCCAGTC GAGCAAGGAG GCACTGACCC CCGCCATCGG CGCCCTCATC  
 AAAGGGTCAG CTCGTTCTC CGTGACTGGG GGCGGTAGCC GCGGGAGTAG

**orf 6 (amlG)** →

8651 AAGGCGCACA AGGATGAGCT **GGTGC**GTCTGT CTGGCGGCC GCGCCGCTT  
 TTCCGCGTGT TCCTACTCGA CCACGCGACA GACCGCCGGG CGCGGCGGAA

**ValArgCys LeuAlaAlaArg AlaAlaPhe·**

8701 CGAGGCACCT ATCGTCGCC AGGGAGCCCA GAGCGGGCCG CTCTCGTCGT  
 GCTCCGTGGA TAGCAGCGGG TCCCTCGGGT CTCGCCCGGC GAGAGCAGCA

**·GluAlaPro IleValAlaGln GlyAlaGln SerGlyPro LeuSerSerSer·**

8751 CCCAGAGCGG GCTCTGGTTT ATCGAGCAGT ACGAGGAGGC CTCCCACCTC  
 GGGTCTCGCC CGAGACCAA TAGCTCGTCA TGCTCCTCCG GAGGGTGGAG

**·SGlnSerGly LeuTrpPhe IleGluGlnTyr GluGluAla SerHisLeu**

8801 TACAATATGC CGGTCTATTT TCGGGTGAGC GGCGAGCTGG ACACAGCCGC  
 ATGTTATACG GCCAGATAAA AGCCACTCG CCGCTCGACC TGTGTCGGCG

**TyrAsnMetPro ValTyrPhe ArgValSer GlyGluLeuAsp ThrAlaAla·**

8851 CCTGGAGTTT GCCTTCGACC ACCTGTTTGC GCGCCACCCC AGCATGCGCA  
 GGACCTCAA CGGAAGCTGG TGGACAAACG CGCGGTGGGG TCGTACGCGT

**·LeuGluPhe AlaPheAspHis LeuPheAla ArgHisPro SerMetArgThr·**

8901 CCCGTTTCGT CAAGGACGAG GCGGGCAGGG GCGCCCAGGA GATCCTGCCC  
 GGGCAAAGCA GTTCCTGCTC CGCCCGTCCC CGCGGGTCTT CTAGGACGGG

**·TArgPheVal LysAspGlu AlaGlyArgGly AlaGlnGlu IleLeuPro**

8951 CACACGCCCT TCACGCTGCA GATTGAGGAC GTGAGCGAGC TACTCGCTGC  
 GTGTGCGGGA AGTGCGACGT CTAACCTCTG CACTCGCTCG ATGAGCGACG

**HisThrProPhe ThrLeuGln IleGluAsp ValSerGluLeu LeuAlaAla·**

9001 CGAGCGTGAG GCCTATGTGG CTCGCCGGGT GCGCGAGGAG ATTGCCCGTC  
 GCTCGCACTC CGGATACACC GAGCGGCCCA CGCGCTCCTC TAACCGGCAG

**·GluArgGlu AlaTyrValAla ArgArgVal ArgGluGlu IleGlyArgPro·**

9051 CCTTCTCCCT GACCCAGGGG GATCTCAGCC GGGTGCACCT GATCCGGCTC  
 GGAAGAGGGA CTGGGTCCCC CTAGAGTCGG CCCACGTGGA CTAGGCCGAG

**·PPheSerLeu ThrGlnGly AspLeuSerArg ValHisLeu IleArgLeu**

9101 GGCAGCCGCG AACACGTACT GCTGATCACC CAGCACCACA TCATCTCCGA  
 CCGTCGGCGC TTGTGCATGA CACTAGTGG GTCGTGGTGT AGTAGAGGCT

**GlySerArgGlu HisValLeu LeuIleThr GlnHisHisIle IleSerAsp·**

9151 CGGCTGGTTCG GTCAAGAACA TGTTCCGGGA TCTCAAGCGC GCCTTCTTG  
 GCCGACCAGC CAGTTCCTGT ACAAGCGCCT AGAGTTCGG CGGAAAGAAC

**·GlyTrpSer ValLysAsnMet PheAlaAsp LeuLysArg AlaPheLeuAla·**

9201 CCCATCAGAA CCGCGAGCCC CTGCAGGTGA GCGAGCTGCC GCTCACCTAC  
 GGGTAGTCTT GGCGCTCGGG GACGTCCACT CGCTCGACGG CGAGTGGATG

**·AHisGlnAsn ArgGluPro LeuGlnValSer GluLeuPro LeuThrTyr**

9251 ATCGACTATG CCCGCTGGTT CAACTCGCCG CATTCTCTCG ATTATCACGC  
 TAGCTGATAC GGGCGACCAA GTTGGAGCGGC GTAAAAGAGC TAATAGTGCG

**IleAspTyrAla ArgTrpPhe AsnSerPro HisPheLeuAsp TyrHisAla·**

9301 CGAGTTCAAG CCGTTCCTGGG TCGACAGGCT CCGTGGCAGC CCCGAGGTGC  
 GCTCAAGTTC GGCAAGACCC AGCTGTCCGA GCCACCGTCG GGGCTCCACG

**·GluPheLys ProPheTrpVal AspArgLeu GlyGlySer ProGluValHis·**

9351 ·HGlyLeuPro LeuAspLys ProArgProAla HisGlnAla SerGlyGly  
 ACGGCCTGCC GCTCGACAAG CCGCGCCCGG CCCATCAGGC CAGCGGCGGC  
 TGCCGGACGG CGAGCTGTTC GGCGCGGGCC GGGTAGTCCG GTCGCCGCCG

9401 GluLeuValPhe SerThrIle AspAsnGly LeuTrpGluSer PheLysArg·  
 GAGCTGGTCT TCTCCACCAT AGACAACGGG CTGTGGGAGA GCTTCAAGCG  
 CTCGACCAGA AGAGGTGGTA TCTGTTGCC GACACCCTCT CGAAGTTCGC

9451 ·LeuCysGln ArgHisAsnThr SerAsnPhe IleGlyLeu HisAlaLeuPhe·  
 GCTGTGCCAG CGCCACAACA CCTCCAATT CATCGGCCTG CACGCCCTGT  
 CGACACGGTC GCGGTGTTGT GGAGGTTGAA GTAGCCGGAC GTGCGGGACA

9501 ·PAlaLeuLeu MetValArg GlnSerGlyGlu LysGluVal ValIleGly  
 TTGCCCTGCT GATGGTGC GC CAGAGCGGCG AGAAGGAAGT CGTCATAGGC  
 AACGGGACGA CTACCACGCG GTCTCGCCGC TCTTCCTTCA GCAGTATCCG

9551 ThrProLeuAla TyrArgGlu ArgHisGlu IleGluSerLeu ValGlyPhe·  
 ACGCCGCTCG CCTACCGCGA GCGCCACGAG ATAGAGTCTC TGGTGGGCTT  
 TGCGGCGAGC GGATGGCGCT CGCGGTGCTC TATCTCAGAG ACCACCCGAA

9601 ·PheValAsn ThrLeuValLeu ArgThrArg LeuAspGly ArgProSerPhe·  
 CTTCGTCAAT ACCTTGGTGC TGCGCACCCG GCTCGACGGT CGCCCCAGCT  
 GAAGCAGTTA TGGAACCACG ACGCGTGGGC CGAGCTGCCA GCGGGGTCGA

9651 ·PValAspTyr LeuGlnGln CysArgGluGlu AspLeuAla AlaPheAsp  
 TTGTCGACTA CTGCAGCAG TGCCGGGAGG AGGATCTGGC GGCCTTCGAT  
 AACAGCTGAT GGACGTCGTC ACGGCCCTCC TCCTAGACCG CCGGAAGCTA

9701 HisGlnLeuTyr ArgPheGlu AlaLeuAla GluAlaIleGly AlaAspArg·  
 CACCAGCTCT ACCGCTTCGA GGCGCTGGCC GAGGCCATAG GCGCCGATCG  
 GTGGTCGAGA TGGCGAAGCT CCGCGACCGG CTCCGGTATC CGCGGCTAGC

9751 ·ThrThrAla IleAsnProIle PheGlnIle MetLeuVal TyrGlnAlaLys·  
 CACCACCGCC ATCAACCCCA TCTTCCAGAT CATGCTGGTC TATCAGGCCA  
 GTGGTGGCGG TAGTTGGGGT AGAAGGTCTA GTACGACCAG ATAGTCCGGT

9801 ·LValAspPhe AsnAspLeu IleProGlyCys GlnLeuVal GluGluThr  
 AGGTGGATTT CAACGATCTC ATCCCCGGCT GCCAGCTGGT GGAGGAGACC  
 TCCACCTAAA GTTGCTAGAG TAGGGGCCGA CGGTCGACCA CCTCCTCTGG

9851 SerProValLeu ProAlaLys ThrAspIle SerValLysVal ThrGluLeu·  
 TCGCCGGTGC TGCCTGCCAA GACCGACATC TCGGTCAAGG TGACCGAGTT  
 AGCGGCCACG ACGGACGGTT CTGGCTGTAG AGCCAGTTCC ACTGGCTCAA

9901 ·MetAspSer ValArgValAsp TrpLeuPhe AlaThrAla LeuPheGluArg·  
 GATGGATTCC GTCAGGGTGG ACTGGCTGTT CGCCACCGCC CTGTTTCGAGC  
 CTACCTAAGG CAGTCCCACC TGACCGACAA GCGGTGGCGG GACAAGCTCG

9951 ·AGluThrIle GlnAlaTyr AlaAspArgLeu LeuHisLeu MetArgAla  
 GAGAGACCAT CCAGGCTTAC GCCGATCGCC TGCTGCACCT GATGCGCGCC  
 CTCTCTGGTA GGTCCGAATG CGGCTAGCGG ACGACGTGGA CTACGCGCGG

10001 ValValThrAla ProGluThr AspIleTrp GlnLeuProLeu GluAlaGly·  
 GTGGTGA CTG CCCCCGAGAC CGACATCTGG CAACTGCCGC TGGAGGCGGG  
 CACCACTGAC GGGGGCTCTG GCTGTAGACC GTTGACGGCG ACCTCCGCC

10051 ·ThrAspArg AlaAlaLeuAla AlaGluLeu AlaSerLeu ProLeuAspTyr·  
 CACAGACCGA GCCGCGCTGG CCGCCGAGCT CGCCAGCCTG CCCCTAGATT  
 GTGTCTGGCT CGGCGCGACC GGCGGCTCGA GCGGTCCGAC GGGGATCTAA

10101 ·TProSerArg AspThrLeu LeuCysHisIle GluArgArg AlaAlaGln  
 ACCCAAGCCG CGACACCCTG CTTTGCCACA TCGAGCGCCG GGCCGCGCAG  
 TGGGTTCCGGC GCTGTGGGAC GAAACGGTGT AGCTCGCGGC CCGGCGCGTC

	PheProAspSer	LeuAlaVal	SerAspGly	GluGlyAla	Leu	SerTyrGly
10151	TTCCCCGACT	CGCTGGCAGT	GAGTGACGGC	GAAGGCGCCC	TGAGTTACGG	AAGGGGCTGA
	GCGACCGTCA	CTCACTGCCG	CTTCCGCGGG	ACTCAATGCC		
	GluLeu	Glu	AlaArgAlaAsn	ArgLeuAla	HisTrpLeu	GlnSerCysGly
10201	CGAGCTGGAG	GCGCGCGCCA	ACCGGCTGGC	CCACTGGCTG	CAATCCTGCG	GCTCGACCTC
	CGCGCGCGGT	TGGCCGACCG	GGTGACCGAC	GTTAGGACGC		
	GValThrPro	GlyAlaAla	IleGlyIleGln	AlaLysArg	AspValAla	
10251	GCGTGACGCC	GGGCGCCGCC	ATCGGCATCC	AGGCCAAACG	GGATGTGGCC	CGCACTGCGG
	CCCGCGGCGG	TAGCCGTAGG	TCCGGTTTGC	CCTACACCGG		
	PheValValAla	LeuLeuAla	Cys	TrpLys	AlaGlyAlaAla	TyrValPro
10301	TTCGTGGTGC	CCCTGCTCGC	CTGCTGGAAG	GCGGGGGCGG	CCTATGTACC	AAGCACCAGC
	GGGACGAGCG	GACGACCTTC	CGCCCCCGCC	GGATACATGG		
	LeuAsp	Pro	AlaTyrProAla	GluArgLeu	AlaHisIle	LeuSerAspAla
10351	GCTGGATCCC	GCCTATCCCG	CCGAGCGGCT	GGCCCATATC	CTGAGCGACG	CGACCTAGGG
	CGGATAGGGC	GGCTCGCCGA	CCGGGTATAG	GACTCGCTGC		
	ASerIleAla	LeuValLeu	GlyGlyGluPro	AspAlaArg	LeuAlaGlu	
10401	CCAGCATTGC	GTTGGTGCTG	GGAGGGGAGC	CGGATGCCCG	GCTCGCCGAA	GGTCGTAACG
	CAACCACGAC	CCTCCCCTCG	GCCTACGGGC	CGAGCGGCTT		
	AlaIleLysGly	ThrAspAla	GlyTyrHis	AsnLeuHisArg	LeuAlaLeu	
10451	GCCATCAAGG	GCACAGATGC	CGGTTACCAC	AACCTGCATC	GGCTGGCGCT	CGGTAGTTCC
	CGTGTCTACG	GCCAATGGTG	TTGGACGTAG	CCGACCGCGA		
	AspGlyLeu	ProThrSerVal	ProAlaIle	ProArgAsp	AlaAlaMet	Leu
10501	GGATGGGCTG	CCAACCAGCG	TACCCGCCAT	CCCCCGGGAC	GCCGCCATGC	CCTACCCGAC
	GGTTGGTCGC	ATGGGCGGTA	GGGGGCCCTG	CGGCGGTACG		
	LAlaGlnVal	IleTyrThr	SerGlySerThr	GlyLeuPro	LysGly	Val
10551	TGGCCAGGT	CATCTACACC	TCCGGCAGCA	CGGGCCTGCC	CAAGGGGGTC	ACCGGTCCA
	GTAGATGTGG	AGGCCGTCGT	GCCCGACGCG	GTTCCCCCAG		
	MetValGluGln	GlySerLeu	ValAsnLeu	MetAlaAspHis	AlaGluArg	
10601	ATGGTGGAGC	AGGGCAGCCT	GGTCAACCTG	ATGGCGGATC	ATGCAGAGCG	TACCACCTCG
	TCCCCTCGGA	CCAGTTGGAC	TACCGCCTAG	TACGTCTCGC		
	IleAlaLeu	AspHisGluGly	AlaMetPhe	AsnCysMet	SerLeuSer	Phe
10651	CATCGCCCTT	GATCATGAGG	GGGCCATGTT	CAACTGCATG	TCTCTGTCTG	GTAGCGGGAA
	CTAGTACTCC	CCCGGTACAA	GTTGACGTAC	AGAGACAGCA		
	PAspAlaGly	AsnMetThr	ThrLeuLeuPro	LeuTyrCys	GlyAlaAla	
10701	TCGATGCGGG	CAACATGACG	ACCCTGCTGC	CGCTCTACTG	CGGCGCGGCC	AGCTACGCC
	GTTGTACTGC	TGGGACGACG	GCGAGATGAC	GCCGCGCCGG		
	LeuHisPheGly	GluProGly	GluValAla	IleThrAlaAla	IleAsnCys	
10751	CTGCACTTTG	GCGAGCCGGG	CGAGGTGGCC	ATCACGGCTG	CGATCAACTG	GACGTGAAAC
	CGCTCGGCC	GCTCCACCGG	TAGTGCCGAC	GCTAGTTGAC		
	GlyAlaSer	HisMetIleLeu	ProThrAla	LeuLeuAla	AsnLeuLeuPro	
10801	TGGCGCCAGC	CACATGATAC	TGCCGACCGC	CCTGCTGGCG	AACCTGCTGC	ACCGCGGTGC
	GTGTACTATG	ACGGCTGGCG	GGACGACCGC	TTGGACGACG		
	PProThrAsp	LeuGlySer	LeuArgAlaIle	GlyPheGly	GlyGluAla	
10851	CACCGACCGA	TCTCGGTTCT	CTGCGCGCCA	TCGGCTTTGG	TGGCGAAGCC	GTGGCTGGCT
	AGAGCCAAGA	GACGCGCGGT	AGCCGAAACC	ACCCTTCGG		
	CysProSerSer	LeuValGlu	ArgTrpGly	GluArgValAla	LeuTyr	Asn
10901	TGCCCGAGCA	GCCTGGTGGG	ACGCTGGGGG	GAGCGGGTGG	CGCTCTACAA	ACGGGCTCGT
	CGGACCACCT	TGCGACCCCC	CTCGCCCACC	GCGAGATGTT		

10951 ·MetTyrGly ProThrGlu Cys ThrValThr AlaLeuCys AlaArgLeuVal·  
 CATGTACGGC CCGACCGAGT GCACAGTCAC GGCGCTCTGC GCGCGGCTCG  
 GTACATGCCG GGCTGGCTCA CGTGTACAGT CCGCGAGACG CCGCGCCGAGC

11001 ·VProGlyGln ProIleThr IleGlyGlnPro IleSerAsn LeuLysAla  
 TGCCGGGTCA GCCCATCACC ATAGGCCAGC CCATCAGCAA TTTAAAAGCG  
 ACGGCCAGT CGGGTAGTGG TATCCGGTCG GGTAGTCGTT AAATTTTCGC

11051 LeuIleLeuAsp GluGlyGly AsnLeuCys ProValGlyVal ProGlyGlu·  
 CTGATCCTGG ACGAAGGGGG CAACCTCTGC CCTGTGGGGG TGCCCGGCGA  
 GACTAGGACC TGCTTCCCCC GTTGGAGACG GGACACCCCC ACGGGCCGCT

11101 ·LeuCysLeu SerGlyLeuGly LeuAlaArg GlyTyrLeu AsnLeuProGlu·  
 GCTCTGCCTG AGTGGTCTGG GTCTTGCTCG TGGCTACCTC AATCTACCGG  
 CGAGACGGAC TCACCAGACC CAGAACGAGC ACCGATGGAG TTAGATGGCC

11151 ·GArgThrGln GluAlaPhe IleGluLeuAla LeuAspGly ArgThrHis  
 AGCGAACCCA GGAGGCTTTT ATCGAGCTGG CTCTCGACGG TCGTACCCAT  
 TCGCTTGGGT CCTCCGAAA TAGCTCGACC GAGAGCTGCC AGCATGGGTA

11201 ArgLeuTyrArg ThrGlyAsp ArgAlaLeu ArgArgArgAsp GlyAsnIle·  
 CGCCTCTACC GCACAGGCGA TCGGGCGCTC AGGCGCCGCG ACGGCAACAT  
 GCGGAGATGG CGTGTCCGCT AGCCCAGGAG TCCGCGGCGC TGCCGTTGTA

11251 ·GlnTyrLeu GlyArgIleAsp GluGlnIle LysLeuArg GlyTyrArgIle·  
 CCAATATCTG GGCCGGATTG ACGAGCAGAT CAAGCTGCGG GGCTATCGCA  
 GGTATAGAC CCGGCCTAAC TGCTCGTCTA GTTCGACGCC CCGATAGCGT

11301 ·IGluProGly GluIleGlu ThrGlnValAla AlaLeuCys ProAlaIle  
 TCGAGCCCGG CGAGATAGAG ACGCAAGTCG CCGCGCTGTG CCCGGCCATC  
 AGCTCGGGCC GCTCTATCTC TGCGTTCAGC GGCGCGACAC GGGCCGGTAG

11351 ArgGlnIleLys ValValVal GlnGluGly ArgLeuLeuAla TyrAlaCys·  
 CGCCAGATCA AGGTGGTGGT GCAGGAGGGT CGCCTGCTGG CGTACGCCTG  
 GCGGTCTAGT TCCACCACCA CGTCCCTCCA GCGGACGACC GCATGCGGAC

11401 ·LeuHisGlu GlyAlaSerGlu ProAspGly GluAlaLeu LeuGlnArgAla·  
 CCTGCATGAG GGGGCGAGCG AGCCGGACGG CGAGGCCCTG CTGCAACGGG  
 GGACGTA CT CCCCCTCGC TCGGCCTGCC GCTCCGGGAC GACGTTGCC

11451 ·AGlyGluCys LeuProGlu TyrMetValPro ValArgLeu CysTrpLeu  
 CTGGCGAATG CCTGCCCGAA TACATGGTGC CCGTGCGGCT CTGCTGGCTG  
 GACCGCTTAC GGACGGGCTT ATGTACCACG GCCACGCCGA GACGACCGAC

11501 ProGluMetPro LeuThrPro AsnGlyLys LeuAspLeuArg ArgLeuPro·  
 CCCGAGATGC CGCTACCCC CAACGGCAAG CTGGACCTGC GCCGCCTGCC  
 GGGCTCTACG GCGAGTGGGG GTTGCCGTTT GACCTGGACG CCGCGGACGG

11551 ·AlaIleAsp TrpGlnGlnSer LysSerGlu ProGlnSer GluLeuGluGln·  
 CGCCATTGAC TGGCAGCAGA GCAAGAGTGA GCCACAAAGC GAGCTGGAGC  
 GCGGTA ACTG ACCGTCGTCT CGTTCTCACT CCGTGTTTCG CTCGACCTCG

11601 ·GThrValLeu AlaIleTrp GlnGlyValLeu LysGlnPro LeuGlyVal  
 AGACTGTGCT CGCCATCTGG CAGGGGGTGC TCAAGCAGCC CCTCGGGGTG  
 TCTGACACGA GCGGTAGACC GTCCCCACG AGTTCGTCGG GGAGCCCCAC

11651 GluAspAspPhe PheArgLeu GlyGlyAsp SerIleLeuSer IleGlnLeu·  
 GAGGATGACT TCTTCCGACT GGGGGGGAT TCCATCCTCA GCATCCAGCT  
 CTCCTACTGA AGAAGGCTGA CCCCCCTA AGGTAGGAGT CGTAGGTCTGA

