



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i de Microbiologia

**Importancia de los genes
fur y *thyA* en la patogenia de
*Haemophilus parasuis***

Anna Bigas Terricabras

2007

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE
BARCELONA**

Departament de Genètica i de Microbiologia

**Importancia de los genes
fur y *thyA* en la patogenia de
*Haemophilus parasuis***

Memoria presentada por la
licenciada en Biología **Anna Bigas
Terricabras** para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas por
la Universitat Autònoma de
Barcelona.

Vo Bo

Las directoras de la tesis

Dra. Montserrat Llagostera Casas Dra. M^a Elena Garrido Ocaña

Bellaterra 2007

**A la meva família
i a en Lluís**

**“El que sabem es una gota d’aigua,
el que ignorem és l’oceà”**

(Isaac Newton)

AGRAÏMENTS

En aquest punt, es fa difícil agrair a tantes persones l'ajuda rebuda només amb quatre paraules però, ho intentaré. Espero no deixar-me a ningú.

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Montserrat Llagostera i al Dr. Jordi Barbé per haver-me donat l'oportunitat d'entrar a formar part del seu grup de recerca. Així mateix, agrair a la Dra. Montserrat Llagostera la co-direcció de la meva tesis i la confiança dipositada amb mi.

Vull agrair molt especialment a la meva altra co-directora de tesis, la Dra. M^aElena Garrido, per compartir tots els seus coneixements amb mi i per ser molt més que una companya de feina. M^a Elena, quan estaves per aquí necessitava la teva companyia i ara et trobo molt a faltar. Gràcies per ser indispensable.

També m'agradaria agrair al Dr. Ignacio Badiola, a Anna M^a Pérez de Rozas i a Montserrat Saco per la seva col·laboració incondicional amb els animals d'experimentació.

Per altra banda, m'agradaria donar les gràcies a tots els que han format part del nostre grup i amb els quals he compartit llargues estones al laboratori. La Montse Rebollo per la seva organització i maneres de fer. La Lorena per la seva alegria i "bronques" que ens posaven a tots a ratlla. La Mirle que ha fet de mare, tieta i amiga, una escorpí que sabia sempre el que m'havia de dir. La Montse Bosch, que va iniciar una saga i que em va ensenyar moltíssimes coses. En José, "mi cariño", gràcies per compartir amb mi tantes estones i mantenir una amistat sincera i afectuosa. En Gerard Mazón per les seves converses de política amb caràcter inconformista. La Mónica Jara, pel seu esperit de lluitadora. La Núria Busquets disposada sempre a ajudar i en Jordi Cuñé pel seu humor a vegades una mica assassí. La Sonia Rodríguez que tira endavant a l'altra banda de l'oceà. L' Anna Hervás pel seu entusiasme per les coses i pel seu caràcter indeformable. La Noelia, el nostre follet del bosc i l'Isabel una mama amb l'esperit més jove que el meu. I tampoc em puc deixar en Raúl Mesa un xicot tranquil amb ganes de batalla.

Ara continuem vivint el dia a dia uns quants personatges més. Tot i que ara estic físicament al laboratori 1 la meva escola sempre serà el laboratori 2. Allà hi ha persones a les que els hi haig d'agrair haver-me aguantat el dia a dia parlant fort, no cridant. La Pilar Cortés per la teva manera de fer i per tot el que m'has ensenyat. La Vanessa Blanc, coetania meva i amb una mica de temperament, gràcies per totes les xerrades compartides. La Susana Escribano, la rapidesa personificada però, sempre amb temps per un bon cafè. En Jesús Aranda, sempre disposat a tocar la pera però en el fons de bona fe. En Gerard Álvarez, el començament una mica tímid i ara com de la família. I la Carlota Bardina per compartir el cansament de bon matí i els propòsits de marxar d'hora.

Pel que fa el laboratori 1, els vull agrair a tots plegats la bona acollida i personalment a cada un d'ells. En Joan Ruiz, company de taula i de projectes futurs, espero que la sordesa no augmenti. La Susana Campoy, que apart d'alimentar-nos molt bé sempre té una resposta a un problema. En Marc Abella, coetani de llicenciatura i de doctorat, em sembla que ens hem entès moltes vegades sense paraules. La Laura Teixidó, companya de llargues cues a la carretera i entregada el cent per cent en tot el que fa. La Neus Sánchez, sempre disposada a alegrar-te el dia i a pensar més enllà. La Laura Medina, de les últimes incorporacions, una valenciana amb un bon caràcter. Tampoc em puc deixar en Marc Pybus un híbrid entre biotecnòleg i informàtic que ja s'ha fet un lloc al laboratori, ni tampoc a l'Andrea que ja ens estem acostumant a veure-la per aquí.

I per últim i no de importància, vull donar les gràcies molt sincerament i de tot cor, a la meva família que m'ha recolzat sempre i s'ha esforçat perquè jo hagi pogut complir els meus somnis. Ja sé que per molt que digui mai farà justícia a tot el que m'heu donat. I evidentment a tu, Lluís, que cada dia em dones una raó per tirar endavant i per seguir lluitant. Gràcies per caminar al meu costat i per ser el meu bastó en els moments difícils, t'estimo.

Per tot plegat i per molt més, moltes gràcies a tots!

RESUMEN

Haemophilus parasuis es un miembro de la familia *Pasteurellaceae* y un importante patógeno del tracto respiratorio porcino, causante de la enfermedad de Glässer. En la actualidad, esta enfermedad es una de las que tiene mayor incidencia en el sector porcino con una elevada repercusión económica. Por este motivo, es necesario estudiar la biología molecular de este patógeno para poder desarrollar vacunas más eficientes que las existentes hasta el presente. Para abordar dicho estudio es imprescindible disponer de algún proceso de transferencia genética eficaz en *H. parasuis*. No obstante, dado el desconocimiento que se tenía de dicho patógeno, no se conocía ningún mecanismo natural o de laboratorio que permitiera introducir DNA en *H. parasuis*. Por ello, el primer objetivo del presente trabajo ha sido desarrollar un método de transferencia genética en *H. parasuis* que permita estudiar posteriormente los genes implicados en su virulencia y en la colonización del hospedador.

En la presente tesis se ha demostrado por vez primera que *H. parasuis* es capaz de transformar de forma natural si el DNA exógeno contiene la secuencia ACCGAACTC, la cual es muy similar al motivo ACCGCACTT descrito en *H. influenzae* como *Uptake Signal Sequence*. Además, se ha optimizado este proceso, determinando las concentraciones más adecuadas de células bacterianas, AMPc y DNA transformante, así como el tiempo de incubación.

Un segundo objetivo de este trabajo ha sido averiguar el papel de la timidilato sintasa, enzima clave en la síntesis de desoxitimidina monofosfato (dTMP), en la virulencia de *H. parasuis*. Para ello, se ha construido un mutante *knockout* en el gen *thyA* de *H. parasuis* y se ha determinado la capacidad de colonización y la inmunogenicidad de la cepa salvaje y de dicho mutante *thyA* en un modelo animal de cobayas. Los resultados han mostrado que la cepa defectiva en la enzima timidilato sintasa tienen una menor capacidad de colonización, a pesar de que es capaz de inducir una respuesta inmune en el animal. Por ello, el mutante *thyA* de *H. parasuis* puede ser un buen candidato para el desarrollo de futuras vacunas.

Finalmente, en este trabajo se ha estudiado la importancia de la proteína Fur en la virulencia de *H. parasuis*. Dicha proteína es un regulador pleiotrópico que, entre otras funciones, controla los mecanismos implicados en la captación de hierro. Para abordar esta parte del trabajo se propuso la construcción de un mutante de *H. parasuis* defectivo en la proteína Fur. Los resultados obtenidos han mostrado claramente que dicha proteína es esencial para la viabilidad de esta bacteria. Así, se ha determinado el entorno genético del gen *fur* y se ha confirmado la no viabilidad de los mutantes *fur* mediante la obtención de cepas merodiploides.

ÍNDICE

	página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Haemophilus parasuis</i>	3
1.1.1. Generalidades	3
1.1.2. Serotipos	4
1.1.3. Virulencia y factores de virulencia	6
1.1.4. Modelos experimentales	8
1.2. LA TRANSFORMACIÓN	11
1.2.1. Transformación en bacterias grampositivas	13
1.2.2. Transformación en bacterias gramnegativas	18
1.3. LA ENZIMA TIMIDILATO SINTASA Y SU PAPEL EN LA VIRULENCIA	25
1.3.1. Generalidades	25
1.3.2. Virulencia de los mutantes <i>thyA</i>	29
1.4. EL HIERRO	31
1.4.1. Importancia y disponibilidad del hierro	31
1.4.2. Mecanismo de captación del hierro	34
1.4.2.1. Sideróforos	34
1.4.2.2. Proteínas receptoras de transportadores de hierro	36
1.4.3. Transporte del hierro al interior de la célula	39
1.4.4. Control de la expresión génica por el hierro	43
1.4.4.1. Mecanismo de acción	44
1.4.4.2. La caja Fur	45
1.4.4.3. Regulación y funciones	47
1.4.4.4. Mutantes <i>fur</i>	48
1.4.4.5. Otros reguladores	49
2. OBJETIVOS	51

3. ARTÍCULOS	55
3.1. Artículo 1: Development of a genetic manipulation system for <i>Haemophilus parasuis</i>	59
3.2. Artículo 2: Colonization capacity and serum bactericidal activity of <i>Haemophilus parasuis thy</i> mutants	67
3.3. Artículo 3: Non-viability of <i>Haemophilus parasuis fur</i> -defective mutants	75
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
4.1. Desarrollo de un método de transferencia genética en <i>H. parasuis</i>	89
4.2. Estudios de virulencia de un mutante <i>thyA</i> de <i>H. parasuis</i>	98
4.2.1. Aislamiento y caracterización del gen <i>thyA</i> de <i>H. parasuis</i>	98
4.2.2. Obtención de un mutante <i>thyA</i> de <i>H. parasuis</i>	99
4.2.3. Análisis de la capacidad colonizadora y de la actividad bactericida de un mutante <i>thyA</i> de <i>H. parasuis</i>	101
4.3. Viabilidad de mutantes <i>fur</i> de <i>H. parasuis</i>	107
4.3.1. Aislamiento y caracterización del gen <i>fur</i> de <i>H. parasuis</i>	107
4.3.2. Caracterización del entorno génico del gen <i>fur</i>	109
4.3.2. Construcción de mutantes <i>fur</i> de <i>H. parasuis</i> y análisis de su viabilidad	112
5. CONCLUSIONES	123
6. BIBLIOGRAFÍA	127

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Haemophilus parasuis*

1.1.1. Generalidades

Haemophilus parasuis es una bacteria gramnegativa de la familia *Pasteurellaceae* y un importante patógeno del tracto respiratorio porcino. Su transmisión es directa por contacto entre los animales infectados o indirecta por vía aérea, pudiendo transmitirse a cierta distancia. Esta enfermedad, conocida como la enfermedad de Glässer, fue descrita por este investigador en 1910 como una inflamación fibrinosa de las articulaciones de cerdos jóvenes, durante sus tres primeros meses de vida. La enfermedad se manifiesta esporádicamente y se ha asociado a situaciones de estrés (transporte y manipulación) de los animales, produciendo una elevada mortalidad.

El agente etiológico fue identificado por primera vez como *Haemophilus suis* (Hjärre y Wramby, 1943) y más tarde como *Haemophilus influenza suis* (Lecce, 1960). Finalmente, se le denominó *H. parasuis* al demostrarse que para su crecimiento sólo necesitaba el factor V [dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD)] y que no dependía del factor X de coagulación de la sangre (hemina u otras porfirinas) como *Haemophilus suis*. A partir de ese momento se aceptó que las especies de *Haemophilus* que no requerían el factor X para su crecimiento se denominarían con el prefijo “para” (Biberstein y White, 1969; Kilian, 1976).

Las células de *H. parasuis* son bacilos pleomórficos muy cortos, inmóviles, de longitud variable y algunos presentan cápsula (Morozumi y Nicolet, 1986a). En estudios metabólicos se determinó que la mayoría de las cepas tienen actividad catalasa y oxidasa y que reducen nitratos y nitritos. No presentan actividad ureasa, no producen indol y no descarboxilan la ornitina, la lisina ni la arginina. Además, presentan un metabolismo fermentativo, produciendo ácido desde glucosa, manosa, maltosa y sacarosa, pero no desde xilosa, lactosa, manitol, ramnosa ni arabinosa.

Asociada al incremento del síndrome respiratorio y reprodutor porcino (SRRP), la prevalencia de la enfermedad de Glässer ha aumentado en los últimos años de manera espectacular. Esta enfermedad ha sido diagnosticada prácticamente en todo el mundo y representa en la actualidad uno de los principales problemas emergentes del sector porcino, generando elevadas pérdidas económicas (Takahashi *et al.*, 2001).

1.1.2. Serotipos

El serotipado de *H. parasuis* ha sido controvertido y ha sufrido diversos cambios a lo largo del tiempo. Así, inicialmente, después de analizar 120 aislados mediante la técnica de precipitación (Bakos, 1955), se describieron 4 serotipos (del A al D). Posteriormente, y a través del método de inmunodifusión con extractos antigénicos termoestables, se identificaron siete nuevos serotipos (del 1 al 7) (Morozumi y Nicolet, 1986b y Nicolet *et al.*, 1986). Más recientemente, se han descrito 7 (Jena 6 a Jena 12) (Kielstein *et al.*, 1991) y 5 serotipos adicionales (ND1 a ND5) (Rapp-Gabrielson y Gabrielson, 1992).

Finalmente, basándose en la técnica de inmunodifusión con antisueros específicos producidos en conejo, originalmente descrito por Morozumi y Nicolet (1986a), se propuso una nueva clasificación para el serotipado de *H. parasuis* (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992). En esta clasificación se mantuvieron los primeros 7 serotipos del 1 al 7 y se unificaron los Jena y ND (del 8 al 15). De esta manera se definieron 15 serotipos (del 1 al 15) que fueron posteriormente validados (Rafiee y Blackall, 2000). La técnica de identificación de estos serotipos consiste en la detección de un polisacárido termoestable, probablemente de origen capsular o del lipopolisacárido que es resistente a la proteólisis enzimática. De todas formas, entre el 15 y el 25% de los aislados de *H. parasuis* no son serotipables, lo cual indica que es posible que existan más de los 15 serotipos reconocidos (Rafiee y Blackall, 2000). Por este motivo, han continuado las investigaciones para encontrar un método más efectivo. Kielstein y Rapp-Gabrielson usaron la técnica de inmunodifusión (ID) con extractos antigénicos

inactivados en el autoclave. Otros autores observaron que usando hemoaglutinación indirecta (IHA) con extractos salinos o hervidos (del Río *et al.*, 2003; Tadjine *et al.*, 2004a) se reducía el número de cepas no tipables (Angen *et al.*, 2004). Sin embargo, en un estudio australiano en el que se comparaban las técnicas de IHA y GD (difusión en gel), se concluyó que GD podía usarse como un primer método de serotipado y IHA como un segundo método (Turni y Blackall, 2005). En estudios más recientes, el serotipado se realiza mediante la combinación ambas técnicas (GD y IHA) (Cai *et al.*, 2005).

Como complemento al serotipado serológico se han aplicado diversas técnicas de biología molecular, entre las que destacan:

- *Multilocus enzyme electrophoresis*, a través de la cual se ha demostrado la existencia de una variedad considerable de patrones dentro de un mismo serotipo, indicando que el serotipado de *H. parasuis* puede mejorarse (Blackall *et al.*, 1997).
- *Restriction Endonuclease Pattern* (REP) (Smart *et al.*, 1988).
- *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR* (ERIC-PCR) (Rafiee *et al.*, 2000).
- Perfiles de proteínas de membrana externa (OMPs: *Outer Membrane Proteins*) (Ruiz *et al.*, 2001).
- PCR basada en el gen 16S rRNA (Oliveira *et al.*, 2001) y posteriormente con el mismo gen aplicando *nested* PCR para aumentar la sensibilidad de la técnica (Jung *et al.*, 2004).
- PCR-*Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) con los genes *tbpA* y *tbpB* (de la Puente-Redondo *et al.*, 2000 y 2003) y el gen *aroA* (del Río *et al.*, 2006a).
- *In Situ Hybridisation* (ISH) para detectar secuencias genómicas (Jung y Chae, 2004).
- *Single locus sequence typing* con el gen *hsp60* (Olvera *et al.*, 2006a).
- *Multilocus Sequence Typing* (MLST), utilizando secuencias parciales de los genes *housekeeping mdh*, *6pgd*, *atpD*, *g3pd*, *frdB*, *infB* y *rpoB* (Olvera *et al.*, 2006b).

- *Representational Difference Analysis* (RDA), usando la técnica de *Southern* (Lancashire *et al.*, 2007).
- *Species specific PCR test*, empleando la secuencia del 16S rDNA de los 15 serotipos de referencia (Angen *et al.*, 2007).

1.1.3. Virulencia y factores de virulencia

Se han identificado diferentes factores de virulencia de *H. parasuis*, si bien no está muy claro el papel biológico de cada uno de ellos. En contra de lo que pudiera pensarse, no existe una relación absoluta entre serotipo y virulencia, ya que para un mismo serotipo se pueden encontrar cepas patógenas y cepas no virulentas (Rapp-Gabrielson *et al.*, 1992). De todas formas, se ha observado que determinados serotipos se relacionan preferentemente con procesos más severos y otros son considerados no patógenos.

En general, los serotipos 1, 5, 10, 12, 13 y 14 se asocian a casos agudos, capaces de producir la muerte del animal en un período de cuatro días, mientras que los serotipos 2, 4 y 15 provocan una situación crónica con graves lesiones. El serotipo 8 presenta una virulencia moderada y los serotipos 3, 6, 7, 9 y 11 no se han relacionado con síntomas clínicos (Kielstein y Rapp-Gabrielson, 1992).

Entre los posibles factores de virulencia descritos en *H. parasuis* cabe destacar: cápsula, fimbrias, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa (OMPs), biopelículas y producción de neuraminidasa. Sin embargo, la asociación entre la expresión de estos factores y la virulencia es cuestionable.

Diversos trabajos se han centrado en elucidar el papel de la **cápsula** en el proceso infeccioso, demostrando que las cepas capsuladas se aíslan preferentemente de las cavidades nasales de cerdos sanos (Little y Hardling, 1971; Morozumi y Nicolet, 1986a). En cambio, las cepas acapsuladas proceden más frecuentemente de materiales patológicos. Asimismo, se demostró que *H. parasuis* era capaz de formar **fimbrias** tras diversos pases *in vivo*, las cuales se

suelen perder al subcultivar las células (Munch *et al.*, 1992). Ambas estructuras, cápsula y fimbrias, permiten la adherencia de algunos patógenos a la superficie de las células epiteliales y la consiguiente colonización. No obstante, no está claro si las cápsulas y las fimbrias de *H. parasuis* tienen esta función en su virulencia.

Tampoco se conoce el papel del **lipopolisacarido (LPS)**, ya que no se han detectado diferencias significativas en el LPS de cepas virulentas y no virulentas (Zucker *et al.*, 1996). Sin embargo, se cree que podría ejercer algún papel determinante en la virulencia, ya que se encontraron anticuerpos contra el LPS en la sangre de animales inoculados con *H. parasuis* del serotipo 5 (Amano *et al.*, 1997). De la misma forma, se sabe que el lípido A del LPS es una endotoxina, al igual que el de otras bacterias gramnegativas (Raetz y Whitfield, 2002). Además, usando anticuerpos monoclonales específicos en un modelo de infección en ratón, se ha estudiado su implicación en la patogenicidad. Dichos anticuerpos provocaron una disminución de la invasión bacteriana y posteriormente la eliminación de la bacteria en la sangre. Estos resultados indican un posible vínculo del LPS con la patogenicidad de la bacteria (Tadjine *et al.*, 2004b). Relacionado también con la membrana externa, se han estudiado las **proteínas de membrana externa (OMPs)** de *H. parasuis*, mediante geles de poliácridamida SDS-PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). En estos ensayos se describieron dos perfiles diferentes: el biotipo I y biotipo II (Nicolet *et al.*, 1980; Morozumi y Nicolet, 1986a; Ruiz *et al.*, 2001). Los aislados a partir de animales sanos eran mayoritariamente del biotipo I, mientras que, los de animales con la enfermedad de Glässer eran usualmente del biotipo II. Estos resultados fueron confirmados posteriormente mediante análisis informáticos (Oliveira y Pijoan, 2004a).

Otro potencial factor relacionado con la virulencia es la producción de **neuraminidasa** (Lichtensteiger y Vimr, 1997) que está presente en más del 90% de los aislados de *H. parasuis*. Esta enzima contribuye a la virulencia bacteriana secuestrando carbohidratos desde el hospedador. Asimismo, se ha sugerido que la producción de **toxinas** específicas podría estar involucrada en la virulencia, si bien hasta el momento no se ha descrito ninguna de ellas.

Recientemente, se ha demostrado que muchos de los serotipos de *H. parasuis* son capaces de formar biopelículas *in vitro* y que dicha capacidad no se pierde tras subcultivarlos en el laboratorio. Por ello, se ha analizado el papel de las biopelículas en relación con los serotipos y la virulencia (Jin *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos indican que, generalmente, los serotipos no virulentos muestran mayor capacidad de formar biopelículas que los virulentos. Además, cuando se realiza una infección experimental con cepas formadoras de biopelículas y se recuperan las células de las fosas nasales de los animales, las bacterias mantienen la capacidad de formar las biopelículas. Por el contrario, si se recuperan del pulmón o del cerebro, las bacterias han perdido dicha capacidad. Estos datos sugieren que la formación de biopelículas en el tracto respiratorio superior por parte de cepas no virulentas debe producir una infección persistente, mientras que los aislados virulentos asociados a la enfermedad de Glässer, recuperados mayoritariamente de órganos internos, han cambiado su capacidad de formar biopelículas por algún otro determinante de virulencia implicado en la invasión de tejidos (Jin *et al.*, 2006).

Además de los factores ya mencionados, otros estudios en los que se simulan las condiciones en las que se encuentra un organismo durante la infección han permitido identificar algunos genes relacionados con la virulencia (Hill *et al.*, 2003). Asimismo, usando un análisis con *microarrays* se han localizado una serie de genes potencialmente involucrados en la virulencia y en la adaptación al hospedador (Melnikow *et al.*, 2005).

1.1.4. Modelos experimentales

A pesar de que han sido varios los modelos de experimentación animal que se han utilizado para estudiar la virulencia y la patogenia de *H. parasuis*, así como la respuesta inmune frente a la infección, no se dispone de un modelo aceptado y suficientemente validado.

En primer lugar se utilizaron cerdos convencionales inoculados intraperitonealmente con *H. parasuis*. En este modelo se observó que el desarrollo de la enfermedad y de las lesiones dependía de la dosis administrada. Así, en cerdos inoculados con 10^8 y 10^9 cfu/animal se observaban síntomas, mientras que a dosis de 10^6 y 10^7 cfu/animal no se apreciaban lesiones (Morozumi *et al.*, 1981).

Similares resultados se obtuvieron en un modelo experimental con ratones, ya que éstos se morían al inocularlos con 10^9 cfu/animal, mientras que a dosis de 10^7 y 10^8 cfu/animal no se observó ninguna sintomatología (Morozumi *et al.*, 1982).

Otro modelo de laboratorio utilizado para estudiar el desarrollo de la enfermedad han sido los cobayas. En este modelo se han utilizado diversas vías de inoculación (nasal, intratraqueal, intrapulmonar, abdominal, intramuscular, subcutánea y conjuntiva) con dosis de 10^8 y 10^{10} cfu/animal, observándose únicamente serositis en los animales inoculados por vía intramuscular e intrapulmonar. Con dicho modelo se obtuvieron resultados muy similares al comparar la virulencia de los serotipos del 1 al 7 inoculados por vía intratraqueal (Rapp-Gabrielson *et al.*, 1992) y se determinó que los serotipos 1 y 5 eran los más invasivos, causando incluso la muerte a dosis altas y septicemia a dosis bajas. Así pues, estos datos indicaban que los cobayas podían ser un buen modelo experimental de laboratorio para estudiar la infección debida a *H. parasuis*.

Con posterioridad se realizaron ensayos con cerdos SPF (*Specific Pathogen-Free*) para evaluar la virulencia e inmunogenicidad, realizando inoculaciones intranasales con 10^{10} cfu/animal de 7 serotipos. Los serotipos 1 y 5 produjeron la enfermedad de Glässer, mientras que los serotipos 2, 3, 4, 6 y 7 no causaron lesiones sistémicas (Nielsen, 1993). Más tarde se utilizó otro modelo, el basado en cerdos CDCD (*Caesarean-Derived-Colostrum-Deprived*), los cuales se inocularon con 10^9 cfu/animal por vía intranasal con una cepa virulenta. En estos ensayos se observaron síntomas clínicos y las lesiones de poliserositis y poliartritis, típico de la enfermedad, lo cual sugería que este tipo de cerdos podía ser un buen modelo animal para el estudio de la patogénesis causada por *H. parasuis* (Vahle *et al.*, 1995). En estudios posteriores, los cerdos NFCD (*Naturally*

Farrowed Colostrum-Deprived) se propusieron como un modelo alternativo a todos los anteriores ya que, se obtuvieron los síntomas y lesiones característicos (Oliveira *et al.*, 2003).

1.2. LA TRANSFORMACIÓN

Es bien conocido que los procariotas pueden intercambiar material genético mediante conjugación, transducción y transformación y que estos mecanismos tienen una gran importancia en su evolución.

La transformación fue demostrada por primera vez en *Streptococcus pneumoniae* por Fred Griffith en 1928. Este hallazgo condujo a experimentos posteriores (Avery *et al.*, 1944) que demostraron que el responsable de la transformación era el DNA. Así pues, la transformación génica es un proceso en el que el DNA que se encuentra libre en el ambiente se incorpora a una célula receptora dando lugar a un cambio genético (Madigan *et al.* 2004).

Tabla 1.1. Procariotas en las que se ha descrito la transformación natural

Especies bacterianas	Frecuencia de transformación	Especies bacterianas	Frecuencia de transformación
Fototrofos		<i>Thermus flavus</i>	8.8×10^{-3}
<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	4.3×10^{-4}	<i>Thermus caldophilus</i>	2.7×10^{-3}
<i>Anacystis nidulans</i>	8.0×10^{-4}	<i>Thermus aquaticus</i>	6.4×10^{-4}
<i>Chlorobium limicola</i>	1.0×10^{-5}	<i>Vibrio</i> sp. strain D19	2.0×10^{-7}
<i>Nostoc muscorum</i>	1.2×10^{-3}	<i>Vibrio</i> sp. strain WJT-1Cd	2.5×10^{-4}
<i>Synechocystis</i> sp. strain 6803	5.0×10^{-4}	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.9×10^{-9}
<i>Synechocystis</i> sp. strain OL50	2.0×10^{-4}	Metilotrofos	
Quimiolitotrofos		<i>Methylobacterium organophilum</i>	5.3×10^{-3}
<i>Thiobacillus thioparus</i>	10^{-3} - 10^{-2}	Archaea	
<i>Thiobacillus</i> sp. strain Y	1.7×10^{-3}	<i>Methanobacterium thremoautotrophicum</i>	a
Heterotrofos		<i>Methanococcus voltae</i>	8.0×10^{-6}
<i>Achromobacter</i> spp.	a	Aislados clínicos de especies patógenas	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	7.0×10^{-3}	<i>Campylobacter jejuni</i>	2.0×10^{-4}
<i>Azotobacter vinelandii</i>	9.5×10^{-2}	<i>Campylobacter coli</i>	1.2×10^{-3}
<i>Bacillus subtilis</i>	3.5×10^{-2}	<i>Haemophilus influenzae</i>	7.0×10^{-3}
<i>Bacillus licheniformis</i>	1.2×10^{-2}	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	8.6×10^{-3}
<i>Deinococcus radiodurans</i>	2.1×10^{-2}	<i>Helicobacter pylori</i>	5.0×10^{-4}
<i>Lactobacillus lactis</i>	2.3×10^{-5}	<i>Moraxella</i> spp.	a
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	10^{-7} - 10^{-6}	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1.0×10^{-4}
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (y sp relacionadas)	7.0×10^{-5}	<i>Neisseria meningitidis</i>	1.1×10^{-2}
<i>Rhizobium meliloti</i>	7.0×10^{-4}	<i>Staphylococcus aureus</i>	5.5×10^{-6}
<i>Streptomyces</i> spp.	b	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2.9×10^{-2}
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	2.7×10^{-3}	<i>Streptococcus sanguis</i>	2.0×10^{-2}
<i>Thermus thermophilus</i>	1.0×10^{-2}	<i>Streptococcus mutans</i>	7.0×10^{-4}

a: determinación cualitativa, b: medición de la captación de DNA marcado con tritio (tabla modificada de Lorenz y Wackernagel, 1994)

Las bacterias y también algunas arqueobacterias son los únicos organismos capaces de realizar una transformación natural. Se han descrito como mínimo 40 especies, distribuidas a través de todos los grupos taxonómicos, con la capacidad de presentar transformación (Lorenz y Wackernagel, 1994) (Tabla 1.1).

En muchas de estas especies, la competencia es un estado fisiológico transitorio, cuyo desarrollo está controlado por procesos específicos que incluyen *quorum sensing* (coordinación de ciertos aspectos o acciones entre bacterias del mismo tipo dependiendo de su número) y señales nutricionales (MacFayden *et al.*, 2001; Claverys y Havarstein, 2002; Hamoen *et al.*, 2003) y en los que intervienen los productos de diversos genes, denominados *com*, cuya función concreta se conoce en algunos casos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Ejemplos de algunas de las proteínas involucradas en la captación del DNA y sus ortólogos en algunas especies bacterianas

Proteína	<i>B. subtilis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>H. influenzae</i>
Pseudopelos de competencia				
NTPasa(s)	ComGA	ComGA	PilF, PilT	PilB
Proteína de membrana politópica	ComGB	ComGB	PilG	PilC
Pilinas o Pseudopilinas	ComGC, GD, GE, GG	CglC, CglD	PilE, ComP	PilA
Prepilin peptidasas	ComC	CilC	PilD	PilD
Secretina			PilQ/PilP	ComE/ni
Maquinaria de translocación del DNA				
Receptor del DNA	ComEA	ComEA	ComE	ni
Canal de membrana	ComEC	ComEC	ComA	ni
Proteína de unión al DNA	ComFA	ComFA	ni	ni

ni: no identificada (tabla modificada de Chen y Dubnau, 2004)

Se han postulado tres hipótesis sobre el significado biológico de la transformación natural (Dubnau, 1999):

- Hipótesis de la reparación: El DNA exógeno procedente de células lisadas sería usado como molde para la reparación de lesiones existentes en el DNA de la célula receptora.
- Hipótesis de la nutrición: El DNA puede ser utilizado como una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo por parte de las células receptoras.

- Hipótesis de la diversidad genética: Las células receptoras adquieren una nueva información genética que las capacita para conquistar nuevos nichos ecológicos.

1.2.1. Transformación en bacterias grampositivas

El sistema de captación de DNA exógeno de las bacterias grampositivas es inespecífico y no distingue entre el DNA homólogo (de una misma especie) o heterólogo (de otras especies). Sin embargo, aunque físicamente pueda captarse DNA de otras especies, éste sólo podrá recombinar si existe un alto grado de similitud con el genoma de la célula receptora.

Las células necesitan ser competentes para captar el DNA desde el medio externo. La inducción de este estado de competencia se encuentra condicionada por una serie de factores como densidad celular, pH y nutrientes, entre otros.

Entre los modelos de transformación más estudiados en bacterias grampositivas destacan el de *S. pneumoniae* y el de *Bacillus subtilis*, los cuales se comentan a continuación.

Estado de competencia

En las especies transformables, la expresión de los genes que codifican la maquinaria de captación de DNA se encuentra muy bien regulada. Normalmente, los circuitos de regulación de la competencia son propios de cada especie y dependen de un factor secretado al medio (Claverys y Martin, 2003) (Fig. 1.1).

En *S. pneumoniae*, el 100% de las células son competentes al final de la fase de crecimiento exponencial y permanecen así entre 10 y 15 minutos. Mientras las células van creciendo secretan al medio un péptido de 17 aminoácidos, denominado **CSP** (Competence-Stimulating Peptide). Éste se sintetiza a partir de un precursor codificado en el gen **comC** el cual es procesado por un sistema de transporte del tipo ABC y de una proteasa (**ComA** y **ComB**). A ciertas

concentraciones, CSP se une a una proteína quinasa de membrana (**ComD**) que se autofosforila y a su vez fosforila al regulador de la respuesta (**ComE**). ComE fosforilado activa la transcripción de los operones **comCDE** y **comAB** (por consiguiente, se autoactiva el sistema) y de un gen que codifica un factor σ alternativo (**comX**) que será el punto clave para el desarrollo de la competencia en la transformación natural de *S. pneumoniae* (Claverys y Havarstein, 2002). La RNA polimerasa con la subunidad alternativa transcribe los operones tardíos de la competencia que codifican la maquinaria de la transformación (Luo y Morrison, 2003), mediante el reconocimiento de una secuencia específica denominada **caja cin (TACGAATA)** que está conservada en la región reguladora de estos genes (Campbell *et al.*, 1998).

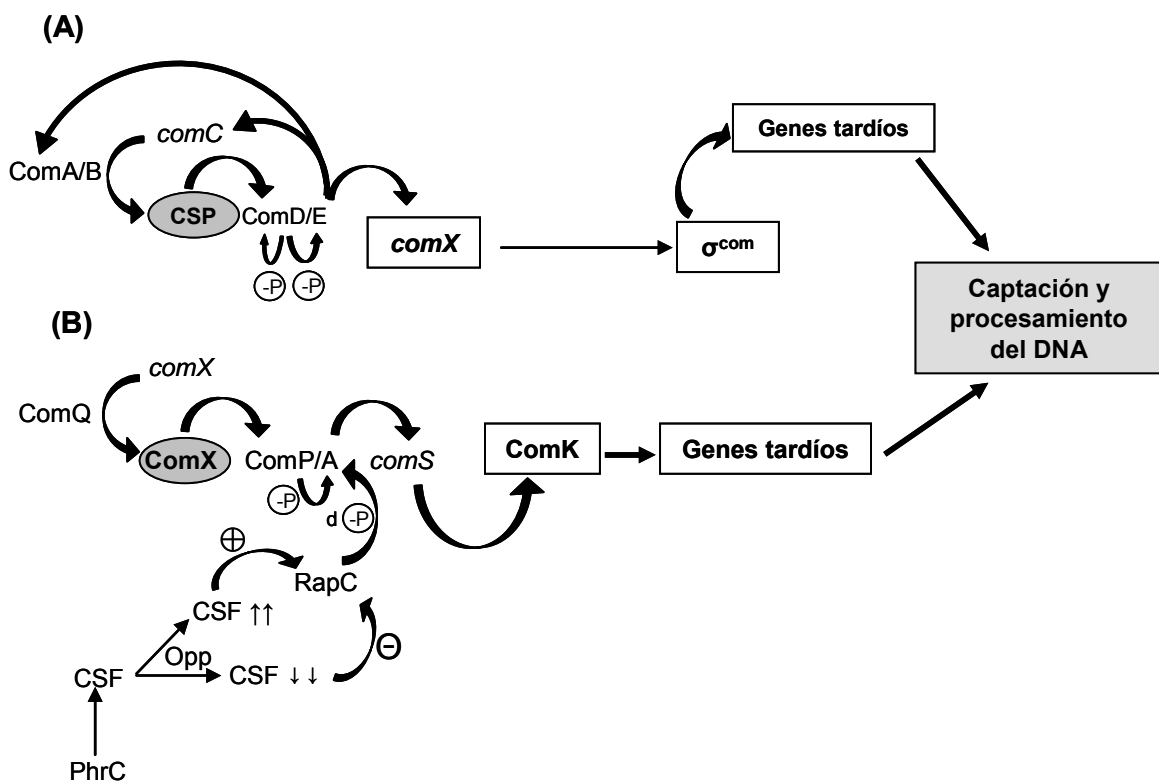


Fig. 1.1. Inducción del estado de competencia en *S. pneumoniae* (A) y en *B. subtilis* (B) (esquema modificado de Claverys y Martin, 2003).

A diferencia de *S. pneumoniae*, en la transición entre la fase logarítmica y la estacionaria del crecimiento, algo más de un 25% de la población de *B. subtilis* entra en competencia (Grossman, 1995; Lazazzera y Grossman, 1998). Además, *B. subtilis* utiliza *quorum sensing* para escoger entre la esporulación y el estado de competencia (Miller y Bassler, 2001). Cuando la población entra en la fase estacionaria, aumenta la concentración de DNA libre, como consecuencia de la lisis de parte de la población, y este DNA se utiliza para reparar cromosomas dañados o mutados. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales son desfavorables y las bacterias no tienen acceso a los nutrientes, las células de *B. subtilis* se diferencian formando endósporas.

En *B. subtilis*, el regulador del sistema de transformación responsable de activar los genes tardíos de la competencia es **ComK**, el cual, a su vez, es regulado por los péptidos **ComX** y **CSF** que se secretan según las condiciones ambientales.

El primero de ellos, **ComX**, es un péptido de 10 aminoácidos que contiene una modificación hidrofóbica en un residuo de triptófano que tiene importancia en la actividad señalizadora. Este péptido deriva de un precursor peptídico de 55 aminoácidos codificado en el gen *comX*. Aun cuando no se ha identificado la maquinaria necesaria para la secreción de ComX, se sabe que requiere de la actividad de la proteína **ComQ** (Bacon Schneider *et al.*, 2002; Ansaldi *et al.*, 2002). La detección de la acumulación de ComX se realiza mediante un sistema de dos componentes (**ComP/ComA**), en el cual ComA fosforilado activa la expresión del gen *comS*, cuyo producto produce la activación de **ComK** e inhibe su degradación proteolítica (Turgay *et al.*, 1998). ComK es un activador transcripcional de los genes estructurales tardíos, implicados en el desarrollo de la competencia (Turgay *et al.*, 1997; van Sinderen *et al.*, 1995).

El segundo péptido se denomina **CSF** y es un pentapéptido que proviene de los 5 últimos aminoácidos del dominio C-terminal del precursor PhrC que es procesado para dar lugar a esta molécula señal (Solomon *et al.*, 1996). CSF se acumula extracelularmente como resultado de un aumento de la densidad celular. No obstante, CSF es importante a nivel intracelular ya que es transportado hacia el interior mediante el transportador de membrana **Opp** (oligopéptido-permeasa) del

tipo ABC y está especializado en el transporte de oligopéptidos (Lee y Morrison, 1999; Solomon *et al.*, 1995; Solomon *et al.*, 1996). Cuando la concentración intracelular de CSF es baja, CSF inhibe a **RapC** que es una fosfatasa que desfosforila a ComA. Por lo tanto, como ya se ha mencionado anteriormente, ComA fosforilado podrá activar a los genes de competencia (Solomon *et al.*, 1995). Por el contrario, altos niveles de CSF inhiben la expresión de *comS*, lo cual provoca una proteólisis de ComK y, en consecuencia, no hay expresión de los genes de competencia. El resultado será la inducción de la esporulación.

El proceso de transformación

En el proceso de la transformación de grampositivos pueden distinguirse las siguientes etapas:

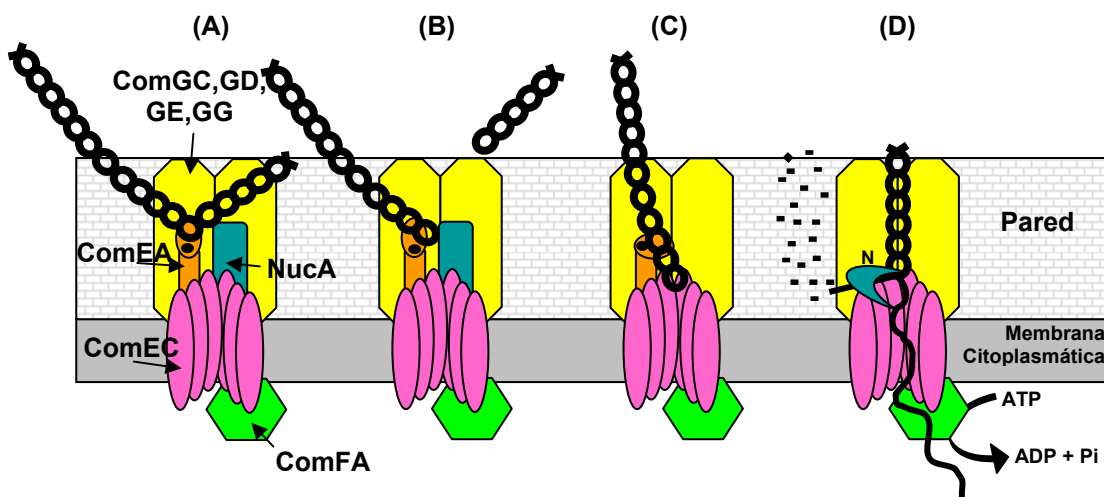


Fig. 1.2. Modelo de captación del DNA en *Bacillus subtilis*.

- i. **Unión del DNA:** el primer paso de la transformación es la unión del DNA libre en forma de doble cadena a la superficie celular. En *B. subtilis* se estima que existen unos 50 lugares de unión por célula competente (Dubnau y Cirigliano, 1972b; Singh, 1972). En esta unión están involucradas las proteínas class-3PSTC que se encuentran codificadas en los operones *comGC*, *comGD*, *comGE* y *comGG*, las cuales forman una estructura que atraviesa la pared y la modifican, constituyendo un canal

que permite el acceso del DNA al dominio C-terminal del receptor ComEA de la membrana citoplasmática (Dubnau, 1999). Esta proteína tiene la capacidad de unir DNA a través de un dominio hélice-giro-hélice sin una secuencia específica. Esta unión es en principio reversible ya que inmediatamente después de que el DNA se haya unido puede recuperarse dsDNA intacto (Dubnau y Cirigliano, 1974) (Fig. 1.2A).

- ii. **Fragmentación:** en las moléculas de dsDNA unidas a la célula se producen unos cortes limitados que fragmentan el DNA, pudiendo todavía recuperarse dichos fragmentos (Arwet y Venema, 1973; Dubnau, 1976; Dubnau y Cirigliano, 1972a). Se asume que el proceso de captación del DNA tiene lugar a partir de uno de los nuevos extremos formados y no desde uno preexistente. Conforme aumenta el tamaño del DNA donador, la unión a un lugar preexistente es menos probable. En el caso de *B. subtilis*, la endonucleasa NucA introduce dichos cortes en el DNA unido cerca del punto del contacto con ComEA (Provvedi *et al.*, 2001) (Fig. 1.2B).
- iii. **Transporte al citoplasma:** Una vez se ha fragmentado el DNA, éste pasa a través de la membrana citoplasmática, a la vez que se degrada una de las cadenas. El nuevo extremo formado durante la fragmentación se acerca al sistema de transporte mediante una secuencia flexible (QQGGGG) que se localiza por delante del dominio de unión al DNA del receptor ComEA. En el caso de *S. pneumoniae* se ha descrito una secuencia similar que cuando se delecta la célula es capaz de captar el DNA pero no de transportarlo a su interior (Inamine y Dubnau, 1995). El sistema de transporte, mencionado anteriormente, está formado por ComEC y ComFA, el cual hidroliza ATP para conseguir la energía necesaria para el transporte del DNA. Además, es probable que asociado a este sistema de transporte se encuentre una nucleasa [EndA en *S. pneumoniae* (Bergé *et al.*, 2002)] que degrada la cadena simple que no entrará al citoplasma, ya que en este momento se puede recuperar ssDNA (Davidoff-Abelson y Dubnau, 1973; Piechowska y Fox, 1971), a la vez que se detectan en el medio productos de degradación del DNA (Dubnau y Cirigliano, 1972a). Seguidamente, el DNA se convierte en inaccesible a la DNAsa, denominándose a este

período fase de eclipse (Levine y Strauss, 1965) (Fig. 1.2C y 1.2D). Finalmente, el ssDNA interiorizado podrá recombinar con el DNA de la célula receptora si encuentra regiones de homología.

1.2.2. Transformación en bacterias gramnegativas

El proceso de transformación en bacterias gramnegativas presenta mucha similitud con el de las grampositivas. No obstante existen ciertas diferencias, como por ejemplo que en los gramnegativos se requiere una secuencia específica en el DNA donador para poder unirse a los receptores de la membrana externa. En *Haemophilus influenzae* (Sisco y Smith, 1979) y especies de *Neisseria* (Goodman y Scocca, 1988) se han identificado dichas secuencias, las cuales se conocen como **DUS (DNA Uptake Sequence)** o **USS (Uptake Signal Sequence)** (Tabla 1.3). Se sabe que dichas secuencias están contenidas en el genoma de estas bacterias a una frecuencia más alta de lo esperable, no habiéndose identificado sus receptores hasta el momento.

Asimismo, la membrana externa de gramnegativos representa una barrera extra de la que carecen las grampositivas, lo cual puede confundir el significado del término captación del DNA. Esta captación se define como la conversión del DNA exógeno sensible a la DNAsa a un estado de resistencia. Este proceso en las bacterias grampositivas es el paso a través de la membrana citoplasmática, en cambio, en las bacterias gramnegativas, es el paso a través de la membrana externa.

Otra diferencia destacable es el sitio físico donde tiene lugar la degradación de una de las dos cadenas del DNA. En las bacterias grampositivas ocurre en el medio extracelular, mientras que en las gramnegativas se da en el espacio periplasmático (Chen y Dubnau, 2004) (Fig.1.3).

Tabla 1.3. Presencia de la secuencia USS (*uptake signal sequences*) en diferentes especies bacterianas.

SECUENCIA		USS
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	1.83 Mb ^a	1471
AAGTGCGGT		737
ACCGCACTT		734
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	2.04 Mb ^a	341
AAAATCAAA		182
TTTGATTTT		159
<i>Pasteurella multocida</i>	2.26 Mb ^a	927
AAGTGCGGT		468
ACCGCACTT		459
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491	2.18 Mb ^a	1892
GCCGTCTGAA		958
TTCAGACGGC		934
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	3.57 Mb ^a	2823
GGCGATCGCC		2823
GCGATCGCCA		na

a: longitud del genoma, na: no aplicable porque es una secuencia palindrómica en una sola orientación (tabla modificada de Smith *et al.*, 1999)

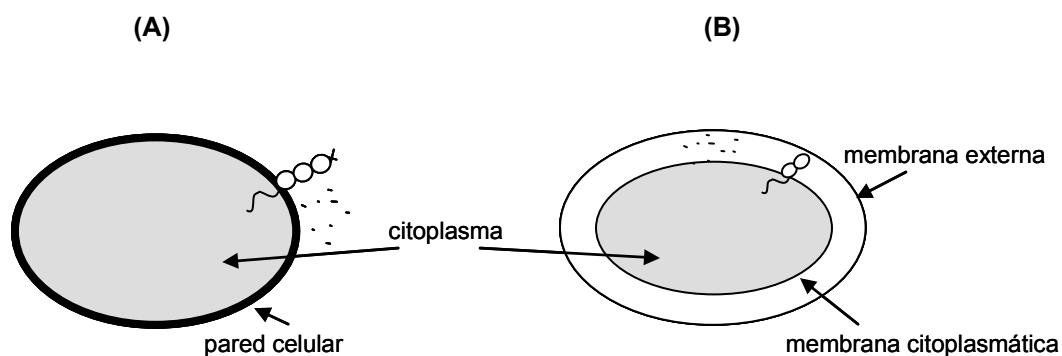


Fig. 1.3. Degradación de una de las dos hebras de DNA en bacterias grampositivas (A) y en gramnegativas (B).

De entre las diversas especies de gramnegativas que poseen transformación natural, las más estudiadas han sido *Neisseria gonorrhoeae* y *H. influenzae*. Seguidamente se comentan los sucesos más destacables de este proceso.

Estado de competencia

En las bacterias gramnegativas, a diferencia de lo que ocurre en las grampositivas, el estado de competencia no depende de un factor secretado al medio sino que la inducción se produce internamente.

En *N. gonorrhoeae*, el estado de competencia es constitutivo y no hay variaciones durante el ciclo de crecimiento (Biswas *et al.* 1977). Por el contrario, en *H. influenzae* el 100% de las células adquieren el estado de competencia al llegar a la fase estacionaria o al transferir un cultivo en medio rico y en fase exponencial a un medio pobre, en el que habrá un aumento de síntesis proteica sin que haya una multiplicación celular (Goodgal y Herriott, 1961). Los máximos niveles de competencia se observan al cabo de una o dos horas después de haberse producido un descenso en la concentración de nutrientes del medio (Stewart y Carlson, 1986).

Asimismo, se ha demostrado que elevadas concentraciones intracelulares de **AMPc** (Adenosina 3'5' Monofosfato Cíclico) inducen la competencia (Dorocicz *et al.*, 1993; Chandler, 1992) y que la adición de AMPc exógeno a un cultivo en fase exponencial estimula la competencia, si bien a unos niveles inferiores que el cambio de medio rico a medio pobre (Wise *et al.*, 1973; Zoon *et al.*, 1975). Estos datos sugieren que el AMPc es una señal reguladora, aunque deben existir otras que permitan la máxima inducción de la competencia (Dorocicz *et al.*, 1993). En cualquier caso, el estado de competencia requiere la proteína **CRP** (Catabolite Represor Protein) [denominada también **CAP** (Catabolite Activator Protein)] y su cofactor AMPc, combinado con una señal general de energía insuficiente (Chandler, 1992; Dorocicz *et al.*, 1993; MacFayden *et al.*, 1996). Así pues, la competencia también dependerá de los niveles de adenilato ciclasa (codificado en el gen *cya*), responsable de la síntesis de AMPc (MacFayden y Redfield, 1998).

Del mismo modo, otros estudios indican que mutaciones en el gen *murE* de biosíntesis del peptidoglicano también inducen el ya mencionado estado de competencia (Ma y Redfield, 2000).

El proceso de transformación

En la transformación de bacterias gramnegativas pueden distinguirse las siguientes fases:

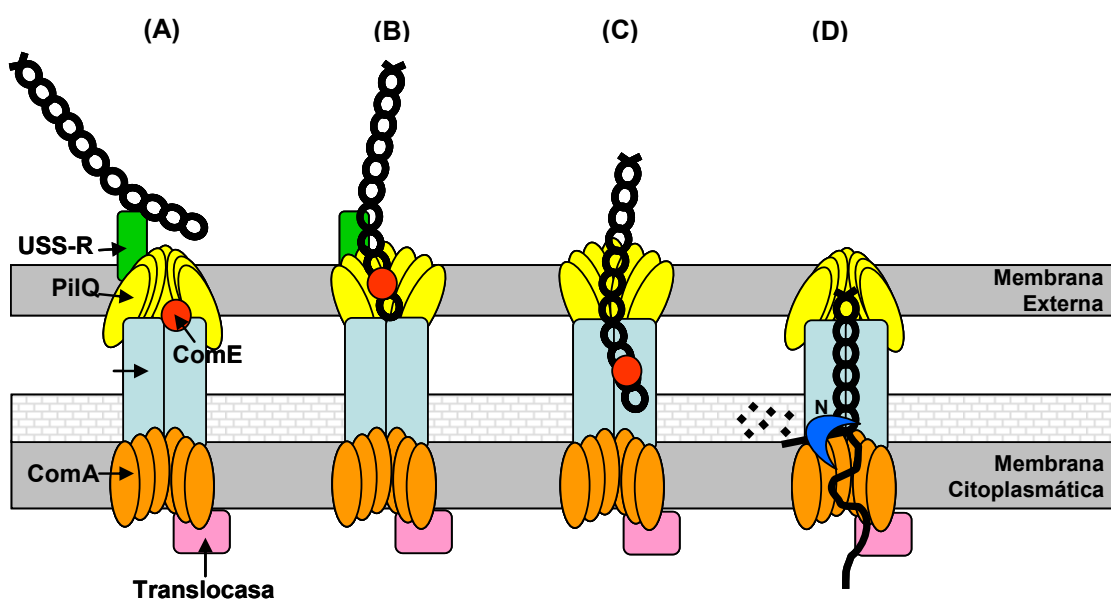


Fig. 1.4. Modelo de captación del DNA en *N. gonorrhoeae*.

- i. **Unión del DNA:** En esta fase inicial, el DNA se une a unos receptores de la superficie celular no identificados hasta el momento, que reconocen las secuencias USS del DNA. En *H. influenzae* existen de 4 a 8 lugares activos por célula competente (Deich y Smith, 1980). En este momento el DNA transformante es todavía accesible a las DNAsas (Fig. 1.4A).
- ii. **Entrada al espacio periplasmático:** Como ya se ha mencionado anteriormente, en bacterias gramnegativas, el DNA unido a la superficie celular debe penetrar al espacio periplasmático. En *H. influenzae* se ha descrito una partícula especializada en la superficie de las células competentes, llamada transformosoma (Kahn y Smith, 1984), en la cual

el DNA de doble cadena es secuestrado en las primeras etapas de la transformación (Fig.1.5).

Después de la unión a la superficie celular, el DNA exógeno atraviesa la membrana externa a través de un canal formado por la proteína PilQ. Después, pasará a un complejo de pilinas formado principalmente por PilE, que permitirá su transporte a través del periplasma y de la capa de peptidoglicano, ayudado por la proteína de unión al DNA, ComE (Chen y Gotschlich, 2001), la cual contiene un péptido señal y un dominio de unión al DNA. En todo este proceso, el DNA es ya resistente a la acción de las DNAsas (Fig. 1.4B y 1.4C).

- iii. **Transporte:** En el transporte del DNA transformante a través de la membrana celular interviene **ComA** en *N. gonorrhoeae* (Fascius y Meyer, 1993) y **Rec2** en *H. Influenzae* (Clifton *et al.*, 1994), las cuales son similares a la proteína ComEC de *B. subtilis*. Se sabe que al atravesar la membrana celular una de las dos hebras de DNA es degradada por una nucleasa no identificada (Kahn y Smith, 1984). Tampoco se han identificado proteínas similares a ComFA de *B. subtilis*, involucradas en la translocación del DNA monocatenario. Seguramente en gramnegativos se utilizan otras ATPasas (Fig. 1.4D).

Finalmente, puede darse recombinación homóloga de la cadena sencilla con el genoma bacteriano, y mediante ésta la célula receptora adquiere la información genética contenida en el DNA exógeno (Notani y Goddgal, 1966).

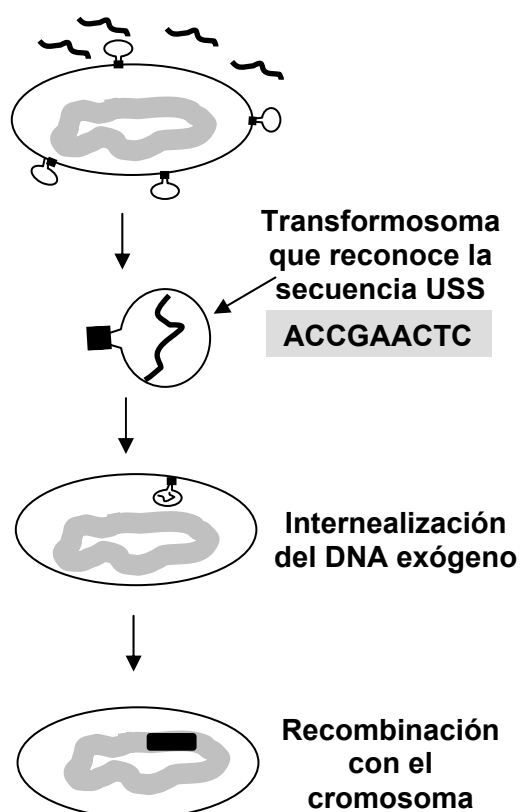


Fig. 1.5. Transformación en *H. influenzae*. La resistencia a la degradación por DNAasas tiene lugar cuando el DNA exógeno es secuestrado en una estructura especializada en la superficie de la célula, denominada transformosoma.

De todas maneras, debe diferenciarse el concepto de **transformación natural** del de **transformación artificial**. En esta última se utilizan procedimientos *in vitro* para obtener células competentes e introducir el DNA en las células receptoras. Los principales métodos para obtener células competentes se pueden agrupar en (Mercenier y Chassy, 1988):

- i. Tratamiento de las células con soluciones de CaCl_2 o cloruros de otros elementos como Mg, Ba, Rb, Sr.
- ii. Tratamiento de las células con agentes quelantes (p.ej. EDTA).
- iii. Tratamiento de las células con enzimas (muraminidasas o peptidasas), que hidrolizan la pared, generando esferoplastos o protoplastos.
- iv. Congelación y descongelación de las células.

Asimismo, por lo que se refiere a los métodos de transformación se pueden citar (Mercenier y Chassy, 1988):

- Fusión de las células o protoplastos con DNA, con células o con DNA empaquetado dentro de liposomas (con la adición de polietilenglicol).
- Exposición de las células a una descarga eléctrica (electroporación).
- Bombardeo de las células con pequeñas partículas que transportan el DNA al interior del citoplasma (transformación biolística).

1.3. LA ENZIMA TIMIDILATO SINTASA Y SU PAPEL EN LA VIRULENCIA

1.3.1. Generalidades

La timina, descubierta en 1885 por el bioquímico alemán Albrecht Kossel, es una de las cuatro bases nitrogenadas que forman parte del ácido desoxirribonucleico (DNA).

El gen *thyA* codifica la enzima **timidilato sintasa**, esencial para la síntesis *de novo* de desoxitimidina monofosfato (dTMP) a partir de desoxiuridina monofosfato (dUMP) (Neuhard y Kelln, 1996) (Fig. 1.6). En esta reacción se transfiere un grupo metilo desde el N⁵,N¹⁰-metilen-tetrahidrofolato al dUMP, oxidando el tetrahidrofolato (THR) a dihidrofolato (DHR) (Friedkin y Kornberg, 1957). Posteriormente, el dTMP es secuencialmente fosforilado a difosfato y trifosfato por la dTMP quinasa (Nelson y Carter, 1969) y la dTDP quinasa (Lehman *et al.*, 1958).

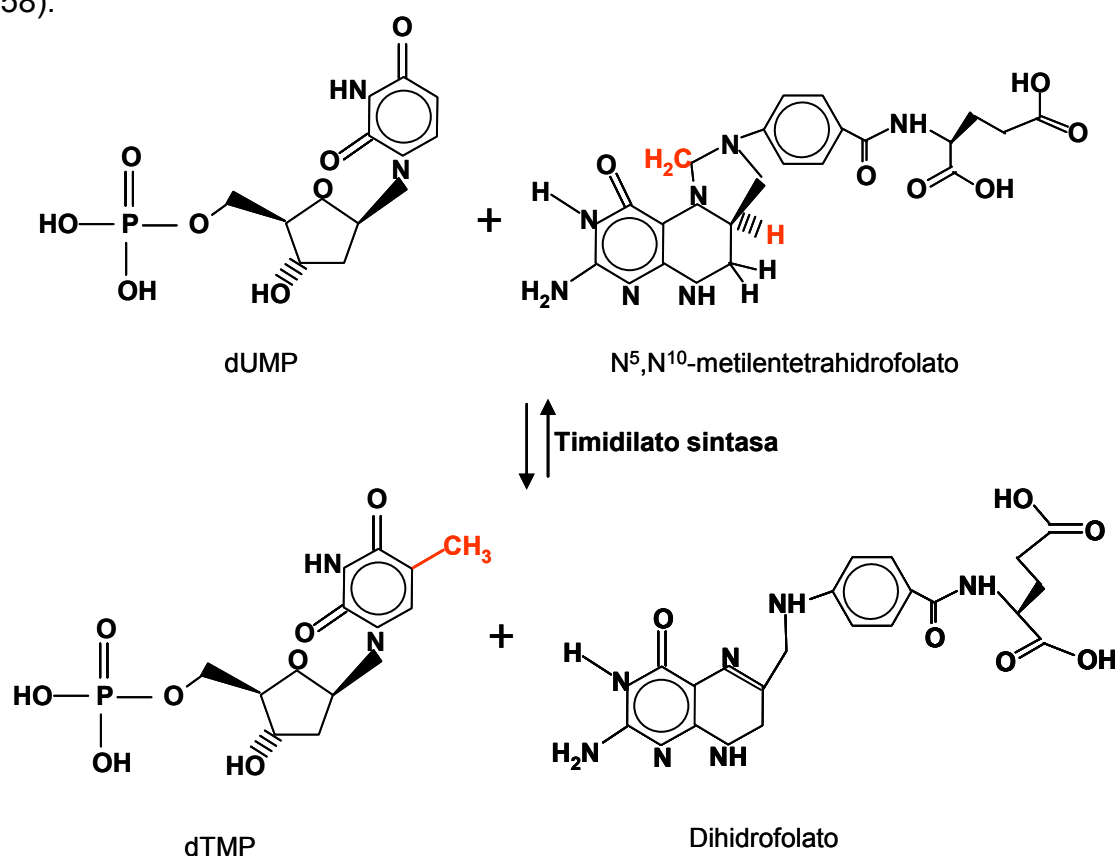


Fig. 1.6. Reacción catalizada por la enzima timidilato sintasa.

El gen *thyA* ha sido identificado en diversas especies bacterianas (Belfort *et al.*, 1983; Fleischmann *et al.*, 1995; Neuhard *et al.*, 1978; Printer *et al.*, 1988; Carlson y Hill, 1997) y se sabe que mutantes en este gen son incapaces de sintetizar DNA, ya que no pueden producir de forma endógena dTMP, dTDP o dTTP, si en el medio de cultivo no se encuentra biodisponible timina o timidina que será convertida a dTMP mediante la vía *salvage* (Ahmad *et al.*, 1998). Dicha vía, implica la desoxirribosa-1-fosfato (dRib-1-P) y la timina exógena produciendo timidina y finalmente dTMP (Fig. 1.7).

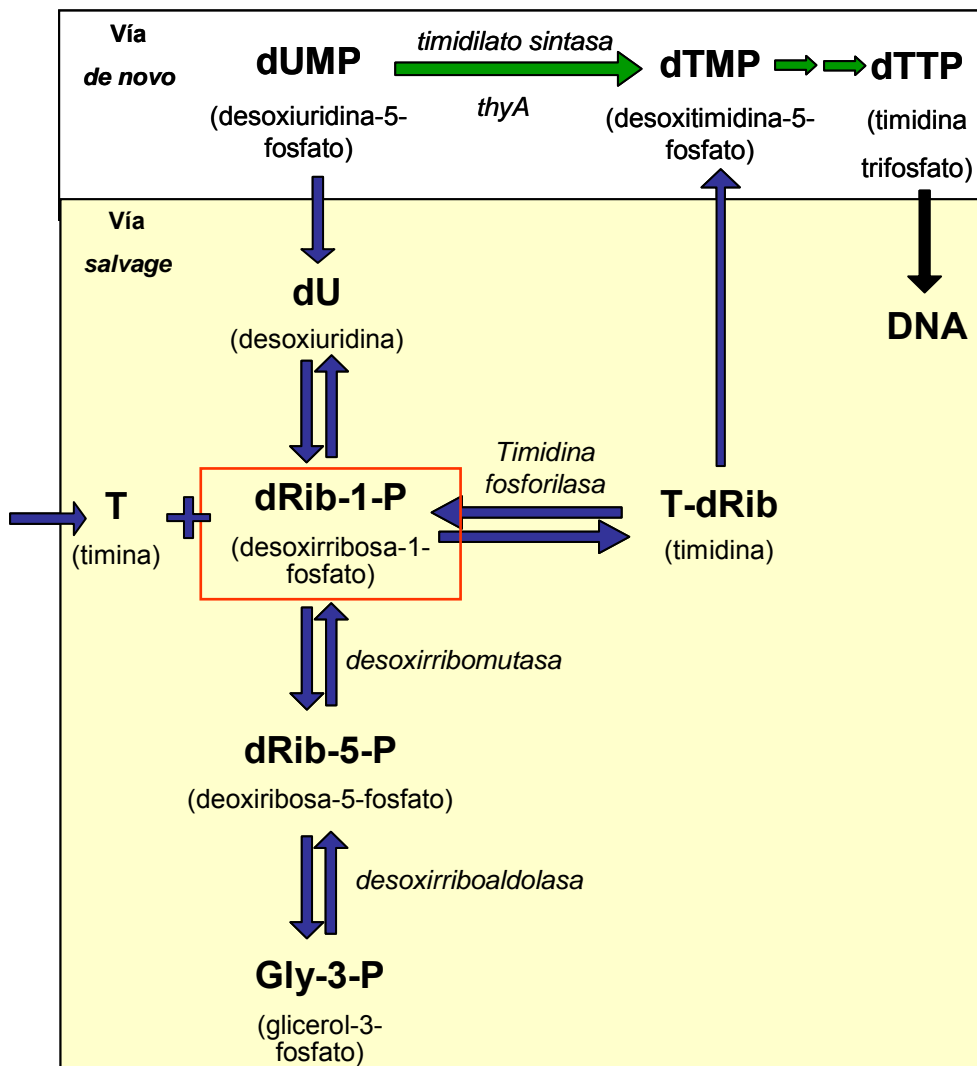


Fig. 1.7. Síntesis de dTMP a partir de las dos vías posibles: la *de novo* y la *salvage* (esquema modificado de Zaritsky *et al.*, 2006).

Las bacterias son incapaces de captar timina del medio mediante un transporte activo con bombas, sin embargo existe un transporte pasivo por difusión dependiendo de las concentraciones (Reinhart y Copeland, 1973). Las células salvajes normalmente no pueden usar la timina del medio porque no tienen un *pool* suficiente de dRib-1-P (Budman y Pardee, 1967). En dichas células la timidina exógena captada puede incorporarse durante cierto período de tiempo al DNA pero rápidamente es degradada por la timidina fosforilasa a timina y dRib-1-P, y cesa su incorporación.

Sin embargo, en las células mutantes en el gen *thyA* hay una acumulación de dUMP, el cual, en ausencia de la timidilato sintasa, no es convertido a dTMP (vía *de novo*) y es degradado a desoxiuridina y posteriormente a uracilo y dRib-1-P, generando el *pool* necesario para inducir la reacción hacia la síntesis de timidina y posteriormente dTMP (vía *salvage*).

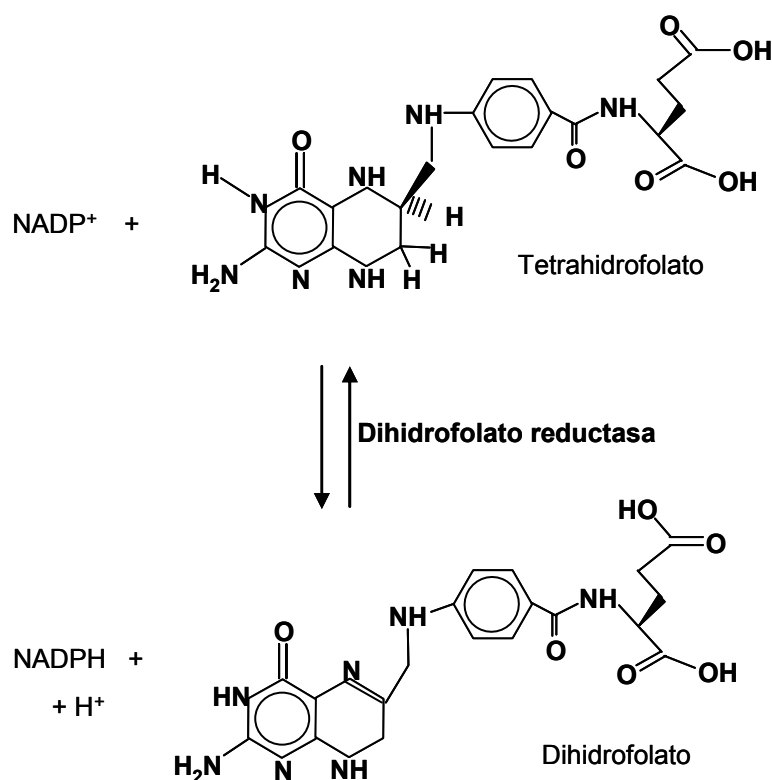


Fig. 1.8. Reacción catalizada por la enzima dihidrofolato reductasa.

Se han obtenido fácilmente mutantes espontáneos *thyA* de *E. coli* (Okada *et al.*, 1960) y *B. subtilis* (Farmer y Rothman, 1965), entre otros, usando “antifolatos” como el trimetoprim (Huovinen, 1987) y la aminopterina. El **trimetoprim** es un agente antibacteriano sintético que forma parte de un grupo denominado diaminopirimidinas. Estos agentes inhiben la **dihidrofolato reductasa (DHFR)**, una enzima que cataliza la reducción del DHR a THR en células microbianas y eucarióticas (Burchall, 1979; Hitchins, 1973) (Fig. 1.8).

El **THR** es necesario para la biosíntesis de ciertos aminoácidos (metionina y glicina), síntesis de purinas e iniciación de la síntesis proteica (Blakley, 1969). Asimismo, el N⁵,N¹⁰-metilentetrahidrofolato es usado en la conversión del dUMP a dTMP por la timidilato sintasa (Fig. 1.9).

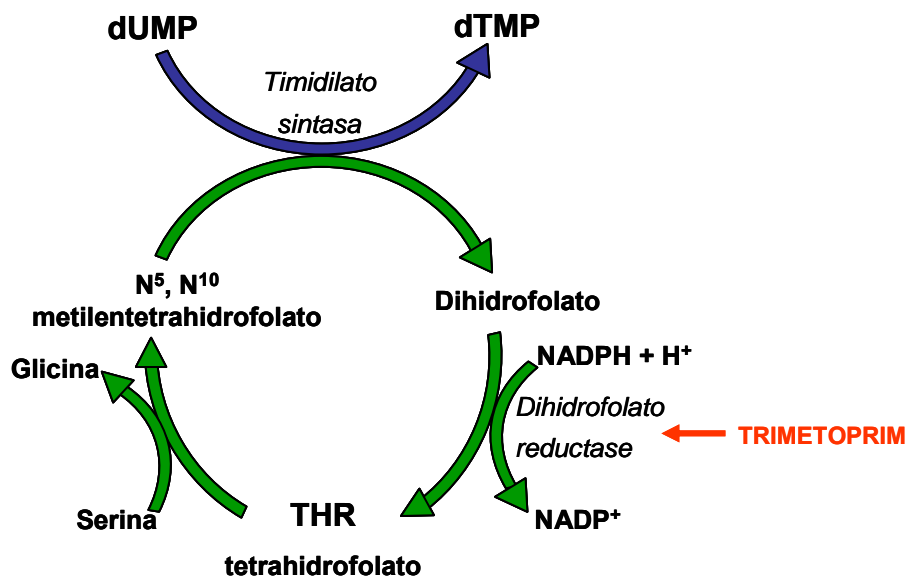


Fig. 1.9. Relación entre las reacciones catalizadas por la timidilato sintasa y la dihidrofolato reductasa.