11701 ·ThrThrArg LeuArgAspAla GlyLeuHis CysSerVal LysAspValPhe·  
 CACCACAAGG CTGCGGGATG CGGGGCTGCA CTGCAGCGTC AAGGACGTGT  
 GTGGTGTTCC GACGCCCTAC GCCCCGACGT GACGTCGCAG TTCCTGCACA

11751	·PGluAlaLys ThrValArg ArgLeuCysArg GlnLeuGly GlnGlnGln TCGAAGCCAA GACGGTGC GC CCGCTCTGCC GCCAGCTCGG CCAGCAGCAG AGCTTCGGTT CTGCCACGCG GCGGAGACGG CCGTTCGAGCC GGTCGTCTGTC
11801	AlaValSerHis GlnThrGlu GlnGlyAsn LeuValGlyAsp PheProLeu· GCAGTCAGCC ATCAGACCGA ACAGGGCAAC CTGGTTCGGCG ACTTCCCCTGCT CGTCAGTCGG TAGTCTGGCT TGTCCCGTTG GACCAGCCGC TGAAGGGCGA
11851	·HisProIle GlnHisTrpPhe PheGluGln GlyPheAla LysProGlyHis· CCATCCCATC CAGCACTGGT TCTTCGAGCA GGGCTTTGCC AAGCCCGGCC GGTAGGGTAG GTCGTGACCA AGAAGCTCGT CCCGAAACGG TTCGGGCCGG
11901	·HTrpAsnGln GlyValIle LeuArgLeuPro AlaGlyVal GlyAspAla ACTGGAATCA GGGGGTGATA TTGCGCCTGC CCGCGGGGGT GGGCGATGCC TGACCTTAGT CCCCCTACTAT AACGCGGACG GGCGCCCCCA CCCGCTACGG
11951	AlaLeuHisGly TrpLeuThr ThrLeuArg HisHisHisAsp AlaLeuArg· GCCCTGCATG GCTGGCTGAC CACTCTGCGC CATCACCACG ATGCCCTGCG CGGGACGTAC CGACCGACTG GTGAGACGCG GTAGTGGTGC TACGGGACGC
12001	·LeuAlaVal ThrProThrGly GlnArgTyr LeuAlaGlu LeuAlaLeuPro· TCTGGCGGTG ACCCCGACCG GCCAGCGCTA TCTGGCCGAG CTGGCGCTGC AGACCGCCAC TGGGGCTGGC CCGTTCGCGAT AGACCGGCTC GACCGCGACG
12051	·PProLeuPro AlaLeuAsp AlaGlyThrLeu GlyGlyAla GluLeuGln CGCCCTTGCC GGCCCTGGAT GCAGGAACAC TCGGCGGGGC TGAAGTGCAG GCGGGAACGG CCGGGACCTA CGTCCCTTGTG AGCCGCCCCG ACTTGACGTC
12101	AlaArgLeuThr GluLeuGln GlyGluLeu AspProAlaSer GlyHisThr· GCCCCGCTGA CCGAGTTGCA AGGGGAGCTC GATCCTGCCA GCGGCCACAC CGGGCGGACT GGCTCAACGT TCCCCTCGAG CTAGGACGGT CGCCGGTGTG
12151	·LeuAlaTrp AlaArgLeuArg AsnLeuAla IleGluGly GluAlaAspPro· CCTGGCCTGG GCCCCGCTGC GCAACCTGGC CATCGAGGGT GAGGCCGATC GGACCGGACC CCGGCGGACG CGTTGGACCG GTAGCTCCCA CTCCGGCTAG
12201	·PValGluGly LeuPheLeu AlaPheHisHis LeuValIle AspAlaVal CGGTGGAGGG GCTTTTCCTC GCCTTCCACC ATCTGGTCAT CGATGCCGTC GCCACCTCCC CGAAAAGGAG CGGAAGGTGG TAGACCAGTA GCTACGGCAG
12251	SerTrpArgIle LeuAlaGlu AspLeuAla ArgValSerArg GlyGluPro· TCCTGGCGCA TCCTGGCCGA GGATCTGGCC CGGGTGAGCA GGGGCGAGCC AGGACCGCGT AGGACCGGCT CCTAGACCGG GCCCACTCGT CCCCCTCGG
12301	·LeuProAla LysGlySerSer TyrArgGln TrpGlyGlu GlyLeuAlaAla· CCTGCCCGCC AAGGGCAGCA GCTATCGCCA GTGGGGCGAA GGGCTGGCCG GGACGGGCGG TTCCCGTCTG CTAGTACGGT CACCCCGCTT CCCGACCGGC
12351	·ATyrAlaLeu ArgGluGlu AspGlnLeuAla PheTrpLeu AlaGlnGly CCTACGCCCT GCGCGAAGAG GATCAGCTGG CGTTCTGGCT GGCCCGAGGG GGATGCGGGA CGCGCTTCTC CTAGTCGACC GCAAGACCGA CCGGGTCCCC
12401	GluGlyAsnGln ArgGlyLeu LeuGluAla GlnArgAlaGlu AspGlyArg· GAGGGCAACC AGCGAGGACT GCTGGAAGCG CAGCGCGCTG AGGATGGCCG CTCCCGTTGG TCGCTCCTGA CGACCTTCGC GTCGCGCGAC TCCTACCGGC
12451	·AlaAlaAla SerLeuLeuGln LeuAspLys GluThrThr AlaArgLeuIle· CGCCCGCGCC AGCCTGCTGC AACTGGACAA GGAGACCACG GCCCGCTTGA GCGGCGGCGG TCGGACGACG TTGACCTGTT CCTCTGGTGC CGGGCGAACT
12501	·IAspProAla AsnGlnAla PhePheThrArg ValProAsp LeuLeuLeu TCGATCCGGC CAATCAGGCC TTCTTCACCC GGGTACCGA CTTGTTGCTG AGCTAGGCCG GTTAGTCCGG AAGAAGTGGG CCCATGGGCT GAACAACGAC

12551 **AlaAlaLeuThr** ArgThrLeu SerGlnLeu GlyTyrGlyAla ArgHisCys·  
 GCCGCCCTGA CTCGCACCTT GAGCCAGCTG GGTTATGGCG CACGTCACCTG  
 CGGCGGGACT GAGCGTGGAA CTCGGTCGAC CCAATACCGC GTGCAGTGAC

12601 ·ValMetLeu **GluGlyHisGly ArgGlu**Ala IleAspAla GluLeuAspVal·  
 CGTGATGCTG GAAGGGCACG GCCGAGAGGC AATCGATGCT GAACTCGATG  
 GCACTACGAC CTTCCCGTGC CGGCTCTCCG TTAGCTACGA CTTGAGCTAC

12651 ·V**SerArgThr LeuGlyTrp PheThrSerThr TyrProLeu AlaLeuAla**  
 TGAGCCGCAC CCTGGGCTGG TTCACCAGCA CCTATCCGCT GGCCTGGCC  
 ACTCGGCGTG GGACCCGACC AAGTGGTCGT GGATAGGCGA CCGCGACCGG

12701 **AspGluGlnGlu TrpAspAla LeuValCys AlaThrLysGlu ArgLeuArg**·  
 GATGAGCAAG AATGGGATGC GCTGGTGTGC GCCACCAAGG AGCGGCTGCG  
 CTACTCGTTC TTACCCTACG CGACCACACG CGGTGGTTCC TCGCCGACGC

12751 ·AlaVal**Pro AspLysGlyVal GlyPheAsn**AlaLeuArg LeuHisHisPro·  
 GGCCGTACCG GACAAGGGGG TAGGCTTCAA CGCCCTGCGT CTGCACCATC  
 CCGGCATGGC CTGTTCCCC ATCCGAAGTT GCGGGACGCA GACGTGGTAG

12801 ·PArgGlyTrp GluLeuPro GluAlaLeuIle Val**PheAsn TyrLeuGly**  
 CCCGTGGCTG GGAGTTGCC GAGGCCCTCA TCGTCTTCAA TTACCTGGGG  
 GGCACCGAC CCTCAACGGG CTCCGGGAGT AGCAGAAGTT AATGGACCCC

12851 **Val**SerHisGln AlaSerArg AlaLysGly ThrAlaGlyGln ProTrpGln·  
 GTCAGCCATC AGGCATCACG AGCGAAGGGT ACCGCAGGTC AGCCCTGGCA  
 CAGTCGGTAG TCCGTAGTGC TCGCTTCCA TGGCGTCCAG TCGGGACCGT

12901 ·ProLeuPro MetAlaProGly AlaProThr SerProAsp AsnLeuProArg·  
 GCCCCTGCC ATGGCGCCGG GGGCGCCTAC TTCGCCGAC AACCTGCCGC  
 CGGGGACGGG TACCGCGGCC CCCGCGGATG AAGCGGCCTG TTGGACGGCG

12951 ·AGluLeuIle SerLeuHis GlyGlyValTyr AspGlyCys LeuThrLeu  
 GGGAGCTCAT CAGCCTGCAC GGGGGCTCT ATGACGGCTG CCTCACCTG  
 CCCTCGAGTA GTCGGACGTG CCCCCGAGA TACTGCCGAC GGAGTGGGAC

13001 **ArgGlnValGly AlaLeuAsn GlnGlnGly SerAspAlaLeu MetValArg**·  
 CGCCAGGTCG GCGCCCTCAA CCAGCAAGGG AGCGACGCCT TGATGGTGCG  
 GCGTCCAGC CGCGGGAGTT GGTCGTTCCT TCGCTGCGGA ACTACCACGC

13051 ·LeuPheAla AsnLeuLysAla LeuValAsp HisCysCys GlyValSerAla·  
 GCTTTTTGCC AACCTGAAGG CGCTAGTGGA TCACTGCTGT GGGGTGAGCG  
 CGAAAAACGG TTGGACTTCC GCGATCACCT AGTGACGACA CCCACTCGC

13101 ·AProArgHis ThrProSer AspPheProGly LeuGlyLeu SerGlnSer  
 CCCCGGCCA CACCCGAGC GACTTCCCGG GGCTTGGCCT CTCGCAATCG  
 GGGGCGCGGT GTGGGGCTCG CTGAAGGGCC CCGAACC GGA GAGCGTTAGC

13151 **AlaLeuAspGln ValLeuSer GlyArgGlu ValGluThrLeu LeuProMet**·  
 GCGCTCGACC AGGTGCTGAG CGGGCGCGAG GTGGAGACAC TGCTGCCCAT  
 CGCGAGCTGG TCCACGACTC GCCCGCGCTC CACCTCTGTG ACGACGGGTA

13201 ·**ThrSerLeu GlnGlnSerMet LeuTyrHis** ArgAlaLeu AlaProArgAsp·  
 GACGTCCTTG CAGCAGAGCA TGCTCTATCA CAGGGCGCTG GCGCCTCGTG  
 CTGCAGGAAC GTCGTCTCGT ACGAGATAGT GTCCCGCGAC CGCGGAGCAC

13251 ·A**ThrAlaTyr HisLeuGln ThrGluIleGlu TyrArgGln ProLeuAsp**  
 ATACGGCTTA TCACCTGCAG ACCGAGATTG AGTACCGCCA GCCACTGGAC  
 TATGCCGAAT AGTGGACGTC TGGCTCTAAC TCATGGCGGT CGGTGACCTG

13301 **GlnAlaValTyr ArgGlnAla TrpGlnAla GlnIleAlaArg TrpProAla**·  
 CAGGCGGTCT ACCGCCAGGC CTGGCAGGCG CAGATAGCCC GCTGGCCGGC  
 GTCCGCCAGA TGGCGGTCCG GACCGTCCGC GTCTATCGGG CGACCGGCCG

13351 ·LeuArgSer GluLeuValLeu AlaAspGly ValAlaLeu GlnArgIleLeu·  
 CCTGCGCAGC GAACTGGTGC TGGCGGATGG GGTGGCGCTG CAGCGCATCC  
 GGACGCGTGC CTTGACCACG ACCGCCTACC CCACCGCGAC GTCGCGTAGG

13401 ·LArgHisAla GluLeuPro PheHisTyrGln AspLeuVal GlyAspGlu  
 TGCGCCATGC CGAGCTGCCG TTCCAATATC AGGATCTGGT GGGGGATGAG  
 ACGCGGTACG GCTCGACGGC AAGGTGATAG TCCTAGACCA CCCCCTACTC

13451 GlnAlaGluAla ArgIleAla AlaTyrArg GlnGlnAspLeu AlaArgPro·  
 CAGGCCGAGG CGCGCATCGC GGCCTATCGC CAGCAGGATC TGGCCCGCCC  
 GTCCGGCTCC GCGCGTAGCG CCGGATAGCG GTCGTCCTAG ACCGGGCGGG

13501 ·IleProLeu GluGlnAlaPro LeuLeuArg ValAlaCys PheLysLeuAla·  
 GATCCCGCTC GAGCAGGCTC CTTGTTGCG GGTCGCTGC TCAAACCTGG  
 CTAGGGCGAG CTCGTCCGAG GGAACAACGC CCAGCGGACG AAGTTTGACC

13551 ·AProAspHis HisLysVal IlePheSerAla HisHisGly ValLeuAsp  
 CGCCCGATCA CCACAAGGTC ATCTTCAGCG CCCACCATGG CGTGCTGGAT  
 GCGGGCTAGT GGTGTTCCAG TAGAAGTCGC GGGTGGTACC GCACGACCTA

13601 GlyTrpSerGly ProValLeu LeuGlySer LeuHisArgCys TyrGlnSer·  
 GGCTGGAGCG GCCCAGTGCT GCTGGGCTCC CTGCATCGCT GCTATCAATC  
 CCGACCTCGC CGGGTCACGA CGACCCGAGG GACGTAGCGA CGATAGTTAG

13651 ·LeuMetAsn GlyLeuLeuPro GlnValGlu AlaAspGly AlaTrpLeuGlu·  
 CCTGATGAAC GGCCTGCTGC CGCAAGTCGA AGCGGATGGG GCCTGGCTCG  
 GGACTACTTG CCGGACGACG GCGTTCAGCT TCGCCTACCC CGGACCGAGC

13701 ·GPheGlyArg HisIleAla SerGlnThrArg AlaSerGlu AlaTyrTrp  
 AATTTGGCCG CCATATCGCG AGCCAAACCC GCGCCAGCGA GGCCTACTGG  
 TTAAACCGGC GGTATAGCGC TCGGTTTGGG CGCGGTTCGCT CCGGATGACC

13751 GlnGlyArgAla GluGlnLeu AlaArgPro AsnAspLeuSer ArgLeuPhe·  
 CAGGGGCGCG CCGAGCAGCT GGCCCCACCC AACGATCTCT CCCGCCTGTT  
 GTCCCCGCGC GGCTCGTCGA CCGGGCTGGG TTGCTAGAGA GGGCGGACAA

13801 ·GlyValVal LeuGluProGln LeuThrGln HisArgPro AlaValCysGly·  
 CGGGGTGGTG CTGGAGCCGC AGCTGACGCA GCACAGGCCT GCGGTGTGCG  
 GCCCCACCAC GACCTCGGCG TCGACTGCGT CGTGTCCGGA CGCCACACGC

13851 ·GGlnThrLeu AlaProHis ValSerAlaGln LeuGluAla ArgAlaArg  
 GACAGACCCT GGCGCCGCAC GTGTGCGCTC AACTGGAGGC TCGCGCCCGC  
 CTGTCTGGGA CCGCGGCGTG CACAGCCGAG TTGACCTCCG AGCGCGGGCG

13901 GluLeuGlyVal ThrThrGly LeuLeuAla GlnTyrAlaTrp HisArgLeu·  
 GAGCTGGGGG TAACCACGGG CTTGCTGGCC CAATACGCCT GGCATCGGTT  
 CTCGACCCCC ATTGGTGCCG GAACGACCGG GTTATGCGGA CCGTAGCCAA

13951 ·LeuAlaArg ArgCysGlyAsp AspIleThr LeuValGly AsnValThrPro·  
 GCTGGCCCGC CGCTGTGGCG ACGACATCAC CCTGGTGGGC AACGTGACGC  
 CGACCGGGCG GCGACACCGC TGCTGTAGTG GGACCACCCG TTGCACTGCG

14001 ·PGlyArgAsp PheProIle GluGlyIleThr GlnSerVal GlyLeuTyr  
 CGGGCCGGGA TTTCCCATC GAGGGGATCA CCCAGAGTGT CCGTCTCTAT  
 GCCCCGCCCT AAAGGGGTAG CTCCCCTAGT GGGTCTCACA GCCAGAGATA

14051 IleAsnSerLeu ProLeuIle LeuAspTrp ArgThrGluAla ThrLeuAla·  
 ATCAATAGCC TGCCGCTCAT CCTGGATTGG CGCACCGAGG CGACCTTGGC  
 TAGTTATCGG ACGGCGAGTA GGACCTAACC GCGTGGCTCC GCTGGAACCG

14101 ·GluHisIle AlaArgLeuGln SerAspLeu MetAlaLeu AsnGluHisGly·  
 CGAGCATATA GCCCGGCTGC AGTCGGATTT GATGGCACTC AACGAGCACG  
 GCTCGTATAT CCGGCGGACG TCAGCCTAAA CTACCGTGAG TTGCTCGTGC

14151 ·GThrGlnSer LeuAlaAla LeuThrGlnGly ArgAlaArg LeuPheGln  
 GCACCCAGTC GCTCGCCGCG CTGACGCAAG GCAGGGCGCG CCTGTTCCAG  
 CGTGGGTCAG CGAGCGGCGC GACTGCGTTC CGTCCCGCGC GGACAAGGTC

14201 SerLeuPheVal PheGluAsn TyrProVal ProAlaLeuPro GluGluPro·  
 AGCCTGTTCG TGTTTCGAGAA CTACCCTGTG CCGGCGCTGC CGGAGGAGCC  
 TCGGACAAGC ACAAGCTCTT GATGGGACAC GGCCGCGACG GCCTCCTCGG

14251 ·GluProHis GlnLeuValPro ArgPheGly AlaValVal GluLysValGlu·  
 GGAGCCCCAT CAGCTGGTGC CGCGCTTTGG CGCCGTGGTG GAGAAGGTGG  
 CCTCGGGGTA GTCGACCACG GCGCGAAACC GCGGCACCAC CTCTTCCACC

14301 ·GLeuProLeu SerLeuVal ValAsnAlaArg GlyGlyArg LeuAsnLeu  
 AACTGCCGCT CTCCCTGGTG GTGAACGCC GCGGCGGCCG GCTCAATCTG  
 TTGACGGCGA GAGGGACCAC CACTTGCGGG CGCCGCCGCGC CGAGTTAGAC

14351 ArgLeuGluPhe AspGlyAsp LeuIlePro MetAlaLysAla GluValVal·  
 CGCCTCGAGT TCGACGGGGA TCTGATCCCC ATGGCGAAGG CAGAAGTCGT  
 GCGGAGCTCA AGCTGCCCTT AGACTAGGGG TACCGCTTCC GTCTTCAGCA

14401 ·LeuAlaAla TrpLeuAlaGlu LeuGlyTrp LeuAlaGlu AlaSerLeuAla·  
 GCTGGCCGCC TGGCTGGCCG AGCTCGGCTG GCTGGCGGAG GCGAGCCTTG  
 CGACCGGCGG ACCGACCGGC TCGAGCCGAC CGACCGCCTC CGCTCGGAAC

14451 ·ALeuProAla ArgProAsp GluMetSerLeu ProAlaPro ValAlaAla  
 CGCTGCCGGC CAGACCCGAT GAGATGAGCC TGCCTGCCCC CGTGGCAGCG  
 GCGACGGCCG GTCTGGGCTA CTCTACTCGG ACGGACGGGG GCACCGTCGC

14501 ArgAlaAlaAla ProValAla GluSerCys ProProAlaAla ArgProLeu·  
 CGCGCCGCGG CGCCAGTCGC TGAGTCCTGT CCACCTGCGG CCCGTCCTCT  
 GCGCGGCGCC GCGGTCAGCG ACTCAGGACA GGTGGACGCC GGGCAGGAGA

14551 ·ValAlaLeu TrpGluArgGln CysGlyVal ProGlyVal TrpGlnGlnThr·  
 GGTGGCCCTG TGGGAGCGCC AGTGC GGCGT GCGCCGCGTC TGGCAGCAGA  
 CCACCGGGAC ACCCTCGCGG TCACGCCGCA CGGGCCGAG ACCGTGCTCT

14601 ·TLeuCysGlu LeuGlyVal AspSerValGln GlnLeuAla LeuLeuAla  
 CCCTGTGTGA ACTCGGGGTG GATTCGGTGC AGCAGCTCGC CCTGCTGGCG  
 GGGACACACT TGAGCCCCAC CTAAGCCACG TCGTCGAGCG GGACGACCGC

14651 AlaLeuAsnAla AlaPheAla GlyGluArg AlaProLeuThr LeuArgAsp·  
 GCTCTCAATG CCGCCTTCGC CGGCGAGCGT GCGCCGCTCA CTCTGCGGGA  
 CGAGAGTTAC GGCGGAAGCG GCCGCTCGCA CGCGGCGAGT GAGACGCCCT

14701 ·LeuLysAla HisSerSerPro SerArgLeu TyrGlnHis TrpLeuValArg·  
 TCTCAAGGCC CATTATCCC CCAGCCGGCT CTATCAGCAC TGGCTGGTGC  
 AGAGTTCCGG GTAAGTAGGG GGTCGGCCGA GATAGTCGTG ACCGACCACG

·ALeuProGlu GluValLeu \*\*\*

orf 7 (amlH) →

14751 GACTGCCCGA GGAGGTGCTA **TG**ACGACCCT GACCCAGATT GACCAGGCTC  
 CTGACGGGCT CCTCCACGAT ACTGCTGGGA CTGGGTCTAA CTGGTCCGAG

14801 ·PValLysPro LysAlaHis ArgGluLeuSer ProProGln GlyGlyLeu  
 CCGTCAAACC GAAAGCCCAT CGGGAGTTGA GCCCTCCGCA AGGCGGGCTG  
 GGCAGTTTGG CTTTCGGGTA GCCCTCAACT CGGGAGGCGT TCCGCCCGAC

14851 AlaThrGluGln ThrLeuGly SerArgLeu AlaAspCysLeu AlaAlaThr·  
 GCAACCGAAC AGACCCTGGG CTCGCGCCTG GCCGATTGCC TCGCCGCCAC  
 CGTTGGCTTG TCTGGGACCC GAGCGCGGAC CGGCTAACGG AGCGGCGGTG