Por lo tanto, en presencia de trimetoprim y timina en el medio de cultivo, sólo podrán crecer las bacterias que sean mutantes en el gen *thyA* ya que podrán

captar la timina o la timidina exógena y convertirla en dTMP mediante la vía *salvage*. Asimismo, las bacterias salvajes dejarán de incorporar timina del medio al no tener *pool* suficiente de dRib-1-fosfato y también dejarán de sintetizar timidilato al no poder reciclar el dihidrofolato. En consecuencia, dichas bacterias no podrán crecer.

1.3.2. Virulencia de los mutantes *thyA*

Desde hace tiempo se sabe que los mutantes auxotróficos en la biosíntesis de purinas y pirimidinas de determinados patógenos, presentan una atenuación de su virulencia (Fields *et al.*, 1986). Ello, probablemente, se debe a que la síntesis de timina es esencial para la supervivencia celular si ésta no se encuentra disponible. Por este motivo, se ha considerado que la inactivación del gen *thyA* puede ser una estrategia de biocontrol de las bacterias en el medio (Mekalanos, *et al.*, 1985) y también una estrategia de atenuación, útil en el diseño de vacunas (Smith y Tucker, 1976, Mintz *et al.*, 1988, Fields *et al.*, 1986; Ahmed *et al.*, 1990; Okada *et al.*, 1991; Yoshikawa *et al.*, 1995; D'Enfert *et al.*, 1996; Cersini *et al.*, 1998).

Por ejemplo, se ha demostrado en cultivos de monocitos que los mutantes *thyA* de *Legionella pneumophila* pierden su capacidad infectiva (Mintz *et al.*, 1988). Estos datos fueron confirmados *in vivo* en *Salmonella enterica* serovariedad Thyphimurim al observarse que la virulencia se recuperaba si en el hospedador había suficiente concentración de timina (Leung y Finlay, 1991). Lo mismo ocurre en *Shigella flexneri*, en la cual se determinó que los mutantes *thyA* presentaban una alta disminución de su virulencia (Cersini *et al.*, 1998). Asimismo, también se ha descrito que los mutantes de *S. flexneri* pueden ser buenos candidatos para el desarrollo de vacunas atenuadas gracias a su poder protector descrito en conejos y monos (Ahmed *et al.*, 1990; Yoshikawa *et al.*, 1995).

Sin embargo, existen datos discordantes con los indicados anteriormente. Así, en algunos estudios se ha demostrado que las cepas mutantes (*thyA*) de *Vibrio*

cholerae mantienen las mismas características que las salvajes en términos de crecimiento e inmunogenicidad y sólo presentan una ligera disminución de su capacidad colonizadora (Yu *et al.*, 2005). En otros estudios con cepas mutantes de la misma bacteria se ha observado que el gen *thyA* no es esencial para la colonización y que se mantiene la inmunogenicidad (Valle *et al.*, 2000). Por lo tanto, según los datos obtenidos hasta el momento, la patogenicidad de los mutantes *thyA* puede variar dependiendo de la especie bacteriana estudiada, del procedimiento de obtención de los mutantes (Valle *et al.*, 2000) y también de la vía de infección e inoculación y de la disponibilidad de timina en dicha vía. En consecuencia, serán necesarios futuros trabajos para determinar la implicación real de este gen en la virulencia bacteriana.

1.4. EL HIERRO

1.4.1. Importancia y disponibilidad del hierro

Generalmente se considera que el hierro es el micronutriente más importante que utilizan las bacterias. Este metal es esencial para el metabolismo celular y es necesario como cofactor de un elevado número de enzimas y reacciones (Wackett *et al.*, 1989). En condiciones anaeróbicas, el Fe^{2+} es estable a un pH fisiológico y las células bacterianas pueden obtenerlo sin dificultad desde el medio externo. Lo mismo ocurre en un medio ácido y aeróbico. No obstante, este elemento no se halla siempre disponible para los microorganismos. Así, en condiciones aeróbicas y de pH neutro, el Fe^{2+} se oxida espontáneamente a Fe^{3+} y forma hidróxidos insolubles, lo cual comporta una drástica disminución del hierro disponible (Crichton, 1991).

Las bacterias necesitan una concentración de hierro comprendida entre 10^{-6} y 10^{-8} M (Pradel *et al.*, 2000), lo cual significa que una célula requiere del orden de 10^5 a 10^6 iones de hierro por generación para poder crecer (Wandersman y Stojiljkovic, 2000). Por lo tanto a altas densidades celulares (10^9 cfu/ml), cada generación necesita consumir 10^{18} átomos de hierro por litro (Braun *et al.*, 1998). En consecuencia, las bacterias han desarrollado sistemas complejos para captar eficientemente el hierro, regulando su captación y detoxificando su exceso.

En los animales y en el hombre, el mayor depósito de hierro es la **hemoglobina** de los eritrocitos que, juntamente con el hierro de la **mioglobina** (reservorio de oxígeno del músculo), representa el 85% del total (Wessling-Resnick, 2000). Además, en humanos y otros vertebrados superiores, el hierro, después de ser asimilado en la dieta por las células mucosas del yeyuno, pasa al torrente sanguíneo donde es transportado por una glicoproteína denominada **transferrina** (Aisen, 1998). Las transferrinas son proteínas de unión al hierro de las cuales se han descrito tres clases principales:

- i. **Transferrinas séricas o serotransferrinas (Tf)**
- ii. **Lactoferrinas o lactotransferrinas (Lf):** Se encuentran en diversos fluidos extracelulares.
- iii. **Ovotransferrinas:** Se localizan en la clara de los huevos.

Las transferrinas no sólo obtienen el hierro desde la dieta, también lo pueden adquirir desde el grupo hemo que se genera por la degradación por fagocitosis de eritrocitos viejos (Wessling-Resnick, 2000) o desde la **ferritina**. Esta proteína es el mayor almacén de hierro en muchos organismos y se encuentra tanto en animales, como en plantas [fitoferritinas (Briat y Lobreaux, 1999)] y en microorganismos [bacterioferritinas (Andrews, 1998)].

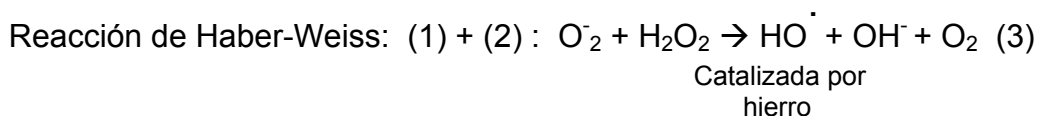
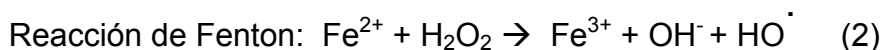
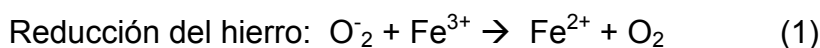
La **hemosiderina**, sintetizada en el hígado, presenta características similares a la ferritina y constituye un mecanismo especializado para reducir la concentración de hierro libre (Otto *et al.*, 1992; Ratledge y Dover, 2000).

La **albúmina**, que es la proteína mayoritaria del plasma, también tiene la capacidad de unir hierro (Genco y Dixon, 2001). Asimismo, cuando se produce hemólisis de los glóbulos rojos, la hemoglobina pasa al torrente sanguíneo, pero rápidamente se une a otra proteína denominada **haptoglobina**. Si se satura esta proteína, la hemoglobina libre se oxida y se disocia el grupo hemo de la globina al cual se une otra proteína denominada **hemopexina** (Otto *et al.*, 1992).

Por lo tanto, el problema para captar el suficiente hierro es más acusado en las bacterias patógenas ya que en sus hospedadores el hierro se halla quelado a proteínas. De hecho, limitar la disponibilidad del hierro es una primera defensa contra el ataque microbiano. Frente a esta defensa, los microorganismos patógenos han desarrollado mecanismos capaces de contrarrestar las restricciones de hierro ya sea mediante la síntesis de quelantes de iones férricos, llamados **sideróforos**, que son sintetizados y exportados al exterior celular (Braun y Hantke, 2002) o bien captando hierro mediante **receptores de las proteínas transportadoras de hierro de la célula hospedadora** (Andrews *et al.*,

2003). Además, a menudo los bajos niveles de hierro pueden actuar como una señal de inducción de genes de virulencia (Litwin y Calderwood, 1993).

En contraposición, un exceso de hierro es tóxico para la célula bacteriana por su habilidad para catalizar reacciones que darán lugar a especies reactivas de oxígeno que pueden causar daño celular. Estas especies son derivados parcialmente reducidos del oxígeno molecular que se generan como consecuencia del metabolismo aeróbico (Fridovich, 1995). Los productos que se obtienen son el superóxido y el peróxido de hidrógeno con los cuales interactúa el hierro generando radicales hidroxilos que son muy reactivos y pueden provocar daños en macromoléculas biológicas (Andrews *et al*, 2003). Las reacciones son las siguientes:



El exceso de hierro responsable de estos efectos deletéreos puede ser suprimido mediante la ferrozina o aumentando la capacidad de almacenar hierro por sobreproducción de proteínas tipo ferritinas, un quelante de los iones ferrosos. Asimismo, se puede bloquear la importación de iones férricos con un mutante *tonB*, el cual no permitirá el paso del ión hacia el citoplasma (Touati, 1999).

En función de lo comentado anteriormente, queda claro que la concentración intracelular de hierro tiene que estar muy bien regulada. Se considera que un elevado número de genes son regulados en respuesta a la ausencia de hierro en la célula bacteriana, y que estos genes son expresados (o reprimidos) de una forma coordinada. Todo esto sugiere que hay un regulador común para todos ellos (Ratledge y Dover, 2000). En *E. coli*, al igual que en otras bacterias gramnegativas y algunas grampositivas, este regulador es la proteína Fur.

1.4.2. Mecanismos de captación del hierro

Las bacterias patógenas grampositivas y gramnegativas disponen de los dos tipos de mecanismos, ya mencionados anteriormente, para captar hierro: los sideróforos y los receptores de proteínas transportadoras de hierro del hospedador. Seguidamente se comentan brevemente ambos mecanismos.

1.4.2.1 Sideróforos

Los sideróforos son moléculas de baja masa molecular (<1000 Da), caracterizados por su especificidad y afinidad por el ion férrico (Byers y Arceneaux, 1998). Son sintetizados por bacterias, hongos y plantas monocotiledóneas en respuesta a déficit de hierro (Ratledge y Dover, 2000). El número de sideróforos caracterizados es superior a 500 (Drechsel y Jung, 1998; Drechsel y Winkelmann, 1997; Neilands, 1995; Telford y Raymond, 1996; Winkelmann, 1991; Winkelmann y Drechsel, 1997).

Forman complejos octaédricos hexadentados con el hierro y típicamente usan hidroxamatos, α -hidroxicarboxilatos y catecoles como ligantes del Fe^{3+} (Winkelmann, 1991b; Winkelmann, 2002) (Fig. 1.10) y se clasifican según el grupo funcional que quela el hierro. Los sideróforos pueden ser sintetizados a elevadas concentraciones, como puede ser el caso de la aerobactina producida por algunas cepas de *Escherichia coli* (Braun, 1985).

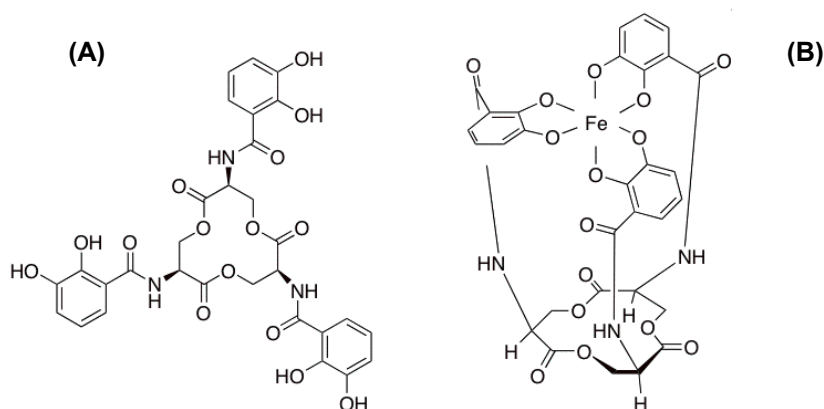


Fig. 1.10. Esquema representativo de la enterobactina, sideróforo producido por enterobacterias, en ausencia (A) y presencia de hierro (B).

La producción de sideróforos específicos no otorga automáticamente patogenicidad o virulencia a una bacteria. Su actividad de unión al hierro es suficientemente elevada para que el sideróforo capte el hierro unido a moléculas como la ferritina, la transferrina o la lactoferrina, pero no el que portan las hemoproteínas. Asimismo, los sideróforos son capaces de quelar las sales férricas insolubles, incluso hidróxidos férricos (Ratledge y Dover, 2000).

Las bacterias gramnegativas captan los complejos Fe^{3+} -sideróforos mediante una vía específica de receptores en la membrana externa [como pueden ser FepA, FecA y FhuA, cuya estructura cristalina ha sido determinada (Buchanan *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 2002)], ya que son demasiado grandes para pasar a través de las porinas que tienen una masa límite de aproximadamente 600 Da.

Los receptores de sideróforos están formados por un canal cerrado. Este cierre consiste en un dominio globular derivado de los primeros 160 residuos del extremo N-terminal y se posiciona con la apertura hacia el extremo periplasmático. Su inducción generalmente se da en condiciones de restricción de hierro y no suelen estar presentes en condiciones de suficiencia de hierro. Una importante razón para explicar este hecho es que los receptores de sideróforos pueden llegar a ser dianas para bacteriófagos, colicinas o antibióticos. Las bacterias a menudo presentan múltiples receptores con especificidad según el sideróforo, e incluso pueden captar sideróforos producidos por otras bacterias (Andrews *et al.*, 2003).

En *H. parasuis* se ha detectado, mediante PCR, la presencia de genes que intervienen en la captación de hierro mediada por proteínas de unión a sideróforos (tipo hidroxamato) que forman parte de la región *fhu*. Los cuatro genes se disponen de forma consecutiva en el cromosoma bacteriano, con idéntica localización a la descrita en otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* (del Río *et al.*, 2006b).

1.4.2.2. Proteínas receptoras de transportadores de hierro

Otro mecanismo de captación del hierro que tienen las bacterias es mediante proteínas receptoras de transportadores de hierro del hospedador (Andrews *et al.*, 2003). Entre dichos transportadores se encuentran las transferrinas y las hemoproteínas.

A. Captación de hierro desde las transferrinas

Las lactoferrinas, las transferrinas séricas y las ovotransferrinas constituyen una familia de glicoproteínas de unión al hierro llamada transferrina. Todos los miembros de esta familia son glicoproteínas monoméricas de unos 80 KDa que presentan cierta homología y se caracterizan por tener dos dominios similares de unión al hierro (N-terminal y C-terminal), con una constante de unión de 10^{20} . Además, estos iones férricos se unen a la transferrina mediante otro anión (normalmente carbonado) que sirve como puente entre el metal y la transferrina (Ratledge y Dover, 2000) (Fig. 1.11)

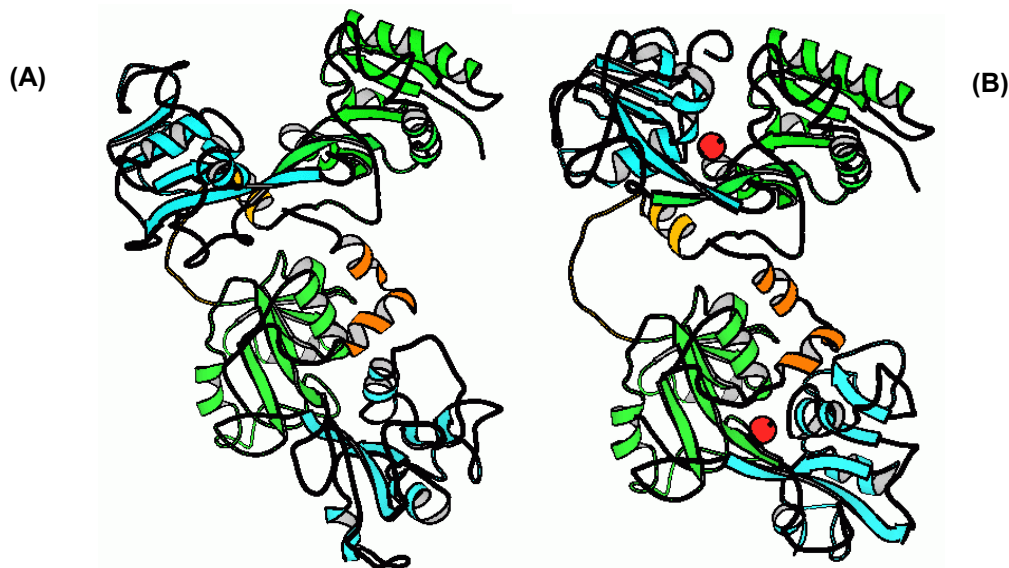


Fig. 1.11. Modelo de la transferrina sérica humana en ausencia (A) y presencia (B) de dos moléculas de hierro.

Es importante que las transferrinas nunca estén saturadas de hierro. Esta disponibilidad permitirá quelar los excesos de hierro que lleguen desde la sangre

o desde otros fluidos durante una infección. Dicha capacidad permitirá que durante la infección no quede hierro libre disponible en circulación, que pueda ser captado por los patógenos (Crichton y Ward, 1998).

En condiciones de limitación de hierro, muchas especies de patógenos gramnegativos de las familias *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae* sintetizan dos proteínas de unión a transferrinas, altamente conservadas, que unen específicamente la transferrina de su hospedador (Fuller *et al.*, 1998; Morton y Williams, 1989). Los receptores están formados por dos subunidades: TbpA y TbpB para los receptores de transferrinas (TfR) y LbpA y LbpB para los receptores de lactoferrinas (LfR). TbpA y LbpA son homólogas y están relacionadas con los receptores de sideróforos de la membrana externa (Legrain *et al.*, 1993). Se cree que estos receptores sirven de canal por el cual atraviesa el ión férrico. TbpB y LbpB también son homólogas, pero no relacionadas con los receptores de sideróforos. Ambas son lipoproteínas ancladas en la cara externa de la membrana externa, gracias a los grupos lipídicos de su dominio N-terminal (Anderson *et al.*, 1994). Parece ser que TbpB y LbpB actuarían aumentando la afinidad de los receptores por la transferrina y la lactoferrina y proporcionarían la habilidad para discriminar entre las proteínas que llevan hierro de las que no lo contienen (Cornelissen y Sparling, 1994). En *H. parasuis* se ha demostrado también, la presencia de los genes *tbpB* y *tbpA* en todos sus serotipos (del Río *et al.*, 2005).

El mecanismo de captación de hierro a partir de transferrinas en grampositivos está menos caracterizado (Cornelissen y Sparling, 1994). La mayoría de estudios se han realizado en *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* (Modun *et al.*, 1998; Modun *et al.*, 1994; Modun *et al.*, 2000). Dichas bacterias expresan un receptor específico de transferrinas de 42 KDa, saturable, que reconoce una gran diversidad de transferrinas humanas como ocurre en los gramnegativos. El hierro es extraído del extremo N-terminal de la proteína mediante un proceso activo. Además, se ha descrito en *S. aureus* y *S. epidermidis*, que estos receptores de transferrinas son funcionalmente las gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas (GAPDH) de la pared celular, reguladas por la disponibilidad de hierro en el medio (Modun y Williams, 1999).

B. Captación de hierro desde hemoproteínas

La obtención de hierro a partir de la hemina es una característica de un gran número de bacterias patógenas, como pueden ser: *V. cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Neisseria spp.*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *H. influenzae* (Ochsner *et al.*, 2000; Stoebner y Payne, 1988). Se han definido dos mecanismos principales para la adquisición del metal a partir de las hemoproteínas:

1. Una unión directa de la hemoproteína a los receptores de la membrana externa dependientes del sistema TonB y el posterior paso de la hemina por el periplasma hacia el citoplasma mediante el sistema PBT (*Periplasmic Binding-protein-dependent Transport*). Los sistemas de captación de hemoproteínas se pueden clasificar en dos grupos según su especificidad (Braun *et al.*, 1998):

- receptores de la hemina o de la hemoglobina que son específicos del nicho ecológico que ocupan ciertos patógenos, altamente adaptados al hospedador, como son: *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*.
- receptores que pueden obtener hemina de un gran número de hospedadores por ejemplo los de *Y. pestis* y *Y. enterocolitica*.

2. La participación de una proteína soluble o hemóforo que interactúa con la hemoproteína y transporta la hemina a la superficie celular donde se encontrará con un receptor dependiente del sistema TonB. Algunos ejemplos son:

- HasA, una proteína extracelular que produce *S. marcescens* en condiciones de limitación de hierro, necesaria para que la hemoglobina sea usada como fuente de hierro (Létoffé *et al.* 1994).
- HuxA, una proteína de unión a hemina-hemopexina producida por *H. influenzae* tipo b y también por cepas no tipables (Cope *et al.* 1994).

1.4.3. Transporte del hierro al interior de la célula

Acoplados a los mecanismos de captación del hierro se encuentran los sistemas encargados de transportar el hierro hacia el interior de la célula. Seguidamente se comentan dichos procesos para las bacterias gramnegativas (Fig. 1. 12).

Paso del hierro a través de la membrana externa

Una vez las proteínas que transportan el hierro (sideróforos, transferrinas o hemoproteínas) se encuentran asociadas a los receptores de membrana externa, deben atravesarla para llegar al periplasma.

La translocación de estas moléculas es un proceso activo que necesita una fuerza motriz de protones aportada por el **sistema Ton** (Elkins *et al.*, 1998; Guerry *et al.*, 1997; Koebnik *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1996; Larsen *et al.*, 1999; Nicholson y Beall, 1999; Occhino *et al.*, 1998; Stojiljkovic y Srinivasan, 1997).

El sistema Ton está formado por tres proteínas: **TonB**, **ExbB** y **ExbD**, que interactúan con la membrana citoplasmática. La proteína TonB es periplasmática y se encuentra anclada en la membrana citoplasmática por su dominio hidrofóbico N-terminal, mientras contacta con los receptores de la membrana externa a través de su dominio C-terminal. Por el contrario, las proteínas ExbB y ExbD son integrales de la membrana citoplasmática. La proteína ExbB presenta tres dominios transmembrana, mientras que su dominio N-terminal y un pequeño giro se encuentran en el periplasma. En referencia a ExbD, ésta se encuentra anclada a la membrana citoplasmática por su dominio N-terminal y el resto de la proteína se localiza en el periplasma (Braun y Killmann, 1999).

Estudios *in vivo* demuestran que la relación de estas tres proteínas es de 1:7:2 para formar el complejo TonB-ExbB-ExbD (Higgs *et al.*, 2002). Se cree que **ExbB** y **ExbD** aprovechan el gradiente electroquímico de la membrana para producir un TonB “energético” que provoca un cambio conformacional en el receptor de la membrana externa, al que se encuentra unido mediante un fragmento de 7 aminoácidos hidrofóbicos denominado *TonB box* (Andrews *et al.*, 2003). Dicha

energía es también aprovechada para el transporte de la vitamina B₁₂ al periplasma.

Paso del hierro a través de la membrana citoplasmática

Sea cual sea el mecanismo de captación de hierro, su transporte a través de la membrana citoplasmática en bacterias gramnegativas, se realiza mediante un mecanismo del tipo **ABC** (*ATP Binding Cassette*) (Köster, 2001).

El sistema ABC está formado por:

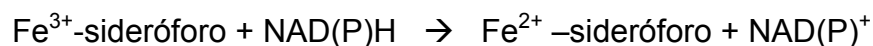
- **Proteínas periplasmáticas de unión al sustrato (PBT)**. Estas proteínas pueden ser solubles o encontrarse ancladas a la membrana citoplasmática en forma de lipoproteínas (como sucede en los grampositivos). Cada proteína de unión acepta un complejo pero no está muy claro si lo capta directamente del receptor de la membrana externa o bien en forma libre del periplasma (Köster, 2001). En *E. coli*, las proteínas periplasmáticas implicadas en el transporte del hierro son la proteína FecB del sistema de transporte Fe(III)-dicitrato (Staudenmaier *et al.*, 1989), la proteína FepB del sistema de transporte de la enterobactina férrica (Elkins y Earhart, 1989) y la proteína FhuD del sistema de captación del hidroxamato férrico (Köster y Braun, 1990). En grampositivos, también se encuentran sistemas de captación dependientes de proteínas de unión similares en estructura y organización al de las gramnegativas. Las proteínas de unión actúan como lanzadera, recogiendo el complejo en los receptores de la membrana externa y derivándolo a las permeasas transmembrana.
- Complejos de **Permeasas** transmembrana, formados por 4 módulos. Dos de ellos son idénticos u homólogos a los de permeasas integrales de membrana y los otros dos son generalmente idénticos entre sí y se localizan en la cara interna de la membrana citoplasmática.

- Las **ATP hidrolasas** o **ATPasas** se sitúan en la cara interna de la membrana citoplasmática y se encargan de aportar la energía necesaria al sistema de transporte (Köster, 2001).

Se pueden definir tres tipos de transportadores de hierro ABC:

A) Transportadores de sideróforos/ hemo/ vitamina B₁₂: Este tipo de transportadores son bastante conservados tanto en bacterias como en arqueobacterias. Sólo en algunas bacterias no se encuentra ninguna representación de este sistema porque tienen su metabolismo acoplado al del huésped (ej. micoplasmas), o porque no necesitan hierro (ej. lactobacilos). En la gran mayoría de casos se han identificado exclusivamente mediante análisis de secuencias, y sólo en algunos casos se han podido caracterizar bioquímicamente y se ha determinado su sustrato específico. El paso a través de la membrana citoplasmática es menos específico que la translocación a través de la membrana externa. El mejor transportador caracterizado es el sistema *fhuBCD* de *E. coli* que sirve de modelo para la familia que utiliza sideróforos (Köster, 2001).

En el citoplasma han sido identificadas en un gran número de bacterias, reductasas del complejo sideróforo-Fe³⁺, por ejemplo en: *Bacillus* spp. (Arceneaux y Byers, 1980; Gaines *et al.*, 1981), *Paracoccus* (*Micrococcus*) *denitrificans* (Möllmann *et al.*, 1998), *E. coli* (Fisher *et al.*, 1990) y *P. aeruginosa* (Cox, 1980). En todos los casos el reductor es el NADH o el NADPH y la reacción es la siguiente:



En este momento, el Fe²⁺ que ahora es soluble, se libera del sideróforo y se incorporará a porfirinas por la vía de las ferroquelatasas (Dailey y Lascelles, 1977), o a apoproteínas. Se han identificado ferri-reductasas similares para desplazar el hierro de algunos sideróforos de hongos (Ernst y Winkelmann, 1977; Timmerman y Woods, 1999). La reducción de los

complejos sideróforo-Fe³⁺ tiene lugar a través del dicitrato férrico en *E. coli* (Fisher *et al.*, 1990; Moody y Dailey, 1983), pero no involucra a ninguna de las partes de la cadena respiratoria (Williams y Poole, 1987).

B) Transportadores del ión férrico: El primer transportador de este tipo caracterizado, independiente de sideróforos, fue el sistema *Sfu* de *S. marcescens* (Angerer *et al.*, 1990). Posteriormente, se han definido sistemas similares en *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* habiéndose identificado las proteínas FbpA, FbpB y FbpC (Mietzner, *et al.*, 1998). Estos transportadores median el paso del ión férrico adquirido de las transferrinas y lactoferrinas, que ha sido transportado hasta el periplasma, gracias a un receptor que depende del sistema TonB (Schryvers y Stojiljkovic, 1999; Vasil y Ochsner, 1999).

C) Transportadores de metales: Es el grupo de transportadores del tipo ABC que se ha descubierto más recientemente. Las proteínas de unión de este tipo de transportador fueron originariamente descritas como adhesinas y no requieren necesariamente receptores en la membrana externa o sideróforos. No todos los transportadores de este tipo están vinculados al transporte de hierro, sino que algunos de ellos presentan especificidad para otros iones metálicos como el zinc o el manganeso, que difunden libremente a través de la membrana externa (Köster, 2001).

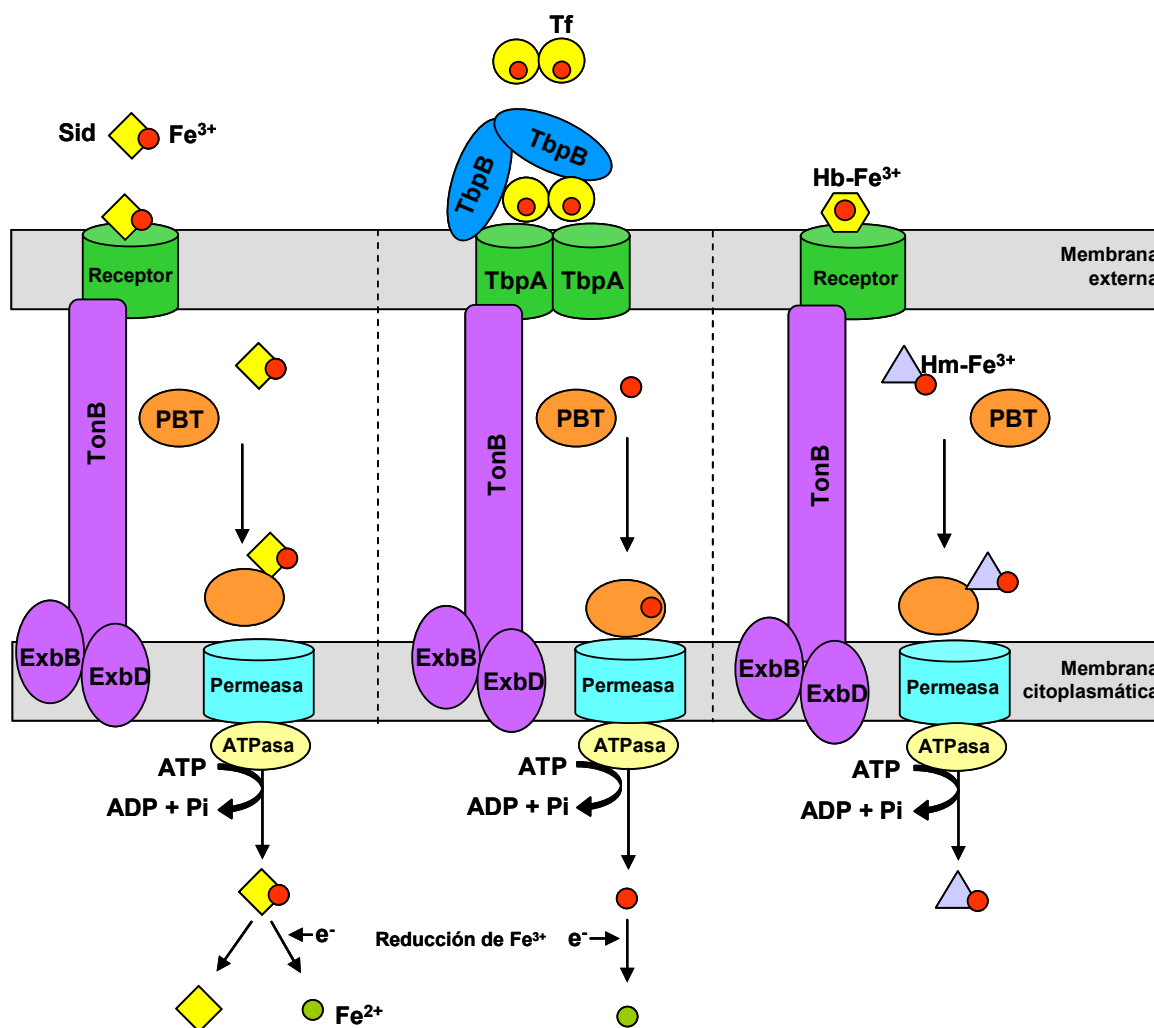


Fig. 1.12. Representación de los distintos mecanismos de captación de hierro (esquema modificado de Ratledge y Dover, 2000 y Jacques y Mikael, 2002).

1.4.4. Control de la expresión génica por el hierro

Típicamente, las bacterias regulan su metabolismo del hierro en respuesta a la disponibilidad del recurso. En *E. coli* y en otras bacterias esta regulación es a nivel transcripcional y se encuentra controlada por la proteína **Fur** (*Ferric Uptake Regulator*) que es capaz de regular a gran cantidad de genes (Hantke, 2001; Hantke y Braun, 2000).

1.4.4.1. Mecanismo de acción

La proteína Fur es un homodímero formado por dos subunidades de 17 kDa. En presencia de hierro, la proteína Fur unida a él, actúa como represor de la transcripción, uniéndose a los promotores de los genes que regula. Por el contrario, en ausencia de hierro, la forma apo-Fur no puede unirse a los promotores y se producen altos niveles de expresión de los genes que se encuentran bajo su control (Fig. 1.13). Los resultados *in vitro* indican que la proteína Fur puede ser activada por Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} pero *in vivo* sólo por Mn^{2+} , Fe^{2+} y Co^{2+} (Bagg y Neilands, 1987; Ochsner *et al.*, 1995). Probablemente estos cationes divalentes se unirán en el mismo lugar que el cofactor Fe^{2+} . Las constantes de afinidad varían de 10 a 100 μM , dependiendo de la bibliografía.

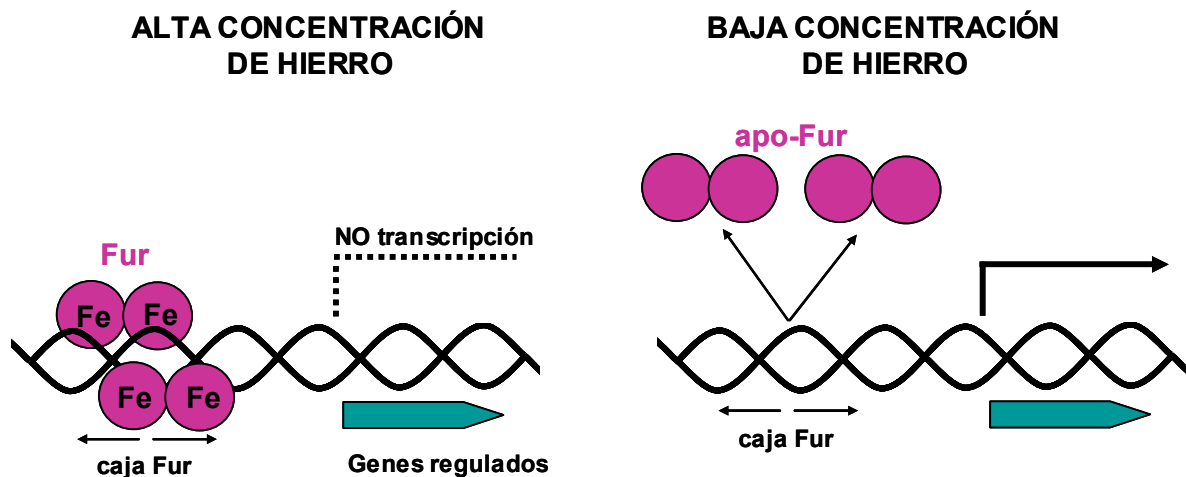


Fig. 1.13. Mecanismo de acción de la proteína Fur. A altas concentraciones, el hierro se une a la proteína Fur y el complejo Fur-Fe a la caja Fur, reprimiendo así los genes que se encuentran bajo su control. Por el contrario, a bajas concentraciones, la forma apo-Fur no puede unirse al DNA y se transcriben los genes que están bajo su control (esquema modificado de Andrews *et al.*, 2003).

Cada subunidad de la proteína Fur está formada por un dominio N-terminal, que se unirá al DNA entre los lugares -35 y -10 de los promotores de los genes regulados por Fur, y por el dominio C-terminal, rico en histidinas, relacionado con la unión al cofactor (ión ferroso) y con la dimerización (Coy y Neilands, 1991;

Stojiljkovic y Hantke, 1995). Cuando se une el metal a la proteína Fur, ésta sufre un cambio conformacional que permitirá la unión de su dominio N-terminal al DNA. Además, se ha descrito que la proteína Fur es una zinc-metaloproteína, ya que contiene un lugar estructural de zinc esencial para su actividad (Jacquamet *et al.*, 1998).

Asimismo, se han estudiado los lugares específicos de unión a metales usando diferentes métodos espectroscópicos (Adrait *et al.*, 1999; Althaus *et al.*, 1999; Jacquamet *et al.* 1998). La región relacionada con el reconocimiento del DNA se ha determinado mediante espectrometría de masa MALDI-TOF (Tiss *et al.* 2005). Es la primera identificación de un residuo aminoacídico involucrado directamente en la interacción DNA-Fur. La secuencia aminoacídica que podría ser la responsable del reconocimiento del DNA es TXY (donde X es V o I) y ha sido identificada en la proteína Fur de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis*, en la proteína Zur de *B. subtilis* y *E. coli* y en PerR de *B. subtilis*. Esta información sugiere un modelo conformacional de unión de la proteína Fur al DNA que podría ser semejante a la unión de otras proteínas tipo Fur como son Zur y PerR.

1.4.4.2. La caja Fur

Se ha descrito que la unión del complejo Fur-Fe²⁺ al DNA tiene lugar en una secuencia palindrómica denominada **caja Fur**, presente en los promotores de los genes regulados por esta proteína entre los lugares -35 y -10 (de Lorenzo *et al.*, 1987). Esta caja está formada por 19 pb y la interpretación que fue más aceptada era que constaba de dos secuencias repetidas e invertidas de 9 pb separadas por una base (Fig. 1.14A).

No obstante, más tarde, se postuló que la proteína Fur reconocía series repetidas de 6 pb GATAAT (Fig. 1.14B) (Escolar *et al.*, 1999). Una posterior reinterpretación de la caja Fur, se basó en explicar cómo los dímeros de Fur interaccionaban con sus lugares de unión. En esta interpretación se consideró un solapamiento de 13 pb con el motivo 6-1-6, en la cual dos dímeros de Fur se unían a cada caja en las caras opuestas de la doble hélice (Fig. 1.14C) (Lavrrar *et al.*, 2002). Este modelo

se adaptó para una repetición heptamérica de 15 pb en *B. subtilis* (Fig. 1.14D) (Baichoo y Helmann, 2002). Finalmente, el último modelo postulado es el que propone la unión de dímeros solapados. La presencia de estos lugares solapados puede permitir un mayor rango de regulación de Fur, ya que sitios semejantes permiten la unión de dímeros adicionales (Fig. 1.14E) (Lavrar y McIntosh, 2003).

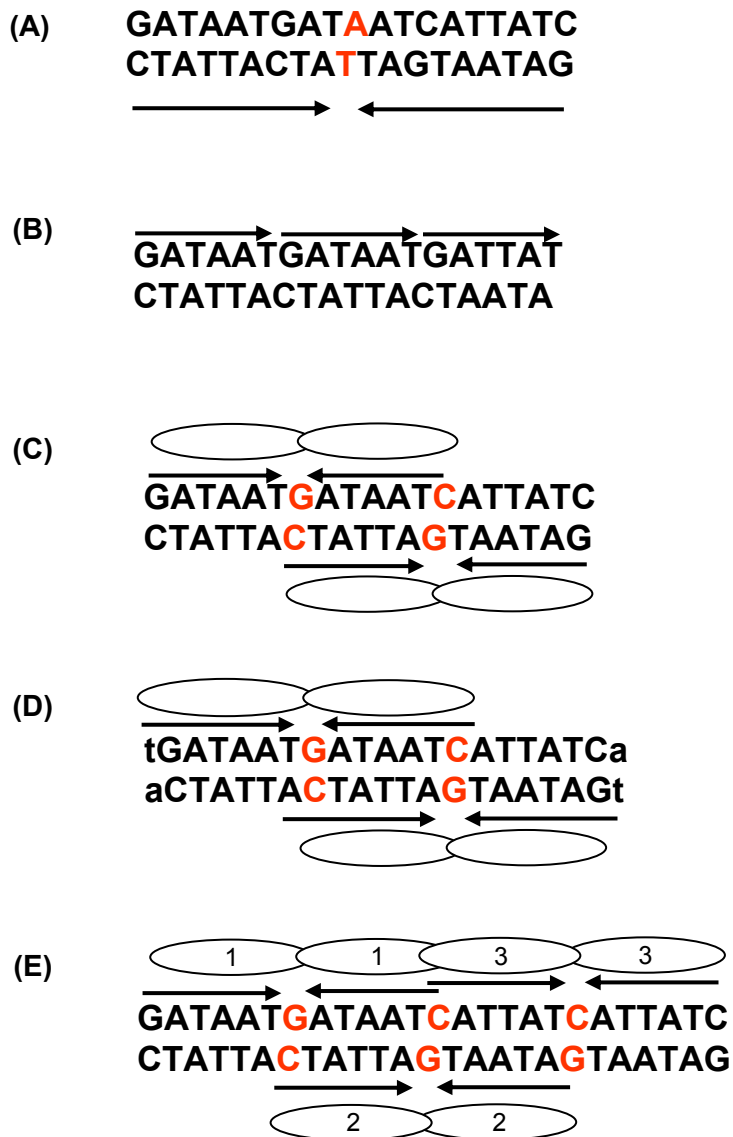


Fig. 1.14. Diferentes modelos de la caja Fur. (A) 19 pb con dos secuencias repetidas e invertidas de 9 pb separadas por una base. (B) tres repeticiones con motivo de 6 pb. (C) superposición de hexámeros, 13 pb con el motivo 6-1-6 (modelo *E. coli*). (D) superposición de heptámeros (modelo *B. subtilis*). (E) modelo de unión de dímeros solapados en lugares de unión extendidos. En los tres últimos modelos, cada monómero de la proteína Fur (elipse) se une a un hexámero o heptámero invertido (marcado con un flecha) (esquema modificado de Lavrar y McIntosh, 2003).

1.4.4.3. Regulación y funciones

Inicialmente se creía que la proteína Fur únicamente regulaba genes implicados en la captación de hierro, pero posteriormente se ha observado que también regula la expresión de otros genes, por lo cual hoy en día se acepta que es un regulador general, pleiotrópico, que está implicado en la regulación de las siguientes funciones:

- Captación de hierro
- Almacenaje del hierro en *E. coli* (Andrews, 1998)
- Producción de algunas toxinas y factores de patogenicidad
 - Colicinas, α -hemolisinas y pectato liasas (Calderwood y Mekalanos, 1987; Poole y Braun, 1988; Ochsner *et al.*, 1995; Hirono *et al.*, 1997; Franza *et al.*, 1999)
- Metabolismo en general
 - Regulación de la biosíntesis de purinas (Stojiljkovic *et al.*, 1994)
 - Reemplazamiento de la ferredoxina por la flavodoxina (Ghassemian y Straus, 1996)
- Motilidad bacteriana (Stojiljkovic *et al.*, 1994)
- Protección contra el estrés mediante la regulación de las defensas contra el estrés oxidativo y la respuesta al estrés ácido (Foster y Hall, 1992)

A parte del mecanismo de regulación anteriormente mencionado, se sabe que el gen *pfr* que codifica la ferritina de *Helicobacter pylori*, puede ser regulado a través de una interacción directa con la proteína Fur (Delany *et al.*, 2001). Su expresión es reprimida por la forma no activa de la proteína Fur (apo-Fur) que se une al DNA bloqueando la expresión y desreprimida por el complejo Fur-Fe²⁺.

Además, se ha observado que, en algunos casos, la proteína Fur actúa como un regulador positivo (Niederhoffer *et al.*, 1990; Tsolis *et al.*, 1995; Gruer y Guest, 1994). Los genes regulados de este modo no contienen la caja Fur en sus regiones 5' y no está muy claro cuál es el mecanismo de dicha regulación. En *E. coli*, el gen más estudiado que también se induce de este modo es *sodB*,

habiéndose demostrado que su inducción necesita un elemento en *cis* consistente en un palíndromo en la región +1 y una región adyacente rica en AT. Parece ser que este tipo de regulación se produce a nivel post-transcripcional, al menos parcialmente (Dubrac y Touati, 2000).

1.4.4.4. Mutantes *fur*

La gran variedad de genes controlados por la proteína Fur sugiere que un defecto de esta proteína podría tener severas consecuencias para las células bacterianas. Además, se ha demostrado que la proteína Fur está implicada en la virulencia, regulando factores asociados a ella (Cooksley *et al.*, 2003; Litwin y Calderwood, 1993).

Un ejemplo bien conocido, son los mutantes *fur* de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, los cuales presentan una expresión constitutiva de las proteínas de unión a transferrinas, deficiencias de crecimiento *in vitro*, y reducción de su virulencia en un modelo animal (Jacobsen *et al.*, 2005). Asimismo, mutantes *fur* de *E. coli* (Touati *et al.*, 1995) son viables pero tienen deficiencias en su crecimiento en aerobiosis y presentan evidencias de daño en el DNA. Se sabe que aumenta la tasa de mutagénesis espontánea en presencia de oxígeno y no pueden sobrevivir si se han eliminado los sistemas de recombinación (*recA* o *recB*), además de presentar un aumento de su sensibilidad al peróxido de hidrógeno. También se han obtenido mutantes *fur* de *S. enterica* serovariedad Typhimurium (Foster y Hall, 1992) y de *Pasteurella multocida* (Bosch *et al.*, 2001).

Por el contrario, los intentos para obtener mutantes *fur* no han dado su fruto en *P. aeruginosa* ni *Vibrio anguillarum* y tampoco se han podido eliminar copias salvajes del gen *fur* en *Rhizobium leguminosarum* y en *Synechococcus* 7942, por lo cual parece que este gen tendría un papel esencial en estas bacterias (Ghassemian y Straus, 1996; de Luca *et al.*, 1998).

1.4.4.5. Otros reguladores

El tipo de regulación llevado a cabo por la proteína Fur puede ser aplicada a otros represores dependientes de metales. En esta línea, cabe destacar a la proteína **PerR** de *B. subtilis* (Bsat *et al.*, 1998) y a la proteína **Irr** de *Bradyrhizobium japonicum* (Hamza *et al.*, 1998).

La proteína PerR regula la expresión de las proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo en combinación con manganeso y hierro. Por otro lado, la proteína Irr controla la biosíntesis de hemo, cuyo producto participa en la ruta de biosíntesis de hemina, y coordina este mecanismo con la homeostasis del hierro. A diferencia de la proteína Fur, la proteína Irr es activa en carencia de hierro (Hamza *et al.*, 1998).

2. OBJETIVOS

Como se ha comentado anteriormente, *H. parasuis* es un patógeno causante de graves pérdidas económicas en el sector porcino y del cual se conoce muy poco sobre su biología. Por ello, los objetivos de la presente tesis han sido:

- Desarrollar un método de transferencia genética que permita el estudio de la biología molecular de *H. parasuis*.
- Determinar el papel de la timidilato sintasa en la virulencia de *H. parasuis*.
- Determinar la virulencia de un mutante de *H. parasuis* defectivo en la proteína Fur.

3. ARTÍCULOS

3.1. Artículo 1: Development of a genetic manipulation system for *Haemophilus parasuis*.

3.2. Artículo 2: Colonization capacity and serum bactericidal activity of *Haemophilus parasuis thy* mutants.

3.3. Artículo 3: Non-viability of *Haemophilus parasuis fur*-defective mutants.

3.1. ARTÍCULO 1

Development of a genetic manipulation system for *Haemophilus parasuis*

Anna Bigas^{a,1}, M. Elena Garrido^{a,1}, Ana M. Pérez de Rozas^b,
Ignacio Badiola^b, Jordi Barbé^{a,b}, Montserrat Llagostera^{a,b,*}

^aDepartment of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

^bCentre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona-Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (UAB-IRTA), Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

Received 15 June 2004; received in revised form 7 October 2004; accepted 22 October 2004

Abstract

Haemophilus parasuis is a member of the family *Pasteurellaceae* and an important respiratory-tract pathogen of swine, which is the etiological agent of Glässer's disease. Because no genetic manipulation system is available for *H. parasuis* so far, in vivo studies about the role of its genes involved in virulence are unfeasible. Here we demonstrate that *H. parasuis* has a cyclic AMP (cAMP)-dependent natural transformation system that enables the uptake of DNA in which the ACCGAACTC sequence signal must be present. After improving DNA transformation parameters, such as cAMP and DNA concentration and exposition time of the exogenous DNA, a knockout mutant of *H. parasuis* defective in the *thy* gene, encoding the thymidylate synthase enzyme, has been constructed. Data presented in this work open the possibility for the functional analysis of genes involved in the infectious process of this animal pathogen.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Haemophilus parasuis*; DNA transformation; Knockout mutants; Genetic manipulation

1. Introduction

Haemophilus parasuis is a Gram-negative bacterium belonging to the family *Pasteurellaceae*. This

bacterial species is an important respiratory-tract swine pathogen that is the etiological agent of porcine polyserositis and arthritis syndrome, known as Glässer's disease (Kilian, 1976). *H. parasuis* infections produce significant mortality and morbidity in pig farms, giving rise to important economic losses in this industry. For this reason, the knowledge of virulence mechanisms of this organism, as well as its molecular biology, are relevant work-fields in progress. Recently, several putative virulence genes have

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5812615;
fax: +34 93 5812387.

E-mail address: montserrat.llagostera@uab.es (M. Llagostera).

¹ A. Bigas and M.E. Garrido should be regarded as joint first authors in this work.

been identified for *H. parasuis* (Hill et al., 2003), however, no systems for genetic manipulation are known, so, as a consequence, it has not been possible to obtain targeted mutants of *H. parasuis* so far.

It is known that several members of the family *Pasteurellaceae*, such as *H. influenzae* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, present a natural transformation system (Albritton et al., 1984; Wang et al., 2002) if DNA contains a specific DNA-uptake signal sequence (USS) (Smith et al., 1999; Davidsen et al., 2004). In the present work, and taking advantage of this capacity of some *Pasteurellaceae* species, a transformation methodology for *H. parasuis* has been developed. Furthermore, this method has been used to construct an *H. parasuis* strain defective in *thy* gene that encodes the thymidylate synthase enzyme. This is the first description of a knockout mutant for *H. parasuis*.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids, growth conditions and genetic methods

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains were grown in either Luria-Bertani rich medium (Sambrook et al., 1989) or AB minimal medium (Clark and Maaloe, 1967), with glucose (0.2%) and casamino acids (0.4%). *H. parasuis* was cultured on chocolate blood agar plates (BioMérieux, Inc.). Antibiotic concentrations employed for *E. coli* cultures have been described before (Cárdenas et al., 2001). For *H. parasuis*, streptomycin, kanamycin and trimethoprim were used at 150, 50 and 100 µg/ml, respectively. Plasmid and chromosomal DNA extractions were

Table 1
Bacterial strains and plasmids used in this work

	Relevant features	Source or reference
Bacterial strain		
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE4 ΔlacU169</i> (Ø80 <i>lacZΔM15</i>)	Sambrook et al. (1989)
HB101	<i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> <i>supE4 hsdS20 recA13 ara-1 proA2</i>	Clontech
KL742	<i>lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i> λ^- <i>thyA748::Tn10 rph-1 deo-77</i>	CGSC (Coli Genetic Stock Center)
MC1061 (λ pir)	<i>hsdR mcrB araD139 Δ(araABC-leu)7679 ΔlacX74</i> <i>gal1 galK rpsL thi</i> , lysogenized with λ pir bacteriophage	This laboratory
<i>H. parasuis</i>		
HP100	Parenteral strain, serotype 5, isolated from a naturally infected pig	I. Badiola (IRTA, Spain)
HP101	Str ^R , spontaneous mutant of HP100	This work
HP102	As HP100, but <i>thy</i>	This work
Plasmid		
pBBR1MCS	A broad-host-range cloning vector, Cm ^R Mob ⁺	BioTechniques
pGEM-T	PCR cloning vector, Ap ^R	Promega
pGP704	Suicide and narrow-broad-host vector, Ap ^R	Herrero et al. (1990)
pHRP309	A broad-host-range cloning vector, Gm ^R Mob ⁺	Parales and Harwood (1993)
pRK2013	Mob ⁺ Tra ⁺ Km ^R	Ditta et al. (1985)
pUA520	As pBBR1MCS, but Km ^R	This laboratory
pUA658	As pGP704, but Gm ^R	This laboratory
pUA1056	As pUA520, but carrying a 4-kb fragment containing the <i>H. parasuis thyA</i> gene	This work
pUA1057	As pHRP309, but carrying the <i>H. parasuis rps12</i> gene	This work
pUA1058	As pHRP309, but carrying the <i>H. parasuis rps12</i> gene without DNA USS sequence	This work
pUA1059	As pUA658, but carrying a 4-kb fragment containing the <i>H. parasuis thyA</i> gene interrupted by Km cassette	This work

carried out as reported (Bosch et al., 2001). DNA techniques were performed as described (Sambrook et al., 1989). *E. coli* mating experiments and site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction (PCR) were performed as reported before (Calero et al., 1994; Ho et al., 1989). Site-directed mutations obtained were corroborated by sequencing by the dideoxy method on an ALF Sequencer (Pharmacia Biotech).

2.2. Isolation of *H. parasuis thy* and *rps12* genes

To isolate the *H. parasuis thy* gene, a genomic library of this organism was constructed by partial digestion of chromosomal DNA with *Sau3AI* and ligating fragments of 3–6 kb into the *BamHI* site of plasmid vector pUA520. This library was transformed into the *E. coli* DH5 α strain and afterwards by triparental mating into the *E. coli thyA* (KL742) strain, using the mobilising functions of the broad-host-range plasmid pRK2013 in *E. coli* HB101. The mixture was plated in AB minimal medium with glucose and in the

absence of exogenous thymidine. A recombinant plasmid, pUA1056, able to abolish the thymidine deficiency of the KL742 *E. coli* strain, and containing an insert of approximately 4 kb, was isolated. The *H. parasuis thy* gene was identified in this 4-kb fragment by subcloning and sequencing by the methodology indicated above.

To isolate and clone the *H. parasuis rps12* gene that encodes a ribosomal protein, a comparison of the sequence of the *rps12* gene of *P. multocida* and *H. influenzae* and its surrounding regions was carried out. This analysis revealed a strong conservation of these sequences in both bacterial species. Thus, two oligonucleotides, flanking the *P. multocida rps12* gene, were designed (Table 2) to amplify, by PCR, the *H. parasuis rps12* from its chromosomal DNA. The PCR product was cloned into the pGEM-T vector and the inserted region was sequenced to confirm the presence of the *H. parasuis rps12* gene. The entire nucleotide sequences of both *thy* and *rps12* genes have been deposited in the GenBank under accession numbers AY262733 and AY236072, respectively.

Table 2
Oligonucleotide primers used in this work

Primer	Sequence ^{a, b}	Position
Rps12PMup ^c	5'-TGAATAATTGTTAAAACACTGC-3'	-30 ^d
Rps12PMdw ^c	5'-ACTAATTTAGACGTTTGGCC-3'	+412 ^d
Rps12Hpup ^e	5'-CCCGGGTGAATAATTGTTAAAACACTGG-3'	-30 ^d
Rps12Hpdw ^e	5'-CCCGGGGGAGAACCATTAAGATTTAG-3'	+384 ^d
RpsHptailup ^e	5'-CCCATCCACTAAAAACGAGCATTACGTAAGTATGCCG-3'	+141 ^d
RpsHptaildw ^e	5'-CGTTTTTAGTGGATGGGTTTTTAGGTGTAGTTGTGTATAC-3'	+131 ^d
Extthyup ^f	5'-GTAAGCTATTTGGCAGTGTGG-3'	-Almost 2000 ^g
Extthydw ^f	5'-ACGAACTTTACCAGAATAG-3'	+Almost 2000 ^g
Thytailup ^f	5'-CCCATCCACTAAACTTAAACGGAATTCGTGGTGAGATTTATACGTTTC-3'	+419 ^g
Thytaildw ^f	5'-CGTTTAAAGTTTAGTGGATGGGGATTATCTACGCCACGTTTC-3'	+418 ^g
Thyup ^h	5'-TACTCCTTATCTCTCTGTAC-3'	-85 ^g
Thydw ^h	5'-AATAAAGTCTGTAAGATAGC-3'	+886 ^g
Kmup ⁱ	5'-GAATTCGTAAGGTTGGGAAGCCCTGC-3'	-110 ^j
Kmdw ⁱ	5'-GAATTCGGTCGGTCATTCGAACCCC-3'	+825 ^j

^a When present, restriction sites are shown in italics.

^b When present, complementary tails are underlined.

^c Primers used to obtain the *H. parasuis rps12* gene.

^d Position of the 5'-end of the oligonucleotide with respect the translational starting point of the *H. parasuis rps12* gene.

^e Primers used to remove the DNA USS of *H. parasuis rps12* gene.

^f Primers used to generate an *EcoRI* restriction site inside the *H. parasuis thyA* gene.

^g Position of the 5'-end of the oligonucleotide with respect the translational starting point of the *H. parasuis thyA* gene.

^h Primers used to confirm the *thyA* mutation genotype of *H. parasuis*.

ⁱ Primers used to amplify the Km cassette from Tn5.

^j Position of the 5'-end of the oligonucleotide with respect the translational starting point of the Km cassette from Tn5.

2.3. Transformation methodology

Transformation assays were routinely performed on agar plates. Recipient bacteria (HP100 strain) were grown on chocolated blood plates overnight (BioMérieux, Inc.) at 37 °C and resuspended in TYE broth (O'Reilly and Niven, 1986) to achieve an $OD_{660} = 2$ (about 10^{10} cfu/ml). Then, a 20- μ l aliquot of a 1/10 dilution of the suspension was spotted onto a prewarmed chocolated blood plate and spread in a small area (diameter of about 10 mm); next, 20 μ l of cAMP at the appropriate concentration and 10 μ l of donor DNA, resuspended in TE buffer, were added and mixed with the bacterial cells by using a loop. The mixture was incubated for the required time at 37 °C. Afterwards, bacterial cells were scraped up, resuspended in 300 μ l of TYE broth and plated onto selective agar chocolated blood plates, which were incubated at 37 °C for 2 days. Likewise, serial dilutions of cells were also plated without any antibiotic to determine the number of CFU, used to calculate the frequency of transformation. In all experiments, 10 μ l of TE buffer was added to a bacterial spot, instead of donor DNA, as a negative control.

3. Results and discussion

3.1. Natural transformation of *H. parasuis* requires cAMP

It has been reported that the addition of cAMP increases the transformation efficiency in *H. influenzae* (Wise et al., 1973), although this nucleotide is not the only requirement for transformation to take place in this organism (Herriott et al., 1970; Macfadyen et al., 2001). To analyse the putative ability to transform *H. parasuis* wild type cells, the effect of the cAMP concentration in the uptake of exogenous DNA was determined. The DNA donor was obtained from an *H. parasuis* Str^R strain, previously selected by plating the wild type strain on chocolated blood agar plates supplemented with 150 μ g/ml of streptomycin. In the transformation experiments, the addition of increasing concentrations of cAMP (from 0.05 to 8 mM) to the cells spotted in chocolated blood agar produces a progressive increase of the number of Str^R transfor-

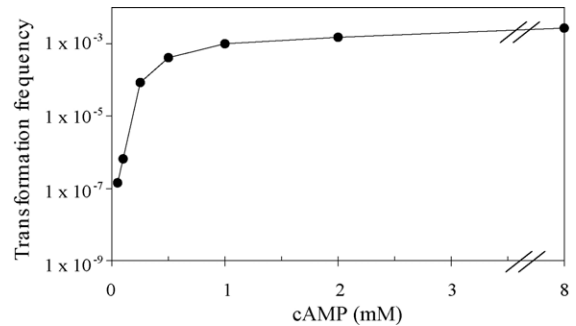


Fig. 1. Effect of different cAMP concentrations on the transformation frequency of *H. parasuis* wild type strain with chromosomal DNA (1 μ g) of an *H. parasuis* spontaneous mutant resistant to streptomycin. Transformation frequency is defined as the number of Str^R transformants per CFU of recipient cells. Data are the averages of three independent experiments.

ants in *H. parasuis* (Fig. 1). Thus, the maximum frequency of transformation was achieved when cAMP was used at a concentration of about 8 mM and no Str^R transformants were obtained in the absence of cAMP, demonstrating that this nucleotide is absolutely necessary for *H. parasuis* cells to be able to incorporate DNA. As a consequence of these data, cAMP at 8 mM was used in the following experiments carried out in this work concerning DNA transformation.

3.2. Improved conditions for DNA transformation of *H. parasuis*

To improve DNA uptake for *H. parasuis* cells, the effect of the following parameters were analysed: (i) DNA concentration, (ii) addition of DNA at different times to cells and cAMP and (iii) time of incubation of the transformation mix before plating. Our results indicate that a saturation effect in the transformation efficiency (about 10^6 transformants per μ g of DNA) is obtained when the chromosomal DNA amount is comprised of between 1 and 5 μ g, and a high efficiency (3×10^5 transformants per μ g of DNA) is found at a very low DNA concentration (0.1 ng) (data not shown). Likewise, the best frequency of transformation is achieved when the DNA is incubated together with the cAMP and cells for 5 h (data not shown).

In contrast with the results reported above, no Gm^R transformants were obtained when the broad-host-range plasmid pHRP309 was used as the donor DNA, regardless of the DNA amount used. However, the

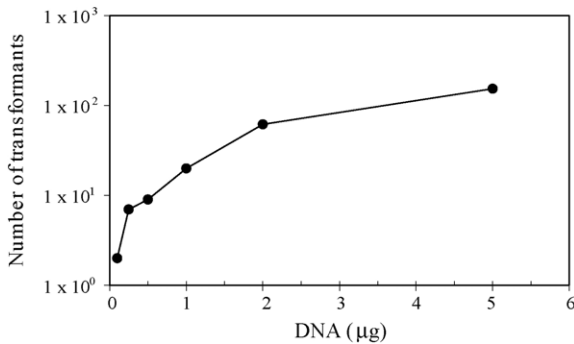


Fig. 2. Number of Gm^R transformants of *H. parasuis* with different amounts of DNA of plasmid pUA1057. Data are the averages of three independent experiments.

presence in this plasmid of the *H. parasuis rps12* gene enables the DNA uptake by *H. parasuis* (Fig. 2). The analysis of 10 Gm^R transformants revealed that in all of them this plasmid was free in the cytoplasm of the *H. parasuis* cells, discarding the possible phenomenon of homologous recombination between both chromosomal and plasmidic *rps12* genes. These results clearly demonstrate that the *rps12* gene, carried on the pHRP309 plasmid, is required for DNA uptake by *H. parasuis* cells, suggesting that the natural transformation of this organism requires the presence of a USS in the donor DNA. A detailed analysis of the *H. parasuis rps12* nucleotide sequence revealed the existence, at 132 pb from the translational starting point, of the ACCGAACTC motif, which is very related to the USS (ACCGCACTT) of *H. influenzae* (Fitzmaurice et al., 1984). To confirm that the ACCGAACTC sequence is required for *H. parasuis* transformation, a derivative of plasmid pUA1057 (pHRP309-*rps12*), lacking this motif, was constructed by PCR overlap extension, using oligonucleotides shown in Table 2. Gm^R transformants were not recovered when the mutagenised plasmid, pUA1058, was used as donor DNA, showing that specific USS must be present in the exogenous DNA for natural transformation to occur in *H. parasuis*.

3.3. Construction of an *H. parasuis thy* knockout mutant

Once a transformation system had been developed in *H. parasuis*, this was used to obtain a mutant in the *thy* gene. First, the *H. parasuis thy* gene was isolated

by complementation of an *E. coli thyA* mutant (see Section 2) and the analysis of its sequence revealed that it contained a USS sequence at 324 pb from its translational starting point. After isolation of *thy* gene, an internal *EcoRI* site was introduced through PCR overlap extension, using oligonucleotides shown in Table 2. Afterwards, a 0.8-kb fragment encoding the kanamycin resistance gene from the Tn5 transposon was obtained by PCR with primers indicated in Table 2, which presented *EcoRI* sites at its 5' ends. This fragment was cloned into the *EcoRI* site of the *thy* gene of *H. parasuis*, previously generated, as indicated above. Finally, the *thy::km* fragment was cloned in the suicide and narrow-host-range plasmid pUA658. The plasmid constructed (pUA1059) was introduced by natural transformation into *H. parasuis* cells and a high number of Km^R transformants was obtained. In these transformants, the resistance to kanamycin could be due to either the integration of pUA1059 plasmid into the chromosome (single crossover) or the exchange of the wild type *thy* gene by the *thy::km* construction (double crossover). In the first case, cells should be Km^R Gm^R, whereas in the second one, Km^R Gm^S. After replica plating, all clones tested were Km^R Gm^S, and PCR analysis of the chromosomal DNA from some of them confirmed that the wild type *thy* gene had been substituted by the mutant copy (data not shown). Furthermore, and as has been described for other bacterial species (Miller, 1992), the *H. parasuis thy* mutant is able to grow on chocolate blood agar plates supplemented with trimetoprim (100 µg/ml), whereas the wild type strain cannot do that.

Results obtained in this work provide the necessary knowledge and tools for the genetic manipulation of *H. parasuis* and open the possibility for the in vivo analyses of the role of its genes in the virulence process of this significant animal pathogen.

Acknowledgements

This work was funded by Grant RTA 03-065 of the INIA (Spain) and 2001SGR-206 of the CUR (Generalitat de Catalunya). A. Bigas and M. E. Garrido are recipients of predoctoral fellowships from the DGU (Generalitat de Catalunya). We are deeply indebted to J. Ruiz and Dra. P. Cortés for their excellent technical assistance and to our English-teaching university

colleague, Mr. Chuck Simmons, for his help in the language revision and correction of this article.

References

- Albritton, W.L., Setlow, J.K., Thomas, M., Sottnek, F., Steigerwalt, A.G., 1984. Heterospecific transformation in the genus *Haemophilus*. *Mol. Gen. Genet.* 193, 358–363.
- Bosch, M., Tarragó, R., Garrido, M., Campoy, S., Fernández de Henestrosa, A., Pérez de Rozas, A., Badiola, I., Barbé, J., 2001. Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by Fur protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 35–40.
- Calero, S., Fernandez de Henestrosa, A.R., Barbé, J., 1994. Molecular cloning, sequence and regulation of expression of the *recA* gene of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol. Gen. Genet.* 242, 116–120.
- Cárdenas, M., Fernández de Henestrosa, A.R., Campoy, S., Pérez de Rozas, A.M., Barbé, J., Badiola, I., Llagostera, M., 2001. Virulence of *Pasteurella multocida recA* mutants. *Vet. Microbiol.* 80, 53–61.
- Clark, A.J., Maaloe, O., 1967. DNA replication and the division cycle of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 23, 99–112.
- Davidson, T., Rodland, E.A., Lagesen, K., Seeberg, E., Rognes, T., Tonjum, T., 2004. Biased distribution of DNA uptake sequences towards genome maintenance genes. *Nucleic Acids Res.* 32, 1050–1058.
- Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X.W., Finlay, D.R., Guiney, D., Helinski, D.R., 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13, 149–153.
- Fitzmaurice, W.P., Benjamin, R.C., Huang, P.C., Scocca, J.J., 1984. Characterization of recognition sites on bacteriophage HP I cI DNA which interact with the DNA uptake system of *Haemophilus influenzae*. *Gene* 31, 187–196.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172, 6557–6567.
- Herriott, R.M., Meyer, E.M., Vogt, M., 1970. Defined nongrowth media for stage II development of competence in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 101, 517–524.
- Hill, C.E., Metcalf, D.S., MacInnes, J.I., 2003. A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 96, 189–202.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59.
- Kilian, M., 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* 93, 9–62.
- Macfadyen, L.P., Chen, D., Vo, H.C., Liao, D., Sinotte, R., Redfield, R.J., 2001. Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by availability of nucleic acid precursors. *Mol. Microbiol.* 40, 700–707.
- Miller, J.H., 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
- O'Reilly, T., Niven, D.F., 1986. Yeast extract broth as a culture medium for *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* to be used as challenge inocula. *Can. J. Vet. Res.* 50, 441–443.
- Parales, R.E., Harwood, C.S., 1993. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for Gram-negative bacteria. *Gene* 133, 23–30.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Smith, H.O., Gwinn, M.L., Salzberg, S.L., 1999. DNA uptake signal sequences in naturally transformable bacteria. *Res. Microbiol.* 150, 603–616.
- Wang, Y., Goodman, S.D., Redfield, R.J., Chen, C., 2002. Natural transformation and DNA uptake signal sequences in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Bacteriol.* 184, 3442–3449.
- Wise Jr., E.M., Alexander, S.P., Powers, M., 1973. Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate as a regulator of bacterial transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 471–474.

3.2. ARTÍCULO 2

Anna Bigas¹
M. Elena Garrido²
Ignacio Badiola²
Jordi Barbé^{1,2}
Montserrat Llagostera^{1,2*}

¹Department of Genetics and Microbiology, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain

²Animal Health Research Center (CReSA), Autonomous University of Barcelona, and Institute for Agriculture and Food Technology (UAB-IRTA), Bellaterra, Spain

Received 24 September 2006
Accepted 8 November 2006

*Corresponding author:
M. Llagostera
Department of Genetics and Microbiology
Autonomous University of Barcelona
08193 Bellaterra, Spain
Tel. +34-935812615. Fax +34-935812387
E-mail: Montserrat.Llagostera@uab.es

Colonization capacity and serum bactericidal activity of *Haemophilus parasuis thy* mutants

Summary. The bacterial *thyA* gene encodes the enzyme thymidylate synthase, which is essential for dTMP synthesis and, consequently, for DNA replication. In this work, a *Haemophilus parasuis thyA* mutant was constructed in order to analyze its colonization characteristics and its capacity to generate serum bactericidal activity in infected guinea pigs. The data showed that colonization by the *H. parasuis thyA* mutant was much less than that of the wild-type strain. Nevertheless, the mutant generated a strong immunogenic response in the host, as detected by measuring serum bactericidal activity. [*Int Microbiol* 2006; 9(4):297-301]

Key words: *Haemophilus parasuis* · colonization capacity · bactericidal activity · *thy* mutants · vaccine strains · immunogenic response

Introduction

Haemophilus parasuis is a gram-negative bacterium belonging to the *Pasteurellaceae* family. This organism is an important respiratory-tract pathogen in swine and the etiological agent of porcine polyserositis and arthritis syndrome, known as Glässer's disease [11]. *H. parasuis* causes high mortality and morbidity in pig farms, leading to significant economic losses. Although several approaches have been tested [19,25], the development of an effective general vaccination against *H. parasuis* has yet to be achieved.