14901 ·ProLeuAla ProAlaIleGly MetGlyGly ValGlyVal AsnGluGlnGly·  
 CCGCTGGCC CCGCCATCG GCATGGGCGG AGTCGGTGTG AATGAGCAAG  
 GGGCGACCGG GGGCGGTAGC CGTACCCGCC TCAGCCACAC TTAICTCGTTC

14951 ·GMetSerGlu GlnGlyThr GlyGluAlaGly ProGlyAla TrpLeuAsn  
 GCATGAGTGA GCAAGGCACG GGCGAGGCCG GCCCGGGCGC CTGGCTCAAC  
 CGTACTCACT CGTTCCGTGC CCGTCCGGC CGGGGCCGCG GACCGAGTTG

15001 TyrGlyGluLeu SerLeuArg ValGlyGln IleAlaAlaArg LeuGlnGly·  
 TATGGCGAGC TCAGCCTGCG GGTCGGTCAG ATCGCCGCC GCCTGCAGGG  
 ATACCGCTCG AGTCGGACGC CCAGCCAGTC TAGCGGCCGG CGGACGTCCC

15051 ·LeuAlaVal GlyGluArgVal GlyLeuTyr LeuValArg GlyProAspLeu·  
 GCTGGCGGTG GGAGAGAGGG TCGGCCTCTA TCTGGTGCGA GGCCCGGATC  
 CGACCGCCAC CCTCTCTCCC AGCCGGAGAT AGACCACGCT CCGGGCCTAG

15101 ·LValAlaSer LeuLeuAla CysLeuArgLeu GlyLeuThr PheValPro  
 TGGTGGCCAG CCTGCTCGCC TGCCTGCGGC TCGGGCTCAC CTTTGTGCCG  
 ACCACCGGTC GGACGAGCGG ACGGACGCCG AGCCCGAGTG GAAACACGGC

15151 LeuGluProAsp PheProVal GluArgLeu GlnGlyIleAla ArgGlnAla·  
 CTCGAGCCGG ATTTCCCGGT GGAGCGGCTG CAGGGTATCG CCCGGCAGGC  
 GAGCTCGGCC TAAAGGGCCA CCTCGCCGAC GTCCCATAGC GGGCCGTCCG

15201 ·ArgLeuSer AlaValIleCys AspGlyHis GlyAspVal ProAlaPheGly·  
 CCGGCTCTCG GCGGTGATCT GTGATGGACA TGGCGATGTG CCCGCGTTTG  
 GGCCGAGAGC CGCCACTAGA CACTACCTGT ACCGCTACAC GGGCGCAAAC

15251 ·GCysProLeu ArgSerLeu AlaGlyLeuGly HisAlaGly AlaAlaThr  
 GCTGTCCGCT GCGATCCCTC GCCGGTCTCG GTCACGCGGG GGCTGCGACC  
 CGACAGGCGA CGCTAGGGAG CGGCCAGAGC CAGTGCGCC CCGACGCTGG

15301 ValGlnTrpPro AsnValAsp AspAlaLeu AlaAlaTyrMet MetPheThr·  
 GTGCAGTGGC CCAACGTGGA CGATGCGCTG GCGGCCTACA TGATGTTTAC  
 CACGTCACCG GGTGACCT GCTACGCGAC CGCCGGATGT ACTACAAGTG

15351 ·SerGlySer ThrGlyGluPro LysGlyVal ValIleSer ArgArgAlaLeu·  
 CTCGGGCTCC ACCGGCGAGC CCAAGGGGGT GGTCATCAGC CGGCGGGCCT  
 GAGCCCGAGG TGGCCGCTCG GGTTCCTCCCA CCAGTAGTTC GCGCCCGGA

15401 ·LLeuCysPhe LeuAspGly IleArgGluArg LeuGlyLeu SerProAsn  
 TGCTCTGCTT CCTCGACGGG ATCCGCGAGC GGCTGGGGTT ATCACCTAAC  
 ACCGAGACGAA GGAGCTGCC TAGGCGCTCG CCGACCCCAA TAGTGGATTG

15451 CysHisTrpLeu PheIleThr ThrProAla PheAspIleSer LeuLeuGlu·  
 TGCCATTGGC TCTTTATCAC CACCCGGCC TTCGATATCT CGCTGCTGGA  
 ACGGTAACCG AGAAATAGTG GTGTGGCCGG AAGCTATAGA GCGACGACCT

15501 ·MetLeuGly ProLeuTrpGly GlyGlyArg LeuThrVal AlaGlyGlyGlu·  
 GATGCTGGGA CCGCTTTGGG GCGGGGGCCG CTTGACGGTG GCTGGCGGTG  
 CTACGACCTT GGCGAAACCC CGCCCCGGC GAACCTGCCAC CGACCGCCAC

15551 ·GHisAsnLys AspProLeu GlyMetValAla LeuLeuGlu AlaAspPro  
 AGCACAACAA GGATCCGCTG GGAATGGTGG CGTTGCTTGA GGCGGATCCT  
 TCGTGTGTTT CCTAGGCGAC CTTACCACC GCAACGAACT CCGCCTAGGA

15601 SerIleAsnPhe LeuGlnAla ThrProAla CysTrpArgMet LeuLeuLys·  
 TCCATCAACT TCCTGCAGGC CACCCCGGCT TGCTGGCGCA TGCTGCTCAA  
 AGGTAGTTGA AGGACGTCCG GTGGGGCCGA ACGACCGCGT ACGACGAGTT

15651 ·AlaGlyTrp GlnGlyArgGlu ArgLeuThr AlaLeuCys GlyGlyGluAla·  
 AGCAGTTGG CAGGGGCGCG AGCGTCTCAC CGCCCTGTGT GGCGGCGAGG  
 TCGTCCAACC GTCCCCGCGC TCGCAGAGTG GCGGGACACA CCGCCGCTCC

15701 ·ALeuAspSer GlyLeuAla GluGlnLeuCys SerArgThr GlnArgLeu  
 CGCTGGACTC GGGATTGGCC GAGCAGCTCT GCAGTCGCAC CCAGCGGCTG  
 GCGACCTGAG CCCTAACCGG CTCGTCGAGA CGTCAGCGTG GGTCCGCCGAC

15751 TrpAsnCysTyr GlyProThr GluAlaThr ValTrpSerLeu ValSerGlu·  
 TGGAAGTGTCT ACGGGCCGAC CGAGGCCACC GTCTGGTCCG TGGTGAGCGA  
 ACCTTGACGA TGCCCGGCTG GCTCCGGTGG CAGACCAGCG ACCACTCGCT

15801 ·ValArgTrp ProProAlaGlu GlyGlnIle ThrIleSer HisSerLeuPro·  
 GGTGCGCTGG CCGCCGGCGG AGGGGCAGAT CACCATCAGC CACAGCCTGC  
 CCACGCGACC GCGCGCCGCC TCCCCGTCTA GTGGTAGTCG GTGTCGGACG

15851 ·PGlyTyrArg HisTrpVal LeuAspGluVal GlyLeuPro ValSerGlu  
 CCGGCTACCG CCACTGGGTG CTGGACGAGG TGGGGCTGCC GGTATCTGAG  
 GGCCGATGGC GGTGACCCAC GACCTGCTCC ACCCCGACGG CCATAGACTC

15901 GlyGluCysGly GluLeuCys IleGluSer ProAlaLeuCys GluGlyTyr·  
 GGGGAGTGCG GGGAGCTTTG CATCGAGAGC CCGGCCCTGT GTGAAGGCTA  
 CCCCTCACGC CCCTCGAAAC GTAGCTCTCG GGCCGGGACA CACTTCCGAT

15951 ·TrpArgLys ProGlyLeuThr AlaAlaAla PheLeuArg ValAspAlaHis·  
 CTGGCGCAAG CCTGGATTGA CGGCGGCGGC CTTCTGCGG GTCGATGCCC  
 GACCGCGTTC GGACCTAACT GCCGCCGCC GAAGGACGCC CAGCTACGGG

16001 ·HArgLeuTyr ArgThrGly AspArgValArg ArgLeuGly AlaAspArg  
 ATCGCCTCTA TCGCACCGGC GATCGGGTGC GCCGACTGGG GGCGGATCGC  
 TAGCGGAGAT AGCGTGGCCG CTAGCCCACG CGGCTGACCC CCGCCTAGCG

16051 PheLeuTyrVal GlyArgArg AspAspGln VallLysLeuArg GlyPheArg·  
 TTCCTCTATG TGGGGCGGCG CGACGATCAG GTCAAGCTGC GCGGTTTTTCG  
 AAGGAGATAC ACCCCGCCGC GCTGCTAGTC CAGTTCGACG CGCCAAAAGC

16101 ·IleGluLeu GlyGluValGlu AlaGlyLeu ArgArgGln ProGlyValGln·  
 CATCGAGCTC GGGGAGGTGG AGGCGGGCCT TCGCCGTCAA CCCGGGGTAC  
 GTAGCTCGAG CCCCTCCACC TCCGCCCGGA AGCGGCAGTT GGGCCCCATG

16151 ·GGluAlaAla ValArgLeu PheGlyGluGly AspGluAla MetLeuVal  
 AGGAGGCGGC GGTGCGCCTC TTTGGCGAGG GGGACGAGGC CATGCTGGTG  
 TCCTCCGCCG CCACGCGGAG AAACCGCTCC CCCTGCTCCG GTACGACCAC

16201 GlyTyrValGlu AlaLysAla GlyValIle LeuAsnArgLeu AlaLeuArg·  
 GGCTATGTGG AGGCCAAAGC CGGGGTGATC CTCAATCGCC TCGCCCTGCG  
 CCGATACACC TCCGGTTTTG GCCCCACTAG GAGTTAGCGG AGCGGGACGC

16251 ·LysGlyLeu GlnAlaThrLeu ProHisTyr MetValPro AlaArgIleIle·  
 CAAGGGGTTG CAGGCCACGC TGCCGCACTA CATGGTGCCG GCGCGGATCA  
 GTTCCCAAC GTCCGGTGCG ACGGCGTGAT GTACCACGGC CGCGCCTAGT

16301 ·ILeuLeuAsp AlaLeuPro LysThrGlySer GlyLysLeu AspArgLys  
 TCCTGCTCGA TGCCCTGCCC AAGACAGGCA GCGGAAAATT GGATAGAAAG  
 AGGACGAGCT ACGGGACGGG TTCTGTCCGT CGCCTTTTAA CCTATCTTTC

16351 AlaLeuProLeu ProGlu\*\*\*  
 GCGCTGCCAC TGCCTGAATA GGGCGACTGG AAAGCGCAA ACGTCCATAA  
 CGCGACGGTG ACGGACTTAT CCCGCTGACC TTTCGCGGTT TGCAGGTATT

16401 AAAAGAAGCC CGCATGATGC GGGCTTCTTT CTTGCCATAT GAGCGCGGGC  
 TTTTCTTCGG GCGTACTACG CCCGAAGAAA GAACGGTATA CTCGCGCCCG

16451 TTATTGGGTG ATGGGGGCCG CGTCCGGTTT GGCGAGCAGC TGCTCGACGT  
 AATAACCCAC TACCCCGGC GCAGGCCAAA CCGCTCGTCG ACGAGCTGCA  
 \*\*\*GlnThrIle ProAlaAla AspProLys AlaLeuLeuGln GluValAsp·

16501 CGTCGATCAC CTTGAGGGCC GCCTGGGGGC CGCCGGTGGA GGTCCACAGC  
GCAGCTAGTG GAACTCCCGG CGGACCCCGG GCGGCCACCT CCAGGTGTCTG  
·AspIleVal LysLeuAlaAla GlnProGly GlyThrSer ThrTrpLeuSer·

16551 GAGCCGTCCA CGGCGCCAAA GCGCTTGCCC TTGATGGCGT TCAGTTGCTG  
CTCGGCAGGT GCCGCGGTTT CGCGAACGGG AACTACCGCA AGTCAACGAC  
·SeryAspVal AlaGlyPhe ArgLysGlyLys IleAlaAsn LeuGlnGln

16601 GAAGGCCGGG GTCTGCTCGG CCTGCTTCAT GGCATCCACC GCATCGCCGC  
CTTCCGGCCC CAGACGAGCC GGACGAAGTA CCGTAGGTGG CGTAGCGGCG  
PheAlaProThr GlnGluAla GlnLysMet AlaAspValAla AspGlySer·

16651 TGGCGCTCAG GGTGCCTATC ACCAGCCAGT CACCGTCCAG CAGGTTGAGG  
ACCGCGAGTC CCACGGATAG TGGTCGGTCA GTGGCAGGTC GTCCAACCTC  
·SerSerLeu ThrGlyIleVal LeuTrpAsp GlyAspLeu LeuAsnLeuSer·

16701 GACTCGAGGC TCAGGGCCGG GGAGTGGGGG GTTTTGTTCG CGATCTGGTG  
CTGAGCTCCG AGTCCCGGCC CCTCACCCCC CAAAACAGCG GCTAGACCAC  
·SeruLeuSer LeuAlaPro SerHisProThr LysAspGly IleGlnHis

16751 GGTGGGACGG GCCAGCCCCA TCTCTTCCAC CACGCTGCTG GCGAAGGTGC  
CCACCTTGCC CGGTCCGGGT AGAGAAGGTG GTGCGACGAC CGCTTCCACG  
ThrProArgAla LeuGlyMet GluGluVal ValSerSerAla PheThrGly·

16801 CGCTGTGCAT GTAGCTCGGG CCCTTCGGGT TCCAGCGTAC TATGCTCAGG  
GCGACACGTA CATCGAGCCC GGGAAGCCCA AGGTTCGCATG ATACGAGTCC  
·GlyHisMet TyrSerProGly LysProAsn TrpArgVal IleSerLeuArg·

16851 CGCTCGCCCT GATGCTTGGC AAGCTTGCTG CGGGCCTCTT GCAGGCGGGC  
GCGAGCGGGA CTACGAACCG TTCGAACGAC GCCCGGAGAA CGTCCGCCCCG  
·ArguGlyGln HisLysAla LeuLysSerArg AlaGluGln LeuArgAla

16901 GTCATACTGG GCGAGGAAGG CTTGCCCTC GGCGTCCCGG TTCAGCACGT  
CAGTATGACC CGCTCCTTCC GGAACGGGAG CCGCAGGGCC AAGTCGTGCA  
AspTyrGlnAla LeuPheAla LysGlyGlu AlaAspArgAsn LeuValHis·

16951 GGGCGCTGCG ATTGAAGATC TCCTTCCAGG AATCACCCCA GTTGCCGGTG  
CCCGCGACGC TAACTTCTAG AGGAAGGTCC TTAGTGGGGT CAACGGCCAC  
·HisSerArg AsnPheIleGlu LysTrpSer AspGlyTrp AsnGlyThrVal·

17001 ACGACTGTGG GGGCTATCTC TTGCAGCAGG GTCAGCAGCT CGGGTTTGGT  
TGCTGACACC CCGGATAGAG AACGTCGTCC CAGTCGTCGA GCCCAAACCA  
·VallThrPro AlaIleGlu GlnLeuLeuThr LeuLeuGlu ProLysThr

17051 CTGGCCGGTC AGGATGAGAT CCGGCTCCAG ATCGATCAGC CGCTCCAGAT  
GACCGGCCAG TCCTACTCTA GGCCGAGGTC TAGCTAGTCG GCGAGGTCTA  
GlnGlyThrLeu IleLeuAsp ProGluLeu AspIleLeuArg GluLeuAsn·

17101 TGGGATTGTC CAGATCGCCG ACCACGGCGA TATCCTTGCC CGCCTTGTTT  
ACCTAACAG GTCTAGCGGC TGGTGCCGCT ATAGGAACGG GCGGAACAAG  
·AsnAsnAsp LeuAspGlyVal ValAlaIle AspLysGly AlaLysAsnLeu·

17151 AGCAGGTAAC GGGGCAATGT GCCCTGGCCA CGACCGTTGA CGGTGCCGAC  
TCGTCCATTG CCCCCTTACA CGGGACCGGT GCTGGCAACT GCCACGGCTG  
·LeuuTyrArg ProLeuThr GlyGlnGlyArg GlyAsnVal ThrGlyVal

17201 CGGCTGCAAC CCCAGGTCA GGGCCGTATC CAGATCGATT TCGCTCAGCA  
GCCGACGTTG GGGTCCCAGT CCCGGCATAG GTCTAGCTAA AGCGAGTCGT  
ProGlnLeuGly LeuThrLeu AlaThrAsp LeuAspIleGlu SerLeuVal·

17251 CCACCACCG CTTGGGTTGG GTGGGCACGA CCTGGGTCTT GCCATCGGCA  
GGTGGTGGGC GAACCCAACC CACCCGTGCT GGACCCAGAA CGGTAGCCGT  
·ValValArg LysProGlnThr ProValVal GlnThrLys GlyAspAlaAsp·

17301 TCGGTCACCT GACGGGTCTC GGTGCTGGCC TGGCCTGAA AACCGACCAG  
AGCCAGTGGG CTGCCCAGAG CCACGACCGG ACCCGACTT TTGGCTGGTC  
·AsprValGln ArgThrGlu ThrSerAlaGln AlaGlnPhe GlyValLeu

17351 GCTGGCCAGC ATGAGTGC GG CGGCCAGAGG GGAGGAGATC TTCATCGTTA  
CGACCGGTCG TACTCACGCC GCCGGTCTCC CCTCCTCTAG AAGTAGCAAT  
SerAlaLeuMet LeuAlaAla AlaLeuPro SerSerIleLys Met

← orf 8 (*fapB*)

17401 CATCCTTCTT GGTGAAATCA GCGAAAAACC GGGCCCCAAA CGGGCCGGACT  
GTAGGAAGAA CCACTTTAGT CGCTTTTGG CCCGGGTTT GCCCGCCTGA

Caja Fur *amlD* (68,4% similaridad)

17451 TATGCTATCA CAAATTCAAA TGATAAAAAT TGTCATTTGC GTTTGTGGTG  
ATACGATAGT GTTTAAGTTT ACTATTTTAA ACAGTAAACG CAAACACCAC

← Caja Fur *fapB* (73,7% similaridad) →

17501 CTAGGAGGGG GTGATTTGCT ACCATGGCCG CTCTCGAACC AAGGGTCTTT  
GATCCTCCCC CACTAAACGA TGGTACCGGC GAGAGCTTGG TTCCAGAAA

orf 9 (*amlD*) →

MetProIle AlaSerLeu AlaAlaGly SerArgGlySer PheIleLeu·

17551 TCGATGCCAA TCGCTTCCCT GGCTGCCGGA TCCCGAGGCA GTTTTATCCT  
AGCTACGGTT AGCGAAGGGA CCGACGGCCT AGGGCTCCGT CAAAATAGGA

·HisAlaAsp CysLeuProLeu ProGlyAla AlaHisIle AlaLeuGlnArg·

17601 GCATGCCGAC TGCCTGCCGC TGCCCCGTGC GGCGCATATT GCGCTGCAGC  
CGTACGGCTG ACGGACGGCG ACGGGCCACG CCGCGTATAA CCGACGTGCG

·AValCysPhe AspProAla AlaPheThrPro AlaCysTyr GluGlnAla

17651 GGGTCTGCTT CGATCCCGCC GCCTTCACCC CGGCCTGCTA TGAGCAGGCC  
CCCAGACGAA GCTAGGGCGG CGGAAGTGGG GCCGGACGAT ACTCGTCCGG

ArgIleLeuLeu ProAlaSer LeuGlnArg AlaAlaProLys ArgLeuGly·

17701 CGGATCCTGC TGCCCCCAG CTTGCAGCGT GCGGCCCCA AGCGGCTGGG  
GCCTAGGACG ACGGGCGGTC GAACGTGCA CGCCGGGGGT TCGCCGACCC

·GluPheLeu AlaGlyArgLeu AlaAlaArg GluAlaLeu ArgGlyPheGly·

17751 GGAGTTTCTG GCCGGTCGGT TGGCGGCCCG TGAGGCTCTG CGCGGCTTTG  
CCTCAAAGAC CGGCCAGCCA ACCGCCGGG ACTCCGAGAC GCGCCGAAAC

·GLeuGlyAsp HisValVal AlaIleGlySer AlaArgGlu ProArgTrp

17801 GGCTGGGTGA TCACGTGGTG GCCATAGGCT CGGCCCGCGA GCCGCGCTGG  
CCGACCCACT AGTGCACCAC CGGTATCCGA GCCGGGCGCT CGGCGCGACC

ProAlaGlyPhe GluGlySer IleSerHis SerLeuLeuGln GlyArgGly·

17851 CCTGCTGGGT TTGAGGGCAG CATCAGCCAC AGCCTGTTGC AGGGGCGCGG  
GGACGACCCA AACTCCCGTC GTAGTCGGTG TCGGACAACG TCCCCGCGCC

·MetValLeu CysAlaValArg ArgGlyGln AlaGlyIle GlyLeuAspLeu·

17901 CATGGTCCTG TGTGCGGTGC GCCGAGGCCA GGCTGGTATT GGGCTGGATC  
GTACCAGGAC ACACGCCACG CGGCTCCGGT CCGACCATAA CCCGACCTAG

·LLeuAlaTrp LeuGluAsp GluGlnAlaCys GluLeuTrp ProSerIle

17951 TGGAAGCCTG GCTGGAGGAT GAGCAGGCGT GCGAGCTCTG GCCAAGTATT  
ACCTTCGGAC CGACCTCCTA CTCGTCCGCA CGCTCGAGAC CGTTTCATAA

ValAsnAspGlu GluTrpGly ArgLeuGln ArgCysProLeu GlyProAla·

18001 GTGAATGATG AGGAGTGGGG ACGGCTGCAG CGCTGTCCGC TCGGTCCGGC  
CACTTACTAC TCCTACCCC TGCCGACGTC GCGACAGGCG AGCCAGGCCG

18051 ·LeuGlyLeu ThrLeuValPhe SerAlaLys GluSerLeu PheLysAlaLeu·  
 CCTGGGGTTG ACCCTGGTGT TCTCCGCCAA GGAGAGCCTG TTCAAGGCGC  
 GGACCCCAAC TGGGACCACA AGAGGCGGTT CCTCTCGGAC AAGTTCCGCG