Thymine is an absolute requirement for chromosome bacterial replication; thus, its biosynthesis is essential for bacterial cell survival and growth. Bacteria synthesize deoxythymidylate monophosphate nucleotide (dTMP) via the

methylation of deoxyuridylate (dUMP). The reaction is catalyzed by thymidylate synthase, which is encoded by the *thyA* gene [3,23]. Bacterial *thyA* mutants cannot replicate their DNA in the absence of exogenous precursors, such as thymine or thymidine, in the growth medium [18] and they eventually die. In fact, inactivation of the *thyA* gene has been proposed as a strategy for the biological containment of bacteria in the environment [15]. Nevertheless, analyses of the protection and colonization abilities of *thyA* mutants from different bacterial pathogens have yielded contradictory results. For example, *Thy* mutants of *Legionella pneumophila*, which inhabit phagosomes [2], lose their infectivity in monocyte cultures [17]. By contrast, the virulence of *Salmonella enterica* Typhimurium *thy* mutants is recovered in the presence of the appropriate thymine concentration in the host [13]. It has been determined that *thyA* mutants of *Shigella*

flexneri are much less virulent than wild-type [1,5,20], whereas in the baby-mouse cholera model *Vibrio cholerae* *thy* mutants are able to colonize the animals and are immunogenic in rabbits as well [26]. Taken together, these findings show that the pathogenicity of bacterial *thy* mutants depends on the bacterial species. In this study, the colonization capacity of a *H. parasuis thyA* mutant and its ability to induce an immunogenic response in a guinea pig model of lung infection were analyzed.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions. Bacteria used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains were grown in LB medium [24], and *H. parasuis* on chocolate-blood agar plates (Biomérieux) and in tryptone-yeast extract (TYE) broth [21]. When necessary, *H. parasuis* strains were grown in the presence of kanamycin (50 µg/ml), gentamycin (20 µg/ml), or trimethoprim (100 µg/ml).

Genetic methods. The *H. parasuis thyA* mutant was obtained by natural transformation as previously described [4]. Briefly, the *H. parasuis thyA* gene was isolated by complementation of an *E. coli thyA* mutant using a genomic library constructed with the broad-host-range vector pUA520. Among several plasmids of the library that were able to complement the *E. coli thyA* gene, one of them was kept and sequenced to confirm the presence of the *H. parasuis thyA* gene (GenBank accession number AY262733). A 0.8-kb fragment encoding the kanamycin resistance gene from the Tn5 transposon was cloned into the *H. parasuis thy* gene in internal *EcoRI* sites previously generated by PCR overlap extension. The *thy::Km* fragment was then cloned into the suicidal and narrow-host-range plasmid pUA658, which was transformed into *H. parasuis* cells (Fig. 1A). The resulting *Km^R* and *Gm^S* clones were analyzed by PCR to confirm that the wild-type *thy* gene had been replaced by the mutant copy (Fig. 1B), using primers Thyup 3'-TACTCCTTATCTCTCTGTAC-5' and Thydw 3'-AATAAAGTCTGTAA-GATAGC-5'. In concordance with the fact that mutations in the thymidylate

synthase gene (*thyA*) confer resistance to trimethoprim in *E. coli* [16], the *H. parasuis thy* mutant, but not the wild-type, was able to grow on chocolate-blood agar plates supplemented with trimethoprim (Fig. 1C).

Animal experiments. Guinea pigs were used as the animal model. The animals were kept at room temperature in individual enclosures, acclimated for 6 days prior to inoculation, and received water and food *ad libitum*. The inoculations were administered intratracheally [22] and consisted of 0.2 ml of bacterial suspension in TYE broth, equivalent to 10¹⁰ cfu/ml. The animals were killed at 1, 4, 7, and 11 days after inoculation by intraperitoneal injection of pentobarbital. Before the first inoculation, one animal was killed and used as a control. Blood samples were collected from the heart of the guinea pig immediately before the animals were killed. Sera were incubated at 37°C, centrifuged, aliquoted, and stored at -20°C until use. To recover *H. parasuis* from infected animals, samples were taken aseptically from guinea-pig lungs. Each lung sample was divided into two equal-sized parts. One part was stored at -80°C for DNA extraction using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen) followed by PCR amplification with primers described earlier [10]. The other part was homogenized and plated onto chocolate-blood agar plates, which were incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% carbon dioxide.

Protein and immunoblot studies. To detect antibodies against *H. parasuis*, outer-membrane proteins from the wild-type strain were extracted as previously reported [8], with minor modifications. Protein concentration was measured as described before [14] and protein profiles were examined by 12% SDS-PAGE [12]. The antigenicity of sera was determined by Western blot analysis as previously described [8], with slight modifications. Briefly, the SDS-PAGE gels of outer-membrane proteins extracted from the *H. parasuis* wild-type were transferred to Immobilon-P membranes (Millipore) using a Hoefer miniVe (Amersham Pharmacia Biotech) TransBlot Cell. Membranes were air-dried for 20 min and blocked for 2 h in blocking solution (200 ml PBS buffer, 2 g blocking reagent, and 0.2 ml Tween 20). The transferred proteins were immunostained overnight with a specific serum at a dilution of 1/100 in blocking solution. Afterwards, membranes were washed three times with PBS and incubated in a 1/30,000 dilution in blocking solution of anti-guinea pig IgG (Sigma) for 1 h. Membranes were again washed three times with PBS, and reactive polypeptides were visualized in alkaline phosphate buffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM MnCl₂) containing 4-nitro blue tetrazolium chloride and X-phosphate-

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

	Relevant features	Source or reference
Bacterial strains		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE4 ΔlacU169 (Ø80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	[24]
KL742	<i>λ⁻ thyA748::Tn10 rph-1 deo-77</i>	CGSC(Coli Genetic Stock Center)
<i>Haemophilus parasuis</i>		
HP100	Parenteral strain, serotype 5, isolated from a naturally infected pig	I. Badiola (IRTA, Spain)
HP102	HP100 <i>thy Km^R</i>	This laboratory
Plasmids		
pBBR1MCS	A broad-host-range cloning vector <i>Cm^R Mob⁺</i>	BioTechniques
pGEM-T	PCR cloning vector <i>Ap^R</i>	Promega
pGP704	Suicide and narrow-broad-host vector <i>Ap^R</i>	[9]
pRK2013	<i>Mob⁺ Tra⁺ Km^R</i>	[6]
pUA520	pBBR1MCS <i>Km^R</i>	This laboratory
pUA658	pGP704 <i>Gm^R</i>	This laboratory
pUA1059	pUA658 carrying a 4-kb fragment containing the <i>H. parasuis thyA</i> gene interrupted with <i>Km</i> cassette <i>Km^R</i>	This work

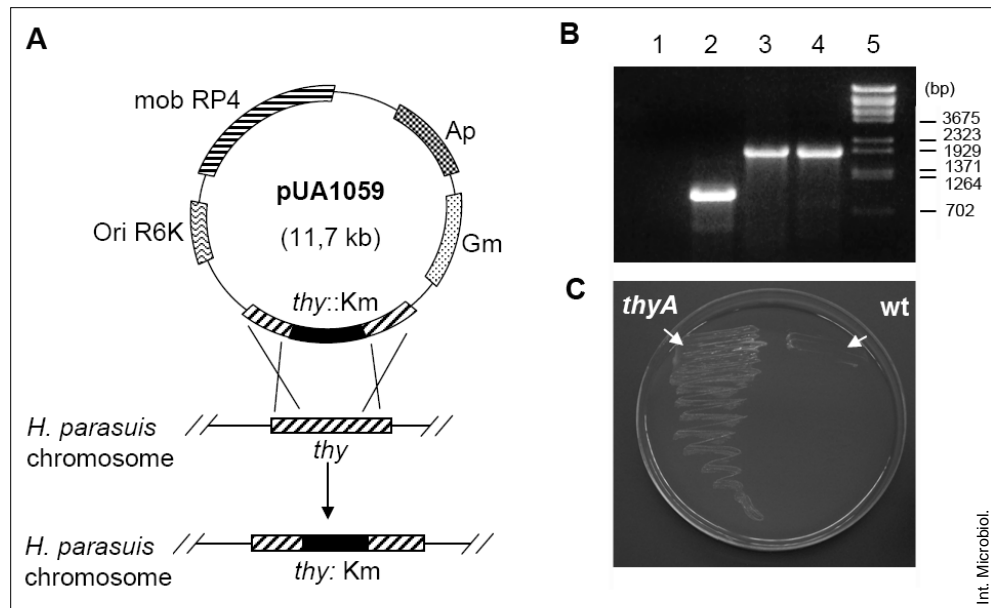


Fig. 1. Construction of the *Haemophilus parasuis* *thyA* strain. (A) Mutant construction. The *thy::km* fragment was cloned into suicidal vector pUA658, yielding pUA1059. The construct was introduced into *H. parasuis* wild-type by natural transformation. (B) PCR analysis of chromosomal DNA from the *H. parasuis* *thyA* mutant using Thyup and Thydw oligonucleotides. The results of PCR reactions using chromosomal DNA from *H. parasuis* *thyA* (lane 4), pUA1059 vector (lane 3), and chromosomal DNA of the *H. parasuis* wild-type strain (lane 2), as well as the negative control (lane 1). *BstEII* digested- λ DNA was used as the molecular size marker (lane 5). (C) Phenotypic test of the presence of the *thyA* mutation. The *Thy* mutant, but not the wild-type strain, was able to grow on plates supplemented with trimethoprim.

5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP, 4-toluidine salt), as recommended by the supplier (Roche Diagnostics).

Bactericidal assays. The method used was basically as already described [7], with slight modifications. Briefly, 10 μ l containing 10^6 cells of the wild-type strain were added to 190 μ l of the serum samples, which had been diluted 50% by the addition of PBS, or to the control solution containing PBS alone. All of the samples were incubated at 37°C with shaking for 30 min. Serial dilutions of each reaction were plated onto chocolate-blood agar, incubated for 24 h, and the resulting colonies were counted.

Results and Discussion

Inactivation of *H. parasuis* colonization ability.

H. parasuis wild-type or strain *thyA* was detected in the lungs of guinea pigs inoculated with the respective strain, as shown by PCR analysis using oligonucleotides corresponding to an internal sequence of the *H. parasuis* 16S rRNA gene [10]. However, when samples of homogenized infected lungs were plated on chocolate-blood agar plates, only colonies of the *H. parasuis* wild-type strain were recovered (days 4, 7, and 11 after inoculation). These data indicated that bacterial proliferation in the lungs of animals infected with the *thyA* mutant was too low to achieve a cellular concentration high enough to be detected by the plating method. Thus, the colonization

capacity of the *H. parasuis* *thyA* mutant was significantly impaired.

Analysis of serum bactericidal activity induced by *H. parasuis* *thyA*.

To determine the serum dilution factor yielding the greatest decrease in bacterial cell survival, serum from guinea pigs killed 11 days after inoculation with *H. parasuis* wild-type strain was diluted by 10, 25, or 50% and then added to cultures of *H. parasuis* wild-type cells for 30 min. As shown in Fig. 2A, the greatest decrease in cell survival was observed with the 50% serum dilution. Accordingly, this dilution factor was used in subsequent assays.

Sera from guinea pigs killed 1, 4, 7, or 11 days after inoculation with either wild-type *H. parasuis* or the *thyA* mutant were then tested for bactericidal activity against *H. parasuis* wild-type strain. A similar decrease in bacterial survival was noted with sera obtained from wild-type- and *thyA*-infected animals. These results clearly indicate that the immunological response provoked by the two strains in infected animals was the same. In agreement with these data, Western blot analysis demonstrated the presence of antibodies against *H. parasuis* outer-membrane proteins in sera from guinea pigs killed 11 days after infection with either wild-type or *thyA* cells (data not shown).

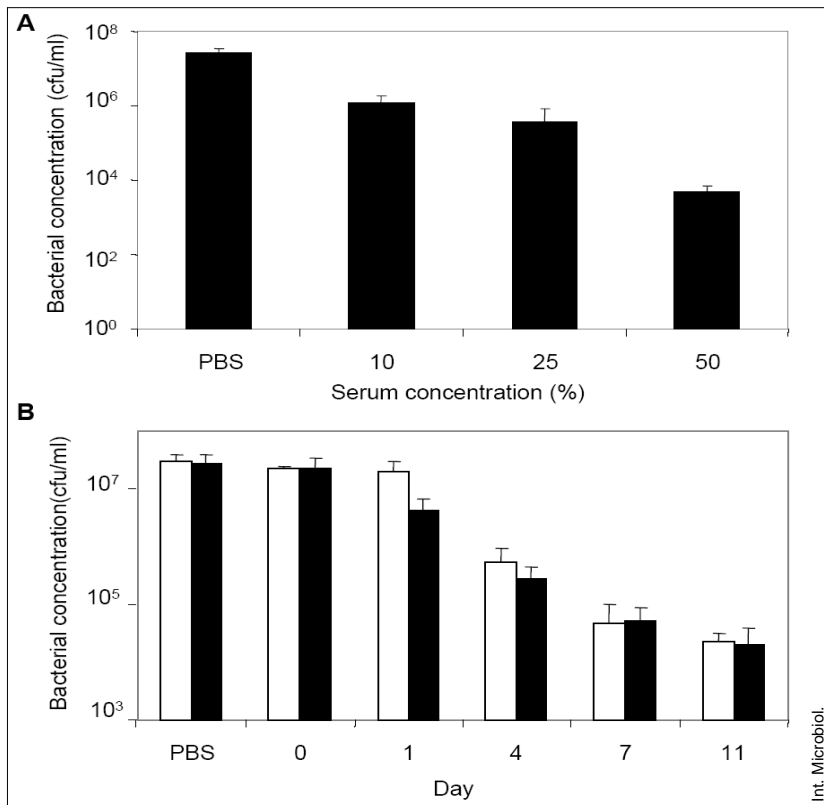


Fig. 2. Bactericidal assays. **(A)** The optimal conditions for demonstrating the bactericidal activity of serum from infected animals were determined by testing 10, 25, or 50% dilutions of serum prepared from guinea pigs killed 11 days after inoculation with the wild-type strain. Maximum bactericidal activity was obtained with the 50% dilution. **(B)** Bactericidal effect of a 50% dilution (in PBS) of sera prepared from guinea pigs infected with either *Haemophilus parasuis* wild-type (black bars) or strain *thyA* (white bars) upon cells of these strains.

The results of this study show that, despite differences in their colonization capacities, *H. parasuis thyA* and wild-type cells are able to induce the same level of serum bactericidal activity in infected guinea pigs. These results provide a basis to evaluate the use of *H. parasuis thyA* mutant as a vaccine strain. Furthermore, our data showed that the permanence time of the *H. parasuis thyA* mutant in the lung of infected animals is sufficient to induce an immunological response by the host.

Acknowledgements. This work was funded by grants RTA 03-065, AGL-2005-03574/Gan and 2005-SGR-00533 from INIA (Spain), MEC (Spain) and DURSI (Generalitat de Catalunya), respectively. A. Bigas is a recipient of a predoctoral fellowship from DURSI (Generalitat de Catalunya). We are deeply indebted to J. Ruiz and Dr. P. Cortés for their excellent technical assistance.

References

- Ahmed ZU, Sarker MR, Sack DA (1990) Protection of adult rabbits and monkeys from lethal shigellosis by oral immunization with a thymine-requiring and temperature-sensitive mutant of *Shigella flexneri* Y. *Vaccine* 8:153-158
- Alonso A, García-del Portillo F (2004). Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol* 7:181-191
- Benkovic SJ (1980) On the mechanism of action of folate- and bioprotein-requiring enzymes. *Annu Rev Biochem* 49:227-251
- Bigas A, Garrido, ME, Pérez de Rozas AM, Badiola I, Barbé J, Llagostera M (2005) Development of a genetic manipulation system for *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol* 105:223-228
- Cersini A, Salvia AM, Bernardini ML (1998) Intracellular multiplication and virulence of *Shigella flexneri* auxotrophic mutants. *Infect Immun* 66:549-557
- Ditta G, Schmidhauser T, Yakobson E, Lu P, Liang XW, Finlay DR, Guiney D, Helinski DR (1985) Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13:149-153
- Furano K, Campagnari AA (2003) Inactivation of the *Moraxella catarrhalis* 7169 ferric uptake regulator increases susceptibility to the bactericidal activity of normal human sera. *Infect Immun* 71:1843-1848
- Garrido ME, Bosch M, Medina R, Bigas A, Llagostera M, Pérez de Rozas AM, Badiola I, Barbé J (2003) *fur*-independent regulation of the *Pasteurella multocida hbpA* gene encoding a haemin-binding protein. *Microbiology* 149: 2273-2281
- Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172:6557-6567
- Jung K, Chae C (2004) In-situ hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in naturally infected pigs. *J Comp Pathol* 130:294-298
- Kilian M (1976) A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. *J Gen Microbiol* 93:9-62
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Leung KY, Finlay BB (1991). Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11470-11474
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275

15. Mekalanos J, Goldberg I, Miller V, et al. (1985) Genetic construction of cholera vaccine prototypes. In: Lerner RA, Chanock RM, Brown F (eds). Vaccines 85: Molecular and chemical basis of resistance to parasitic, bacterial, and viral diseases. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 101-105
16. Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
17. Mintz CS, Chen JX, Shuman HA (1988) Isolation and characterization of auxotrophic mutants of *Legionella pneumophila* that fail to multiply in human monocytes. Infect Immun 56:1449-1455
18. Neuhard J, Kelln RA (1996) Biosynthesis and conversions of pyrimidines. In Neidhart FC, et al. (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, pp 580-599
19. Oliveira S, Pijoan C (2004) *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Vet Microbiol 99:1-12
20. Okada N, Sasakawa C, Tobe T, et al. (1991) Virulence-associated chromosomal loci of *Shigella flexneri* identified by random Tn5 insertion mutagenesis. Mol Microbiol 5:187-195
21. O'Reilly T, Niven DF (1986) Tryptone-yeast extract broth as a culture medium for *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* to be used as challenge inocula. Can J Vet Res 50:441-443
22. Rapp-Gabrielson VJ, Gabrielson DA, Schamber GJ (1992) Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. Am. J Vet Res 53:987-994.
23. Ross P, O'Gara F, Condon S (1990) Cloning and characterization of the thymidylate synthase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl Environ Microbiol 56:2156-2163
24. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
25. Tadjine M, Mittal KR, Bourdon S, Gottschalk M (2004) Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and study of their protective role in mice. Microbiology 15: 3935-3945
26. Valle E, Ledon T, Cedré B, et al. (2000) Construction and characterization of a nonproliferative El Tor cholera vaccine candidate derived from strain 638. Infect Immun 68:6411-6418

Capacidad de colonización y actividad bactericida en suero por mutantes *thy* de *Haemophilus parasuis*

Resumen. El gen bacteriano *thyA* codifica la enzima timidilato sintasa, que es esencial para la síntesis de dTMP y, en consecuencia, para la replicación del DNA. En este trabajo se ha construido un mutante *thyA* de *Haemophilus parasuis* para analizar sus características de colonización, así como la capacidad de generar actividad bactericida en suero en cobayas infectadas. Los datos obtenidos demuestran que la capacidad de colonización del mutante *thyA* de *H. parasuis* es muy reducida con respecto a la cepa tipo salvaje. Sin embargo, el mutante *thyA* de *H. parasuis* origina un elevado nivel de respuesta inmunogénica en el huésped, como se detecta midiendo la actividad bactericida del suero. [Int Microbiol 2006; 9(4):297-301]

Palabras clave: *Haemophilus parasuis* · capacidad de colonización · actividad bactericida · mutantes *thy* · cepas vacunales · respuesta inmunogénica

Capacidade de colonização e de geração de atividade bactericida em soro por mutantes *thy* de *Haemophilus parasuis*

Resumo. O gene bacteriano *thyA* codifica a enzima timidilato sintase, que é essencial para a síntese de dTMP e, em consequência, para a replicação do DNA. Neste trabalho se construiu um mutante *thyA* de *Haemophilus parasuis* para analisar suas características de colonização, assim como a capacidade de gerar atividade bactericida em soro de cobaias infectadas. Os dados obtidos demonstram que a capacidade de colonização do mutante *thyA* de *H. parasuis* é muito reduzida em relação à cepa tipo selvagem. No entanto, o mutante é capaz de gerar um elevado nível de resposta imunológica no hospedeiro quando se mede atividade bactericida do soro. [Int Microbiol 2006; 9(4):297-301]

Palavras chave: *Haemophilus parasuis* · capacidade de colonização · atividade bactericida · mutantes *thy* · cepas vacinales · resposta imunogénica

3.3. ARTÍCULO 3

Non-viability of *Haemophilus parasuis fur*-defective mutants

Anna Bigas^a, M^a. Elena Garrido^b, Ignacio Badiola^b,
Jordi Barbé^{a,b}, Montserrat Llagostera^{a,b,*}

^a Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

^b Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona - Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (UAB-IRTA), Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

Received 3 March 2006; received in revised form 22 June 2006; accepted 3 July 2006

Abstract

By complementation of an *Escherichia coli fur* mutant, the *Haemophilus parasuis fur* gene has been isolated from a genomic library of this organism. The *H. parasuis fur* gene is the distal one of a three-gene operon. Two genes placed upstream of the *H. parasuis fur* open-reading frame encode for a hypothetical protein and a flavodoxin, respectively. Attempts performed to isolate an *H. parasuis fur*-defective mutant either through manganese-resistance selection or exchange markers were unsuccessful. Likewise, anaerobic growth conditions do not enable the attainment of *H. parasuis fur*-defective mutants either. Nevertheless, *H. parasuis* clones carrying a knockout mutation in the chromosomal *fur* gene by insertion of a Km^R cassette were obtained when a stable plasmid, containing an additional copy of the transcriptional unit to which the *fur* gene belongs, was present. Likewise, the presence of a plasmid in which the *H. parasuis fur* gene is under the control of the *Escherichia coli tac* promoter allows for the isolation of *fur*::Km mutants of this organism. Nonetheless, no *fur*-defective mutants may be isolated from *H. parasuis* cells harbouring a stable plasmid in which only the single *fur* gene is contained. These data clearly indicate that *H. parasuis* cell viability requires the presence of a wild-type *fur* gene.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Haemophilus parasuis*; *fur*-defective mutants; Non-viability; Merodiploid

1. Introduction

Bacterial species have developed several strategies for the uptake of iron which is an essential element for many cellular processes in almost all living organisms (Genco and Dixon, 2001; Ratledge and Dover, 2000).

Some of them produce, and release into the environment, siderophores and other present specific receptors for the different iron-binding host molecules such as haeme, haemoglobin, transferrin or lactoferrin. Most of these receptors are iron-regulated, and are thus known as iron-dependent outer-membrane proteins (IROMPs).

IROMPs can play an important role in bacterial pathogenesis (Ratledge and Dover, 2000); they present a significant immunogenic capability (Choi-Kim et al., 1991) and have several attributes to be good vaccine

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 2615;
fax: +34 93 581 2387.

E-mail address: Montserrat.Llagostera@uab.es (M. Llagostera).

candidates for certain pathogens (Ruffolo et al., 1998). Indeed, some IROMPs of certain bacterial pathogens have been used as vaccines (Myers et al., 1998; West et al., 2001). Nevertheless, this strategy is not always suitable. Thus, and as occurs in *Pasteurella multocida* which displays multiple IROMPs, the inoculation of one of them alone did not confer protection (Bosch et al., 2004).

IROMPs in bacteria are typically under the negative control of the *fur* gene product (Ratledge and Dover, 2000), which harbours a Fe²⁺-dependent DNA-binding activity. The Fur protein also regulates expression of some iron metabolism-related genes (Ratledge and Dover, 2000). For Fur-Fe²⁺ to bind DNA, the presence in the gene promoter of a motif, known as Fur box, is required (Escobar et al., 1999). This motif is present upstream of iron-regulated genes of bacterial species belonging to families as different as *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Neisseriaceae* and *Bacillaceae*. The use of bacterial mutants constitutively expressing IROMPs as potential vaccines has been proposed (Bosch et al., 2004; Furano and Campagnari, 2003).

Haemophilus parasuis is a Gram-negative bacterium belonging to the *Pasteurellaceae* family and an important respiratory-tract swine pathogen (Oliveira and Pijoan, 2004). Although several approaches have been tested (Tadjine et al., 2004), there are not yet any effective general vaccination strategies against *H. parasuis*. Likewise, little information exists about the *H. parasuis* iron metabolism. Thus, only a ferric hydroxamate uptake system and one gene encoding a transferrin-binding protein have been described up to now (Charland et al., 1994; Del Rio et al., 2006). In the perspective of further characterisation of the *H. parasuis* iron-uptake systems, its *fur* gene has been isolated and the effect of a *fur*-knockout mutation in the behaviour of this organism has been analysed.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Bacteria used in this study are listed in Table 1. *E. coli* strains were grown in LB medium (Sambrook et al., 1989). *H. parasuis* was grown on chocolate-blood agar plates (Biomérieux Inc.). When necessary, *H. parasuis*

strains were grown in the presence of kanamycin (50 µg ml⁻¹) or gentamycin (20 µg ml⁻¹). When required, FeSO₄ and X-Gal were used at a final concentration of 100 µM and 40 µg ml⁻¹, respectively. The activity of β-galactosidase was assayed as described (Miller, 1991).

2.2. DNA, RNA techniques and genetic methods

General DNA methodology was as described (Bigas et al., 2005). The entire nucleotide sequence of the *H. parasuis fur* gene and its surrounding region was determined for both DNA strands by the dideoxy method (Sanger et al., 1977) on an ALF Sequencer (Pharmacia Biotech) and has been deposited in the GenBank under Accession Numbers AY161278, DQ275197 and DQ275198, respectively. Total cellular RNA extraction and reverse transcriptase (RT)-PCR analyses were performed as reported (Bosch et al., 2002). Triparental matings with the *H. parasuis* genomic library, using pRK2013 as the mobilising plasmid, to isolate the *fur* gene from this organism, were performed as reported previously in *P. multocida* (Bosch et al., 2001). *E. coli* (Sambrook and Russell, 2001) and *H. parasuis* (Bigas et al., 2005) transformation procedures were carried out as described.

2.3. Construction of broad-host-range plasmids containing the *H. parasuis fur* gene

Several plasmids carrying the *H. parasuis fur* gene were constructed to test if its presence allowed for the obtainment of mutants containing a disruption in its chromosomal *fur* marker. Two of these plasmids (Fig. 1) carried an *H. parasuis* chromosomal region containing either all the *fur* transcriptional unit (pUA1077) or only the *fur* open-reading frame (pUA1078). Another plasmid (pUA1088) carried the *fur* gene directly downstream of the *E. coli tac* promoter (Fig. 1).

To obtain plasmids pUA1077 and pUA1078, *H. parasuis* chromosomal fragments containing either the full transcriptional unit or the *fur* open-reading frame alone were isolated by PCR using Lgtup and Furext2up and Furext2up and Furext2dw pairs of oligonucleotides (Table 2). Fragments amplified were end-filled and were cloned into the *Sma*I-digested pHRP309 vector, a broad-host-range plasmid which

Table 1
Bacterial strains and plasmids used in this work

	Relevant features	Source or reference
Bacterial strain		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE4 ΔlacU169 (Ø80 lacZΔMI 5) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook et al. (1989)
H1780	<i>fur araD139 rpsL150 relA1 fbb5301 fiu::λplacMu53 galK2 ara14 xy15 mt11 tsx33 rpsL31</i>	Achenback and Yang (1997)
MC1061 (λ pir)	<i>hsdR mcrB araD139 Δ(araABC-leu) 7679 ΔlacX74 gal1 galK rpsL thi</i> . Lysogenized with λ pir bacteriophage	This laboratory
<i>H. parasuis</i>		
HP100	Parenteral strain. Serotype 5, isolated from a naturally infected pig	I. Badiola (IRTA, Spain)
HP103	As HP100, but carrying pUA1077. Gm ^R	This work
HP104	As HP100, but carrying pUA1078. Gm ^R	This work
Plasmid		
pBBR1MCS	A broad-host-range cloning vector. Cm ^R Mob ⁺	BioTechniques
pGEM-T	PCR cloning vector. Ap ^R	Promega
pGP704	Suicide and narrow-broad-host vector. Ap ^R	Herrero et al., 1990
pHRP309	A broad-host-range cloning vector. Gm ^R Mob ⁺	Parales and Harwood, 1993
pRK2013	Mob ⁺ Tra ⁺ Km ^R	Ditta et al., 1985
pGEX-4T-1	Glutathione S-transferase Gene Fusion Vector	Amersham Biosciences
pUA520	As pBBR1MCS, but Km ^R	This laboratory
pUA658	As pGP704, but Gm ^R	This laboratory
pUA1059	As pUA658, but carrying a 4-kb fragment containing the <i>H. parasuis thyA</i> gene interrupted with Km cassette. Km ^R	Bigas et al., 2005
pUA1074	As pUA520, but carrying a 4-kb fragment containing the <i>H. parasuis fur</i> gene	This work
pUA1075	As pGEM-T, but carrying a 4-kb fragment containing the <i>H. parasuis fur</i> gene with an internal <i>EcoRI</i> site	This work
pUA1076	As pUA658, but carrying a 4 kb fragment containing the <i>H. parasuis fur</i> gene interrupted with Km cassette. Km ^R	This work
pUA1077	As pHRP309, but carrying a 2070 bp fragment containing the <i>H. parasuis hyp-fldA-fur</i> operon	This work
pUA1078	As pHRP309, but carrying a 975 bp fragment containing the <i>H. parasuis fur</i> open-reading frame	This work
pUA1085	As pGEM-T, but carrying the <i>lacI^q</i> gene and the <i>E. coli tac</i> promoter	This work
pUA1086	As pGEM-T, but carrying the <i>H. parasuis fur</i> open-reading frame	This work
pUA1087	As pUA1085, but carrying also the <i>H. parasuis fur</i> open-reading frame downstream the <i>E. coli tac</i> promoter	This work
pUA1088	As pHRP309, but carrying the <i>H. parasuis fur</i> open-reading frame downstream of the <i>E. coli tac</i> promoter	This work

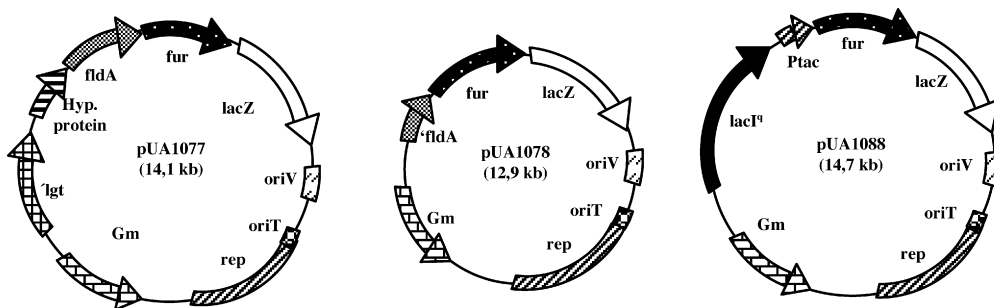


Fig. 1. Diagram of broad-host-range plasmids carrying the *H. parasuis fur* gene constructed in this work. The pUA1077 contains all of the single transcriptional unit, pUA1078 harbours only the *fur* gene and pUA1088 contains the *fur* gene controlled by the *E. coli tac* promoter.

Table 2
Oligonucleotides used in this work

Oligonucleotide	Sequence ^a	Position
Furtailup ^b	5'-CCCATCCACTAAACTTAAACGGAAATTCATGAATTAATATGAACC-3'	+248 ^c
Furtaildw ^b	5'-CGTTTAAAGTTTAGTGGATGGGAGACAGCTTTATTTCG-3'	+247 ^c
Lgtup ^{b,g}	5'-TTCCACGGCGGTTTACTTGG-3'	-1545 ^c
Lgt2up ^d	5'-TTTCGTATTGGGAAGGGGGG-3'	-1572 ^c
Paradw ^b	5'-TGAGTTGTTGTACCATACCC-3'	+almost 3 000 ^c
Para2dw ^d	5'-CACTCGATCACCGAGTTCGC-3'	+almost 3026 ^c
Kmup ^d	5'-GAATTCGTAAGGTTGGGAAGCCCTGC-3'	-110 ^c
Kmdw ^d	5'-GAATTCGGTCGGTCATTTCTGAACCCC-3'	+825 ^c
Hipintup ^f	5'-GAAAATATGCCAAAGGTTGG-3'	-853 ^c
FldAintup ^f	5'-GGTGACCAAGAAGACTATGC-3'	-283 ^c
FldAintdw ^f	5'-ACGGTTTACACGTTCTTCGG-3'	-68 ^c
Furintdw ^f	5'-TGGCTGATTTCACGCTG-3'	+35 ^c
Furextdw ^{g,h}	5'-CAAGCGGCGAGATGTTGCAA-3'	+520 ^c
Furext2up ^h	5'-GTGGATATTCGTGATATTGC-3'	-454 ^c
pGEXup ⁱ	5'-CGGGATCCCCGCATATGTAAGTTTCTGTGTGAA-3'	+1905 ^j
LacIdw ⁱ	5'-GATTTTTGTGATGCTCGTC-3'	-363 ^j
Ndefurup ^k	5'-CATATGTCTGAAGAAAATGTG-3'	+0 ^c
BamHIfurdw ^k	5'-GGATCCAAGCGGCGAGATGTTGC-3'	+520 ^c
Paraintup ^l	5'-ACTGTTCCAGCTAAAAGTACG-3'	+564 ^c
Paraintdw ^l	5'-GATTAACCTTCTGCTTCTACC-3'	+814 ^c

^a When present, restriction sites are shown in italics.

^b Oligonucleotides used to generate an *EcoRI* restriction site inside the *H. parasuis fur* gene.

^c Position of the 5'-end of the oligonucleotide with respect the translational starting point of the *H. parasuis fur* gene.

^d Oligonucleotides used to confirm the *fur* mutation genotype of *H. parasuis fur::km* mutants.

^e Position of the 5'-end of the oligonucleotide with respect the translational starting point of the Km cassette from Tn5.

^f Oligonucleotides used to realize RT-PCR of transcriptional unit.

^g Oligonucleotides used to amplify the fragment contained in the pUA1077.

^h Oligonucleotides used to amplify the fragment contained in the pUA1078.

ⁱ Oligonucleotides used to amplify the fragment contained in the pUA1085.

^j Position of the 5'-end of the oligonucleotide with respect the translational starting point of the *lacI^{fl}* gene.

^k Oligonucleotides used to amplify the *H. parasuis fur* gene contained in the pUA1086.

^l Oligonucleotides used to realize RT-PCR of *fur* downstream gene.

is stable in members of *Pasteurellaceae* (Parales and Harwood, 1993).

To construct pUA1088, the *lacI^{fl}* gene and the *tac* promoter from pGEX-4T-1 were amplified by PCR using pGEXup and LacIdw oligonucleotides (Table 2). These oligonucleotides were designed so that the amplified fragment contained both a *NdeI* and a *BamHI* restriction site downstream of the *tac* promoter. After cloning the PCR product into the pGEM-T vector, the resulting plasmid (pUA1085) was partially digested, firstly with *NdeI* and later with *BamHI*. Afterwards, this linealised plasmid was ligated with the PCR-obtained fragment containing the *fur* gene which had been previously digested with *NdeI* and *BamHI* to generate pUA1087. This plasmid was then digested with *SacI* and *BamHI*, and the 2.7-

kb liberated fragment was end-filled and afterwards inserted into the *SacI*-digested pHRP309, giving rise to pUA1088. Functionality of the *H. parasuis fur* open-reading frame placed downstream of the *E. coli tac* promoter was confirmed by the introduction of pUA1088 into the *E. coli* H1780 strain (a *fur*-deficient mutant containing a fusion between the *fur*-controlled promoter of the *fiu* gene and *lacZ* in its chromosome; Hantke, 1987) and the analysis of its β -galactosidase levels. In the absence of IPTG, the β -galactosidase level of H1780 (pUA1088) cells was of 131 Miller Units, whereas in the presence of IPTG the value obtained was of 73 Miller Units, measured as described before (Miller, 1991). These data clearly demonstrate that the *H. parasuis fur* gene is under the *tac* promoter control in the pUA1088 plasmid.