18101 ·LTyrProArg ValGlyArg TyrPheAspPhe LeuAspAla ArgTrpLeu  
 TCTACCCAG GGTGGGGCGC TATTTTACT TTCTCGATGC CCGCTGGCTG  
 AGATGGGGTC CCACCCCGC ATAAACTGA AAGAGCTACG GGCGACCGAC

18151 AlaMetThrGlu GlnThrLeu ThrLeuGlu LeuLysSerAla LeuThrPro·  
 GCCATGACGG AGCAGACCCT CACCCTCGAA CTAAAAAGCG CGCTGACTCC  
 CGGTACTGCC TCGTCTGGGA GTGGGAGCTT GATTTTTTCGC GCGACTGAGG

18201 ·AspLeuPro AlaGlyTrpHis CysThrLeu HisTrpGln ArgLeuProGly·  
 GGATCTGCCT GCCGGCTGGC ACTGTACCCT GCACTGGCAA CGCTTGCCGG  
 CCTAGACGGA CGGCCGACCG TGACATGGGA CGTGACCGTT GCGAACGGCC

18251 ·GGlyValLeu ThrThrLeu ValLeu\*\*\*  
 GGGGCGTGCT GACCACGCTT GTGCTCTGAA CGTGCCTCTG CCGTTCGGTG  
 CCCCACGCA CTGGTGCGAA CACGAGACTT GCACGGAGAC GGCAAGCCAC

18301 TCATGGGATA AAAAAACCGC CATCAAGGCG GTTTTTTTAT CCTGCGTTCA  
 AGTACCCTAT TTTTTTGGCG GTAGTTCCGC CAAAAAATA GGACGCAAGT  
 \*\*\*

18351 GGCTTGCTGC TTCATGGCAA AGGCCTGCGG GCGGCGGCGC GGCACTATGA  
 CCGAACGACG AAGTACCGTT TCCGGACGCC CGCCGCCGCG CCGTGATACT  
 AlaGlnGlnLys MetAlaPhe AlaGlnPro ArgArgArgPro ValIleIle·

18401 TGGGAGCGCC ATCGCCGGGG GCGTGCAGTA TGTCCACGTC GGTCTGGTAG  
 ACCCTCGCGG TAGCGGCCCC CGCACGTCAT ACAGGTGCAG CCAGACCATC

18451 ·IleAlaGly AspGlyProAla HisLeuIle AspValAsp ThrGlnTyrLeu·  
 AGGCGGTCGA TGAGGGGCTT GGTACCACC TCGCGAGCCG GGCCCATGGC  
 TCCGCCAGCT ACTCCCCGAA CCAGTGGTGG AGCGCTCGGC CCGGGTACCG

18501 ·LeuGAspIle LeuProLys ThrValValGlu ArgAlaPro GlyMetAla  
 CTGGATCTTG CCCTCGCCGA TGGCGATCAG CTCGTGCAG TAGCGGGCGG  
 GACCTAGAAC GGGAGCGGCT ACCGCTAGTC GAGCAGCGTC ATCGCCCGCC  
 GlnIleLysGly GluGlyIle AlaIleLeu GluAspCysTyr ArgAlaAla·

18551 CGGTGGCGAG ATCGTGGATG ACAATGAGCA CCGTCTTGCC CTCGGCGGTG  
 GCCACCGCTC TAGCACCTAC TGTTACTCGT GGCAGAACGG GAGCCGCCAC

18601 ·AlaAlaLeu AspHisIleVal IleLeuVal ThrLysGly GluAlaThrIle·  
 ATCTGGTGA TGGCCTCCAT CACTTCCGTC TGGTGGCCGA TATCCAGCGC  
 TAGACCACCT ACCGGAGGTA GTGAAGGCAG ACCACCGGCT ATAGGTCCGC

18651 ·IlenHisIle AlaGluMet ValGluThrGln HisGlyIle AspLeuAla  
 ACTGGTGGGT TCATCCAGCA ATATGATGTC CGCGTCTGG GCCAGCACCA  
 TGACCACCA AGTAGGTCGT TATACTACAG GCGCAGGACC CCGTCTGGT  
 SerThrProGlu AspLeuLeu IleIleAsp AlaAspGlnAla LeuValMet·

18701 TGGCCAGCCA CACCCGCTGG GCCTGGCCGC CGGAGAGGGA GCTGGCGCTC  
 ACCGGTCCGT GTGGGCGACC CGGACCGGCG GCCTCTCCCT GCACCGCGAG

18751 ·MetLeuTrp ValArgGlnAla GlnGlyGly SerLeuSer SerAlaSerGln·  
 TGTTGCAAGA TGTCGCCAAG CTGCATCCGC TCGCAGGCC AGCGCACCAT  
 ACAACGTTCT ACAGCGGTTT GACGTAGGCG AGCGTCCGG TCGCGTGGTA  
 GlnnLeuIle AspGlyLeu GlnMetArgGlu CysAlaTrp ArgValMet

18801 GCGGGCATCC TCTTCACTCC ACTGATTGAA CCACCCCTGA TGGGGATGGC  
 CGCCCGTAGG AGAAGTGAGG TACTAACTT GGTGGGGACT ACCCTACCG  
 ArgAlaAspGlu GluSerTrp GlnAsnPhe TrpGlyGlnHis ProHisArg·

18851 GGCCGTACTG CACCAGCTGC TCGACCTGAA TGCCGGCGGG CACCAGGGGG  
 CCGGCATGAC GTGGTCGACG AGCTGGACTT ACGGCCGCC GTGGTCCCC  
 ·ArgTyrGln ValLeuGlnGlu ValGlnIle GlyAlaPro ValLeuProArg·

18901 CGCTGGGGCA GGTAGGCCAG CTCCCGGGCC AGCGCCTTCA TGCCGTA ACT  
 GCGACCCCGT CCATCCGGTC GAGGGCCCGG TCGCGGAAGT ACGGCATTGA  
 ·ArgnProLeu TyrAlaLeu GluArgAlaLeu AlaLysMet GlyTyrSer

18951 CTCCAGCGGT TTGCCCTTGA GCAGTATCTC ACCGGATTGG GGCTGCTCCT  
 GAGGTCGCCA AACGGGA ACT CGTCATAGAG TGGCCTAACC CCGACGAGGA  
 GluLeuProLys GlyLysLeu LeuIleGlu GlySerGlnPro GlnGluGln·

19001 GGCCGGCCAA GAGCTTTAGC AGGGTGGATT TGCCGCCGCC ATTGGGGCCG  
 CCGGCCGGTT CTCGAAATCG TCCACCTAA ACGGCCGCCG TAACCCCGGC  
 ·GlnAlaLeu LeuLysLeuLeu ThrSerLys GlyGlyGly AsnProGlyVal·

19051 ACGATGCCGA CCAGCTTGCC CTTGGGAATG GTGAAGGAGA TGTCGTTGAA  
 TGCTACGGCT GGTCGAACGG GAACCCTTAC CACTTCCTCT ACAGCAACTT  
 ·ValeGlyVal LeuLysGly LysProIleThr PheSerIle AspAsnPhe

19101 GACGGGCTTT TGCTGATAGC CGAAGTGGAG GCGATTTAGG GTGAGGGTCA  
 CTGCCCCGAA ACGACTATCG GCTTCACCTC CGCTAAATCC CACTCCCAGT  
 ValProLysGln GlnTyrGly PheHisLeu ArgAsnLeuThr LeuThrMet·

19151 TCAGTCGGTT CTCTGTCTGT CTTTGATCAG AATAAACAGC AGCAGTATGC  
 AGTCAGCCAA GAGACAGACA GAAACTAGTC TTATTTGTCG TCGTCATACG  
 ·MetArgAsn GluThrGlnArg GlnAspSer TyrValAla AlaThrHisArg·

19201 CGCCAAGAAT ACTGGGTCAT GATGCCGGTG GCGACCTCAT GGGGGCTGGC  
 GCGGTTCTTA TGACCCAGTA CTACGGCCAC CGCTGGAGTA CCCCCGACCG  
 ·ArgpSerTyr GlnThrMet \*\*\*Pro ProGlnGly·

← orf 10 (*fapC*)

19251 CAGCACCCGC ACCAGGGTGT CCGCTCGCCA GCAGCAGCAG GCGCCGCAG  
 GTCGTGGGCG TGGTCCCACA GGCGAGCGGT CGTCGTCGTC CCGCGGCGTC  
 ·GlyGlyAla GlyProHisGly SerAlaLeu LeuLeuLeu AlaGlyCysLeu·

19301 AGGGCGGCAA TCCACAGCGG CACTATGCGA TCCCGGCTCA TCCAGGAGGC  
 TCCCGCCGTT AGGTGTCGCC GTGATACGCT AGGGCCGAGT AGGTCCTCCG  
 ·LeuaAlaIle TrpLeuPro ValIleArgAsp ArgSerMet TrpSerAla

19351 GAGTATGGGG GCTGCCATGG CGATGAACAC CACAGGACCG CCGATGGCGG  
 CTCATACCCC CGACGGTACC GCTACTTGTG GTGTCCTGGC GGCTACCGCC  
 LeuIleProAla AlaMetAla IlePheVal ValProGlyGly IleAlaThr·

19401 TGCCAAGGGC CGCCACAACG ATGGCCTGGG CCAGCACGCC GAGCTGCACC  
 ACGGTTCCCG GCGGTGTTGC TACCGGACCC GGTCGTGCGG CTCGACGTGG  
 ·ThrLeuAla AlaValValIle AlaGlnAla LeuValGly LeuGlnValArg·

19451 CGGTTGACGT TCACCCCCAG ACTCTGTGCT GTGACAGGGC CCAGACGCAG  
 GCCAACTGCA AGTGGGGGTC TGAGACACGA CACTGTCCCG GGTCTGCGTC  
 ·ArgnValAsn ValGlyLeu SerGlnAlaThr ValProGly LeuArgLeu

19501 CACGCCCAGG GCGCGGGAGA GATAAATGAT CCAGGGGCAG ACCAGCAGGA  
 GTGCGGGTCC CGCGCCCTCT CTATTTACTA GGTCCCCGTC TGGTCGTCCT  
 ValGlyLeuAla ArgSerLeu TyrIleIle TrpProCysVal LeuLeuIle·

19551 TCAGGATCCC CACAGGCACG ACTGTGTTGT AGCCCTGGCC GACGAAGTTG  
 AGTCCTAGGG GTGTCCGTGC TGACACAACA TCGGGACCGG CTGCTTCAAC  
 ·IleIleGly ValProValVal ThrAsnTyr GlyGlnGly ValPheAsnGly·

19601 CCCATGTTCC ACAGGTAAAG GCTGGTGAGG TGCACCAGCG ACTGGGTGGA  
GGGTACAAGG TGTCCATTTC CGACCACTCC ACGTGGTCGC TGACCCACCT  
·GlytAsnTrp LeuTyrLeu SerThrLeuHis ValLeuSer GlnThrSer

19651 CATGACGAAC TGGCCGATGG CGTTCATCAG CTCGGAGACG CCGATGCCGA  
GTACTGCTTG ACCGGCTACC GCAAGTAGTC GAGCCTCTGC GGCTACGGCT  
MetValPheGln GlyIleAla AsnMetLeu GluSerValGly IleGlyIle·

19701 TCACCACGAA CAGATAGCCC TGCTCCCCCG GCTTGTTGCA CAGGGCGTAG  
AGTGGTGCTT GTCTATCGGG ACGAGGGGGC CGAACAACGT GTCCCGCATC  
·IleValPhe LeuTyrGlyGln GluGlyPro LysAsnCys LeuAlaTyrLeu·

19751 AGCACGGCGG CGGCAAACAG GGCACCGAGC GGCGCGGCC ACCAGGGCCA  
TCGTGCCGCC GCCGTTTGTG CCGTGGCTCG CCGCGCCGGG TGGTCCCGGT  
·LeuAlaAla AlaPheLeu AlaGlyLeuPro AlaAlaTrp TrpProTrp

19801 GCTGCCCAGG GTGAGATAGA GGGAGAAGGC GATGATGGCG AGCGACGCC  
CGACGGGTCC CACTCTATCT CCCTCTTCCG CTACTACCGC TCGCTGCGGG  
SerGlyLeuThr LeuTyrLeu SerPheAla IleIleAlaLeu SerAlaGly·

19851 CCTCGTTGAC CCCTATCATG TCCGGGGTAG CGAGGCGGTT TCGGATCAGG  
GGAGCAACTG GGGATAGTAC AGGCCCATC GCTCCGCCAA AGCCTAGTCC  
·GlyAsnVal GlyIleMetAsp ProThrAla LeuArgAsn ArgIleLeuThr·

19901 GTCTGCACCA GGCAGCCGGA GAGGCCATG GCGGCGCCTG CCACCAAGAC  
CAGACGTGGT CCGTCGGCCT CTCCGGGTAC CGCCGCGGAC GGTGGTTCTG  
·ThrnValLeu CysGlySer LeuGlyMetAla AlaGlyAla ValLeuVal

19951 GGCGACGATA CGCGGCAGCC GGATCTTGAA GACAGTCACC TCATCGAGCC  
CCGCTGCTAT GCGCCGTCGG CCTAGAACTT CTGTCAAGTG AGTAGCTCGG  
AlaValIleArg ProLeuArg IleLysPhe ValThrValGlu AspLeuArg·

20001 GGCTCCCCTC GCCAAGCAGG GTCTGCATGA CCCCAGCAT GGTGAGCTTG  
CCGAGGGGAG CGGTTCGTCC CAGACGTACT GGGGGTCGTA CCACTCGAAC  
·ArgGlyGlu GlyLeuLeuThr GlnMetVal GlyLeuMet ThrLeuLysSer·

20051 CTTGAGCCCA GGGTCAGCGC CAGCAGGGAG AGCAACGCCA GTGTGAGCAC  
GAACTCGGGT CCCAGTCGCG GTCGTCCCTC TCGTTGCGGT CACTCTCGTG  
·SerrGlyLeu ThrLeuAla LeuLeuSerLeu LeuAlaLeu ThrLeuVal

20101 CAAGCCAGG GTGATCAGCC AGGCGCGGCG GTGCAGCAGC AGGGTGCGGT  
GTTCCGGTCC CACTAGTCGG TCCGCGCCGC CACGTCGTCG TCCCACGCCA  
LeuGlyLeuThr IleLeuTrp AlaArgArg HisLeuLeuLeu ThrArgAsp·

20151 CACCCAGCCG CAGGCAGAGG GTGCCGAGG GGAGGGAAGC GTTCAGCGAT  
GTGGGTCCGC GTCCGTCTCC CACGGCCTCC CCTCCCTTCG CAAGTCGCTA  
·AspLeuArg LeuCysLeuThr GlySerPro LeuSerAla AsnLeuSerThr·

20201 GTGTTCATTG GATTGTTCAT GAGGCAGGGC GACCTTATTT GACGGCCAGC  
CACAAGTAAC CTAACAAGTA CTCCGTCCCCG CTGGAATAAA CTGCCGGTCG  
·ThrnMetPro AsnAsnMet \*\*\*Lys ValAlaLeuLeu·

← orf 11 (*fapG*)

20251 AGGGAACGGA AGCCGCCGCT GCGACCACC ATGATGAGCA CGGGGGCGCC  
TCCCTTGCTT TCGGCGGCGA CGCGTGGTGG TACTACTCGT GCCCCCGCGG  
·LeurArgPhe GlyGlySer ArgValValMet IleLeuVal ProAlaGly

20301 GATCAGCGCC AGGATCACCC CGTTGGGCAG CTCGAACGGC TGGATCAGCC  
CTAGTCGCGG TCCTAGTGGG GCAACCCGTC GAGCTTGCCG ACCTAGTCGG  
IleLeuAlaLeu IleValGly AsnProLeu GluPheProGln IleLeuTrp·

20351 AGCGGGCCAG GATGTCGGCC CCCAGCAGGA ACAGCACACC AAACAGGGCG  
TCGCCCAGTC CTACAGCCGG GGGTCGTCTT TGTCGTGTGG TTTGTCCCGC  
·TrpAlaLeu IleAspAlaGly LeuLeuPhe LeuValGly PheLeuAlaSer·

20401 GAGAAACGCA CCTGGATGGC GAGGCGCACC GGCTCCACCA GACGGGCGCA  
 CTCTTTGCGT GGACCTACCG CTCCGCGTGG CCGAGGTGGT CTGCCCGCGT  
 ·SereArgVal GlnIleAla LeuArgValPro GluValLeu ArgAlaCys

20451 GTAGGCGGCC AGAAAGCCGA CGAAGCCGAT GGGACCGGCG ATGGCGATGG  
 CATCCGCCGG TCTTTCGGCT GCTTCGGCTA CCCTGGCCGC TACCGCTACC  
 TyrAlaAlaLeu PheGlyVal PheGlyIle ProGlyAlaIle AlaIleAla·

20501 CGCAGGCGGT GAACAGGGTG GCGGCCAGCA GCACGCCGAT CCGTACCCGG  
 GCGTCCGCCA CTTGTCCCAC CGCCGGTCGT CGTGCGGCTA GGCATGGGCC  
 ·AlaAlaThr PheLeuThrAla AlaLeuLeu ValGlyIle ArgValArgThr·

20551 GTCGGCCGTA TCCCGAGCGC CTGGGCCTGG TTGTCTCCA TCTGCATCAG  
 CAGCCGGCAT AGGGCTCGCG GACCCGGACC AACAGAGGGT AGACGTAGTC  
 ·ThroArgIle GlyLeuAla GlnAlaGlnAsn AspGlyMet GlnMetLeu

20601 GGTGAGCTGG CGGCACAGCG CCAGGGTCAG CAGCAGACCG GCCAGGGCGA  
 CCACTCGACC GCCGTGTCGC GGTCCCAGTC GTCGTCTGGC CGGTCCCGCT  
 ThrLeuGlnArg CysLeuAla LeuThrLeu LeuLeuGlyAla LeuAlaPhe·

20651 AGGGCACCAC AGTGAGCACG GCGTCGAGAT CCGAGGCGGC CAGAGACCCC  
 TCCCGTGGTG TCACTCGTGC CGCAGCTCTA GGCTCCGCCG GTCTCTGGGG  
 ·PheValVal ThrLeuValAla AspLeuAsp SerAlaAla LeuSerGlyLeu·

20701 AGGTTCCAGA AGCGGAACTG CTCCAGCACC ACCTTGTGG AGAGCAGCAG  
 TCCAAGGTCT TCGCCTTGAC GAGGTCGTGG TGGAACAACC TCTCGTCGTC  
 ·LeuTrpPhe ArgPheGln GluLeuValVal LysAsnSer LeuLeuLeu

20751 GAAGTTCGAG AGGCCGCCAA AGGTGGCGGA GAGGGCGACC CCCACCAGGA  
 CTTCAGCTC TCCGGCGGTT TCCACCGCCT CTCCCGCTGG GGGTGGTCCT  
 PheAsnSerLeu GlyGlyPhe ThrAlaSer LeuAlaValGly ValLeuIle·

20801 TGAGCTTGAG CGGATTGGAG CGACCCACCA TGAGGCCAG GCCCAGAACT  
 ACTCGAACTC GCCTAACCTC GCTGGGTGGT ACTCCGGGTC CCGGTCTTGA  
 ·IleLysLeu ProAsnSerArg GlyValMet LeuGlyLeu GlyLeuValIle·

20851 ATGAGGTTGC CAAGCAGGGC ACCCATGCCG GACCAGAGCA GATAACCGTA  
 TACTCCAACG GTTCGTCCCG TGGGTACGGC CTGGTCTCGT CTATTGGCAT  
 ·IleuAsnGly LeuLeuAla GlyMetGlySer TrpLeuLeu TyrGlyTyr

20901 GGCCGATTCA ACGCCGAAAT AGGTCAGCCC TATCACCAGG GCGAAGACGG  
 CCGGCTAAGT TGCGGCTTTA TCCAGTCGGG ATAGTGGTCC CGCTTCTGCC  
 AlaSerGluVal GlyPheTyr ThrLeuGly IleValLeuAla PheValAla·

20951 CGCCGGCGTT GACGCCGAGC AGGCTGGCT CGGCCAGCGG ATTGCGGGTA  
 GCGGCCGCAA CTGCGGCTCG TCCGGACCGA GCCGGTCGCC TAACGCCCAT  
 ·AlaAlaAsn ValGlyLeuLeu GlyProGlu AlaLeuPro AsnArgThrAla·

21001 GCGCTTTGCA GCATGGAGGC CGCCAGCGCG AGACAGACGC CCACCACCAG  
 CGGAAACGT CGTACCTCCG GCGGTCGCGC TCTGTCTGCG GGTGGTGGTC  
 ·AlarGlnLeu MetSerAla AlaLeuAlaLeu CysValGly ValValLeu

21051 GGCACACAGG GTGCGGGGCA GACGCAGGGT ATGAATGATC ATGGCGAGTT  
 CCGTGTGTCC CACGCCCCGT CTGCGTCCA TACTTACTAG TACCGCTCAA  
 AlaCysLeuThr ArgProLeu ArgLeuThr HisIleIleMet AlaLeuLys·

21101 TTTCGTCCGC CATGAGGGCG GGATCGCCA GCAGAAATCC GGCGACCTCG  
 AAAGCAGCCG GTECTCCCGC CCTAGCGGGT CGTCTTTAGG CCGCTGGAGC  
 ·LysAspAla MetLeuAlaPro AspGlyLeu LeuPheGly AlaValGluArg·

21151 CGGCCACCAT AGACACCGGC ACCCGTGGCC AGTGACAGAC AGATCAGCAT  
 GCCGGTGGTA TCTGTGGCCG TGGGCACCGG TCACTGTCTG TCTAGTCGTA  
 ·ArgyGlyTyr ValGlyAla GlyThrAlaLeu SerLeuCys IleLeuMet

21201 GAACAGGAGA ACAACTCCCA GCCAGAACAG CTGTGTTTGG TGTCTGAGCA  
 CTTGTCCTCT TGTTGAGGGT CGGTCTTGTC GACACAAACC ACAGACTCGT  
 PheLeuLeuVal ValGlyLeu TrpPheLeu GlnThrGlnHis ArgLeuVal·

← orf 12 (*fupD*)

21251 CCCGGATACT CCTTATTGTC GAGGCGATAA AAACGGAAAA AGGGAGCCCCG  
 GGGCCTATGA GGAATAACAG CTCCGCTATT TTTGCCTTTT TCCCTCGGGC

21301 CTTGGGCTCC CGAACGGGGG ATTACAGCTT GTAATTCACC CCGGCATAGA  
 GAACCCGAGG GCTTGCCCCC TAAATGTCGAA CATTAAAGTGG GGCCGTATCT  
 \*\*\*LeuLys TyrAsnValGly AlaTyrVal·

21351 CGGTGCGACC TTCCAGAATG AAGTCGGCGT CGGTGGCGAC CTGGTCACGC  
 GCCACGCTGG AAGGTCTTAC TTCAGCCGCA GCCACCGCTG GACCAGTGCG  
 ·ValArgGly GluLeuIlePhe AspAlaAsp ThrAlaVal GlnAspArgGln·

21401 TGGGTGTTGG TCAGGTGGT GATGCCGAGT TTGAAGTCGA GCGCCGGGGT  
 ACCCACAACC AGTCCAACCA CTACGGCTCA AACTTCAGCT CGCGGCCCA  
 ·GlnrAsnThr LeuAsnThr IleGlyLeuLys PheAspLeu AlaProThr

21451 GACTTTCCAG TTGGTGTGGA GGTCCAGGGT CTGATAGTGC TTGGACTTGA  
 CTGAAAGGTC AACCACAACCT CCAGGTCCCA GACTATCACG AACCTGAACT  
 ValLysTrpAsn ThrAsnLeu AspLeuThr GlnTyrHisLys SerLysLeu·

21501 GCGCCTGGGA GTTGTGCATC GGCACCTTGA TGAAGTGGCT GCCCACGTAT  
 CGCGGACCCT CAACACGTAG CCGTGGAACCT ACTTGACCGA CGGGTGCATA  
 ·LeuGlnSer AsnHisMetPro ValLysIle PheGlnSer GlyValTyrGln·

21551 TGCCAGGCCA GGTTGGTGTCT GACGATCTCG GTGGCTTGCC AATCCAGGCT  
 ACGGTCCGGT CCAACCACGA CTGCTAGAGC CACCGAACGG TTAGGTCCGA  
 ·GlnpAlaLeu AsnThrSer ValIleGluThr AlaGlnTrp AspLeuSer

21601 GAGGTTGCCG GTGTGATCCG GGTCTTGGC CAGATCCTCG CCCGTGCTCT  
 CTCCAACGGC CACACTAGGC CCCAGAACCG GTCTAGGAGC GGGCACGAGA  
 LeuAsnGlyThr HisAspPro ThrLysAla LeuAspGluGly ThrSerLys·

21651 TGTCTTCGGA ATCCAGCAGG CTCCAGTTGC CGGTCAGCTT GAGGTCGTCT  
 ACAGAAGCCT TAGGTCGTCC GAGGTCAACG GCCAGTCGAA CTCCAGCAGA  
 ·LysGluSer AspLeuLeuSer TrpAsnGly ThrLeuLys LeuAspAspArg·

21701 CGCACGTCGA CCCAGCCGTT CAGCTCCAGC CCTTTCACCC GCGCCTTCTT  
 GCGTGCAGCT GGGTCGGCAA GTCGAGGTCG GGAAAGTGGG CGCGGAAGAA  
 ·ArglAspVal TrpGlyAsn LeuGluLeuGly LysValArg AlaLysLys

21751 GACGTTGAGG TAGGTCATGA CGGTCCGACG GTAGCCAGGG CCCCACTGAT  
 CTGCAACTCC ATCCAGTACT GCCAGCCTGC CATCGGTCCC GGGGTGACTA  
 ValAsnLeuTyr ThrMetVal ThrProArg TyrGlyProGly TrpGlnAsp·

21801 CGCTCTGGAT CAGATCTTCG ATGTGCTTGT GGAAGCCGGT CACACCTGCG  
 GCGAGACCTA GTCTAGAAGC TACAGCAACA CCTTCGGCCA GTGTGGACGC  
 ·AspGlnIle LeuAspGluIle AspAsnHis PheGlyThr ValGlyAlaGly·

21851 CCGAAGCGAG CGCTCTCGTA GGCGGTGCC AGCTCATAGC TGACGGCGGT  
 GGCTTCGCTC GCGAGAGCAT CCGCCACGGG TCGAGTATCG ACTGCCGCCA  
 ·GlyeArgAla SerGluTyr AlaThrGlyLeu GluTyrSer ValAlaThr

21901 TTCCGTTTTC AGGTTCCGGT TGCCGACCAC CTTGCAGGCG CCACGGCAGG  
 AAGGCCAAAG TCCAAGCCCA ACGGCTGGTG GAACGTCCGC GGTGCCGTCC  
 GluProLysLeu AsnProAsn GlyValVal LysCysAlaGly ArgCysAla·

21951 CGGTGGTGGC GAAGCCTTCG CTGGACTGGG CCAGGGTCGG TGCCTTGAAC  
 GCCACCACCG CTTCGGAAGC GACCTGACCC GGTCCAGCC ACGGAACCTG  
 ·AlaThrAla PheGlyGluSer SerGlnAla LeuThrPro AlaLysPheAla·

22001 GCCTTGCCGG CGCCACCCTT GATCACCCAC TCGTCGCTCA GTTTGTAGAG  
 CGGAACGGCC GCGGTGGGAA CTAGTGGGTG AGCAGCGAGT CAAACATCTC  
 ·AlaGlyAla GlyGlyLys IleValTrpGlu AspSerLeu LysTyrLeu

22051 CGCATAGGCG CGCGGGCTGA ATTCATTGCC ATAGGTTTCA TGGTGGTCTGA  
 GCGTATCCGC GCGCCCGACT TAAGTAACGG TATCCAAAGT ACCACCAGCT  
 AlaTyrAlaArg ProSerPhe GluAsnGly TyrThrGluHis HisAspLeu·

22101 GGCGGCCGGA GAGAGTCAGC GCCAGATCCC CCAGGCTGAA TTCGTCCTGC  
 CCGCCGGCCT CTCTCAGTCG CGGTCTAGGG GGTCCGACTT AAGCAGGACG  
 ·LeuGlySer LeuThrLeuAla LeuAspGly LeuSerPhe GluAspGlnLeu·

22151 AGATAGAGGG CGCTCTGGCT CGCATCCACG CTGCCGTTGG TGATGCTGCG  
 TCTATCTCCC GCGAGACCGA GCGTAGGTGC GACGGCAACC ACTACGACGC  
 ·LeuLeuAla SerGlnSer AlaAspValSer GlyAsnThr IleSerArg

22201 GCTGTGCTCC AGCTCGGTCT TGCGCATCTC GGCGCCGAG GTCAGCAGGT  
 CGACACGAGG TCGAGCCAGA ACGCGTAGAG CCGCGGGCTC CAGTCGTCCA  
 SerHisGluLeu GluThrLys ArgMetGlu AlaGlySerThr LeuLeuHis·

22251 GATCCCCCAG ATAGCCGCTC AGCTGGCCGT CGACAGTGTG GTTGGTCTGG  
 CTAGGGGGTC TATCGGCGAG TCGACCGGCA GCTGTCACAC CAACCAGACC  
 ·HisGlyLeu TyrGlySerLeu GlnGlyAsp ValThrHis AsnThrGlnThr·

22301 GTGACATCGG CGGCGCCGCC ATTGAGCTGG GAGTCATCCA TCAGATCCGT  
 CACTGTAGCC GCCGCGGCGG TAACTCGACC CTCAGTAGGT AGTCTAGGCA  
 ·ThrLAspAla AlaGlyGly AsnLeuGlnSer AspAspMet LeuAspThr

22351 TTGCTCGAAG TAGTAGCGGG CGCGGCTGTC GAAGTGCTCC CAACGGCCGT  
 AACGAGCTTC ATCATCGCCC GCGCCGACAG CTTACAGAGG GTTGCCGGCA  
 GlnGluPheTyr TyrArgAla ArgSerAsp PheHisGluTrp ArgGlyAsn·

22401 TGTGGGTCAG CCCAGGCTC AGGCGATCGA GTTTTTGCAC GTTGTGCGGG  
 ACACCCAGTC GGGGTCCGAG TCCGCTAGCT CAAAAACGTG CAACACGCC  
 ·AsnThrLeu GlyLeuSerLeu ArgAspLeu LysGlnVal AsnHisProThr·

22451 GTGGCCGGTG CGGTCGGGGC ACGGGGCACG TTGTTGAAGT AGCTGTCCAT  
 CACCGGCCAC GCCAGCCCCG TGCCCCGTGC AACAACTTCA TCGACAGGTA  
 ·ThraProAla ThrProAla ArgProValAsn AsnPheTyr SerAspMet

22501 GTCGTTCTGG TTGTAGCCCA GATCGAAATC GATATCCTGG TTGTCACTGA  
 CAGCAAGACC AACATCGGGT CTAGCTTTAG CTATAGGACC AACAGTGACT  
 AspAsnGlnAsn TyrGlyLeu AspPheAsp IleAspGlnAsn AspSerVal·

22551 CCAGCCACTT CAGGCTGGAG AGCACATTGA CCACTTCCCG TTTTTCAGC  
 GTCCGGTGAA GTCCGACCTC TCGTGTAACT GGTGAAGGGC AAAAAGGTCG  
 ·ValTrpLys LeuSerSerLeu ValAsnVal ValGluArg LysGluLeuAla·

22601 GCATCGGCAT CCGGGTTGTT GGACTGATCG CTGTGCCAGC GGTACGCTG  
 CGTAGCCGTA GGCCCAACAA CCTGACTAGC GACACGGTCG CCAGTGCGAC  
 ·AlapAlaAsp ProAsnAsn SerGlnAspSer HisTrpArg AspArgGln

22651 ATAGCCTTCC ACCACCACGC TGCCAGCAG CTTGTTGTCTG ATGAGGGCAC  
 TATCGGAAGG TGGTGGTGGC ACGGGTCGTC GAACAACAGC TACTCCCGTG  
 TyrGlyGluVal ValValSer GlyLeuLeu LysAsnAspIle LeuAlaGly·

22701 CGGAGACGAA GGCCTGCC TGGTTGGCAT CGCCACCGTC GCCCTTGGTG  
 GCCTCTGCTT CCGCGACGGG ACCAACCGTA GCGGTGGCAG CGGGAACCAC  
 ·GlyValPhe AlaSerGlyGln AsnAlaAsp GlyGlyAsp GlyLysThrPro·

22751 GGCATGGAGT GGGTGTAGCC GAAGGCCGCT TCCGTCTTCT CCTTGGCCTG  
 CCGTACCTCA CCCACATCGG CTTCCGGCGA AGGCAGAAGA GGAACCGGAC  
 ·ProtSerHis ThrTyrGly PheAlaAlaGlu ThrLysGlu LysAlaGln

22801 GCGCAGGATC ACTGTTGACC ACGCCGCCA AGGCATCGGC ACCCGTACAG  
 CGCGTCCTAG TGACAACTGG TGC GGCGGGT TCCGTAGCCG TGGGCATGTC  
 ArgLeuIleVal ThrSerTrp AlaAlaTrp ProMetProVal ArgValPro·

22851 GGAGGAGACG GGGCCACTGG ATCACTTCGA TGCCTCTAT GGCCGCCATG  
 CCTCCTCTGC CCCGGTGACC TAGTGAAGCT ACGCGAGATA CCGGCGGTAC  
 ·ProLeuArg ProTrpGlnIle ValGluIle ArgGluIle AlaAlaMetPro·

22901 GGGATGGAGC TCAAGTCGAA GTCATTGCCA AAGGAGCTGC CCAGGGTCTC  
 CCCTACCTCG AGTTCAGCTT CAGTAACGGT TTCCTCGACG GGTCCAGAG  
 ·ProeSerSer LeuAspPhe AspAsnGlyPhe SerSerGly LeuThrGlu

22951 GCGAGCGTTG ACCCGTTTAC CGTTGATCAG CAGCAGTGTG TAGTCGCCGC  
 CGCTCGCAAC TGGGCAAATG GCAACTAGTC GTCGTCACAC ATCAGCGGCG  
 ArgAlaAsnVal ArgLysGly AsnIleLeu LeuLeuThrTyr AspGlyGly·

23001 CCATGCCGCG GATCTTGATC TCGCTGCGAC CCGTGGGGTT GGTGCCTATG  
 GGTACGGCGC CTAGAACTAG AGCGACGCTG GGCACCCCAA CCACGGATAC  
 ·GlyGlyArg IleLysIleGlu SerArgGly ThrProAsn ThrGlyIleIle·

23051 ATGTTTACGC CGGGCACATG CTTGAGGGCA TCGTCTATGT TGTTGGCGTT  
 TACAAATGCG GCCCGTGTAC GAACTCCCGT AGCAGATACA ACAACCGCAA  
 ·IlenValGly ProValHis LysLeuAlaAsp AspIleAsn AsnAlaAsn

23101 CATCTTGTCC AGATCGGCGC GGGTCACCAC AGAGACGCTG GCCGGGGCGG  
 GTAGAACAGG TCTAGCCGCG CCCAGTGGTG TCTCTGCGAC CGGCCCCGCC  
 MetLysAspLeu AspAlaArg ThrValVal SerValSerAla ProAlaSer·

23151 ACAACTCTGT GTGCTGGGTC TGGGTGGCGG TGACCACCAT GGTCTCGTTG  
 TGTTGAGACA CACGACCCAG ACCCACCGCC ACTGGTGTA CCAGAGCAAC  
 ·SerGluThr HisGlnThrGln ThrAlaThr ValValMet ThrGluAsnAla·

23201 GCCTTGACCG ATTCGGCCTG GGCCAGGCC GGCAGGGCAA ACAGGCCGAG  
 CGGAACGGC TAAGCCGGAC CCGGTCCGGG CCGTCCCGTT TGTCCGGCTC  
 ·AlasValSer GluAlaGln AlaLeuGlyPro LeuAlaPhe LeuGlyLeu

23251 GGAGAGCAA ATCGGGTTCA AGCGAAATAC GCCAGGCTGC AACTGCATAG  
 CCTCTCGTTT TAGCCCAAGT TCGCTTTATG CCGTCCGACG TTGAC**GTATC**  
 SerLeuLeuIle ProAsnLeu ArgPheVal GlyProGlnLeu GlnMet

← orf 13 (*fapA*)

23301 TCAAACTCC ATGAATAAAA CAGAGTTAT GGGTCCGGC TCTGGGGCCG  
 AGTTTTGAGG TACTTATTTT GTCTCCAATA CCCCAGGCCG AGACCCCGGC

23351 GTAGCTCACT GACTTCCTTG TCTGGCGGCG CCAGACTCGG GGTTATTGTT  
 CATCG**AGTGA** CTGAAGGAAC AGACCGCCGC GGTCTGAGCC CCAATAACAA  
 \*\*\*Gln SerGlyGln ArgAlaAlaGly SerGluPro AsnAsnAsn

23401 ATTCTTGTC TCGCCAGTC CTTGAGCAG GAGCCAGACG CCACCACAGG  
 TAAGGAACAG ACGCGGTCAG GAACTCGTC CTCGGTCTGC GGTGGTGTCC  
 AsnArgThrGln AlaLeuGly LysLeuLeu LeuTrpValGly GlyCysAla·

23451 CCAGCAGGCC GCAGCCGATA TTGATCCAGG CGAGCCCCGC AAAGCCGTGC  
 GGTCGTCCGG CGTCGGCTAT AACTAGGTCC GTCGGGGCG TTTCCGGCACG  
 ·AlaLeuGly CysGlyIleAsn IleTrpAla LeuGlyAla PheGlyHisLeu·

23501 AGGGCGCCAG TATTGTCCGA GAAGAGATAC TTGGCCGAGA GCAGGCTGCC  
 TCCCGCGGTC ATAACAGGCT CTTCTCTATG AACC GGCTCT CGTCCGACGG  
 ·LeuaGlyThr AsnAspSer PheLeuTyrLys AlaSerLeu LeuSerGly

23551 GAGCCCCGCC GCCACATTGG TCACAGTGCC CTGAAAAGAC ATGAAGGCCG  
 CTCGGGGCGG CGGTGTAACC AGTGTACAGG GACTTTTCTG TACTTCCGCC  
 LeuGlyAlaAla ValAsnThr ValThrGly GlnPheSerMet PheAlaAla·

23601 CGCGCTGATG GGGGGCCGGA ATGGCCGCCG TGATGGCGAG CGTGGTGCTG  
 GCGCGACTAC CCCCCGGCCT TACCGGCGGC ACTACCGCTC GCACCACGAC  
 ·AlaGlnHis ProAlaProIle AlaAlaThr IleAlaLeu ThrThrSerSer·

23651 GAGCGCGCCG AGCTCAGTGC CATGAAGAGG GTAAACAGCA GGTAGACGGG  
 CTCGCGCGGC TCGAGTCACG GTACTTCTCC CATTGTGTCG CCATCTGCC  
 ·SergAlaSer SerLeuAla MetPheLeuThr PheLeuLeu TyrValPro

23701 CACGCCAACG GGGGCGGCGA AGCCGAGCAG GGTGATCAGG GCCAACACA  
 GTGCGGTTGC CCCC GCCGCT TCGGCTCGTC CCACTAGTCC CGTTTGTGT  
 ValGlyValPro AlaAlaPhe GlyLeuLeu ThrIleLeuAla LeuLeuLeu·

23751 GGCTGGTGAT CAGAATGGCG GCCAGCGCCC GGCCCTGATC GATCCAGCCA  
 CCGACCACTA GTCTTACCGC CGGTCGCGGG CCGGGACTAG CTAGGTCGGT  
 ·LeuThrIle LeuIleAlaAla LeuAlaArg GlyGlnAsp IleTrpGlyGly·

23801 CCGCACAGCC GCATGGTCGC CATGCTGGCG AGGCCGCCAC ACAGGTAGAG  
 GCGGTGTCCG CGTACCAGCG GTACGACCGC TCCGGCGGTG TGTCCATCTC  
 ·GlysLeuArg MetThrAla MetSerAlaLeu GlyGlyCys LeuTyrLeu

23851 GGCGGCGATC TGCTCGCGCG GGAAAGCCAG GTTGAAGTGG AAGTAGTTGG  
 CCGCCGCTAG ACGAGCGCGC CTTTTCGGTC CAACTTGACC TTCATCAACC  
 AlaAlaIleGln GluArgPro PheAlaLeu AsnPheGlnPhe TyrAsnAla·

23901 CAAAGTGC GG GATCAGCAGG AAGTGACCGA ACATCTGCAA ACAGAGAATG  
 GTTTCACGCC CTAGTCGTCC TTCACTGGCT TGTAGACGTT TGTCTCTTAC  
 ·AlaHisPro IleLeuLeuPhe HisGlyPhe MetGlnLeu CysLeuIleLeu·

23951 AGCAGGGCGC CCTGGCAGAG CGGTGAGCCC AGCAGCTGGC GCAAGCCGCT  
 TCGTCCC CGG GGACCGTCTC GCCACTCGGG TCGTCGACCG CGTTCGGCGA  
 ·LeuAlaGly GlnCysLeu ProSerGlyLeu LeuGlnArg LeuGlySer

24001 GCCGTGAGGG GCGCGGCTGA CCGGCAGGGA GGGCAGCAGC CGGGCGCAGA  
 CGGCACTCCC CGCGCCGACT GGCCGTCCCT CCCGTCGTCG GCCCGCGTCT  
 GlyHisProAla ArgSerVal ProLeuSer ProLeuLeuArg AlaCysLeu·

24051 GCAGGGCCAG CAGCAGGCCG CCAGCGCAA ACAGCAGGAA GGGGCTCTGC  
 CGTCCC GGTC GTCGTCCGGC GGTCGCGGTT TGTCGTCCTT CCCCAGACG  
 ·LeuAlaLeu LeuLeuGlyGly AlaGlyPhe LeuLeuPhe ProSerGlnTrp·

24101 CAGCCGAGCC ACTGGGCCAG TACCAGGGCG ATGGGCACCA CCAAATGGC  
 GTCGGCTCGG TGACCCGGTC ATGGTCCCGC TACCCGTGGT GGTTTTACCG  
 ·TrpyLeuTrp GlnAlaLeu ValLeuAlaIle ProValVal LeuIleAla

24151 GGCGAGCGAG AAGGCCATGC CCACGTAGGC GAGGCGGCGG CCCC GTTCGG  
 CCGCTCGCTC TTCCGGTACG GGTGCATCCG CTCCGCCGCC GGGGCAAGCC  
 AlaLeuSerPhe AlaMetGly ValTyrAla LeuArgArgGly ArgGluAla·

24201 CCGGGGGGAC TAGGTCCAGC ACGGCAGCCA TCAGAATGGC GGAAAGAGGC  
 GGCCCCCTG ATCCAGGTCG TGCCGTCGGT AGTCTTACCG CCTTCTCCG  
 ·AlaProVal LeuAspLeuVal AlaAlaMet LeuIleAla SerLeuProGly·

24251 CCGGCCACGC AGCCCGACAG TATGAACAGC ATCAGCAGTT GCTGGCTGTT  
 GGCCGGTGCG TCGGGCTGTC ATA CTGTGTC TAGTCGTCAA CGACCGACAA  
 ·GlyValCys GlySerLeu IlePheLeuMet LeuLeuGln GlnSerAsn

24301 CTGGACCAGG GCGCAAGCCA TCAGCAGCAG GAAGCGCAGG GTCAGCAGCA  
 GACCTGGTCC CGCGTTCGGT AGTCGTCGTC CTTGCGTCC CAGTCGTCGT  
 GlnValLeuAla CysAlaMet LeuLeuLeu PheArgLeuThr LeuLeuVal·

24351 CCAGCAGGGC GGGTTTGC GG TTGACGCGAT CGAGCCAGGG AGCGGCGATA  
GGTCGTCCCC CCAAACGCC AACTGCGCTA GCTCGGTCCC TCGCCGCTAT  
·ValLeuAla ProLysArgAsn ValArgAsp LeuTrpPro AlaAlaIleLeu·

24401 AGCCCCACCA GAGCCGCGCC CAGGGTGGCG CCGCCGCTGA AATAACCGGT  
TCGGGGTGGT CTCGGCGCGG GTCCCACCGC GGCGGCGACT TTATTGGCCA  
·LeuValLeu AlaAlaGly LeuThrAlaGly GlySerPhe TyrGlyThr