3. Results and discussion

3.1. Isolation of the *H. parasuis fur* gene

To isolate the *fur* gene, a genomic library of the *H. parasuis* HP100 strain was constructed by partial digestion of chromosomal DNA with *Sau3AI*. Fragments in the range of 3–6-kb were inserted into the *Bam*HI site of plasmid pUA520, and the mixture was transformed into *E. coli* DH5 α . This genomic library was then introduced by triparental mating into the *E. coli fur* reporter strain H1780. After plating in LB medium supplemented with X-Gal, ferric sulfate and kanamycin, five white clones were detected whose plasmid was retransformed into H1780, again producing white colonies. Since restriction analysis indicated that all five clones contained an identical, approximately 4-kb fragment, only one of these plasmids (pUA1074) was selected for subsequent work. β -galactosidase analysis of H1780 (pUA1074) cells showed 60 Miller Units in the presence of excess iron, whereas H1780 cells lacking plasmid pUA1074 and growing in the same growth conditions presented 700 Miller Units. This indicated that pUA1074 is able to repress transcription of the *E. coli fur* gene in the presence of iron, suggesting that the *H. parasuis fur* gene was contained in this plasmid.

Further subcloning enabled us to obtain the sequence of an ORF encoding for a polypeptide of 148 amino-acid residues (17.4 kDa), presenting the closest identity (82%) with the *Haemophilus ducreyi* Fur protein. As expected, the *H. parasuis* Fur protein presents the highly-conserved metal-binding motif H₂XHX₂CX₂CG, beginning at its residue 89. Upstream of the *H. parasuis fur* gene, two open-reading frames encoding a hypothetical protein and a flavodoxin are found, respectively (Fig. 2a). RT-PCR analysis of this chromosomal region points out that these three genes constitute a single transcriptional unit (Fig. 2b). It had been described that the *E. coli fur* gene is only co-transcribed with the *fldA* gene (encoding a flavodoxin) when cells are exposed to superoxide-generating agents such as paraquat (Zheng et al., 1999). On the other hand, data presented in Fig. 2b indicate that the *H. parasuis fur* is the distal gene of a three-cistronic mRNA which is synthesised even in the absence of exogenous superoxide-generating compounds. To our knowledge, this is

the first description of a bacterial *fur* gene-transcriptional organisation presenting this structural pattern.

3.2. Attempts to construct *H. parasuis fur* null mutants

To construct an *H. parasuis fur* knockout mutant, an 800-bp Km^R cassette from the Tn5 transposon was inserted into an *Eco*RI site internal to the *fur* gene contained in the pUA1075 plasmid and which had been previously generated by overlap extension (Ho et al., 1989) using oligonucleotides indicated in Table 2. Afterwards, the *fur::km* construction was inserted into the pUA658 suicide vector, and the plasmid obtained (pUA1076) was introduced by natural transformation into *H. parasuis* cells. However, no Km^R clones were obtained when the transformation mixture was plated on Km-supplemented chocolate-blood agar despite the fact that four independent experiments were carried out and saturating DNA concentrations were added to all of them. It is worth noting that, and as a control, in each one of these experiments an aliquot of the competent cells was transformed with plasmid pUA1059 containing the *H. parasuis thy* gene interrupted by the same Km^R cassette (Bigas et al., 2005). In all cases, *H. parasuis thy* mutants were obtained at an efficiency of about 10³ transformants per μ g of DNA, in agreement with previously reported data. This fact clearly demonstrates that the unsuccessful attainment of *H. parasuis fur::km* mutants must not be attributed to any trouble in the DNA transformation process.

It has been reported in some bacteria that *fur*-defective mutants show increased oxidative DNA damage and a very high level of mutations under aerobic conditions (Foster and Hall, 1992; Touati et al., 1995). For this reason, and to discard any putative, negative effect of the oxygen in the obtaining of *fur*-knockout derivatives, *H. parasuis* recipient cells were plated under anaerobic conditions using the BBL gasPak system immediately after the optimal time (5 h) of contact with the transforming DNA. *H. parasuis* Km^R transformants were not recovered under these conditions either.

It is also known that *fur* mutants may also be isolated on the basis of their resistance to manganese (Hantke, 1987). Although the reasons for this relationship between *fur*-gene inactivation and manganese are not well understood, this strategy has been

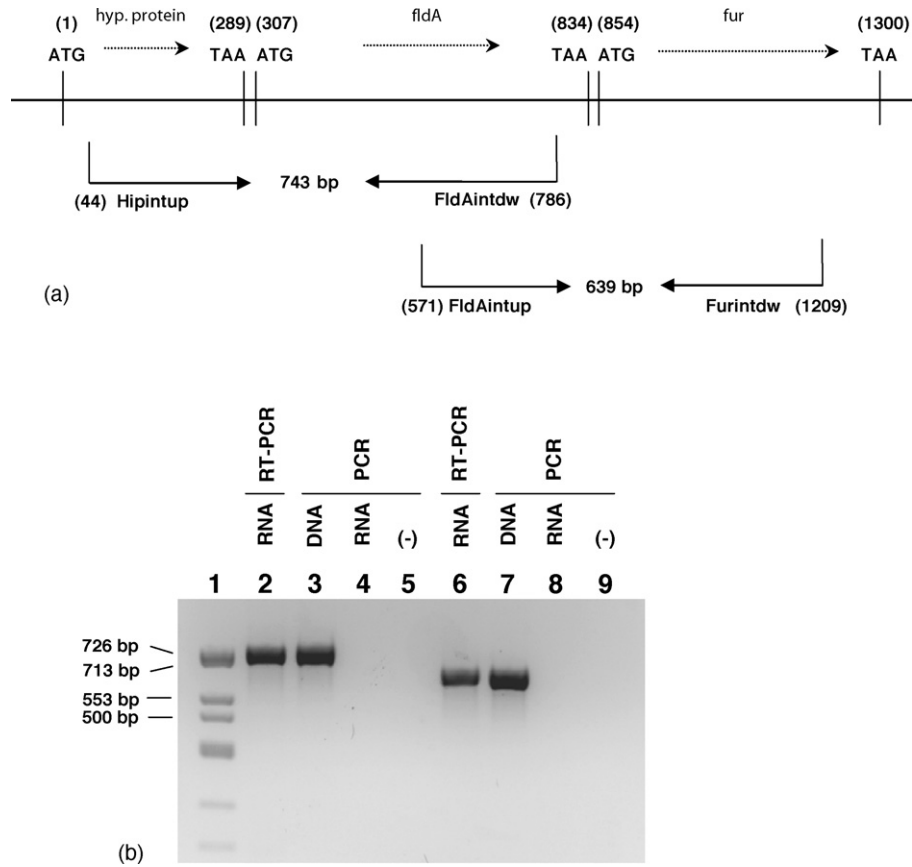


Fig. 2. (a) Genetic organisation of the *H. parasuis* chromosomal region containing the transcriptional unit to which its *fur* gene belongs. The translational starting and stop codons for each one of different ORFs are indicated. Positions of primers (Table 2) used to show the existence of a single mRNA through RT-PCR are also indicated. Numbers in parentheses indicate the positions with reference to the translational starting point of the ORF encoding the hypothetical protein. (b) RT-PCR analysis of the transcriptional organisation of the surrounding region of the *H. parasuis fur* gene using Hipintup and FldAintdw (lanes 2, 3, 4 and 5) and FldAintup and Furintdw (lanes 6, 7, 8 and 9) oligonucleotide sets in the presence of RNA (lanes 2 and 6). As a positive control, the PCR fragment obtained when *H. parasuis* chromosomal DNA was used as template (lanes 3 and 7) is also shown. Lanes 4 and 8, containing RNA template but not reverse transcriptase, and lanes 5 and 9, lacking both RNA and DNA, are shown as negative controls. Lane 1 is *Hinf*I – digested – Φ X174 DNA employed as the molecular size marker. RNA extraction and RT-PCR reactions were performed as reported (2).

successfully employed to obtain *fur*-defective strains containing point mutations in this gene (Delany et al., 2003; Hantke, 1987; Thomas and Sparling, 1996). Nevertheless, and in concordance with the results explained above, we were unable to isolate Mn-resistant *H. parasuis* mutants after several attempts.

3.3. *H. parasuis fur*-defective merodiploid strains are viable

Data described above strongly suggest the possibility that *H. parasuis* mutants are not viable. To confirm this

hypothesis, an *H. parasuis* strain harbouring both a *fur* wild-type gene and a *fur::km* allele was constructed. To achieve this objective, advantage was taken of the above-cited data concerning the *H. parasuis fur* transcription pattern. Thus, a 2-kb-sized fragment containing the *H. parasuis* transcriptional unit to which the *fur* gene belongs was cloned in the pHRP309 vector, giving rise to pUA1077. Then, pUA1077 was introduced by transformation into *H. parasuis* cells which were plated on gentamycin (Gm)-supplemented chocolate-blood agar. One of the Gm^R transformant clones obtained was kept for further work once confirmation of

the plasmid presence through DNA extraction and restriction analysis was established.

Afterwards, the *H. parasuis* HP103 strain (carrying pUA1077) was transformed with pUA1076 (containing the *fur::km* construction). Two days after transformation plating, Gm^R and Km^R clones

were detected on the appropriate plates with an efficiency of 2.5×10^1 transformants per microgram of DNA. To confirm that the *H. parasuis* chromosomal *fur* gene had been substituted by the *fur::km* construction, PCR analyses of these transformants were carried out. With this objective, Lgt2up and

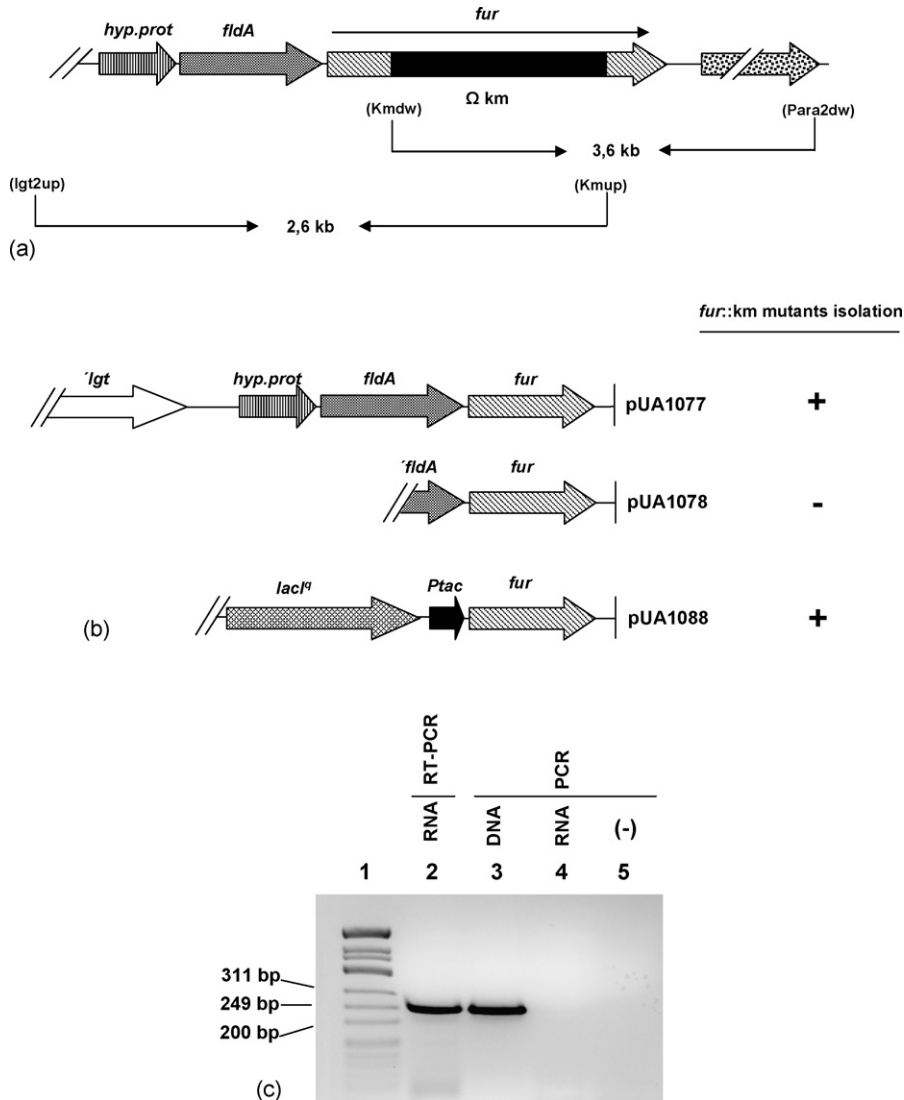


Fig. 3. (a) Schematic representation of the *H. parasuis fur::km* mutant construction. Primers used to determine the presence of the km cassette inside the *H. parasuis fur* gene are also shown. (b) Diagrams indicating DNA fragments cloned into the pHRP309 plasmid to determine the importance of the presence of each one of the three genes belonging to the *fur* transcriptional unit for the obtaining of *fur*-knockout mutants are also presented. (c) RT-PCR analysis of the transcription of the gene placed downstream of the *fur* marker in the *H. parasuis fur::km* mutants, using Paraintup and Paraintdw oligonucleotides (lane 2). As a positive control, the PCR fragment obtained when *H. parasuis* chromosomal DNA was used as template (lane 3) is also shown. Lane 4 containing RNA template but not reverse transcriptase, and lane 5, lacking both RNA and DNA, are shown as negative controls. Lane 1 is *Hinf*I – digested – Φ X174 DNA employed as the molecular size marker.

Kmup, and Kmdw and Para2dw pairs of oligonucleotides, which amplify an internal fragment of the Km^R cassette (Kmup and Kmdw) and the *H. parasuis* chromosomal region placed upstream or downstream of the *fur* gene but not included in pUA1076 (Lgt2up and Para2dw), were used (Fig. 3a). Results obtained indicate that in all of these clones either a 2.6-kb or a 3.6-kb PCR band was obtained depending on the oligonucleotide set employed. On the other hand, neither PCR-amplification band was detected when wild-type *H. parasuis* HP100 DNA was assayed (data not shown).

When a pHRP309 derivative exclusively containing the *fur* gene (pUA1078) (Fig. 1), instead of all the transcriptional unit (hypothetical protein-encoding gene, *fldA* and *fur*), was introduced into *H. parasuis* cells, no *fur::km* mutants were obtained (Fig. 3b). Moreover, when a plasmid (pUA1088) containing a copy of the *H. parasuis fur* gene downstream of the *E. coli tac* promoter (Fig. 1) is present, *H. parasuis* mutants containing a *fur::km* insertion may also be obtained (Fig. 3b). It is worth noting that no changes in growth characteristics of *H. parasuis fur::km* (pUA1088) cells were detected regardless of the presence of IPTG. According to these data, and when analysed by RT-PCR, *H. parasuis fur::km* (pUA1088) cells show *fur* mRNA synthesis that is not increased by the addition of IPTG (data not shown). These results indicate that the *tac* promoter may be used as a non-inducible heterologous expression system in *H. parasuis* cells. Furthermore, all of these data clearly demonstrate that *H. parasuis fur* mutants are not viable and that they may only be obtained when an additional wild-type copy of the *fur* gene is expressed.

It had previously been suggested that neither *N. meningitidis* nor *N. gonorrhoeae fur*-knockout mutants were viable (Thomas and Sparling, 1996). Nevertheless, it has recently been demonstrated that *fur*-defective strains of these two bacteria may be easily isolated when the polar effect that the insertion of a cassette into their *fur* gene produces upon its downstream gene is suppressed (Delany et al., 2003). In concordance with these data concerning the polar effect, *fur*-defective strains of both *Neisseria* containing point mutations have been isolated through the Mn-resistance method (Thomas and Sparling, 1996). However, a putative polar effect on genes downstream

of *H. parasuis fur* must be discarded as the reason for the lethal effect of the *fur* inactivation in this organism. Thus, the presence of plasmid pUA1077 and pUA1088 supports the construction of *H. parasuis fur* mutants despite the fact that in these two plasmids the chromosomal region placed downstream of the *fur* gene is absent (Fig. 1). Likewise, and in concordance with this, the open-reading frame located downstream of the *fur* gene in the *H. parasuis* chromosome is transcribed in *fur::km* mutants when tested through RT-PCR assays (Fig. 3c). Furthermore, these results confirm that the absence of the *fur* gene is the only reason for the non-viability of the *H. parasuis fur::km* mutants.

Several reasons may explain why *H. parasuis fur*-defective cells are not viable. It has been suggested that one of the cellular roles of the Fur protein may be to bind Fe²⁺ to decrease its intracellular concentration to prevent the deleterious effect of this cation when it is present in high levels (Zheng et al., 1999). Likewise, the Fur protein positively regulates synthesis of some superoxide dismutases in different bacterial species (Loprasert et al., 2000; Neiderhoffer et al., 1990). In this context, absence of the *fur* gene may increase the intracellular iron load and decrease the production of enzymes involved in the repair of oxidative damage. In fact, it has been described that *fur*-defective mutants of some bacterial species such as *N. meningitidis* (Delany et al., 2003) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Jacobsen et al., 2005) show impaired growth despite being viable. The lethal effect of a *fur* mutation upon *H. parasuis* cells in comparison with these other bacterial species could be attributed to differences among these bacteria in either DNA repair systems, oxygen-related metabolism or other, thus far unknown cellular factors. Related to this, it has been reported that stationary phase cultures of *H. parasuis* present a higher decrease in cell viability than other bacterial species (O'Reilly and Niven, 1985). In this respect, it is known that bacterial cultures in the stationary phase present a high level of oxidative damage (Nyström, 2003). However, lethality of *H. parasuis fur*-defective cells suggest that this organism is dramatically sensitive to high Fe²⁺ concentrations. This characteristic could perhaps be applied to the control and disinfection of *H. parasuis* contaminated environments.

Acknowledgements

This work was funded by Grant RTA 03-065 of the INIA (Spain). A. Bigas is a recipient of a predoctoral fellowship from the DURSI (Generalitat de Catalunya). We are deeply indebted to J. Ruiz and Dra. P. Cortés for their excellent technical assistance and to our English-teaching university colleague, Mr. Chuck Simmons, for his help in the language revision and correction of this article.

References

- Achenback, L.A., Yang, W., 1997. The *fur* gene from *Klebsiella pneumoniae*: characterization, genomic organization and phylogenetic analysis. *Gene* 185, 201–207.
- Bigas, A., Garrido, M.E., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbé, J., Llagostera, M., 2005. Development of a genetic manipulation system for *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* 105, 223–228.
- Bosch, M., Tarragó, R., Garrido, M.E., Campoy, S., Fernandez de Henestrosa, A.R., Pérez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbé, J., 2001. Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 35–40.
- Bosch, M., Garrido, M.E., Llagostera, M., Pérez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbé, J., 2002. Characterization of the *Pasteurella multocida hgbA* gene encoding a haemoglobin-binding protein. *Infect. Immun.* 70, 5955–5964.
- Bosch, M., Garrido, M.E., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbé, J., Llagostera, M., 2004. *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. *Vet. Microbiol.* 99, 103–111.
- Charland, N., D'Silva, C.G., Dumont, R.A., Niven, D.F., 1994. Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis*. *Can. J. Microbiol.* 41, 70–74.
- Choi-Kim, K., Maheswaran, S.K., Felice, L.J., Monitor, T.W., 1991. Relationship between the iron regulated outer-membrane proteins and the outer-membrane proteins of *in vivo* grown *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 28, 75–92.
- Del Rio, M.L., Navas, J., Martín, A.J., Gutierrez, C.B., Rodríguez-Barbosa, J.I., Rodríguez-Ferri, E.F., 2006. Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (*fhu*) genes and constitutive expression of the FhuA receptor. *Vet. Res.* 37, 49–59.
- Delany, I., Ieva, R., Alaimo, C., Rappuoli, R., Scarlato, V., 2003. The iron-responsive regulator Fur is transcriptionally autoregulated and not essential in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 185, 6032–6041.
- Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X.W., Finaly, D.R., Guiney, D., Helsinki, D.R., 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13, 149–153.
- Escobar, L., Martín, J.P., de Lorenzo, V., 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181, 6223–6229.
- Foster, J.W., Hall, H.K., 1992. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.* 174, 4317–4323.
- Furano, K., Campagnari, A.A., 2003. Inactivation of the *Moraxella catarrhalis* 7169 ferric uptake regulator increases susceptibility to the bactericidal activity of normal human sera. *Infect. Immun.* 71, 1843–1848.
- Genco, C.A., Dixon, D.W., 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* 39, 1–11.
- Hantke, K., 1987. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 210, 135–139.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172, 6557–6567.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59.
- Jacobsen, I., Gerstenberger, J., Gruber, A.D., Bossé, J.T., Langford, P.R., Hennig-Pauka, I., Meens, J., Gerlach, G.F., 2005. Deletion of the ferric uptake regulator Fur impairs the *in vitro* growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 73, 3740–3744.
- Loprasert, S., Sallabhan, R., Whangsuk, W., Mongkolsu, S., 2000. Characterization and mutagenesis of *fur* gene from *Burkholderia pseudomallei*. *Gene* 254, 129–137.
- Miller, J.H., 1991. A short Course in Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NH.
- Myers, L.E., Yang, Y.P., Du, R.P., Wang, Q., Harkness, R.E., Schryvers, A.B., Klein, M.H., Loosmore, S.M., 1998. The transferrin binding protein B of *Moraxella catarrhalis* elicits bactericidal antibodies and is a potential vaccine. *Antigen Infect. Immun.* 66, 4183–4192.
- Neiderhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., Fee, J.A., 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.* 172, 1930–1938.
- Nyström, T., 2003. Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. *Mol. Microbiol.* 48, 17–23.
- Oliveira, S., Pijoan, C., 2004. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis: epidemiology and control. *Vet. Microbiol.* 99, 1–12.
- O'Reilly, T., Niven, D.F., 1985. Tryptone-yeast extract broth as a culture medium for *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* to be used as challenge inocula. *Can. J. Vet. Res.* 50, 441–443.
- Parales, R.E., Harwood, C.S., 1993. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for Gram-negative bacteria. *Gene* 133, 23–30.
- Ratledge, C., Dover, L.G., 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 881–941.
- Ruffolo, C.G., Jost, B.H., Adler, B., 1998. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Vet. Microbiol.* 59, 123–127.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook, J., Russell, R.W., 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467.
- Tadjine, M., Mittal, K.R., Bourdon, S., Gottschalk, M., 2004. Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and study of their protective role in mice. Microbiology 15, 3935–3945.
- Thomas, C.E., Sparling, P.F., 1996. Isolation and analysis of a *fur* mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol. 178, 4224–4232.
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L., Despide, S., 1995. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in Δfur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. J. Bacteriol. 177, 2305–2314.
- West, D., Reddin, K., Matheson, M., Heath, R., Funnell, S., Hudson, M., Robinson, A., Gorrige, A., 2001. Recombinant *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein A protects against experimental meningococcal infection. Infect. Immun. 69, 1561–1567.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D., Store, G., 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. J. Bacteriol. 181, 4639–4643.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Desarrollo de un método de transferencia genética en *H. parasuis*

Como ya se ha mencionado en la introducción de esta memoria, las infecciones por *H. parasuis* causan en la actualidad grandes pérdidas económicas en el sector porcino. Por este motivo el conocimiento de los mecanismos de virulencia y de la biología molecular de este patógeno son aspectos claves para intentar erradicar el problema. No obstante, hasta el momento no se habían descrito técnicas de manipulación genética para la obtención de mutantes y su posterior estudio. Por ello, partiendo de la base de que otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* presentan transformación natural (Albritton *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 2002), el primer objetivo del presente trabajo fue averiguar si *H. parasuis* posee este mecanismo de transferencia.

Para ello, siguiendo un método de transformación natural descrito en *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Wang *et al.*, 2002), pero introduciendo algunas modificaciones, se diseñó una posible metodología de transformación, la cual se comenta brevemente a continuación. En primer lugar, se preparó una suspensión en medio TyE (*tryptone yeast extract*) (O'Reilly y Niven, 1986), de *H. parasuis* recogiendo las células de placas de agar chocolate que habían sido incubadas durante toda la noche. Dicha suspensión se ajustó a una DO₆₆₀ de 2, la cual corresponde aproximadamente a 10¹⁰ cfu/ml. Seguidamente, se diluyó diez veces la suspensión con medio TyE (10⁹ cfu/ml) y se depositó un alícuota de 20 µl en una placa de agar chocolate, previamente atemperada. También se añadieron 20 µl de AMPc (2 mM) para favorecer la transformación y 10 µl de DNA transformante (100 µg/ml) diluido en tampón TE y se mezcló todo usando un asa de Kölle. Una vez seca dicha mezcla, se incubó a 37°C durante 5 horas y se resuspendió en 300 µl de medio TyE, sembrándose en placas de agar chocolate con el antibiótico correspondiente e incubándolas a 37°C hasta observar crecimiento. Posteriormente se realizó un recuento de las colonias por placa. El DNA transformante utilizado (genómico sin digerir) procedía de un mutante espontáneo de *H. parasuis* resistente a la estreptomicina, obtenido por presión

selectiva con el antibiótico. Como control negativo se usó tampón TE en vez de DNA y para calcular la frecuencia de transformación, se efectuó en paralelo una siembra de diluciones seriadas de la misma mezcla de transformación sin antibióticos (Fig. 4.1). Los resultados obtenidos indicaban que, efectivamente, *H. parasuis* era transformable naturalmente.

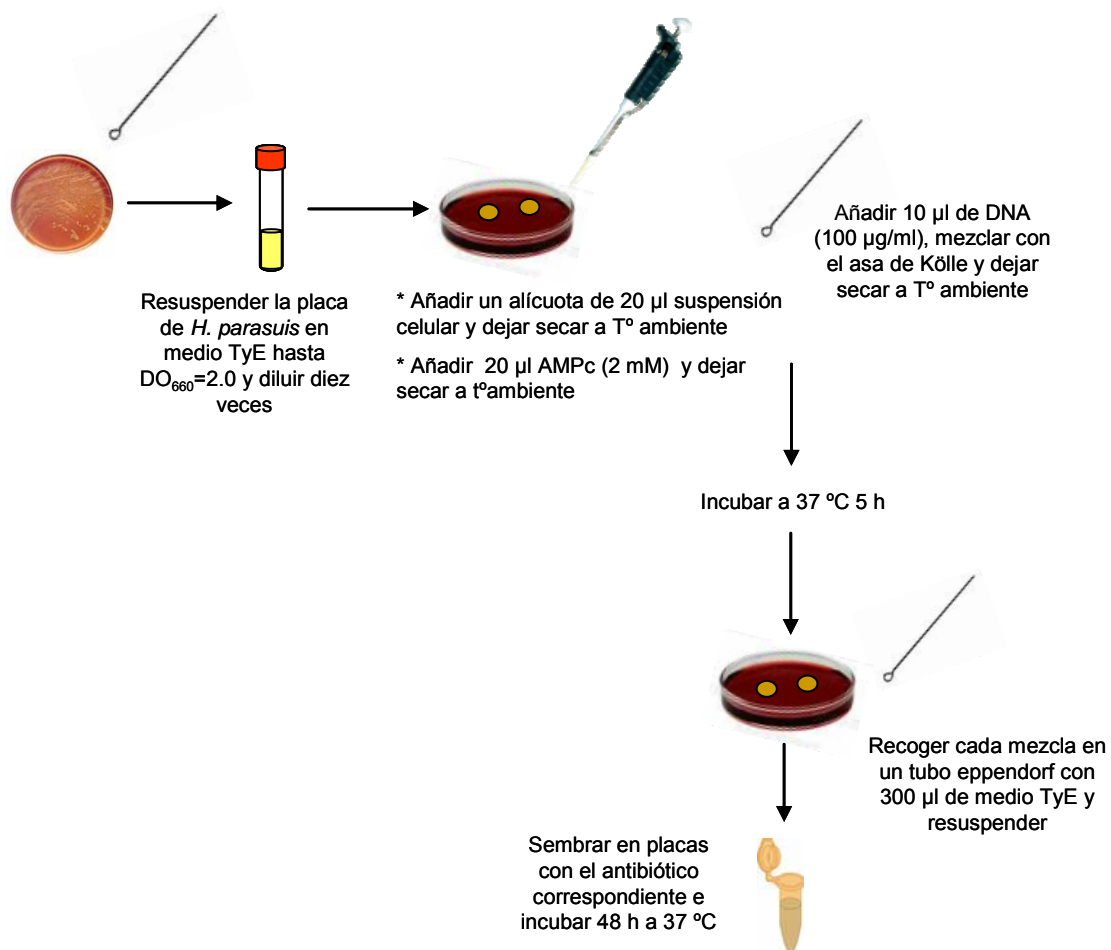


Fig. 4.1. Esquema del protocolo de transformación natural en *H. parasuis*.

A continuación, se determinaron las mejores condiciones para cada uno de los siguientes parámetros: concentración de AMPc, concentración de DNA y tiempo de incubación, estudiándose cada uno de ellos independientemente.

En la introducción ya se ha comentado que la adición de AMPc aumenta la eficiencia de transformación en *H. influenzae* (Wise *et al.*, 1973). Por esta razón,

se determinó la concentración más idónea de AMPc en la transformación de *H. parasuis*. El DNA exógeno utilizado fue el mismo que el indicado anteriormente. En la figura 4.2 se muestran los resultados obtenidos.

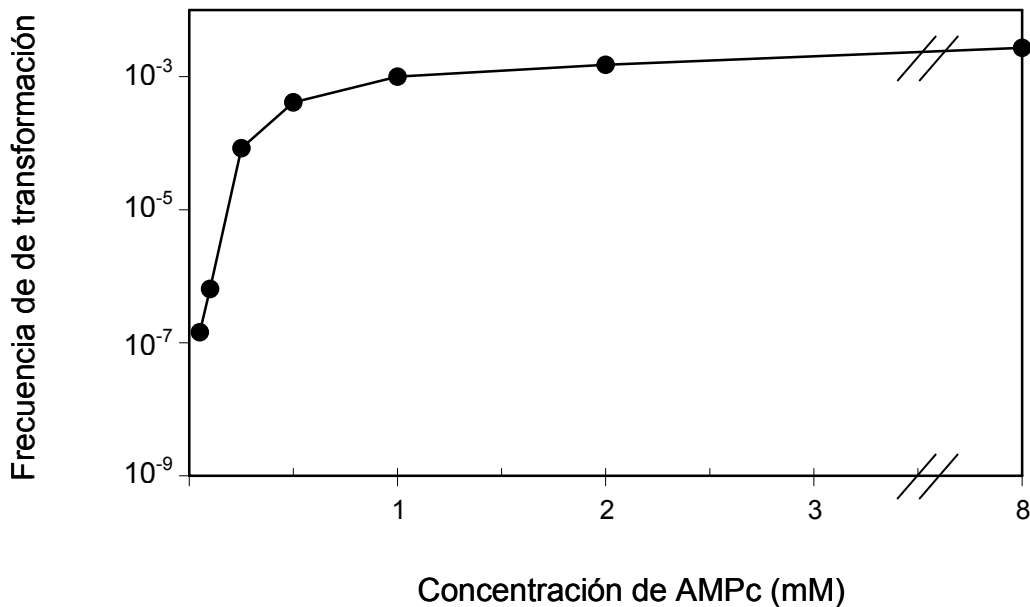


Fig. 4.2. Frecuencia de transformación de *H. parasuis* según la concentración de AMPc.

En dicha figura puede observarse que el número de transformantes resistentes a estreptomicina aumenta a medida que incrementa la concentración de AMPc, aunque la frecuencia de transformación se estabiliza a las concentraciones más elevadas de AMPc. Así pues, en los posteriores ensayos se usó la concentración de 8 mM. Además también pudo determinarse que si no se adicionaba AMPc no se obtenían transformantes, lo que significa que su adición es necesaria.

Seguidamente, se estudió la concentración de DNA exógeno necesaria para una óptima transformación. Para realizar este estudio se utilizaron concentraciones crecientes de 0,5 ng a 5 μ g de DNA cromosómico del mutante de *H. parasuis* Str^R, obteniéndose los siguientes resultados presentados en la Figura 4.3.

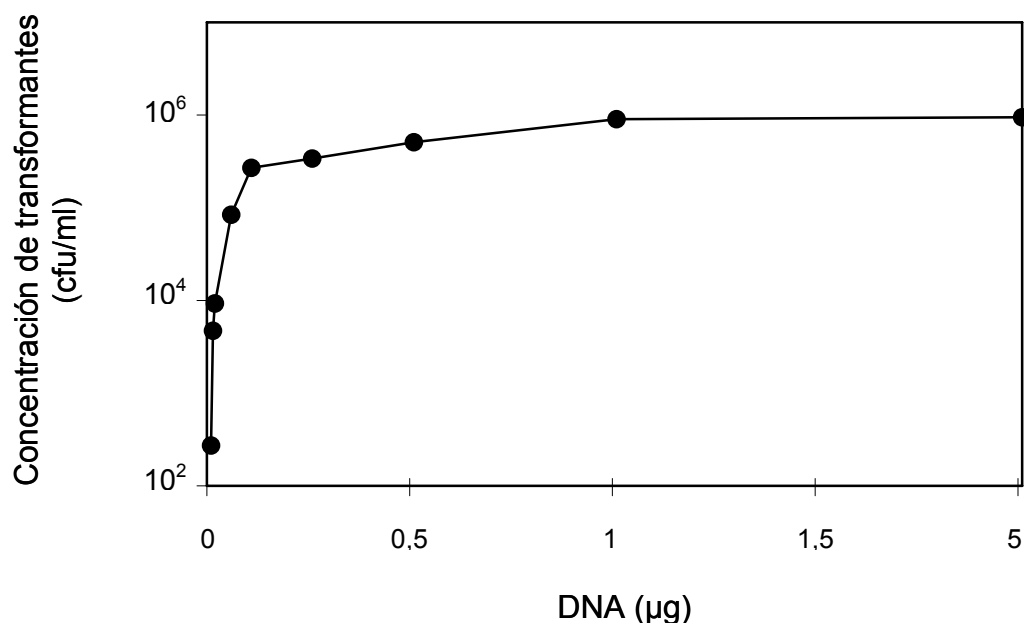


Fig. 4.3. Eficiencia de transformación de *H. parasuis* utilizando DNA cromosómico resistente a estreptomicina.

Observando dicha figura puede apreciarse que la máxima concentración de transformantes (10^6 cfu/ml) se obtuvo cuando la concentración de DNA usada estaba comprendida entre 1 y 5 μg , aunque, ya se obtienen buenos resultados a una concentración de DNA de 0,1 μg . En posteriores estudios se utilizó 1 μg de DNA cromosómico como donador, concentración a la cual el sistema se encuentra ya prácticamente saturado.

Otro parámetro a estudiar fue el tiempo de adición del DNA exógeno a las células bacterianas y al AMPc. Para ello, se realizó un experimento en el cual se adicionó el DNA transformante a distintos tiempos (de 0 a 3 horas), incubándose las placas a 37°C durante diferentes tiempos antes de la adición del DNA. Los resultados obtenidos (Fig. 4.4.) indicaron que la mayor frecuencia de transformación se obtiene cuando la adición del DNA se lleva a cabo al mismo tiempo que las células y el AMPc, ya que a medida que aumenta el tiempo de incubación antes de la adición del DNA exógeno, el número de transformantes

disminuye. Por lo tanto, en el protocolo definitivo de transformación se adicionaron los tres componentes a la vez, dejando secar las gotas en las placas, entre cada adición.