24451 TTGCTCCGGT TGCATGCCGA GGCTGATGAC CAGATCTGGC CCAAGGGGCA  
AACGAGGCCA ACGTACGGCT CCGACTACTG GTCTAGACCG GGTTCCCCGT  
GlnGluProGln MetGlyLeu SerIleVal LeuAspProGly LeuProMet·

24501 TCACCATCAT CATGCTGCC ATGGAGAGCA TGTTGATCAA CATCGCCAGA  
AGTGGTAGTA GTACGACGGG TACCTCTCGT ACAACTAGTT GTAGCGGTCT  
·MetMetMet MetSerGlyMet SerLeuMet AsnIleLeu MetAlaLeuHis·

24551 TGGATGATGG CAGGGGTGGC GGTAACAGGC TTCATCAGCG GCTGGCTCGA  
ACCTACTACC GTCCCCACCG CCATTGTCCG AAGTAGTTCG CGACCGAGCT  
·HisIleAla ProThrAla ThrValProLys Met

24601 AAAAATGAGT CCGAATTGTA TCCGAGCGAT TTTTTCGTGA CAACAAATGG  
TTTTTACTCA GGCTTAACAT AGGCTCGCTA AAAAAGCACT **GTTGTTTACC**

← orf 14 (mrp) ←

24651 TAATCATTTT TATTTGTGTT ATTTGATCTA TCTCCGTCCT TTTAGCTCGC  
**ATTAGTAAAA** **ATAAACACAA** TAAACTAGAT AGAGGCAGGA AAATCGAGCG

Caja Fur 1 *mrp* (63,2% similitud) → orf 15 (exc) →

Caja Fur 2 *mrp* (63,2% similitud) →

24701 AGGCCGTCAA GGGGGGCGCT CCGGCC**ATG** TCGCCATTGC CCCTGGGGTG  
TCCGGCAGTT CCCCCGCGA GGCCGGGTAC AGCGGTAACG GGGACCCAC  
·LysValIle GluLysArgGly LysTrpIle MetMetVal IleAlaArgLeu·

24751 CAAAGTCATT GAAAAGCGGG GCAAATGGAT CATGATGGTG ATAGCCAGAC  
GTTTCAGTAA CTTTTCGCC CGTTTACCTA GTACTACCAC TATCGGTCTG  
·LAlaGluThr ValSerArg AlaProGlyGln GluArgGlu MetLysArg

24801 TGGCAGAGAC GGTGAGCCGG GCTCCCGGAC AGGAGAGAGA GATGAAAAGG  
ACCGTCTCTG CCACTCGGCC CGAGGGCCTG TCCTCTCTCT CTACTTTTCC  
TrpArgTrpSer GlyIleLeu LeuLeuCys GlyLeuTrpCys LeuProLeu·

24851 TGGCGTTGGA GCGGGATCTT GTTGTGTGC GGGCTCTGGT GCCTGCCGCT  
ACCGCAACCT CGCCCTAGAA CAACAACACG CCCGAGACCA CGGACGGCGA  
·ArgAlaGlu ValLysValIle ProValPhe GluAlaGlu AlaMetValGln·

24901 GCGGGCCGAG GTCAAGGTGA TCCCGGTATT CGAGGCCGAG GCCATGGTGC  
CGCCCGGCTC CAGTTCCTACT AGGGCCATAA GCTCCGGCTC CGGTACCACG  
·GThrLeuLys GluIleTyr ProAspLeuGly ValSerAla MetGlyAsn

24951 AGACCTCAA GGAGATCTAC CCGGACCTCG GGGTGAGTGC CATGGGCAAC  
TCTGGGAGTT CCTCTAGATG GGCCTGGAGC CCCACTCACG GTACCCGTTG  
GlnLeuValLeu SerGlySer AlaAlaGln LeuGlnGluAla GluAlaThr·

25001 CAGCTGGTGC TGAGCGGCAG TGCGGCCAG TTGCAGGAGG CCGAAGCGAC  
GTCGACCACG ACTCGCCGTC ACGCCGGGTC AACGTCCTCC GGCTTCGCTG  
·LeuAlaLys LeuAsnGlnPro ProGlnSer LeuLeuVal GluTrpArgVal·

25051 CCTGGCCAAA CTCAACCAGC CGCCCCAGAG CTGCTTGTC GAATGGCGGG  
GGACCGGTTT GAGTTGGTGC GCGGGGTCTC GGACGAACAG CTTACCGCCC

25101 ·VAspGlyAla SerSerGly GlnGlnIleGlu AlaGlyIle GlyGlyAsp  
 TGGATGGCGC CTCAAGCGGT CAGCAGATAG AGGCGGGTAT CGGTGGTGAT  
 ACCTACCGCG GAGTTCGCCA GTCGTCTATC TCCGCCATA GCCACCACTA

25151 AlaAlaLysArg GlnTrpLeu LeuGluGly AsnAlaArgGln TyrGlnArg·  
 GCGGCCAAAC GGCAATGGTT GCTGGAGGGC AATGCCCGGC AATACCAGCG  
 CGCCGGTTTG CCGTTACCAA CGACCTCCCG TTACGGGCGC TTATGGTCGC

25201 ·SerGlnAsn AspSerTrpGln ValArgGly LeuSerGly ArgProValLeu·  
 CAGCCAGAAC GACAGCTGGC AGGTGCGCGG CCTGTCTGGG CGGCCCGTGT  
 GTCGGTCTTG CTGTGACCG TCCACGCGCC GGACAGCCCC GCCGGGCACA

25251 ·LLeuGlnMet GlySerTyr GlnProValThr PheTyrGln TrpArgGly  
 TGCTGCAGAT GGGCTCCTAT CAGCCGGTCA CCTTCTATCA GTGGCGCGGT  
 ACGACGTCTA CCCGAGGATA GTCGGCCAGT GGAAGATAGT CACCGCGCCA

25301 GlyGlnValVal GlyLeuMet ProLeuIle AsnGlyLeuTyr AlaThrAla·  
 GGTCAGGTGG TGGGTTTGAT GCCGCTCATC AACGGTCTCT ATGCCACCGC  
 CCAGTCCACC ACCCAAATA CGGCGAGTAG TTGCCAGAGA TACGGTGGCG

25351 ·ThrLeuIle GlyAspArgVal GlnIleAla LeuSerSer GluGlnAlaArg·  
 CACCCTGATC GGGGACAGGG TGCAGATAGC GCTCAGCAGC GAACAGGCCA  
 GTGGGACTAG CCCCTGTCCC ACGTCTATCG CGAGTCGTGC CTTGTCCGGT

25401 ·ALeuGluGln GlyThrVal ThrThrGlyGln AsnAlaThr GluValSer  
 GGTTGGAGCA GGGCACCGTC ACCACGGGGC AGAACGCCAC CGAAGTGAGC  
 CCAACCTCGT CCCGTGGCAG TGGTGCCCCG TCTTGCGGTG GCTTCACTCG

25451 GlyAlaProGly GlnTrpLeu ThrValGly GluLeuSerThr SerSerAla·  
 GGTGCCCCGG GGCAGTGGCT GACTGTGGGG GAGCTCTCCA CCAGTTCGGC  
 CCACGGGGCC CCGTCACCGA CTGACACCCC CTCGAGAGGT GGTCAAGCCG

25501 ·GlyGlnGly GlySerLeuGly ThrGlnLeu GlnGlyGly SerGlyThrGln·  
 CGGGCAAGGG GGCAGCCTGG GTACCCAGTT GCAGGGGGGG AGTGGTACTC  
 GCCCGTTCCC CCGTCGGACC CATGGGTCAA CGTCCCCC TCACCATGAG

25551 ·GSerAspArg GlnThrLeu GlnIleArgVal ThrArgGln \*\*\*  
 AGAGCGATCG CCAGACCCTG CAGATCCGGG TCACGCGGCA ATGAGTGACC  
 TCTCGCTAGC GGTCTGGGAC GTCTAGGCC AGTGCGCCGT TACTCACTGG

25601 CCTGCATGCT CAGTGAGGTT GATCGGCCGC GTATTGCGCG ATCTGGCGGC  
 GGACGTACGA **G**TCACTCAA CTAGCCGGCG CATAAGCGCC TAGACCGCCG  
 \*\*\* HisProGln AspAlaAla TyrGluArgIle GlnArgSer·

25651 TGCGCAGCAG ATACCAGAGT GCCCAGAGGC TGCCGATCAG CACCAGGGCG  
 ACGCGTCGTC TATGGTCTCA CGGGTCTCCG ACGGCTAGTC GTGGTCCC GC

25701 ·SerLeuLeu TyrTrpLeuAla TrpLeuSer GlyIleLeu ValLeuAlaThr·  
 GTGGGCCAGC TGAACGACCA TTTCTGCAGG TTGAGGCTGT GCAGCTGCAT  
 CACCCGGTCG ACTTGCTGGT AAAGACGTCC AACTCCGACA CGTCGACGTA

25751 ·ThroTrpSer PheSerTrp LysGlnLeuAsn LeuSerHis LeuGlnMet  
 CAGCAGGCCG CTGACGGTGG AGCAGAGCAG GAGGCCGCGG CTGTGGCGTC  
 GTCGTCCGGC GACTGCCACC TCGTCTCGTC CTCCGGCGCC GACACCGCAG

25801 LeuLeuGlySer ValThrSer CysLeuLeu LeuGlyArgSer HisArgArg·  
 TGAGCCAGGC GCGCACGCTG TCAGTTTGCT GATAGGTGCC GCCAAAGGCG  
 ACTCGGTCCG CGCGTGCGAC AGTCAAACGA CTATCCACGG CGGTTTCCGC

25851 ·ArgTrpAla ArgValSerAsp ThrGlnGln TyrThrGly GlyPheAlaLeu·  
 AGCAGTGCCA GCATGGCGGG CACGTCGGTC AGCAGGCTGA TGTAGAGGCT  
 TCGTCACGGT CGTACCGCC GTGCAGCCAG TCGTCCGACT ACATCTCCGA

·LeuAlaLeu MetAlaPro ValAspThrLeu LeuSerIle TyrLeuSer

25901 GATCTTGTCC GGATAGAAGA GGGTCAGGAT CTCGCTGCCG CTCTCGCGGG  
CTAGAACAGG CCTATCTTCT CCCAGTCCTA GAGCGACGGC GAGAGCGCCC  
IleLysAspPro TyrPheLeu ThrLeuIle GluSerGlySer GluArgThr·

25951 TGACCCCGGC CATCAGAAAC AGCCAGACCG AGCGGGTCAG CAAGAGGGCG  
ACTGGGGCCG GTAGTCTTTG TCGGTCTGGC TCGCCAGTC GTTCTCCCGC  
·ThrGlyAla MetLeuPheLeu TrpValSer ArgThrLeu LeuLeuAlaIle·

26001 ATGGGCCAAA ACCAGAGGGG AGGGCGCAAC TGGCCGTGAT CGTCATATCT  
TACCCGGTTT TGGTCTCCCC TCCCGCGTTG ACCGGCACTA GCAGTATAGA  
·IleTrpPhe TrpLeuPro ProArgLeuGln GlyHisAsp AspTyrArg

26051 GTGTTGCGGG TAGAGGGTCA TGGTCGCCCC TTATCGCCTG GGTTGTGCAA  
CACAAGCCCC ATCTCCAGT ACCAGCGGGC AATAGCGGAC CCAACACGTT  
HisGluProTyr LeuThrMet

26101 ATGATGAAGA GGATATGGGG CAGACTGGCG CCCTTTGCAA GGCGTGCCGG  
TACTACTTCT CCTATACCCC GTCTGACCGC GGGAAACGTT CCGCACGGCC

26151 GTGACACGAA TTAATCGGGG GGCCAGTGCC CCCCAATCCA TAATCTCTTT  
CACTGTGCTT AATTAGCCCC CCGGTCACGG GGGGTTAGGT ATTAGAGAAA

Secuencia de nucleótidos del gen *ahuR*, de su entorno en el genoma de *A. hydrophila* AH-3, y de las secuencias de aminoácidos deducidas de las diferentes pautas abiertas de lectura. Los codones de inicio se indican en negrita y los codones de final de lectura se indican en negrita y cursiva. Cuando estos son compartidos por dos pautas abiertas de lectura adyacentes, los nucleótidos están subrayados. Las flechas indican la dirección en la que se traducen las diferentes pautas abiertas de lectura. Los promotores se han subrayado con una línea continua, los nucleótidos correspondientes a las cajas Fur se han resaltado en negrita y los terminadores Rho-independientes se han subrayado con una línea discontinua.

```

1   CAAAACGGAT GAGTTGATGG TAAACTTGTT TGATATAAAT CAATTATTCG
    GTTTTGCCTA CTCAACTACC ATTTGAACAA ACTATATTTA GTTAATAAGC
    orf1 → Met IleProGlu LysLysPro GlyArgArgIle GlnSerGly·
51  TATGAGCCTA TGATCCCCGGA AAAGAAACCT GGCAGACGTA TTCAGAGCGG
    ATACTCGGAT ACTAGGGCCT TTTCTTTGGA CCGTCTGCAT AAGTCTCGCC
    ·GlyCysAla IleHisCysGln AspCysSer IleSerGln LeuCysIlePro·
101 TGGCTGTGCA ATTCATTGCC AGGATTGCAG CATCAGCCAG CTCTGCATTC
    ACCGACACGT TAAGTAACGG TCCTAACGTC GTAGTCGGTC GAGACGTAAG
    ·PpheThrLeu AsnAspSer GluLeuAspGln LeuAspSer IleIleGlu
151 CCTTACCCCT GAATGACAGC GAACTCGATC AGCTCGACAG CATCATCGAG
    GGAAGTGGGA CTTACTGTCTG CTTGAGCTAG TCGAGCTGTC GTAGTAGCTC
    ArgLysLysPro IleGlnLys GlyGluGlu LeuPheLysAla GlyAspGlu·
201 CGAAAGAAGC CGATCCAGAA GGGTGAGGAA CTGTTCAAAG CTGGCGATGA
    GCTTTCTTCG GCTAGGTCTT CCCACTCCTT GACAAGTTTC GACCGCTACT
    ·LeuLysSer ValTyrAlaIle ArgSerGly ThrIleAsn SerTyrThrIle·
251 GCTGAAATCC GTCTACGCGA TCCGTTCCGG GACCATCAAT TCATACACCA
    CGACTTTAGG CAGATGCGCT AGGCAAGGCC CTGGTAGTTA AGTATGTGGT
    ·IThrGluGln GlyAspGlu GlnIleSerAla PheHisLeu AlaGlyAsp
301 TCACGGAACA AGGGGATGAG CAAATCTCCG CCTTCCACCT CGCCGGTGAT
    AGTGCCTTGT TCCCCTACTC GTTTAGAGGC GGAAGGTGGA GCGGCCACTA
    LeuValGlyPhe AspAlaIle HisLysGln AlaHisProSer PheAlaGln·
351 CTGTTTGGTT TCGATGCCAT TCACAAGCAG GCCCACCCTT CCTTCGCTCA
    GACCAACCAA AGCTACGGTA AGTGTTCGTC CGGGTGGGGA GGAAGCGAGT
    ·AlaLeuGlu ThrAlaMetVal CysGluIle ProPheAsp ValLeuAspAsn·
401 GGCGCTGGAA ACGGCCATGG TGTGCGAAAT CCCGTTTCGAC GTGCTCGACA
    CCGCGACCTT TGCCGGTACC ACACGCTTTA GGGCAAGCTG CACGAGCTGT
    ·ALeuSerGly LysMetPro LysLeuArgGln GlnPheLeu ArgLeuMet
451 ATCTCTCCGG CAAAATGCCC AAGCTGCGCC AGCAATTCTT GCGACTGATG
    TAGAGAGGCC GTTTTACGGG TTCGACGCGG TCGTTAAGAA CGCTGACTAC
    SerAsnGluIle ArgLeuCys SerProPro IleAlaLysIle SerSerVal·
501 AGCAACGAGA TCAGGCTCTG TTCACCGCCC ATTGCCAAA TAAGTTCTGT
    TCGTTGCTCT AGTCCGAGAC AAGTGGCGGG TAACGGTTTT ATTCAAGACA
    ·ValAlaGly ProMetArgGlu ArgValVal GlnProSer ArgLeuSerAla·
551 GGTGGCCGGA CCTATGCGGG AAAGGGTTGT TCAGCCGAGC AGGCTGAGTG
    CCACCGGCCCT GGATACGCC TTTCCAACA AGTCGGCTCG TCCGACTCAC

```

·AArgAlaLys ArgArgPro MetLeuThrSer GluGly\*\*\*  
 601 CGAGGGCAA ACGACGGCCC ATGCTAACCT CCGAAGGGTG AATGAAGTTG  
 GCTCCCGTTT TGCTGCCGGG TACGATTGGA GGCTTCCCAC TTACTTCAAC  
 Caja Fur 1 73,7% similitud  
 Caja Fur 2 63,2% similitud  
 651 GGTTGCCGCC GAGAATATCA AGCCGGTGAA AAAAATGCAC TGAGAATGAA  
 CCAACGGCGG CTCTTATAGT TCGGCCACTT TTTTACGTG ACTCTTACTT  
 Caja Fur 1 73,7% similitud  
 Caja Fur 2 63,2% similitud  
 701 **AGCGATTATC AATTGCATTG** GCTCTGGTGC TTTATTAGAG TATTCGCTAT  
 TCGCTAATAG TTAACGTAAC CGAGACCACG AAATAATCTC ATAAGCGATA  
 orf 2 → MetSerIleAla·  
 751 GACAGGAGAG GGATGCAGCA CGCATCCCAA GGGAGAACCT ATGAGCATTG  
 CTGTCCCTCTC CCTACGTCGT GCGTAGGGTT CCCTCTTGA TACTCGTAAC  
 ·AGlnArgIle HisGluLeu LeuGluGlnAsp ProSerAla HisProSer  
 801 CACAACGCAT TCATGAGCTG CTGGAACAAG ACCCCAGCGC CCATCCTTCC  
 GTGTTGCGTA AGTACTCGAC GACCTTGTTT TGGGGTCGCG GGTAGGAAGG  
 ThrIleAlaSer GluLeuAla ValSerGlu TrpGluValVal ArgHisLeu·  
 851 ACCATTGCCA GCGAGCTGGC GGTCAGCGAG TGGGAGGTGG TACGCCACCT  
 TGGTAACGGT CGCTCGACCG CCAGTCGCTC ACCCTCCACC ATGCGGTGGA  
 ·ProAlaGlu LeuValThrLeu ValProAla GluArgAla GluAlaLeuLeu·  
 901 GCCAGCCGAG CTGGTGACCC TGGTGCCCGC CGAGCGGGCC GAAGCCCTGC  
 CGGTCGGCTC GACCACTGGG ACCACGGGCG GCTCGCCCGG CTTCGGGACG  
 ·LAlaAspLeu AlaAspTrp GlyGlnValThr ThrIleVal GluSerAsp  
 951 TGGCGGATCT GCGGATTGG GGTCAGGTGA CCACCATTGT CGAATCCGAT  
 ACCGCCTAGA CCGCCTAACC CCAGTCCACT GGTGGTAACA GCTTAGGCTA  
 GlySerIlePhe GluValLys AlaProPhe ProLysGlyLys SerAlaArg·  
 1001 GGCTCCATCT TCGAGGTGAA GCGCCCGTTT CCCAAGGGCA AGAGCGCCCCG  
 CCGAGGTAGA AGCTCCACTT CCGCGGCAA GGGTTCCCGT TCTCGCGGGC  
 ·GlyTyrTyr AsnLeuMetGly ArgAspGly GluMetHis GlyHisLeuLys·  
 1051 CGGCTATTAC AACCTGATGG GCGCGATGG CGAGATGCAC GGTCACCTCA  
 GCCGATAATG TTGGACTACC CCGCGCTACC GCTCTACGTG CCAGTGGAGT  
 ·LLeuAspAsn ValValGly MetAlaLeuVal SerLysLeu PheMetGly  
 1101 AGCTCGACAA CGTGGTCGGC ATGGCACTGG TCAGCAAGCT GTTCATGGGC  
 TCGAGCTGTT GCACCAGCCG TACCGTGACC AGTCGTTCGA CAAGTACCCG  
 LysGluGlyHis SerPheGln PhePheGly HisSerGlyArg CysIlePhe·  
 1151 AAGGAGGGGC ACTCCTTCCA GTTCTTTGGC CACAGCGGCC GCTGTATTTT  
 TTCTTCCCCG TGAGGAAGGT CAAGAAACCG GTGTGCGCCG CGACATAAAA  
 ·LysValTyr LeuGlyArgAsp GluGlnArg GlnLeuLeu ProAlaGlnVal·  
 1201 CAAGGTCTAT CTGGGACGTG ACGAGCAGCG TCAGCTGCTG CCAGCCCAGG  
 GTTCCAGATA GACCCTGCAC TGCTCGTCGC AGTCGACGAC GGTCGGGTCC  
 ·VGluArgPhe MetAlaLeu ArgHisGlnTyr GlnGluGlu ValLysAla  
 orf 3 → Met·  
 1251 TGGAACGCTT CATGGCCTTG CGCCACCAGT ACCAAGAGGA AGTAAAAGCA  
 ACCTTGCGAA GTACCGGAAC GCGGTGGTCA TGTTTCTCCT TCATTTTCGT

\*\*\*  
 ·MSerGluArg GlnGluArg LeuGlnAsnArg LeuGlnPro GluIleArg  
 1301 **TG**AGTGAACG TCAGGAGCGT CTGCAGAATC GTTTGCAACC GGAGATCCGC  
 ACTCACTTGC AGTCCTCGCA GACGTCTTAG CAAACGTTGG CCTCTAGGCG  
 GluPheArgAsp GlyCysArg ThrLeuGln LeuAlaThrVal AspSerGlu·  
 1351 GAGTTTTCGCG ACGGTTGCCG CACCCTGCAA CTGGCGACGG TGGACAGCGA  
 CTCAAAGCGC TGCCAACGGC GTGGGACGTT GACCGCTGCC ACCTGTCTGCT  
 ·GlyAsnPro AsnAlaSerTyr AlaProPhe ValLeuGln GluAspGlyTyr·  
 1401 AGGCAACCCC AATGCCAGCT ATGCCCCCTT CGTGCTGCAG GAGGATGGCT  
 TCCGTTGGGG TTACGGTCGA TACGGGGGAA GCACGACGTC CTCCTACCGA  
 ·TTyrValLeu IleSerGlu IleAlaArgHis AlaArgAsn LeuGlnGln  
 1451 ACTATGTGCT CATCTCCGAG ATCGCCCGTC ACGCCCGCAA CCTGCAGCAG  
 TGATACACGA GTAGAGGCTC TAGCGGGCAG TCGGGGCGTT GGACGTCGTC  
 ValProLysVal SerLeuMet LeuIleGlu AspGluThrGly AlaArgGlu·  
 1501 GTGCCCAAGG TGTCGCTGAT GCTGATCGAG GATGAAACCG GTGCCCGCGA  
 CACGGGTTCC ACAGCGACTA CGACTAGCTC CTACTTTGGC CACGGGCGCT  
 ·LeuPheAla ArgLysArgLeu ThrPheAsp AlaValAla GluValValAla·  
 1551 GCTGTTTGCC CGCAAGCGGC TCACCTTTGA CGCCGTGGCC GAAGTGGTGG  
 CGACAAACGG GCGTTCGCCG AGTGGAAACT GCGGCACCGG CTTACCACC  
 ·AArgAspAsp ValArgTrp GlyGlnAlaIle AlaAlaLeu GluGlyArg  
 1601 CCCGCGACGA CGTGCGCTGG GGCCAGGCAA TCGCCGCGCT GGAAGGGCGC  
 GGGCGCTGCT GCACGCGACC CCGGTCCGTT AGCGGCGCGA CCTTCCCGCG  
 PheGlyAspIle ValLysGly LeuSerAsn LeuLysAspPhe ValLeuPhe·  
 1651 TTCGGCGACA TCGTCAAAGG GCTCTCCAAT CTCAAGGATT TCGTGCTGTT  
 AAGCCGCTGT AGCAGTTTCC CGAGAGGTTA GAGTTCCTAA AGCACGACAA  
 ·ArgLeuLys ProGluGlnGly LeuPheVal LysGlyPhe GlyGlnAlaPhe·  
 1701 CCGGCTCAAA CCCGAGCAGG GGCTGTTCTG CAAAGGCTTC GGTCAAGCAT  
 GGCCGAGTTT GGGCTCGTCC CCGACAAGCA GTTTCGAAG CCAGTCCGTA  
 ·PArgValSer GlyAspGlu LeuValAspPhe ValHisLeu ValGluGly  
 1751 TTCGCGTCTC AGGTGACGAG CTGGTGGACT TCGTCCATCT GGTGGAAGGG  
 AAGCGCAGAG TCCACTGCTC GACCACCTGA AGCAGGTAGA CCACCTTCCC  
 HisLysArgVal AspAsnGly AlaGluLeu ThrSerProAla AspAlaPro·  
 1801 CACAAGCGGG TCGACAACGG CGCCGAGCTG ACCAGTCCGG CCGATGCGCC  
 GTGTTCGCC AGCTGTTGCC GCGGCTCGAC TGGTCAGGCC GGCTACGCGG  
 ·Val\*\*\*  
 1851 AGT**TGA**CGG CGACCACATC GAATAAAAAT ACGGGCAGCC TGGGCTGCCG  
 TCAGACTGCC GCTGGTGTAG CTTATTTTTA TGCCCGTCGG ACCCGACGGC  
 1901 TTTTTTTATT GCGTGTACACC CCTGAGCGCT AGTCCTGCAG GAGGCTTGTT  
 AAAAA**AATAA** CGCACAGTGG GGACTCGCGA TCAGGACGTC CTCCGAACAA  
 \*\*\*Gln ThrAspGly ArgLeuAlaLeu GlyAlaPro ProLysAsn  
 1951 GGGGAAGGCA TCCCGATCGG CCTGATTGGC CGTCTCGTTG CATTGCCCC  
 CCCCTTCCGT AGGGCTAGCC GGACTAACCG GCAGAGCAAC GTAAGCGGGG  
 ProPheAlaAsp ArgAspAla GlnAsnAla ThrGluAsnCys GluGlyArg·  
 2001 GGATCTTCCA GGAGGTCTGG CTGAGGACGA TATAGCCATC GCGGCAATAC  
 CCTAGAAGGT CCTCCAGACC GACTCCTGCT ATATCGGTAG CGCCGTTATG  
 ·ArgLysTrp SerThrGlnSer LeuValIle TyrGlyAsp ArgCysTyrLys·

2051 TTCCGCTCGG CCAGGGTCTG GGTCAACTGT GCATCCTGCA GCGCATCACG  
AAGGCGAGCC GGTCCCAGAC CCAGTTGACA CGTAGGACGT CGCGTAGTGC  
·LysgGluAla LeuThrGln ThrLeuGlnAla AspGlnLeu AlaAspArg

2101 CCGTTCCAGC AGACTCTTGC TGC GGCTGAG GCGACTGCCG TCGTTCTCCT  
GGCAAGGTCG TCTGAGAACG ACGCCGACTC CGCTGACGGC AGCAAGAGGA  
ArgGluLeuLeu SerLysSer ArgSerLeu ArgSerGlyAsp AsnGluGln·

2151 GCAGTCGGGT GGGCAGGGTG TCGAGCGGCG CGGCTTCAAA GGTGAAGCGC  
CGTCAGCCCA CCGTCCCAC AGCTCGCCGC GCCGAAGTTT CCACTTCGCG  
·GlnArgThr ProLeuThrAsp LeuProAla AlaGluPhe ThrPheArgLys·

2201 TTGCTCCCCT CTTCGTTGAT ATGGGTTCTGA AACAGGGGGG CCGGGCCATC  
AACGAGGGGA GAAGCAACTA TACCCAAGCT TTGTCCCCC GGCCCCGTAG  
·LysrGlyGlu GluAsnIle HisThrArgPhe LeuProAla ProGlyAsp

2251 CGGCTGCTGC CCGGCAAAC CGGAGCAGGC AGTGATTGCC GGTAACAACA  
GCCGACGACG GGGCCGTTTG GCCTCGTCCG TCACTAACGG CCATTGTTGT  
ProGlnGlnGly ProLeuGly SerCysAla ThrIleAlaPro LeuLeuLeu·

2301 GCATGAATGC AACGGCAGAC AGTAGACGCA CACAAGACTC CAATCGGGTG  
CGTACTTACG TTGCCGTCTG TCATCTGCGT GTGTTCTGAG GTTAGCCAC  
·LeuPheAla ValAlaSerLeu LeuArgVal CysSerGlu LeuArgThrIle·

2351 ATCACTTCAA GAGCGGCAGA TTAACACGCC AGCTCGGGCT GGATGGCCTC  
TAGTGAAGTT CTCGCCGTCT **AAT**TGTGCGG TCGAGCCCGA CCTACCGGAG  
·IleI ← orf 4 \*\*\*CysAlaLeu GluProGln IleAlaGlu

2401 GAGCAGCTGA TCCGTGGTGA GCAGGGTCAC GGTTCTGCCC TTTGGCAGGC  
CTCGTCGACT AGGCACCACT CGTCCCAGTG CCAAGACGGG AAACCGTCCG  
LeuLeuGlnAsp ThrThrLeu LeuThrVal ThrArgGlyLys ProLeuSer·

2451 TCAGATGTTG CCACATCCAG TGGTGGTGCT CGATGATCTT CTCCGCGCTC  
AGTCTACAAC GGTGTAGGTC ACCACCACGA GCTACTAGAA GAGGCGCGAG  
·SerHisGln TrpMetTrpHis HisHisGlu IleIleLys GluAlaSerLeu·

2501 AGGTGAGGGC GATCCGCCGT GGTGTGGGCA TCCGTCACCG CAAATACGTC  
TCCACTCCC G TAGGCGGCA CCACACCCGT AGGCAGTGGC GTTTATGCAG  
·LeusProArg AspAlaThr ThrHisAlaAsp ThrValAla PheValAsp

2551 AAACCCTTGC GCTGCGGCGC TGCGCAGCGT GGTGTCGACG CAAAAATCGG  
TTTGGGAACG CGACGCCGCG ACGCGTCGCA CCACAGCTGC GTTTTTAGCC  
PheGlyGlnAla AlaAlaSer ArgLeuThr ThrAspValCys PheAspThr·

2601 TGGCACAGCC GCTGATCAGC AGCCTGTCCA CCGCCTGCTC TGCCAGCAGG  
ACCGTGTCGG C GACTAGTCG TCGGACAGGT GGCGGACGAG ACGGTCGTCC  
·ThrCysGly SerIleLeuLeu ArgAspVal AlaGlnGlu AlaLeuLeuPhe·

2651 AAGCCGAGCT CGGTATCGAG GAAGCTGTCA CAGGCGGTCT TGCGTACCCG  
TTCGGCTCGA GCCATAGCTC CTTCGACAGT GTCCGCCAGA ACGCATGGGC  
·PheyLeuGlu ThrAspLeu PheSerAspCys AlaThrLys ArgValArg

2701 GCTGTCGCCG CGGCCGGGG TGAGATCGGC GTGAAGCTGC CAGCCTGCAC  
CGACAGCGGC GCCGGGCC ACTCTAGCCG CACTTCGACG GTCGGACGTG  
SerAspGlyArg GlyProThr LeuAspAla HisLeuGlnTrp GlyAlaSer·

2751 TGCCGGGTTT CAGTTCAGAA CCCGGTGCCT CGTGTTCAC ATAGATGACA  
ACGGCCCAAG GTCAAGTCTT GGGCCACGCA GCACAACGTG TATCTACTGT  
·SerProGlu LeuGluSerGly ProAlaAsp HisGlnVal TyrIleValArg·

2801 CGCCCCTGAT TGGCCCGCAC GTTGTCTGCC AAGCGGTGTA TGTTGGCGAT  
GCGGGGACTA ACCGGGCGTG CAACAGACGG TTCGCCAACT ACAACCGCTA  
·ArgyGlnAsn AlaArgVal AsnAspAlaLeu ArgAsnIle AsnAlaIle

2851 GACCTGCGCG TCCTGATGGC GGGGATTGGT AAACAACCCC TGTTCATGT  
 CTGGACGCGC AGGACTACCG CCCCTAACCA TTTGTTGGGG ACAACGTACA  
 ValGlnAlaAsp GlnHisArg ProAsnThr PheLeuGlyGln GlnMetAsp·

2901 CGATGACCAG TAACACATCC ATATGAAATC CTTAGGCAAT TTCAGGGTT  
 GCTACTGGTC ATTGTGTAGG TATACTTTAG GAATCCGTTA AAAGTCCCAA  
 ·AspValLeu LeuValAspMet ← orf 5 \*\*\*ProGln·

2951 GCAGCCACTG GCTGCAGTCA CGGCTTCGGG ATTGATGCAG TGCGCCATA  
 CGTCGGTGAC CGACGTCAGT GCCGAAGCCC TAACTACGTC ACGCGGGTAT  
 ·GlnTrpGln SerCysAspArg SerArgSer GlnHisLeu AlaGlyMetAsp·

3001 TCTTGCTTCA TTTCATCGGC ATTTAGCCAG CGTTCTGGCA GGGGGCTGAT  
 AGAACGAAGT AAAGTAGCCG TAAATCGGTC GCAAGACCGT CCCCCGACTA  
 ·AspLysMet GluAspAla AsnLeuTrpArg GluProLeu ProSerIle

3051 CCGCACCCGG ATGTCCGGCG TCCGCCCGGT GGGGGCGTGC GCATCGTTCT  
 GCGTGGGCC TACAGCCGCC AGGCGGGCCA CCCCCGCACG CGTAGCAAGA  
 ArgValArgIle AspAlaThr ArgGlyThr ProAlaHisAla AspAsnGln·

3101 GCGTTTCTGT CTCTGGCAGC ACCAGTCCAC CTTGAGTGCC GGGTTGCGGC  
 CGCCAAGACA GAGACCGTGC TGGTCAGGTG GAACTCACGG CCCAACGCCG  
 ·GlnGluThr GluProValVal LeuGlyGly GlnThrGly ProGlnProGln·

3151 TGCGATGCGG CTGCGAGCCC CAGCCCTCCC TCGACGTGAA GTTGCCGGCG  
 ACGTACGCC GACGCTCGGG GTCGGGAGGG AGCTGCACTT CAACGGCCGC  
 ·GlnrAlaAla AlaLeuGly LeuGlyGlyGlu ValHisLeu GlnArgArg

3201 ATGTGCATGA TACGTTGGCC CGGGTGCTGC GCAGGTAGTC CACCATGCTC  
 TACACGTACT ATGCAACCGG GCCACGACG CGTCCATCAG GTGGTACGAG  
 HisAlaHisTyr ThrProGly ProAlaAla CysThrThrTrp TrpAlaArg·

3251 TCGGCCATGG TGTCGTCCCA GCTGGTCTGG CGGCGAAGCG GCGGGCGTTG  
 AGCCGGTACC ACAGCAGGGT CGACCAGACC GCCGCTTCGC CGCCCGAAC  
 ·ArgTrpPro ThrThrGlyAla ProArgAla AlaPheArg ArgAlaAsnGly·

3301 CCATCGGCAT CACCGTGGTG GAGCGAGGCC ATGAATTTCT GCGGTAAGG  
 GGTAGCCGTA GTGGCACCAC CTCGCTCCGG TACTTAAAGA CCGCCATTCC  
 ·GlypAlaAsp GlyHisHis LeuSerAlaMet PheLysGln ArgTyrPro

3351 ATCATCGGTG AGCGTGAGTT CGCGGGCGAG CTGGCTGCGA CGACTGGCGG  
 TAGTAGCCAC TCGACTCAA GCGCCCGCTC GACCGACGCT GCTGACCGCC  
 AspAspThrLeu ThrLeuGlu ArgAlaLeu GlnSerArgArg SerAlaPro·

3401 GGAGCTTGTC CAGCCAGGAG GACCCTTCCT GACCGACACA GCTCACCAGC  
 CCTCGAACAG GTCGGTCTC CTGGGAAGGA CTGGCTGTGT CGAGTGGTCG  
 ·ProLysAsp LeuTrpSerSer GlyGluGln GlyValCys SerValLeuPro·

3451 GGTTTGGGGG CGTTGGCGGC GATGACCGGC AGATGGTGCT GTTTGGCGAA  
 CCAAACCCCC GCAACCGCCG CTACTGGCCG TCTACCACGA CAAACCGCTT  
 ·ProsProAla AsnAlaAla IleValProLeu HisHisGln LysAlaPhe

3501 CTCCACCAGC GGGCGATAGT CGCTCTGGTA GTTGGGCCAG GCGTTGCCAT  
 GAGGTGGTCG CCCGCTATCA GCGAGACCAT CAACCCGGTC CGCAACGGTA  
 GluValLeuPro ArgTyrAsp SerGlnTyr AsnProTrpAla AsnGlyAsp·

3551 CGCGAATGAG GGCCGCCTCA CCTATGCGCC CGGCCAGATA GGCATCCACC  
 GCGCTTACTC CCGGCGGAGT GGATACGCGG GCCGGTCTAT CCGTAGGTGG  
 ·AspIleLeu AlaAlaGluGly IleArgGly AlaLeuTyr AlaAspValVal·

3601 ACGGCTTGAT CGGCACGGCT GAACTGCTCC ATGGAGAGCA CAAGGGCAGC  
 TGCCGAAC TA GCGTGCCGA CTTGACGAGG TACCTCTCGT GTTCCCGTGC  
 ·ValaGlnAsp AlaArgSer PheGlnGluMet SerLeuVal LeuAlaArg

3651 ACCATCGGCC CGGGATGCTT CTTCCAGCCC CGCCTGCAGG CGGGCCTGCG  
 TGGTAGCCGG GCCCTACGAA GAAGGTCGGG GCGGACGTCC GCCCGGACGC  
 GlyAspAlaArg SerAlaGlu GluLeuGly AlaGlnLeuArg AlaGlnPro·

3701 GCAGGTGCAC GGCCGGGTGG GTATGCAGCT CGCCCACCAC TACTATGTCTG  
 CGTCCACGTG CCGGCCACC CACACGTCTGA GCGGGTGGTG ATGATACAGC  
 ·ProHisVal AlaProHisThr HisLeuGlu GlyValVal ValIleAspAla·

3751 GCGTCCGCCA CCTGATCCAC CGCCTGGGTC AGCGTCAGCT CACCTTGGCT  
 CGCAGGCGGT GGACTAGGTG GCGGACCCAG TCGCAGTCGA GTGGAACCGA  
 ·AlapAlaVal GlnAspVal AlaGlnThrLeu ThrLeuGlu GlyGlnSer

3801 GGTATCGCTC TGACCCGCGC TGAGCCGATA GTGGTAGAGG GTGCCGGCAT  
 CCATAGCGAG ACTGGGCGCG ACTCGGCTAT CACCATCTCC CACGGCCGTA  
 ThrAspSerGln GlyAlaSer LeuArgTyr HisTyrLeuThr GlyAlaAsp·

3851 CGTCATCGGG CACTGTCTGTG CAGGCGGCCA GCAGCAGGGG AAGGGTGAAC  
 GCAGTAGCCC GTGACAGCAC GTCCGCCGGT CGTCGTCCCC TTCCCCTTG  
 ·AspAspPro ValThrThrCys AlaAlaLeu LeuLeuPro LeuThrPheLeu·

3901 AGGGGCAGTA ATCGAGTCAT GGTATCTCAC AACGAAGCAG AGCCAGAGCC  
 TCCCCTCAT TAGCTCAGTA CCATAGAGTG TTGCTTCGTC TCGGTCTCGG  
 ·LeuLeuLeu ArgThrMet ← orf 6

3951 ATACAATGGC AGCATGGCGG GCCGAAAAC AGAGGGGAAT AGTGTAGAAC  
 TATGTTACCG TCGTACCGCC CGGCCTTTTG TCTCCCCTTA TCACATCTTG

← Caja Fur orf7 63'2% →

4001 CTAATTACGA CAAAAGAAAA **TGAGAATGAT TCCGTTTATT** ATTGATCTTT  
 GATTAATGCT **GTTTTCTTTT ACTCTTACTA AGGCAAATAA** TAACTAGAAA  
 ← Caja Fur orf7 68'4% →  
 ← Caja Fur orf6 68'4% →  
 ← Caja Fur orf6 63'2% →

4051 GTTGCGGGCT GAGTAATATG CCAGCTGTTT GATAACAGTT CTCAATAAGG  
 CAACGCCCGA CTCATTATAC GGTCGACAAA CTATTGTCAA GAGTTATTCC  
orf 7 → Val AlaHisAsnAsn ThrLeuSer LeuValAla LeuAlaValAla·

4101 ATTTGCAGTG GCCCATAACA ACACCCTATC GCTGGTTGCC CTTGCTGTGG  
 TAAACGTCAC CGGGTATTGT TGTGGGATAG CGACCAACGG GAACGACACC  
 ·AAlaGlyLeu AlaSerPro ValPheAlaAla AspLysLys AlaAspGlu

4151 CAGCTGGTCT CGCTTCCCCG GTCTTCGCGG CGGACAAGAA AGCAGATGAA  
 GTCGACCAGA GCGAAGGGGC CAGAAGCGCC GCCTGTTCTT TCGTCTACTT  
 ValMetValVal SerGlySer ArgMetGlu GlnLysLeuGlu AspValSer·

4201 GTCATGGTCTG TCAGCGGCTC ACGGATGGAG CAGAAACTGG AGGATGTCTC  
 CAGTACCAGC AGTCGCCGAG TGCCTACCTC GTCTTTGACC TCCTACAGAG  
 ·GlyProIle SerValIleThr AlaGluGln IleGluGlu GlnValValSer·

4251 CGGCCCCATC TCGGTGATCA CGGCCGAACA GATTGAAGAG CAGGTGGTGA  
 GCCGGGGTAG AGCCACTAGT GCCGGCTTGT CTAATTCTC GTCCACCACT  
 ·SAsnValAla AspLeuPhe ArgTyrGluPro GlyValThr AlaLeuGly

4301 GCAACGTCGC CGACCTGTTC CGTTACGAGC CGGGCGTCAC CGCCCTCGGC  
 CGTTGCAGCG GCTGGACAAG GCAATGCTCG GCCCGCAGTG GCGGGAGCCG  
 GlyAlaGlyAsp AlaGlnThr PheIleIle ArgGlyMetGly GluAsnArg·

4351 GCGGCCGGCG ATGCCAGAC CTTCATCATC CGCGGCATGG GTGAGAACC  
 CCGCGGCCGC TACGGGTCTG GAAGTAGTAG GCGCCGTACC CACTCTTGCC

4401 ·ValLysIle ValArgAspGly ValArgGln AsnAspAla TyrLysAsnGly·  
 CGTCAAGATA GTGCGCGACG GCGTGCGCCA GAACGACGCC TACAAGAACG  
 GCAGTTCTAT CACGCGCTGC CGCACGCGGT CTTGCTGCGG ATGTTCTTGC

4451 ·GGlyValGly GlnSerTyr PheAspThrAsp MetIleLys GlnIleGlu  
 GCGGGGTGGG CCAGAGCTAT TTTGACACCG ACATGATCAA GCAGATCGAG  
 CGCCCCACCC GGTCTCGATA AAACGTGTGGC TGTACTAGTT CGTCTAGCTC

4501 ValValLysGly ProAlaSer AlaAlaTyr GlySerAspAla LeuGlyGly·  
 GTGGTCAAGG GACCCGCCTC TGCGGCCTAC GGCTCAGATG CGCTGGGAGG  
 CACCAGTTCC CTGGGCGGAG ACGCCGGATG CCGAGTCTAC GCGACCCTCC

4551 ·ValIleAla IleThrThrLys AspAlaGly AspPheLeu LysGlyArgAsp·  
 CGTCATCGCC ATCACCACCA AGGACGCCGG CGACTTCCTG AAGGGCCGCG  
 GCAGTAGCGG TAGTGGTGGT TCCTGCGGCC GCTGAAGGAC TTCCCGGCGC