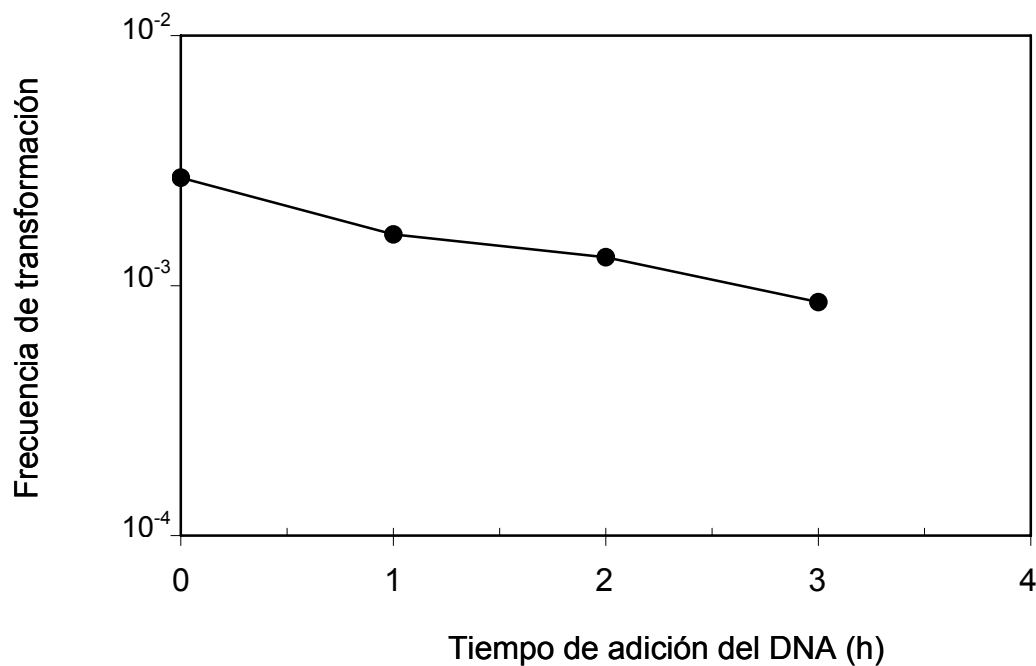


Fig. 4.4. Frecuencia de transformación respecto a diferentes tiempos de adición del DNA exógeno a la mezcla de células y AMPc, después de dejar incubando a 37°C.

El siguiente punto a valorar fue el tiempo de expresión fenotípica a 37°C antes de sembrar en las placas selectivas. En este caso, se estudiaron tiempos de hasta 15 horas de expresión fenotípica. Los resultados obtenidos (Fig. 4.5) indicaron que la máxima frecuencia de transformación se obtuvo tras un tiempo de expresión fenotípica de 5 horas. Asimismo, se observó que aunque se aumentara más dicho tiempo, la frecuencia de transformación era constante.

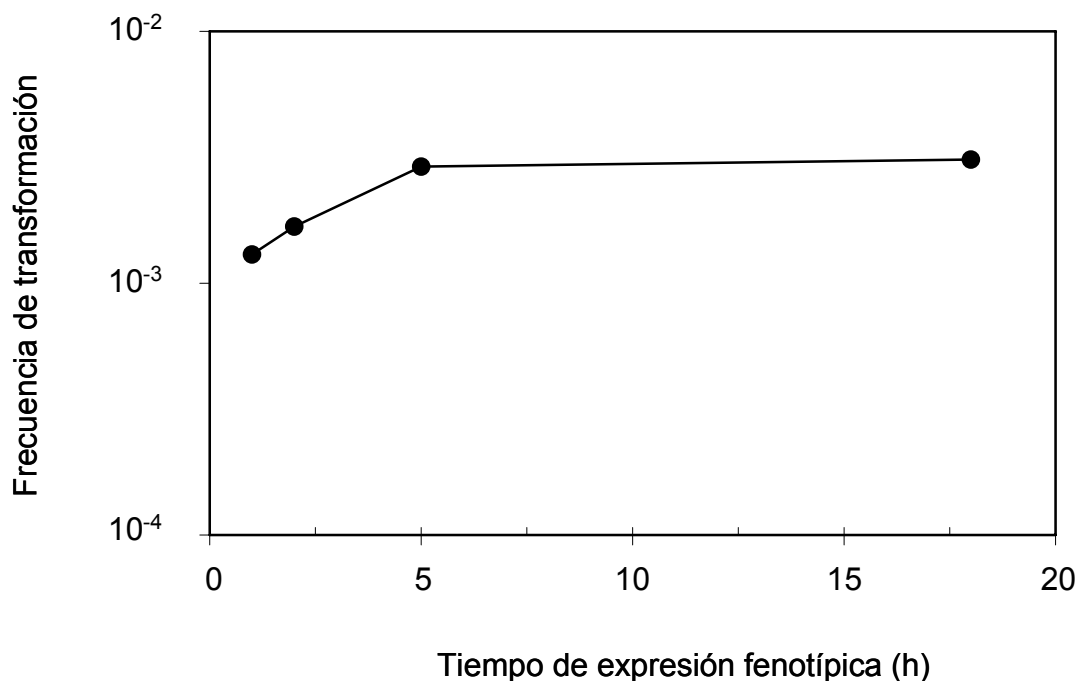


Fig. 4.5. Frecuencia de transformación respecto al tiempo de expresión fenotípica.

Por lo tanto, y en función de los estudios realizados, las mejores condiciones para transformar naturalmente a *H. parasuis* consisten en adicionar AMPc a una concentración de 8 mM y 1 µg de DNA donador al mismo tiempo que las células, siendo el tiempo óptimo de expresión fenotípica de 5 horas.

A continuación, se estudió si este protocolo de transformación natural era válido para introducir plásmidos en esta especie bacteriana. Para ello, se obtuvo el DNA del plásmido pHRP309, el cual es estable en la familia *Pasteurellaceae* (Parales y Hardwood, 1993). Los resultados obtenidos indicaron que en ninguno de los experimentos realizados se consiguieron transformantes. Este hecho sugería que tal vez se requiere que el DNA transformante proceda de la misma especie. Para probar esta hipótesis, se clonó un fragmento del genoma de *H. parasuis* que contenía el gen *rps12* en el plásmido pHRP309 y se utilizó el plásmido recombinante como DNA donador.

Para obtener dicho plásmido, se aisló y caracterizó en primer lugar el gen *rps12* de *H. parasuis*. Para su aislamiento se compararon las secuencias de dicho gen y de su entorno génico en *P. multocida* y *H. influenzae*. Al observarse una alta conservación de dichas secuencias, pudieron diseñarse los cebadores adecuados para obtener la región deseada de *H. parasuis* mediante amplificación de DNA. Por este procedimiento y usando como molde el DNA cromosómico de *H. parasuis*, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 400 pb, el cual fue clonado en el vector pGEM-T. Tras la secuenciación de dicho fragmento se confirmó que contenía el gen *rps12* (Número de acceso del GenBank: AY236072) (Fig. 4.6).

ATGGCAACTATCAACCAGCTAGTACGCAAACCGCGTGTGAAAAAGGTTGTAAAAAGTAACGTTCTT
GCATTAGAGGCTTGCCCGCAGAAACGTGGTGTGTGCACCCGTGTATACACAACCTACACCTAAAAAA
CCGA^{USS}**ACTC**AGCATTACGTAAAGTATGCCGTATTTCGCTTAACTAACGGTTACGAAGTAACTTCTTAT
ATCGGCGGTGAAGTCACAACCTTCAAGAGCACAGTGTGTGCTTATCCGTGGCGGTCGTGTTAAAG
ACTTACCAGGTGTGCGTTATCACACTGTACGCGGTGCATTAGACTGCGCTGGCGTTAAAGATCGTA
AACAAAGGTCGTTCTAAATACGGCGTTAAGCGTCCTAAATCT**TAA**

MATINQLVRKPRVKKVVKSNVPALEACPQKRGVCTRVTTPPKPNSALRKVCRIRLTNGYEVTSY
IGGEGHNLQEHSVVLIRGGRVKDLPGVRYHTVRGALDCAGVKDRKQGRSKYGVKRPKS

Fig. 4.6. Secuencia nucleotídica (375 bases) y secuencia proteica (124 aminoácidos, 13,5 kDa) del gen *rps12* de *H. parasuis*.

Seguidamente, dicho gen fue clonado en el plásmido pHRP309, obteniéndose así el plásmido pUA1057, con el cual se transformó a *H. parasuis*, utilizando el protocolo desarrollado en este trabajo. En estos experimentos siempre se obtuvieron clones transformantes, lo cual indicaba que era necesaria la presencia de una región de *H. parasuis* para la captación del DNA exógeno. Además, en la medida que incrementaba la concentración del DNA exógeno (Fig. 4.7), también pudo observarse que la eficiencia de la transformación (cfu/ml por µg DNA) aumentaba.

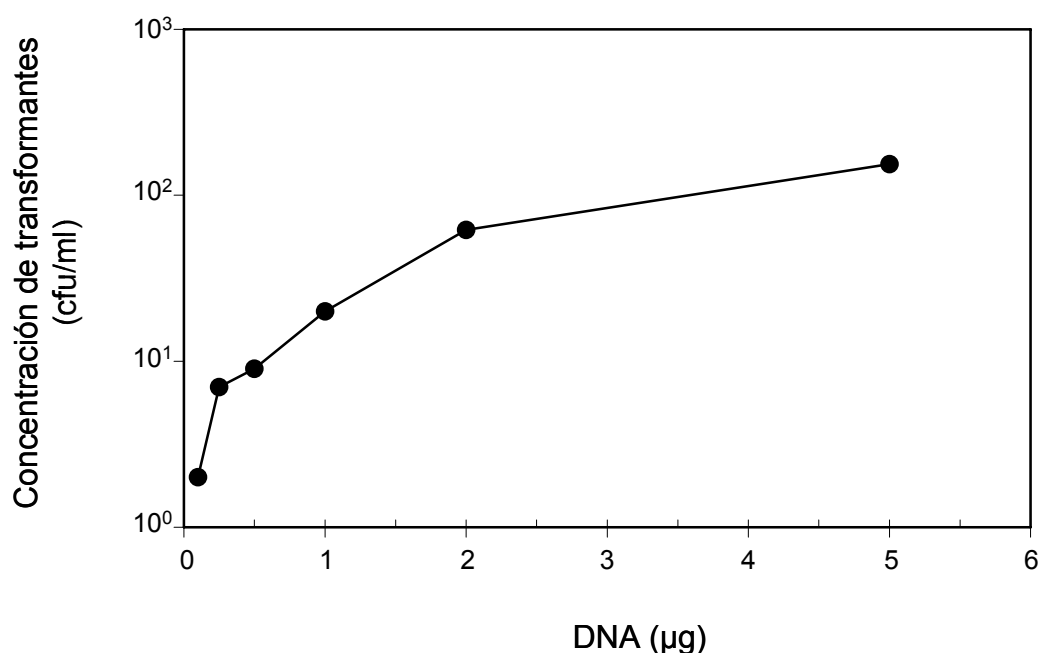


Fig. 4.7. Eficiencia de transformación de *H. parasuis* utilizando DNA del plásmido recombinante pUA1057.

Adicionalmente, se comprobó que los transformantes contenían el plásmido libre en su citoplasma y que los clones obtenidos no eran fruto de una recombinación del gen *rps12* del plásmido con su homólogo cromosómico.

En función de estos resultados y teniendo presente que, como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria, se requieren secuencias USS en la transformación natural de bacterias gramnegativas, se realizó un análisis *in silico* de la secuencia nucleotídica del gen *rps12*. En este estudio se identificó la secuencia ACCGAACTC (Fig. 4.6), la cual es muy similar al motivo ACCGCACTT descrito en *H. influenzae* como USS (Fitzmaurice *et al.*, 1984). Para confirmar que la secuencia encontrada correspondía a un motivo USS en *H. parasuis*, se modificó dicha secuencia del gen *rps12*, usando la técnica de PCR *overlap extension* (Ho *et al.*, 1989) (Fig. 4.8), y se clonó en el vector pHRP309 obteniéndose el pUA1058 que contenía el gen *rps12* pero sin la secuencia que presumiblemente era una USS.

```
TGCACCCGTGTATACACA AACTACACCTAAAAA ACCGAACTCAGCATTACGTAAAGTATGCCGTA
                                     USS
TGCACCCGTGTATACACA AACTACACCTAAAAA CCCATCCACTAAAAACGAGCATTACGTAAAGT
                                     nueva secuencia generada
```

Fig. 4.8. Nueva secuencia generada en el gen *rps12* mediante PCR *overlap extension*.

Los resultados obtenidos confirmaron que la presencia de la secuencia USS en el DNA exógeno era fundamental para que ocurriera la transformación natural en *H. parasuis*, ya que en los diferentes experimentos que se realizaron nunca se obtuvieron transformantes.

El conjunto de los resultados obtenidos nos ha permitido por vez primera disponer de un sistema de transferencia de DNA en *H. parasuis*, desarrollándose un método de transformación natural aplicable tanto a DNA cromosómico, propio de la especie, como a DNA plasmídico, siempre y cuando éste contenga secuencias USS de *H. parasuis*.

4.2. Estudios de virulencia de un mutante *thyA* de *H. parasuis*

Como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria, hace tiempo que se conoce que mutantes auxotróficos para la síntesis de purinas y pirimidinas presentan una virulencia atenuada. También se ha mencionado en dicha introducción, que existían resultados contradictorios en referencia a la virulencia de cepas mutantes en la timidilato sintasa, codificada en el gen *thyA*, de diferentes especies bacterianas. Por este motivo, se ha estudiado el papel de la enzima timidilato sintasa en la virulencia de *H. parasuis*.

4.2.1. Aislamiento y caracterización del gen *thyA* de *H. parasuis*

En primer lugar, y dado que no existe una base de datos con la secuencia completa de *H. parasuis*, se empezó construyendo una librería genómica de dicha bacteria. Con esta finalidad, se realizó una digestión parcial del DNA cromosómico, usando la enzima de restricción *Sau3A* que corta en la secuencia ↓GATC. Los productos obtenidos de 3 a 6 kb fueron ligados al vector pUA520, previamente digerido con la enzima *Bam*HI que corta en la secuencia G↓GATCC y deja extremos compatibles con *Sau3A*. Esta librería fue posteriormente transformada mediante electrotransformación en la cepa de *E. coli* DH5α y guardada a -20°C en glicerol para su posterior utilización.

El aislamiento y caracterización del gen *thyA* de *H. parasuis* se realizó mediante el uso de dicha librería genómica. Gracias a una conjugación triparental entre la librería genómica y una cepa de *E. coli thyA* (KL742), se aislaron clones capaces de complementar la mutación *thyA* y de crecer en medio mínimo AB con glucosa. El análisis de estos clones indicó que contenían un fragmento de aproximadamente 4 kb. Tras subclonar y secuenciar fragmentos de menor tamaño se identificó el gen *thyA* de *H. parasuis* (Número de acceso en el GenBank: AY262733) (Fig. 4.9).

ATGAAACAATATCTTGATCTCTGCCAACGTATTGTGCAACAAGGAAAGTGGGTGAAAATGAACGT
ACGGGTAAGCGTTGTTTAAACCGTGATTAACGCTGATTTAATCTACGACGTGGCAAAGGGGGAATTT
CCCCTTGACTACACGCAAAAAGTTTTTGGAAAGCTGCGATTGCGGAATTACTCGGTTATATCCGT
GGTTATGATAATGCCGCAGATTTCCGTCAGCTTGGCACAAAATCGTGGGACGCAAATGCCAATGAA
AATGCAGCTTGGCTGGCAAACCCACATCGCAAAGGCGAAGATGATATGGGGCTGGTTTAT**TGGTGC**
GTCCGACGAAACTTCCCGAAAGTTGGCGGTGGTAGCGTCGATTTATTGCGTCAAATTGTCGATGAT
CTGAAACGTGGCGTAGATAATCGTGGTGAGATTTATACGTTCTATCACCCCTGGGGCTTTCCATTTA
GGTTGCCTACGTCCGTGTTTACACAGCCACCATTTTTCACTGTTAGATGGCACGCTTTATTTGAAC
AGTATCCAACGCTCTGCCGATGTGCCACTTGGTTTAAACTGGAATATGATCCAATGTTACACTTTT
CTTGCCTTAATGGCACAAATTACAGGACACCAAGCAGGACAAGCATTCCATAAAATTGTGAATGCG
CATATTTATGAAGATCAGCTGGAATTAATGCGAGATGTACAATAAGCGCACGCCATTTAAAGCT
CCAACACTCAAATCAACCCGATATTAATCCCTAGAAGATTTAGAAATTTGGGTAACCTTGGCG
GATTTTGAAGTTGAGGGCTACGAATATCATCCGAGTATTCAGTATCCGTTTTCTGT**GTAG**

MKQYLDLCQRIVEQGKQWVENERTGKRCLTVINADLIYDVAKGEFPLVTTRKSFWKAAlAELLGYIR
GYDNAADFRQLGTKSWDANANENAAWLANPHRKGEDDMGLVYGAVGRNFPKVGGSVDLLRQIVDD
LKRQVGNRGEIYTFYHPGAFHLGCLRPCLHSHHFLSLDGTLYLNSIQRSADVPLGLNWNMIQCYTF
LALMAQITGHQAGQAFHKIVNAHIYEDQLELMRDVQLKRTPFKAPTLKINPDIKSLEDLEIWVTLA
DFEVEGYEYHPSIQYPFSV

Fig. 4.9. Secuencia nucleotídica (852 bases) y secuencia proteica (283 aminoácidos y 32,1 kDa) del gen *thyA* de *H. parasuis*.

4.2.2. Obtención de mutantes *thyA* de *H. parasuis*

Después del aislamiento y caracterización del gen *thyA*, se procedió a la obtención de un mutante *knockout* de *H. parasuis* en dicho gen. Para ello, se introdujo una diana *EcoRI* en medio del gen *thyA*, mediante *PCR overlap extension* y se clonó en esta diana el casete de resistencia a la kanamicina (Km) del Tn5 de aproximadamente 0,8 kb. De esta forma quedaba interrumpido el gen *thyA* y además se disponía de un marcador de resistencia para su selección. La construcción obtenida fue introducida en el plásmido suicida pUA658, el cual no es estable en *H. parasuis*. Mediante transformación natural, dicho plásmido fue introducido en la cepa salvaje obteniéndose clones Km^R Gm^S, lo cual indicaba que estos clones debían ser, dobles recombinantes (Fig. 4.10).

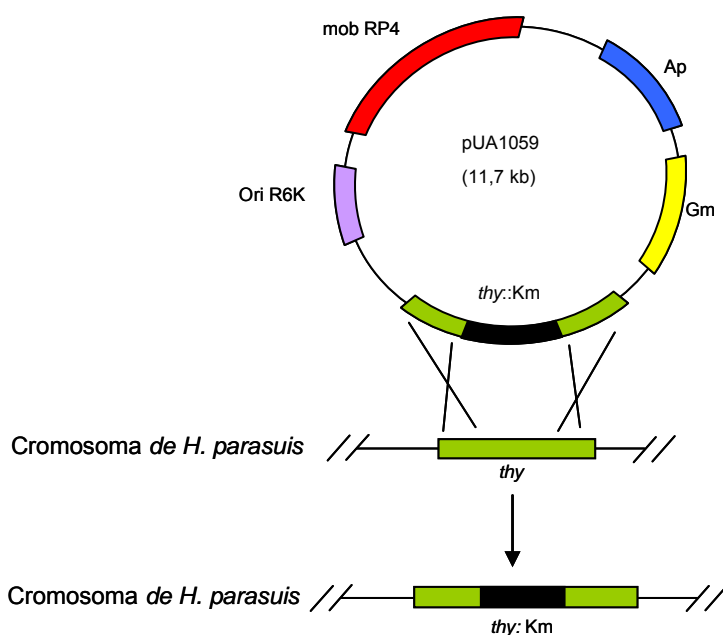


Fig. 4.10. Esquema del vector pUA1059 construido mediante la técnica de *PCR overlap extension*, para la obtención del mutante *thyA* de *H. parasuis*.

La confirmación de que se había conseguido el mutante deseado se obtuvo mediante PCR, al comprobarse que la copia salvaje del gen *thyA* cromosómico había sido substituida por una copia mutante interrumpida con el casete Km (Fig. 4.11).

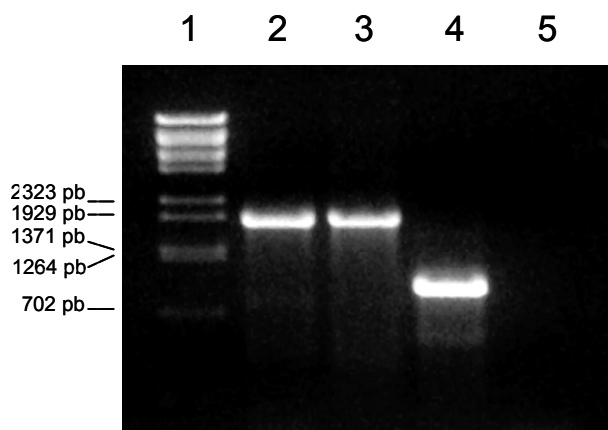


Fig. 4.11. PCR de comprobación del mutante *thyA* de *H. parasuis* con los cebadores Thyup y Thydw. Carril 2: DNA cromosómico del mutante *thyA*; carril 3: vector pUA1059; carril 4: DNA cromosómico de la cepa salvaje; carril 5: control negativo sin DNA y el carril 1: marcador de peso molecular del DNA del bacteriófago λ digerido con *BstE*II.

Además, y según ha sido descrito (Miller, 1992), se comprobó también que el mutante *thyA* obtenido era capaz de crecer en presencia de trimetoprim, mientras que la cepa salvaje no lo hacía (Fig. 4.12).



Fig. 4.12. Crecimiento de un mutante *thyA* y de la cepa salvaje parental en presencia de trimetoprim y timina.

4.2.3. Análisis de la capacidad colonizadora y de la actividad bactericida de un mutante *thyA* de *H. parasuis*.

Como ya se ha indicado en la introducción de la presente memoria, han sido diversos los modelos de experimentación animal que se han utilizado para estudiar la patogenia de *H. parasuis*. No obstante, en un primer nivel de ensayo, los dos modelos posibles eran el ratón y las cobayas. En la bibliografía se comenta que las cobayas podían ser un buen modelo experimental ya que los resultados obtenidos en estudios anteriores permitían comparar la virulencia de distintas cepas. Por ello, en esta fase del estudio se optó por utilizar el modelo animal basado en cobayas. En este modelo no es esperable detectar muchos de los síntomas clínicos que produce *H. parasuis*, pero puede servir para determinar la capacidad de colonización de este patógeno, así como su inmunogenicidad.

El diseño experimental (Fig. 4.13) consistió en inocular un grupo de 5 animales con 10^{10} cfu/ml de la cepa salvaje y otro grupo del mismo número de animales con la cepa mutante *thyA*, procediéndose al sacrificio de 1 animal a los 0, 1, 4, 7 y 11 días de la inoculación y determinándose los siguientes parámetros:

- Aislamiento de colonias de *H. parasuis* mediante siembra en placa de una muestra de pulmón.
- Detección por PCR de la presencia de *H. parasuis* en el pulmón de los animales mediante una extracción de DNA.
- Obtención de sueros para analizar la actividad bactericida e inmunogénica.

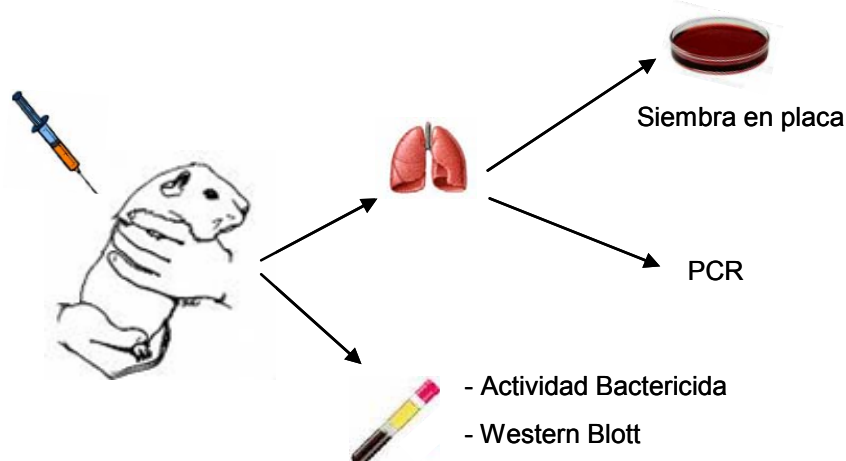


Fig. 4.13. Diseño experimental para estudiar la capacidad colonizadora e inmunogénica de *H. parasuis* en un modelo animal de cobaya.

Por lo que se refiere al primer y al segundo parámetro a estudiar, se analizaron las diferencias en la capacidad colonizadora entre la cepa salvaje y la mutante *thyA* mediante un procesamiento de las muestras del pulmón. Una parte fue homogenizada y sembrada en placas de agar chocolate e incubada a 37°C con una atmósfera del 5 % de dióxido de carbono. Otra parte fue tratada para extraer

el DNA y usarlo como molde en una PCR con los cebadores para amplificar el gen 16S rRNA de *H. parasuis* (Jung y Chae, 2004).

Mediante PCR se observó que en ambos casos (salvaje y mutante) se obtenía una banda de amplificación del tamaño deseado, confirmando la presencia de DNA de *H. parasuis* en las muestras de los pulmones extraídas en los días 1, 4, 7 y 11 después de la inoculación. Sin embargo, observando las placas de agar chocolate solamente se obtuvo crecimiento de colonias en las placas procedentes de los animales infectados con la cepa salvaje. Estos resultados nos indicaban que la cepa mutante *thyA* era capaz de colonizar el pulmón el tiempo suficiente para poder ser detectada por PCR pero no en suficiente cantidad como para ser detectada en placa.

En tercer lugar y para determinar la actividad bactericida del suero extraído de los animales se utilizó el protocolo descrito por Furano y Campagnari en el 2003. Primeramente, se probaron diferentes diluciones de suero para determinar las que se utilizarían en el ensayo definitivo. Para ello, se trabajó con diluciones del 10%, 25% y 50% del suero extraído a los 11 días después de la inoculación con la cepa salvaje (Fig. 4.14).

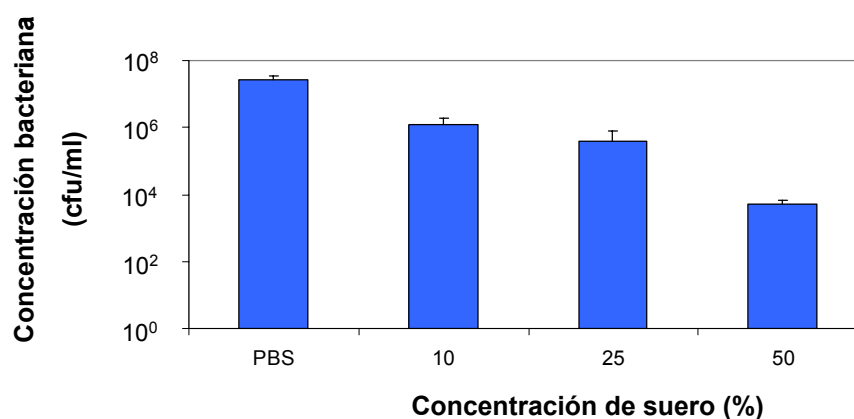


Fig. 4.14. Actividad bactericida con diferentes diluciones del suero extraído del animal sacrificado a los 11 días de la inoculación con la cepa salvaje.

Los resultados obtenidos indicaron que la mayor disminución de viabilidad se encontraba al utilizar la dilución del 50% del suero, la cual fue la utilizada en el análisis bactericida. En dicho análisis se ensayaron los sueros de los animales infectados con la cepa salvaje y la mutante *thyA* de *H. parasuis* sacrificados a los 0, 1, 4, 7 y 11 días después de la inoculación (Fig. 4.15).

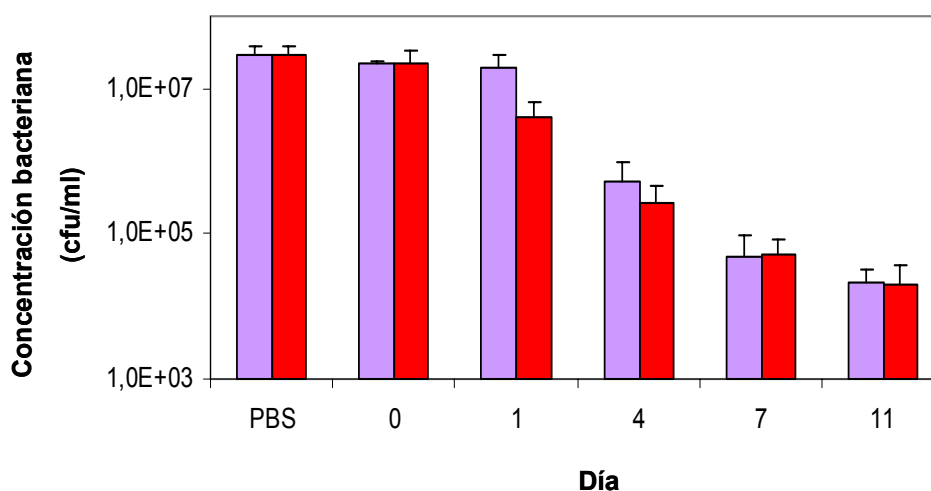


Fig. 4.15. Actividad bactericida de los sueros extraídos de los animales infectados con la cepa mutante *thyA* (■) y con la cepa salvaje (□).

Los datos obtenidos revelaron un descenso en función del tiempo de infección alcanzándose valores de disminución del 90%. Asimismo, si se comparaban las dos cepas utilizadas, salvaje y mutante, se obtenían valores similares, lo cual indicaba que ambas cepas debían ser capaces de inducir una respuesta inmunológica parecida. Posteriormente, y para corroborar esta hipótesis, se procedió a realizar un *Western Blot* con los sueros obtenidos a los 11 días de la infección con la cepa salvaje o con el mutante *thyA* frente a proteínas de membrana externa de *H. parasuis*.

En estos estudios se observó que en el animal control (sacrificado antes de la inoculación) se detectan bandas que equivaldrían seguramente a anticuerpos no específicos de *H. parasuis* pero con cierta capacidad para reconocer epítopes de

sus proteínas. A pesar de ello, se observó claramente un mayor número de bandas con el suero obtenido tras 11 días de la inoculación con la cepa salvaje de *H. parasuis* (Fig. 4.16).

Los resultados obtenidos con los sueros procedentes de los animales infectados con la cepa *thyA* fueron similares, lo cual indica que la infección de cobayas con la cepa mutante *thyA* también induce la síntesis de anticuerpos específicos frente a proteínas de membrana externa de este patógeno.

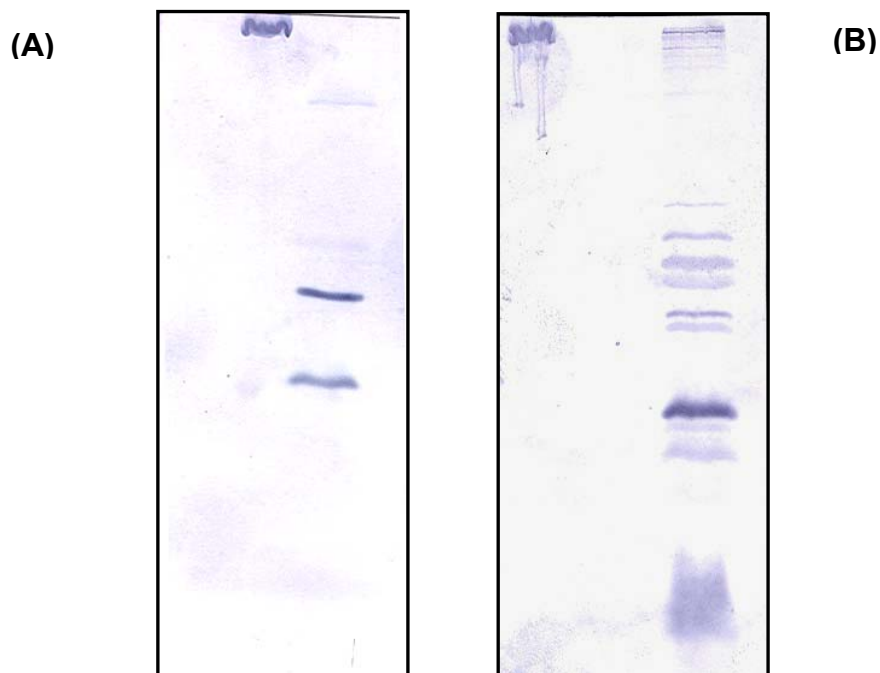


Fig. 4.16. *Western Blot* frente a proteínas de membrana externa de *H. parasuis*, realizado con el suero de un animal sin infectar (A) y de un animal a los 11 días de la inoculación con la cepa salvaje (B) de *H. parasuis*.

El conjunto de los resultados obtenidos indica que el mutante *thyA* de *H. parasuis* posee una capacidad colonizadora menor que la cepa salvaje, si bien es capaz de inducir una respuesta inmunológica en el hospedador similar a la de la cepa salvaje. En función de ello, es probable que una mutación en el gen *thyA* produzca una atenuación en la virulencia de *H. parasuis*, por lo cual son necesarios futuros estudios para evaluar la posibilidad de utilizar esta mutación en el diseño de cepas vacunales.

4.3. Viabilidad de mutantes *fur* de *H. parasuis*

En la introducción ya se ha comentado que las bacterias regulan su metabolismo del hierro en respuesta a la disponibilidad de este recurso mediante la proteína Fur, la cual es capaz de regular gran cantidad de genes, entre los cuales destacan los genes que codifican las IROMPs (Iron-Dependent Outer-Membrane Proteins) que desarrollan un papel importante en la patogenicidad bacteriana (Ratledge y Dover, 2000). Por ello, en la literatura se ha propuesto el uso de mutantes *fur* que expresan constitutivamente estas proteínas como vacunas potenciales (Bosch et al., 2004; Furano y Campagnari, 2003). En esta línea, el siguiente objetivo de esta tesis ha sido obtener un mutante *fur* de *H. parasuis* para estudiar su posible uso como vacuna.

4.3.1. Aislamiento y caracterización del gen *fur* de *H. parasuis*

En primer lugar, se procedió a aislar el gen *fur* de *H. parasuis*, utilizando la librería genómica ya mencionada anteriormente. Dicha librería fue introducida por conjugación triparental en la cepa de *E. coli* H1780, la cual es defectiva para el gen *fur* y contiene la fusión *fiu::lacZ*, controlada por la proteína Fur. En ausencia de la proteína Fur, el gen *fiu* está desreprimido y, consecuentemente, se sintetiza β-galactosidasa, con lo cual en un medio de cultivo con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside), las colonias son de color azul. Por el contrario, en presencia de la proteína Fur, ésta reprime al gen *fiu*, no se sintetiza β-galactosidasa y las colonias no son azules.