4601 ·ASerTyrLeu AspAlaThr ThrGlyTyrAla SerSerSer HisGlnLys  
 ACAGCTATCT GGACGCCACC ACCGGCTATG CCTCCAGCAG TCACCAGAAG  
 TGTCGATAGA CCTGCGGTGG TGGCCGATAC GGAGGTCGTC AGTGGTCTTC

4651 MetAlaGlyPhe ThrGlyAla LeuArgSer GlyGluPheGlu AsnLeuLeu·  
 ATGGCCGGCT TCACCGGCGC CCTGCGCAGC GGCGAGTTCG AGAACCTGCT  
 TACCGGCCGA AGTGGCCGCG GGACGCGTCG CCGCTCAAGC TCTTGGACGA

4701 ·ArgTyrThr TrpArgAspGly GlyValThr GlnAsnTyr AspGlyAspLys·  
 GCGTACACC TGGCGTGACG GCGGCGTGAC CCAGAACTAC GACGGCGACA  
 CGCGATGTGG ACCGCACTGC CGCCGCACTG GGTCTTGATG CTGCCGCTGT

4751 ·LAsnGluPhe AspIleAla SerGlnAlaVal LeuPheLys SerLysTrp  
 AGAACGAATT CGACATCGCC AGCCAGGCCG TGCTGTTCAA GAGCAAGTGG  
 TCTTGCTTAA GCTGTAGCGG TCGGTCCGGC ACGACAAGTT CTCGTTACC

4801 AsnLeuSerGlu GlyGlnPhe LeuLysLeu ThrValAspTyr PheSerGlu·  
 AACCTGAGCG AGGGTCAGTT CCTCAAGCTG ACTGTGCGACT ACTTCAGCGA  
 TTGGACTCGC TCCAGTCAA GGAGTTCGAC TGACAGCTGA TGAAGTCGCT

4851 ·GlyGlnAsp ProAspAlaVal AspLeuThr LysAlaAla SerValPheAsn·  
 AGGGCAGGAT CCGGATGCCG TCGATCTCAC CAAGGCCGCC TCCGTCTTCA  
 TCCCGTCCTA GGCCTACGGC AGCTAGAGTG GTTCCGGCGG AGGCAGAAGT

4901 ·AGlnProIle ThrAspLys AspThrAspAsn LeuSerLeu ValLeuAsp  
 ATCAGCCGAT CACCGACAAG GATACGGACA ACCTCTCGCT GGTGCTGGAT  
 TAGTCGGCTA GTGGCTGTTC CTATGCCTGT TGGAGAGCGA CCACGACCTA

4951 HisGlyIleAla LeuAsnAla ProTrpVal AspArgIleAsp SerLysIle·  
 CACGGCATCG CCCTGAACGC GCCCTGGGTC GATCGCATAG ACAGCAAGAT  
 GTGCCGTAGC GGGACTTGCG CGGGACCCAG CTAGCGTATC TGTCGTTCTA

5001 ·TyrTyrAla ArgThrLysGln ThrLeuAsp GlnTyrAla SerSerLysTyr·  
 CTACTACGCT CGCACCAAGC AGACCCTGGA TCAGTACGCT TCGTCCAAGT  
 GATGATGCGA GCGTGGTTCG TCTGGGACCT AGTCATGCGA AGCAGGTTCA

5051 ·TProValAsn ProThrAsn ProTyrValThr LysAsnSer LeuAspSer  
 ACCCGGTCAA TCCGACCAAC CCCTATGTGA CCAAGAAGTC GCTGGACAGC  
 TGGGCCAGTT AGGCTGGTTG GGGATACACT GGTTCTTGAG CGACCTGTCTG

5101 AsnGlyPheGlu GlnLysSer LeuGlyAla GlnValLysPhe SerLysAla·  
 AACGGCTTCG AGCAGAAGAG CCTGGGGGCT CAGGTGAAGT TCAGCAAGGC  
 TTGCCGAAGC TCGTCTTCTC GGACCCCGA GTCCACTTCA AGTCGTTCCG

5151 ·LeuAlaSer GlnArgLeuAla TrpGlyLeu GluTyrGlu HisThrAspAsn·  
 GCTGGCCAGC CAGCGTCTGG CCTGGGGTCT GGAGTATGAG CACACCGACA  
 CGACCGGTCTG GTCGCAGACC GGACCCCGA CCTCATACTC GTGTGGCTGT

5201 ·AGluArgThr ArgPheLys AlaProThrVal ProGlyAsp PheValGly  
 ATGAGCGGAC CCGCTTCAAG GCGCCGACCG TACCGGGGA TTTGTCGGC  
 TACTCGCCTG GGCGAAGTTC CGCGGCTGGC ATGGCCCCCT AAAGCAGCCG

5251 TyrSerGluLeu SerPhePro SerThrThr SerGluHisGly AlaLeuTrp·  
 TACAGCGAGC TGAGCTTCCC CTCTACCACC AGTGAGCACG GTGCCCTGTG  
 ATGTCGCTCG ACTCGAAGGG GAGATGGTGG TCACTCGTGC CACGGGACAC

5301 ·AlaPheAsp AspIleLysPhe GlyGluArg TrpValLeu ThrProGlyAla·  
 GGCTTTGAC GACATCAAGT TTGGTGAGCG CTGGGTGCTG ACCCCGGGTG  
 CCGGAAACTG CTGTAGTTCA AACCACTCGC GACCCACGAC TGGGGCCCAC

5351 ·AArgTyrAsp TyrTyrGln MetThrProAsp GluAspPro AlaTyrThr  
 CCCGTTACGA CTACTACCAG ATGACGCCGG ATGAGGATCC CGCCTACACG  
 GGGCAATGCT GATGATGGTC TACTGCGGCC TACTCCTAGG GCGGATGTGC

5401 GlyGluLysLeu LysArgPhe SerGluGly GluPheSerPro LysLeuGly·  
 GGCGAAAAGC TCAAGCGCTT CTCCGAAGGG GAGTTCTCGC CCAAGCTGGG  
 CCGCTTTTCG AGTTCGCGAA GAGGCTTCCC CTCAAGAGCG GGTTCGACCC

5451 ·LeuValPhe LysAlaHisGlu AlaAlaAsn LeuPheAla GlnTyrSerHis·  
 GCTGGTATTC AAGGCTCACG AGGCGGCCAA CCTGTTTGCC CAGTACAGCC  
 CGACCATAAG TTCCGAGTGC TCCGCCGGTT GGACAAACGG GTCATGTCCG

5501 ·HGlyPheLys AlaProMet TyrAspAsnAla PheSerThr LeuAsnHis  
 ATGGTTTCAA GGCGCCCATG TATGACAACG CTTTCTCCAC CCTGAACCAT  
 TACCAAAGTT CCGCGGGTAC ATACTGTTGC GGAAGAGGTG GGACTTGGTA

5551 GlnAlaTyrGly TyrArgIle GluProAsn ThrAsnLeuLys ProGluSer·  
 CAGGCGTACG GCTATCGCAT CGAGCCCAAC ACCAACCTCA AGCCCCGAAAG  
 GTCCGCATGC CGATAGCGTA GCTCGGGTTG TGGTTGGAGT TCGGGCTTTC

5601 ·SerAspGly IleHisLeuGly ValArgGly SerAlaGly GlyPheSerTyr·  
 CAGCGACGGC ATCCATCTGG GGGTGC GCGCG CAGTGCCGGC GGTTTCAGCT  
 GTCGCTGCCG TAGGTAGACC CCCACGCGCC GTCACGGCCG CCAAAGTCGA

5651 ·TGluValAla ThrPheTyr AsnLysPheAsp TyrPheIle GluLeuGly  
 ACGAAGTGGC GACCTTCTAC AACAAGTTTG ACTACTTCAT CGAGCTGGGT  
 TGCTTCACCG CTGGAAGATG TTGTTCAAAC TGATGAAGTA GCTCGACCCA

5701 HisValSerThr GluArgArg ThrAlaVal TyrGlnTyrGln AsnLeuAsp·  
 CACGTGAGCA CCGAAAGGCG TACCGCCGTC TACCAGTACC AGAACCTGGA  
 GTGCACTCGT GGCTTTCCGC ATGGCGGCAG ATGGTCATGG TCTTGGACCT

5751 ·LysAlaThr ThrLysGlyAla GluAlaAsn AlaAspTyr TrpLeuAsnAsp·  
 CAAGGCGACC ACCAAGGGGG CCGAGGCCAA TGCGGATTAC TGGTTAAATG  
 GTTCCGCTGG TGGTTCCCCC GGCTCCGGTT ACGCCTAATG ACCAATTTAC

5801 ·ALeuValAsn ValTrpGly AsnLeuAlaTyr IleGluGly AsnAspGly  
 ATTTGGTCAA CGTCTGGGGC AACCTGGCCT ACATCGAAGG CAATGATGGC  
 TAAACCAGTT GCAGACCCCG TTGGACCGGA TGTAGCTTCC GTTACTACCG

5851 AspGlyAsnTyr IleAsnSer LeuSerPro LeuAsnGlySer LeuGlyVal·  
 GATGGCAACT ACATCAACAG CCTGAGCCCG CTTAACGGCA GCCTGGGTGT  
 CTACCGTTGA TGTAGTTGTC GGACTCGGGC GAATTGCCGT CGGACCCACA

5901 ·ArgLeuGlu HisProAsnTrp AsnIleAsn ThrAlaLeu ArgPheAlaAsp·  
 GCGGCTGGAG CATCCCAACT GGAACATCAA CACGGCGCTG CGCTTTGCCG  
 CGCCGACCTC GTAGGGTTGA CTTGTAGTT GTGCCGCGAC GCGAAACGGC

5951 ·AAsnMetAsn LysValGly LysAspAlaThr GlyAsnAsp AsnIleAsn  
 ACAACATGAA CAAGGTGGGC AAGGATGCCA CGGGCAACGA CAACATCAAT  
 TGTTGTACTT GTTCCACCCG TTCCTACGGT GCCCGTTGCT GTTGTAGTTA

IleAlaGlyTrp GlyValVal AspLeuTyr AlaGlnPheLys ProMetGln·  
 6001 ATCGCGGGCT GGGGCGTGGT GGATCTCTAT GCCCAGTTCA AGCCGATGCA  
 TAGCGCCCGA CCCCACACCA CCTAGAGATA CGGGTCAAGT TCGGCTACGT  
 ·AspLeuGln LeuAsnValGly ValPheHis LeuPheAsp LysGluTyrVal·  
 6051 GGATCTGCAG CTCAACGTCG GTGTCTTCCA CCTGTTTGAC AAGGAGTACG  
 CCTAGACGTC GAGTTGCAGC CACAGAAGGT GGACAAACTG TTCCTCATGC  
 ·VserTyrGlu SerIleThr GlyLeuSerAla ThrThrAsn SerSerAsn  
 6101 TCAGCTACGA AAGCATCACC GGGCTGAGTG CCACGACCAA CTCCAGCAAC  
 AGTCGATGCT TTCGTAGTGG CCCGACTCAC GGTGCTGGTT GAGGTCGTTG  
 LysThrGlnPro GlyArgAsn LeuSerAla ArgValLysTyr ValPhe\*\*\*·  
 6151 AAGACACAGC CGGGCCGCAA CCTGAGTGCA CGGGTCAAGT ACGTTTTCTA  
 TTCTGTGTCG GCCCGGCGTT GGACTCACGT GCCCAGTTCA TGCAAAGAT  
 ·\*\*\*·  
 6201 ATGTCGGTGA GCAGCACGCA CATCTTATGA CTCAGGGGCC GCGAGGCCCC  
 TACAGCCACT CGTCGTGCGT GTAGAATACT GAGTCCCCGG CGCTCCGGGG  
 6251 TTTTCTATGG ACTGAAACCG GCCCACGGCC GCTAAAAAAA GAAACCCGCC  
 AAAAGATAACC TGACTTTGGC CGGGTGCCGG CGATTTTTTTT CTTTGGGCGG  
 6301 AGAAGCGGGT GGAAAGATTG CAACACTAAC CAGGAGGTGG TGTACTCAA  
 TCTTCGCCCA CCTTTCTAAC GTTGTGATTG GTCCTCCACC ACAATGAGTT  
 orf8 →Met PhePheIlePhe·  
 6351 TAGACTCCGC TCTTGTGGCA ATAGTTCAAT TTTATTGATG TTTTTCATTT  
 ATCTGAGGCG AGAACACCGT TATCAAGTTA AAATAACTAC AAAAAGTAAA  
 ·PAlaSerPro ArgAspArg ArgIleLeuPro CysLysSer ValIleIle  
 6401 TTGCTTCCCC TCGGGATCGC AGGATCCTCC CCTGCAAATC GGTATCATT  
 AACGAAGGGG AGCCCTAGCG TCCTAGGAGG GGACGTTTAG CCAATAGTAA  
 CysAlaProSer SerArgCys ArgGlySer MetProAlaPhe SerTrpLeu·  
 6451 TGTGCCCTT CTTCCCGCTG TCGAGGATCT ATGCCCGCCT TCTCCTGGTT  
 ACACGGGGAA GAAGGGCGAC AGCTCCTAGA TACGGGCGGA AGAGGACCAA  
 ·AlaLeuPhe PheGlyAlaPhe TyrPheVal TyrGlyAla TyrLeuProPhe·  
 6501 AGCCCTGTTC TTTGGCGCCT TCTACTTCGT CTATGGCGCC TACCTGCCGT  
 TCGGGACAAG AAACCGCGGA AGATGAAGCA GATACCGCGG ATGGACGGCA  
 ·PTrpSerLeu TrpLeuGlu GlyIleGlyVal SerAlaGlu MetIleGly  
 6551 TCTGGTGCCT CTGGCTGGAG GGCATAGGCG TGAGCGCCGA GATGATAGGT  
 AGACCAGCGA GACCGACCTC CCGTATCCGC ACTCGCGGCT CTACTATCCA  
 LeuLeuLeuGly AlaGlyMet AlaIleArg PheAlaGlyAsn LeuLeuVal·  
 6601 CTGCTGCTGG GGGCCGGGAT GGCGATCCGC TTCGCCGGA ACCTGTTGGT  
 GACGACGACC CCCGGCCCTA CCGCTAGGCG AAGCGGCCGT TGGACAACCA  
 ·MetGlyGln IleLysGlyAla GlyHisLeu LeuProVal ThrArgLeuLeu·  
 6651 GATGGGGCAG ATCAAGGGGG CCGGGCACCT GCTGCCCGTT ACCCGGCTGC  
 CTACCCCGTC TAGTTCCCC GGCCCGTGGA CGACGGGCAA TGGGCCGACG  
 ·LCysLeuLeu SerLeuLeu AlaPheLeuGly PheTyrLeu SerHisSer  
 6701 TCTGTCTGCT GAGCCTGCTG GCCTTCTCG GCTTTTATCT GAGTCACAGC  
 AGACAGACGA CTCGGACGAC CGGAAGGAGC CGAAAATAGA CTCAGTGTCTG  
 LeuTrpTrpLeu ValGlyLeu ThrLeuVal AlaAsnPheIle TyrProThr·  
 6751 CTCTGGTGGC TGGTGGGGCT GACCCTGGTG GCGAACTTCA TCTATCCGAC  
 GAGACCACCG ACCACCCCGA CTGGGACCAC CGCTTGAAGT AGATAGGCTG

6801 ·LeuMetPro ValGlyGluAla LeuAlaThr ArgMetVal ValGlnAlaHis·  
 CCTGATGCCG GTGGGGGAGG CACTTGCCAC CCGCATGGTG GTGCAGGCGC  
 GGACTACGGC CACCCCTCC GTGAACGGTG GGCGTACCAC CACGTCCGCG

6851 ·HLeuAspTyr GlyLysVal ArgLeuCysGly SerPheAla PheIleVal  
 ACCTCGACTA CGGCAAGGTG CGGCTGTGCG GCTCCTTTGC CTTCATAGTC  
 TGGAGCTGAT GCCGTTCCAC GCCGACACGC CGAGGAAACG GAAGTATCAG

6901 AlaSerThrLeu ValGlyAla LeuValGly AsnPheGlySer AspTrpVal·  
 GCGTCGACCC TGGTCGGTGC CCTGGTGGGG AATTTTGGCA GCGACTGGGT  
 CGCAGCTGGG ACCAGCCACG GGACCACCC TTAACCCGT CGCTGACCCA

6951 ·LeuHisThr MetValAlaGly LeuValLeu MetLeuLeu LeuSerTrpLeu·  
 GCTGCACACC ATGGTGGCGG GGCTGGTGCT GATGTTGCTG CTCAGCTGGC  
 CGACGTGTGG TACCACCGCC CCGACCACGA CTACAACGAC GAGTCGACCG

7001 ·LProLeuHis ProAlaPro ArgAspIleGln GlyGluArg AlaLysAla  
 TGCCGCTGCA TCCGGCGCCG CGGGACATTC AGGGGGAGCG GGCGAAAGCC  
 ACGGCGACGT AGGCCGCGGC GCCCTGTAAG TCCCCCTCGC CCGCTTTCGG

7051 SerLeuLeuAsp ThrLeuLys SerProSer ValArgArgPhe LeuLeuIle·  
 TCCCTGCTTG ATACCCTCAA GTCCCCCTCG GTGCGCCGTT TCTTGTGAT  
 AGGGACGAAC TATGGGAGTT CAGGGGGAGC CACGCGGCAA AGAACAACTA

7101 ·SerAlaLeu LeuGlnGlySer HisAlaAla TyrTyrGly PheSerAlaMet·  
 TTCTGCCCTG CTGCAGGGCA GCCATGCCGC CTACTIONGTT TTCAGCGCCA  
 AAGACGGGAC GACGTCCCGT CGGTACGGCG GATGATGCCA AAGTCGCGGT

7151 ·MHisTrpLys AlaAlaGly TyrSerGlyThr ThrIleGly TyrLeuTrp  
 TGCCTGGAA GGCGGCGGGT TACAGCGGCA CCACCATAGG CTATCTGTGG  
 ACGTGACCTT CCGCCGCCCA ATGTCGCCGT GGTGGTATCC GATAGACACC

7201 AlaLeuGlyVal ValAlaGlu IleGlyMet PheAlaAlaAsp LysArgPhe·  
 GCGTTGGGGG TGGTGGCGGA GATAGGCATG TTCGCTGCCG ACAAGCGCTT  
 CGCAACCCCC ACCACCGCCT CTATCCGTAC AAGCGACGCG TGTTCCGCGAA

7251 ·LeuAsnArg PheGlyAlaGln SerLeuPhe LeuValGly AlaIleGlyCys·  
 CCTCAACCGG TTCGGCGCCC AGAGCCTGTT TTTGGTGGGG GCGATCGGGT  
 GGAGTTGGCC AAGCCGCGGG TCTCGGACAA AAACCACCC CGCTAGCCCA

7301 ·CValValArg TrpIleLeu LeuGlyAlaSer ThrGluLeu LeuValLeu  
 GCGTGGTGC GCTGGATCCTG CTCGGTGCCT CCACCGAGCT CCTGGTGCTG  
 CGCACCACGC GACCTAGGAC GAGCCACGGA GGTGGCTCGA GGACCACGAC

7351 ValAlaGlyGln LeuLeuHis AlaValThr PheCysValSer HisLeuGly·  
 GTGGCGGGCC AGCTGCTCCA TGCGGTACCC TTCTGCGTCA GCCATCTCGG  
 CACCGCCCGG TCGACGAGGT ACGCCAGTGG AAGACGCAGT CCGTAGAGCC

7401 ·AlaValArg PheMetThrArg GlnLeuPro AlaGluGln LeuIleProThr·  
 CGCAGTGC GC TTCATGACCC GCCAGCTGCC GGCCGAGCAG CTGATCCCCA  
 GCGTCACGCG AAGTACTGGG CGGTTCGACGG CCGGCTCGTC GACTAGGGGT

7451 ·TGlnAlaLeu TyrAlaAla LeuGlyLeuGly MetThrVal AlaAlaLeu  
 CCCAGGCGCT CTACGCGGCG CTCGGGCTCG GCATGACGGT GGCCGCCCTG  
 GGGTCCGCGA GATGCGCCGC GAGCCCGAGC CGTACTGCCA CCGGCGGGAC

7501 MetThrLeuCys GlyLeuLeu PheGluPro LeuGlyGlyGly IlePhePhe·  
 ATGACCCTGT GCGGCCTGCT GTTCGAGCCG CTGGGTGGCG GCATCTTCTT  
 TACTGGGACA CGCCGACGA CAAGCTCGGC GACCCACCGC CGTAGAAGAA

7551 ·IleMetVal LeuValValVal ProValPhe PheLeuArg LeuArgProGly·  
 CATCATGGTG CTGGTGGTGG TGCCCGTTTT CTTCTGCGG CTGCGCCCTG  
 GTAGTACCAC GACCACCACC ACGGGCAAAA GAAGGACGCC GACGCGGGAC

·GAspAlaAla SerAla\*\*\*

7601 GCGACGCGGC CTCCGCC**TGA** TCTTGGCCGA CAATGTCTTG GCCAAAAATG  
CGCTGCGCCG GAGGCGGACT AGAACCGGCT GTTACAGAAC CGGTTTTTTAC

7651 TCCTGGCCGA ACATGAAGGT GCCAGACAAA GTGAAGGGGA GCATGTGCTC  
AGGACCGGCT TGTACTTCCA CGGTCTGTTT CACTTCCCCT CGTACACGAG

7701 CCCTTTTTGC ATATCGCTCG CCTCACGCTG GCTCGCTCAG ATAGCGGCTG  
GGGAAAAACG TATAGCGAGC GGAGTGCGAC CGAGCGAGTC TATCGCCGAC

7751 ATCAGGGAAT GCCAGACCTC GGTACCCAGG GTGCCCGCCA GCAAGGTGCT  
TAGTCCCTTA CGGTCTGGAG CCATGGGTCC CACGGGCGGT CGTTCCACGA

7801 GGAGGCCGCG TCGAAACGAC CATCCTCTTG CCAGGAGAGG TGTGGCAAAA  
CCTCCGGCGC AGCTTTGCTG GTAGGAGAAC GGTCCCTCTCC ACACCGTTTT

7851 GTGCCGACAG GGTACGGTGA TGGCGTTGCA GGGCCAGATC CAGTGCCTCC  
CACGGCTGTC CCATGCCACT ACCGCAACGT CCCGGTCTAG GTCACGGAGG