Así pues, se sembró la conjugación triparental en placas de LB, suplementadas con X-Gal, sulfato de hierro y kanamicina y se seleccionaron las colonias que no presentaban color azul. Mediante restricción se comprobó que todos los clones aislados presentaban un mismo fragmento de aproximadamente 4 kb, por lo que se escogió uno de ellos para los siguientes estudios. Utilizando el ensayo β-galactosidasa, se comprobó cuantitativamente que el clon seleccionado sintetizaba una menor cantidad de esta enzima. Este resultado indicaba que el plásmido introducido era capaz de reprimir el gen *fiu*, y por lo tanto debía contener el gen *fur* de *H. parasuis* en el fragmento clonado.

Como era de esperar, tras diversas subclonaciones y posteriores secuenciaciones de los fragmentos clonados se identificó el gen *fur* cuya secuencia se presenta en la figura 4.17 (Número de acceso del GenBank: AY161278).

ATGTCTGAAGAAAATGTGAAACTGTTGAAAAAAGTGGGTTTAAAAGTTACTGAACCACGTTTAACA
ATCCTTGAGTTAATGCAAATCACCCGTGATAGTATGCAGCATTTTTCTGCTGAGGACATTTATAAA
TTATTGCTAGAACGTCAGTCTGAAATCGGGTTAGCAACAGTTTATCGCGTATTAAATCAATTTGAA
GAAGTTGGCATTTTAACTCGCCATAATTTTGATTGGAATAAAGCTGTCTATGAATTAATATGAAC
CACCAACACGACCATATTATCTGTATGGATTGTGGTAAAGTGTTTGAATTTAAAGACTCTGAAATT
GAACGCCGTGAGCGTGAATCAGCCAACAACACGGAATTGAGCTTGCAAACCATAGCTTATATTTG
TATGGTAAATGTAGCAATATTCAAAAATGTGATGAAAAAGATAAAAA**TAA**

MSEENVKLLKKVGLKVTEPRLTILELMQITRDSMQHFSAEDIYKLLLERQSEIGLA**TVY**RVLNQFE
EVGILTRHNFDNKAUYELNMN**HQHDHICMDCG**KVFEFKDSEIERRQREISQQHGIELANHSLYL
YGKCSNIQKCDEKDKK

Fig. 4.17. Secuencia nucleotídica (447 bases) y secuencia proteica (148 aminoácidos y 17,4 kDa) del gen *fur* de *H. parasuis*. En azul: motivo de unión a metales; en rojo: residuos relacionados con el reconocimiento del DNA.

Analizando la secuencia del gen *fur* se detectó que presentaba el motivo altamente conservado de unión a metales, definido como H₂XHX₂CX₂CG (Escolar *et al.*, 1999). Asimismo, también se observó la presencia de los residuos TXY (donde X es V o I) en la secuencia proteica, los cuales están relacionados con la hélice de reconocimiento del DNA. Dichos residuos están presentes también en la proteína Fur de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis*, en la proteína PerR de *B. subtilis* y en la proteína Zur de *B. subtilis* y de *E. coli* (Tiss *et al.*, 2005).

4.3.2. Caracterización del entorno génico del gen *fur*

Después de aislar y secuenciar el gen *fur* de *H. parasuis* se caracterizó su entorno determinándose que delante del gen *fur* se encontraban dos ORF (*Open Reading Frame*) que codificaban una flavodoxina (*fldA*) y una proteína hipotética (Número de acceso del GenBank: DQ275197 y DQ275198, respectivamente) (Fig. 4.18).

```

ATGGCAAAGCAAGATTTCGGATTGTATTACGCTTGATCTGTTTGAAAATATGCCAAAGGTTGGGCGACCTCGCA
CAAATCCTCTAAGCCGAGAGCAACAAGTTAGAATTAATAAACGTAATCAACTCAGGCGAGATCGTTTCGTCAGG
ATTAAGACGGGTTGAGCTTAAATTTGCATTTCGGATTTAGTGGTGGCATTGGAACAAGAAGCAGCGGTAAAAGGA
CTGTCTAGAGGGCAGTTAATTTGAACTCATTTTAAACGATTATCTCAATGGGGATTCCATTGAATTAAGTAAAT
AGGTATTTCAAATGGCAGTTGTCGGTTTTATTTTACGGTAGTGATACTGGAAACACAGAAAATATTTCTAAAAT
GATTCAAAAACAACCTAGGTGCAAACCTAGTGGATATTCGTGATATTGCAAAAAGCACGAAAGAAGATATTGAA
GCCTACGATTTCTTATTAATTGGTATTCCAACGTGGTATTACGGTGAATCTCAAGCAGATTGGGACGATTTTA
TGCCGACGTTAAAAGAAAATTGATTTTACAGGAAAAATCGTGGGTATCTTTGGTTGTGGTGACCAAGAAGACTA
TGCAGAATATTTCTGCGATGCAATGGGAACTGTGCGTGATGTTATTGAACCTAACGGTGGGACTATTGTCGGT
CATTGGTCAACGGAAGGTTATACTTTTGGAGCCTTCACAAGCATTAGTTGATGATGAAACCTTTGTTGGCTTAT
GTATTGATGAAGATCGCCAGCCAGAACTCACCGAAGAACGTGTAAACCGTTGGTGTAAACAAATTTTTTGATGA
AATGTATTTAGCGGAATTAGCTTAAATATATCTATTGGAGGATATATGTCCTGAAGAAAATGTGAAACTGTTGAA
AAAAGTGGGTTTAAAAGTTACTGAACCACGTTTAAACAATCCTTGAGTTAATGCAAATCACCCGTGATAGTATG
CAGCATTTTCTGCTGAGGACATTTATAAATTATTGCTAGAACGTCAGTCTGAAATCGGGTTAGCAACAGTTT
ATCGCGTATTAATCAATTTGAAGAAGTTGGCATTTTAACTCGCCATAATTTTGA...

```

Fig. 4.18. Secuencia nucleotídica del entorno del gen *fur*. *proteína hipotética* (294 bases), *fldA* (525 bases) y parte del gen *fur*.

Asimismo, delante de la proteína hipotética se encontraba parte de otro ORF que codifica un regulador hipotético y detrás del gen *fur* otra proteína hipotética. Además, se comparó la secuencia del fragmento de 4 kb con otros organismos próximos filogenéticamente a *H. parasuis*, observándose homologías entre ellos (Fig. 4.19). Se determinó que la especie bacteriana que presenta mayor homología es *Haemophilus ducrey*, seguida por *P. multocida* y después por *H. influenzae* y, además, se observó que en todos los casos se conserva el gen *fldA* delante del *fur*.

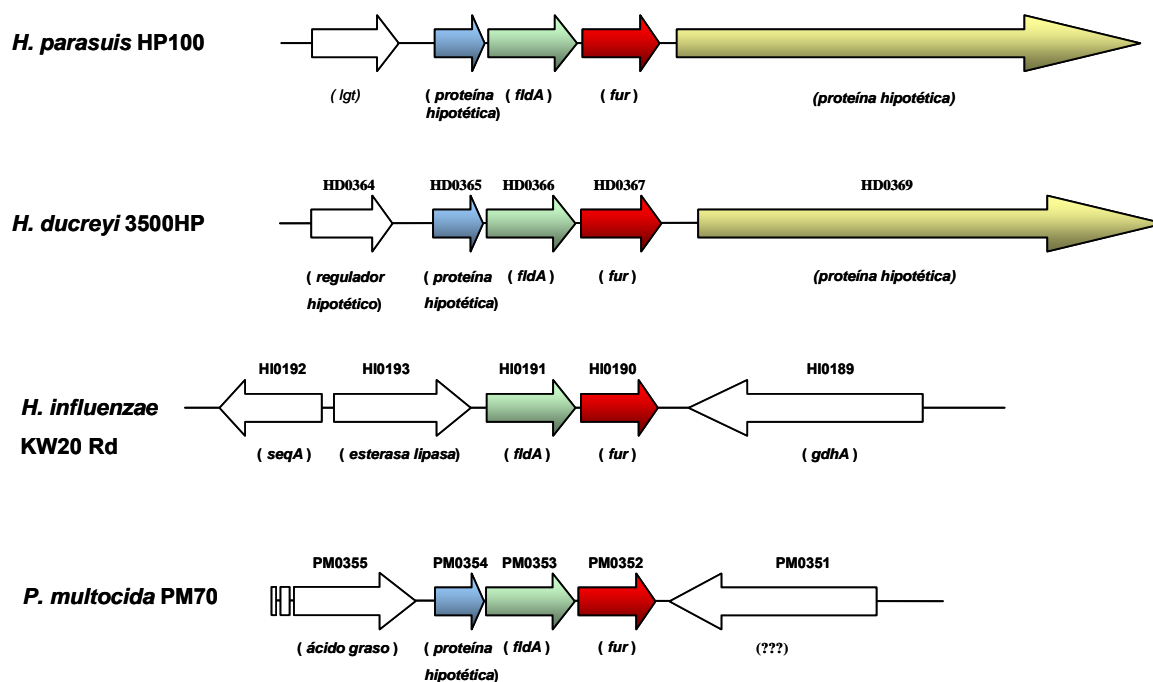


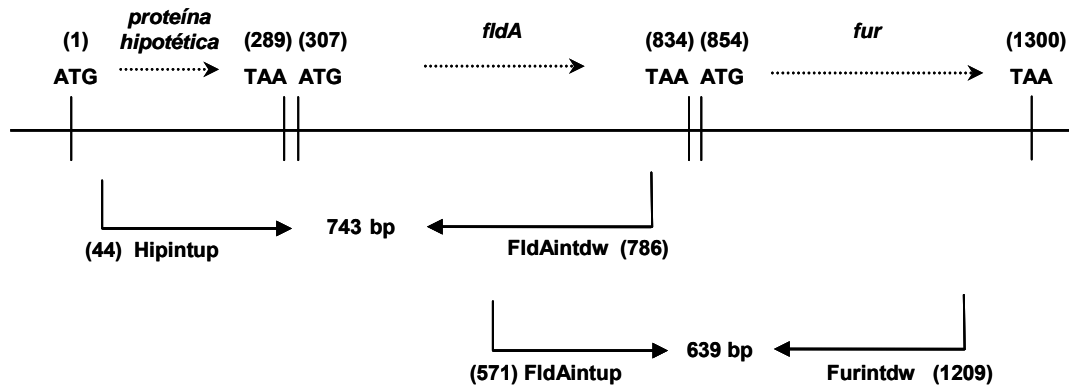
Fig. 4.19. Organización del gen *fur* y de su entorno génico en diferentes especies bacterianas. Los genes con homología se indican con el mismo color.

Seguidamente y mediante RT-PCR, se comprobó si los tres ORFs (la proteína hipotética, el gen *fldA* y el gen *fur*) constituían una unidad transcripcional, ya que se observó que existían muy pocas bases entre el final de un ORF y el inicio del siguiente (Fig. 4.20). Los resultados obtenidos demostraron que los 3 ORFs formaban una unidad transcripcional, siendo el gen *fur* el más distal del operón. En *E. coli* y otras bacterias, el gen *fur* se encuentra en una unidad transcripcional, formada por dos genes, el gen *fldA* y el *fur*, que se cotranscriben juntos únicamente en presencia de agentes generadores de superóxidos (Zheng *et al.*, 1999).

El gen *fldA* es esencial y codifica una flavodoxina, una proteína que contiene flavina, que se encuentra involucrada en procesos redox. Probablemente es importante para mantener el hierro libre del citosol en un estado redox determinado y proveer a la proteína Fur de Fe^{2+} (Zheng *et al.*, 1999). Sin embargo, se pudo determinar que en *H. parasuis*, la síntesis de la unidad

transcripcional no se inducía por la presencia en el medio de agentes generadores de superóxidos.

(A)



(B)

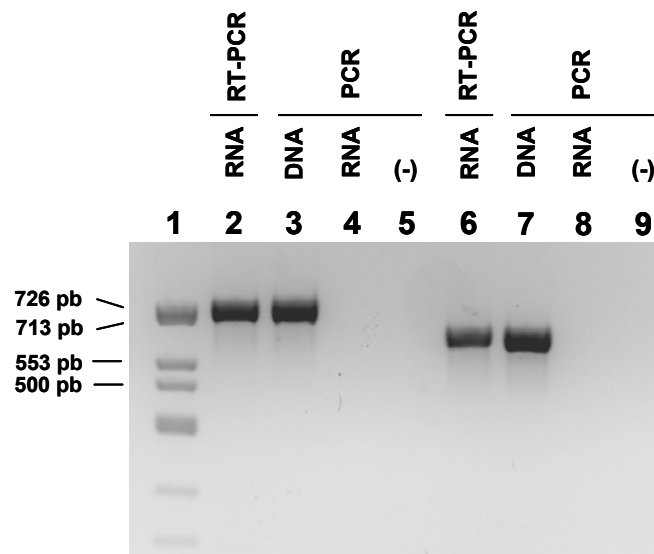


Fig. 4.20. (A) Representación de la organización génica de la región cromosómica del gen *fur* y los cebadores utilizados en la RT-PCR, indicando el tamaño de banda esperado. (B) Análisis por RT-PCR (carriles 2 y 6) y PCR (carriles del 3 al 5 y del 7 al 9) de la organización transcripcional del entorno del gen *fur*. Carriles del 2 al 5: cebadores Hipintup/FldAintdw y carriles del 6 al 9: cebadores FldAintup/Furintdw. Carril 1: marcador de peso molecular Φ X174 digerido con *Hinf*I; carriles 2, 4, 6 y 8: RNA de *H. parasuis*; carriles 3 y 7: DNA cromosómico de *H. parasuis*; carriles 5 y 9: control negativo.

4.3.3. Construcción de mutantes *fur* de *H. parasuis* y análisis de su viabilidad

El siguiente paso consistió en obtener un mutante *fur* de *H. parasuis* para su posterior estudio y uso como posible cepa vacunal. En primer lugar y mediante PCR *overlap extension*, se generó una diana *EcoRI* en medio del gen *fur* y se insertó el casete de resistencia a Km. Toda la construcción de 4 kb, aislada desde la librería genómica, junto con la resistencia a Km se clonó en el vector suicida pUA658, obteniéndose el plásmido recombinante pUA1076, el cual se utilizó para transformar a *H. parasuis*. En este caso, y a diferencia de todos los experimentos anteriores de transformación, no se obtuvo ningún clon recombinante. En vista de ello, se repitió dicha transformación en diferentes condiciones. Así, se aumentó la concentración de DNA y también se comprobó que el proceso de transformación era correcto utilizando el vector pUA1059 con un fragmento de 4 kb con el gen *thyA*, interrumpido mediante el mismo procedimiento que el empleado con el gen *fur*. En todos los experimentos en los que se transformó el gen *thyA* se obtuvieron clones en las placas selectivas, pero nunca cuando se utilizó el fragmento que contiene el gen *fur* interrumpido con el casete Km.

Se ha descrito en la bibliografía que mutantes *fur* de algunas especies bacterianas, bajo condiciones de aerobiosis, presentan un elevado daño oxidativo y altos niveles de mutación debido al aumento de la captación de hierro (Cabiscol *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2006). Por este motivo se realizó la transformación en condiciones de anaerobiosis, sin embargo, tampoco se obtuvieron transformantes.

De la misma forma, también se ha descrito la obtención de mutantes *fur* de especies de *Neisseria* por presión selectiva con manganeso, aunque no se conocen muy bien las razones. No obstante, utilizando este procedimiento no se obtuvieron clones transformantes de *H. parasuis* con el plásmido pUA1076.

En atención a los resultados obtenidos, y al hecho de que, según se ha descrito en la bibliografía, el gen *fur* es un gen esencial para la viabilidad de ciertas especies bacterianas, se hipotetizó que este gen debe ser también esencial en *H.*

parasuis. Para comprobar dicha hipótesis se propuso la construcción de una cepa merodiploide. Para ello, se clonó un fragmento de 2 kb que contenía toda la unidad transcripcional del gen *fur* en el vector pHRP309, estable en *H. parasuis*, obteniéndose el plásmido pUA1077 (Fig. 4.21). Posteriormente, se introdujo dicho plásmido por transformación en *H. parasuis*, obteniéndose así una cepa (HP103) con dos copias salvajes del gen *fur*, una en el cromosoma y la otra en el plásmido. Seguidamente, se introdujo en dicha cepa por transformación el plásmido pUA1076 que contiene el fragmento de 4 kb del genoma con el gen *fur*, interrumpido por la resistencia a la Km. En este caso se obtuvieron clones resistentes a Gm y a Km con una eficiencia de transformación de $2,5 \times 10^1$ transformantes/ μg DNA.

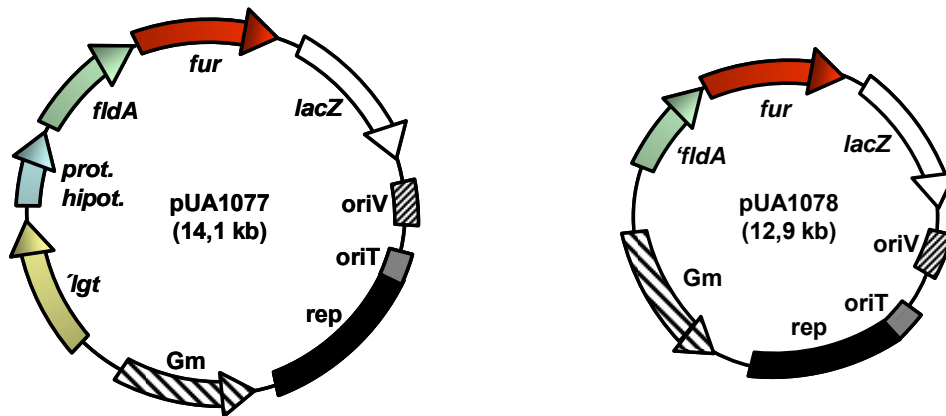


Fig. 4.21. Esquema de los plásmidos construidos (pUA1077 y pUA1078), a partir del plásmido pHRP309, estable en *H. parasuis*.

Para comprobar que el gen *fur* cromosómico había sido inactivado se llevaron a cabo estudios por PCR. En dichos análisis se utilizaron cebadores externos a la construcción de 4 kb y cebadores del casete de resistencia a Km. Los resultados obtenidos (Fig. 4.22) indicaban que se había producido un intercambio entre el gen *fur* del cromosoma y una copia de dicho gen interrumpida por la resistencia a la Km. Así, pudieron observarse bandas del tamaño correspondiente con ambas parejas de cebadores, mientras que dichas bandas no se obtenían cuando se usaba como molde DNA salvaje.

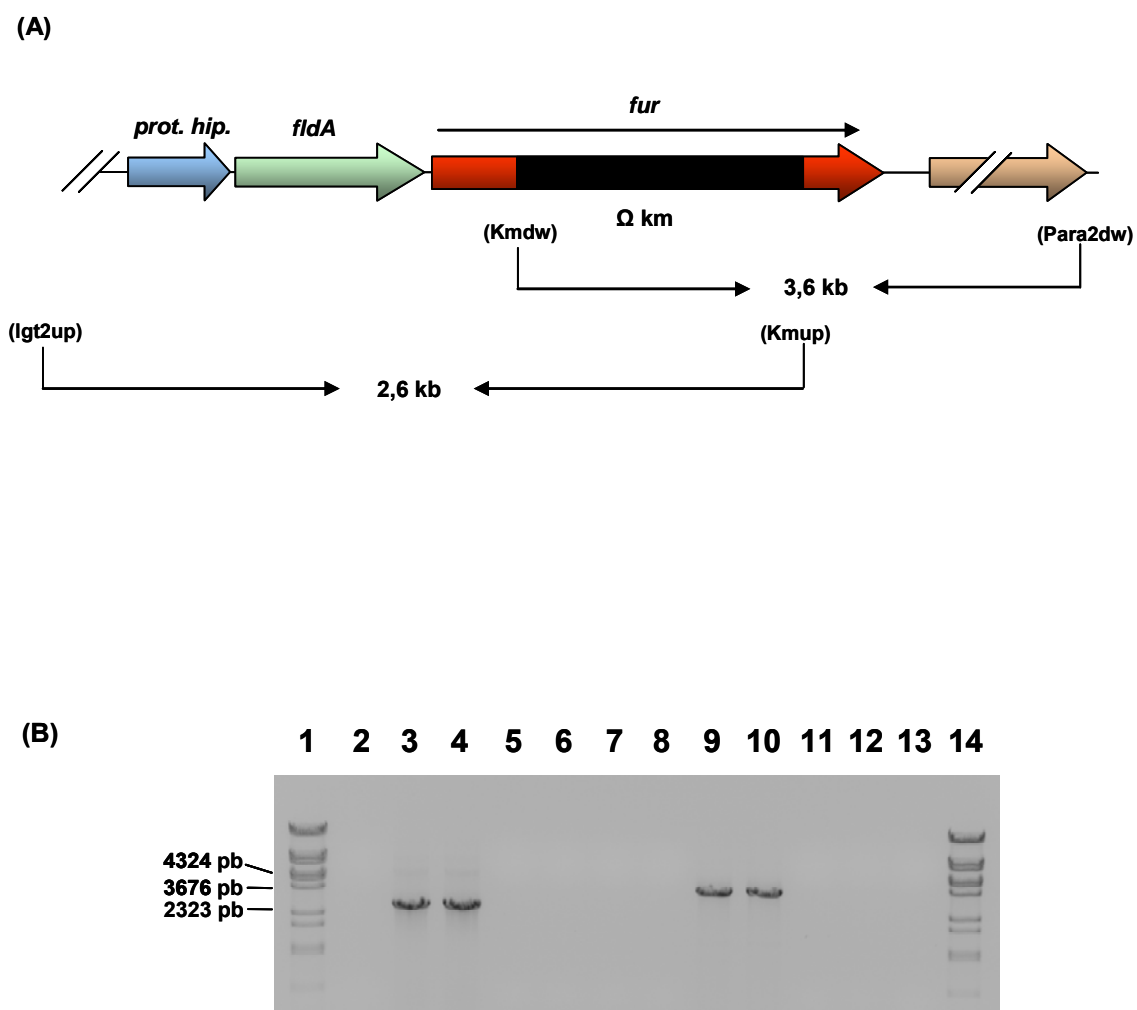


Fig. 4.22. Comprobación del merodiploide. (A) Representación de la construcción del merodiploide para el gen *fur* de *H. parasuis* y de los cebadores usados para su comprobación. (B) PCR de comprobación de los merodiploide obtenidos. Carriles del 2 al 7: cebadores lgt2up/Kmup; carriles del 8 al 13: cebadores Kmdw/Para2dw; carriles 1 y 14: marcador de peso molecular del bacteriófago λ digerido con *BstE*I; carriles 2 y 8: DNA cromosómico de la cepa salvaje; carriles 3, 4, 9 y 10: DNA cromosómico de dos mutantes; carril 5 y 11: vector pUA1059; carril 6 y 12: vector pUA1077; carril 7 y 13: control negativo.

Dado que se habían conseguido merodiploides utilizando un fragmento de 4 kb que contiene el gen *fur* inactivado con el casete de resistencia a Km, se estudió si también podían obtenerse merodiploides utilizando exclusivamente el gen *fur*. Para ello, se realizó el mismo procedimiento de obtención de merodiploides, pero usando como plásmido estable el pHRP309 con un fragmento clonado que únicamente contiene una región de aproximadamente 1 kb con el gen *fur* y una parte del gen *fldA* (Fig. 4.21). En este caso, después de la transformación con el plásmido pUA1076 no se obtuvieron clones. Estos resultados indicaban que inmediatamente delante del gen *fur* no había un promotor interno.

Asimismo, se utilizó también la misma estrategia pero clonando el gen *fur* bajo el control del promotor *tac* inducible por IPTG. Esta construcción se obtuvo en el plásmido pUA1088 y se muestra en la Figura 4.23.

Dicho plásmido fue introducido por transformación en *H. parasuis*, obteniéndose la cepa HP104, la cual fue transformada seguidamente con el plásmido pUA1076. En este experimento también se obtuvieron clones transformantes, en los cuales, tras comprobarse por PCR, se observó que también se había producido un intercambio entre el gen *fur* cromosómico y la copia salvaje inactivada presente en el plásmido pUA1076, incluso sin adicionar IPTG a las placas selectivas.

Es de destacar que a pesar de que el gen *fur* se encuentra en estos merodiploides bajo el control del *P_{tac}*, dicho promotor no se induce en *H. parasuis*, ya que en experimentos de RT-PCR a tiempo real no se observó ningún aumento del mRNA del gen *fur* al añadir IPTG al medio.

Por lo tanto, los resultados obtenidos con los tres vectores estables para la construcción de una cepa merodiploide fueron los que se indican en la Figura 4.24.

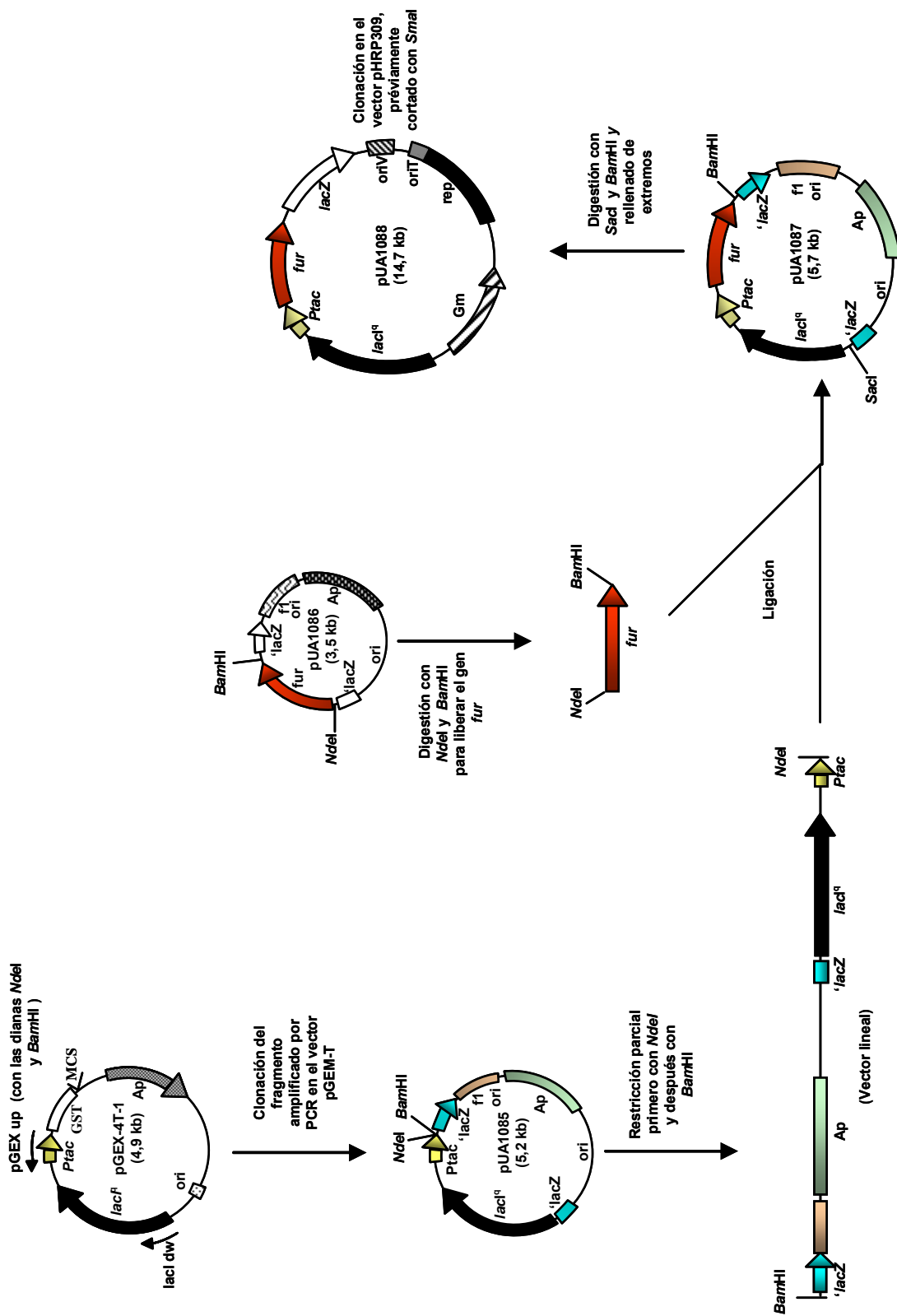


Fig. 4.23. Esquema de la construcción del vector pUA1088.

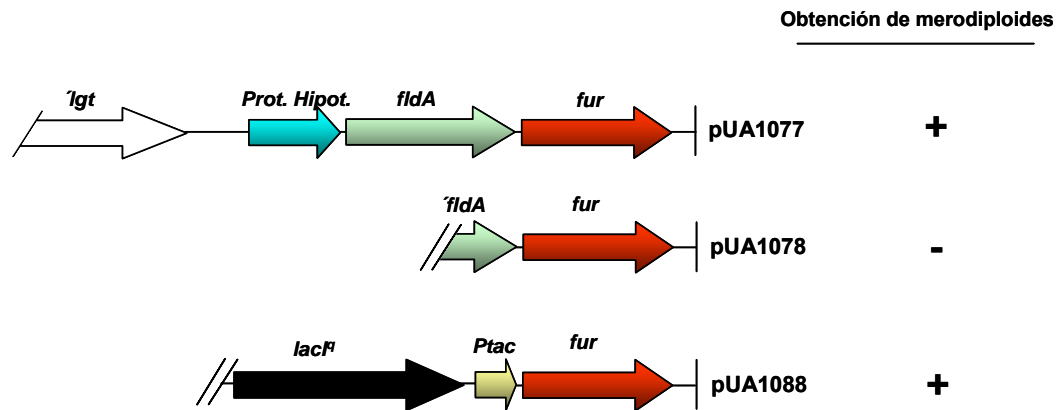
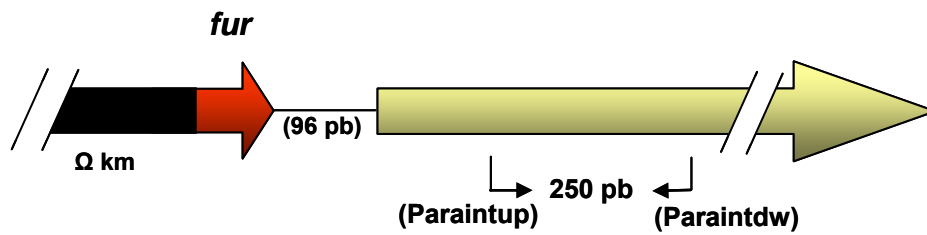


Fig. 4.24. Obtención de merodiploides *fur* según el plásmido estable utilizado.

Los datos obtenidos corroboraron la hipótesis de que el gen *fur* es esencial en *H. parasuis* ya que sólo se puede inactivar el gen cromosómico cuando se introduce una copia salvaje de dicho gen, provista de promotor, en la bacteria. En la bibliografía se habían descrito casos como son los de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, en los cuales los mutantes *fur* no son viables (Thomas y Sparling, 1996). Sin embargo, más recientemente, se ha observado que la viabilidad de estos mutantes dependía de un efecto polar en la expresión de los genes posteriores al *fur* (Delany *et al.*, 2003). Este efecto fue comprobado al obtenerse mutantes por resistencia al manganeso. Como se ha comentado anteriormente, en *H. parasuis* no ha sido posible obtener mutantes *fur* usando este procedimiento. No obstante, se decidió averiguar si existía transcripción de la región cromosómica posterior al gen *fur*, por lo cual se realizó un ensayo de RT-PCR en la cepa merodiploide. Los resultados obtenidos (Fig. 4.25) indicaron que la interrupción del gen *fur* en el cromosoma de *H. parasuis* no producía ningún efecto polar ya que se detectó transcripción del gen posterior al gen *fur*. Asimismo, ninguno de los vectores estables utilizados para la construcción de las cepas merodiploides contenía una copia salvaje de esta región, por lo tanto no existía ninguna posibilidad de complementación. En consecuencia, los resultados obtenidos confirman que la viabilidad de los mutantes *fur* depende exclusivamente del gen *fur*, lo cual probablemente debe atribuirse a que la proteína Fur es un regulador pleiotrópico y debe regular alguna función vital para las células de *H. parasuis*.

(A)



(B)

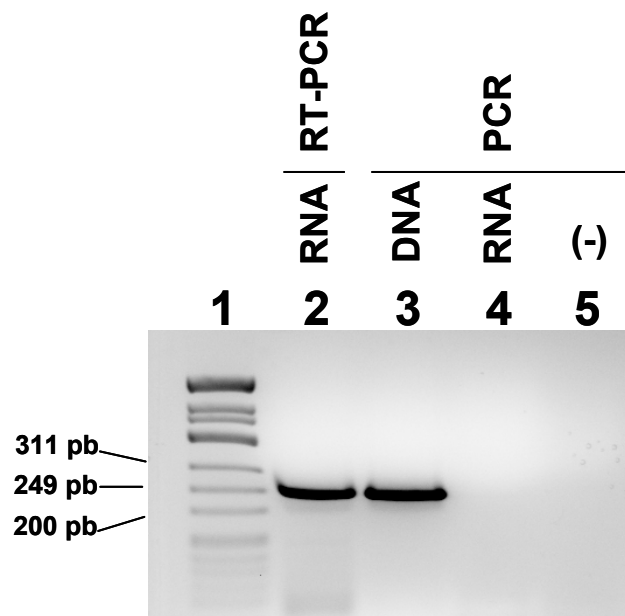


Fig. 4.25. Comprobación por RT-PCR del posible efecto polar de la interrupción del gen *fur*. (A) Representación de parte del gen *fur* y de su gen posterior. Se muestran los cebadores utilizados en la RT-PCR. (B) RT-PCR (carril 2) y PCR (carriles 3, 4 y 5) realizada del gen posterior al gen *fur* en la cepa merodiploide. Carril 1: marcador de peso molecular Φ X174 digerido con *Hinf*I; carriles 2 y 4: RNA de la cepa merodiploide; carril 3: DNA de la cepa merodiploide; carril 5: control negativo.

Al mismo tiempo se realizaron pruebas adicionales para confirmar que las cepas merodiploides eran capaces de complementar la mutación cromosómica en el gen *fur* y recuperar el fenotipo salvaje.

En primer lugar se comprobó si el crecimiento de las cepas salvaje y merodiploide era comparable. Para este fin, se realizó una siembra en una placa de agar chocolate con las tres cepas y se incubó durante 24 horas a 37°C. Los resultados obtenidos (Fig. 4.26) indican que no existían grandes diferencias de crecimiento entre las tres cepas en medio sólido.

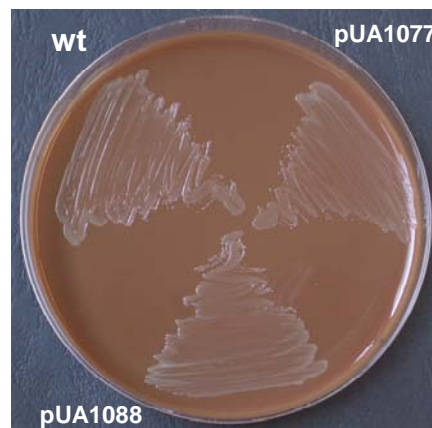


Fig. 4.26. Comparación del crecimiento en agar chocolate de la cepa salvaje de *H. parasuis* versus las cepas merodiploides construidas utilizando los plásmidos estables pUA1077 y el pUA1088.

Asimismo, se llevaron a cabo pruebas de crecimiento en medio líquido (TyE + NAD-Cys) de la cepa salvaje y de las cepas merodiploides. Los resultados obtenidos (Fig. 4.27) mostraron claras diferencias. Así, la cepa que creció mejor fue la salvaje mientras que, el merodiploide con el plásmido pUA1088 presentó un crecimiento muy deficiente.

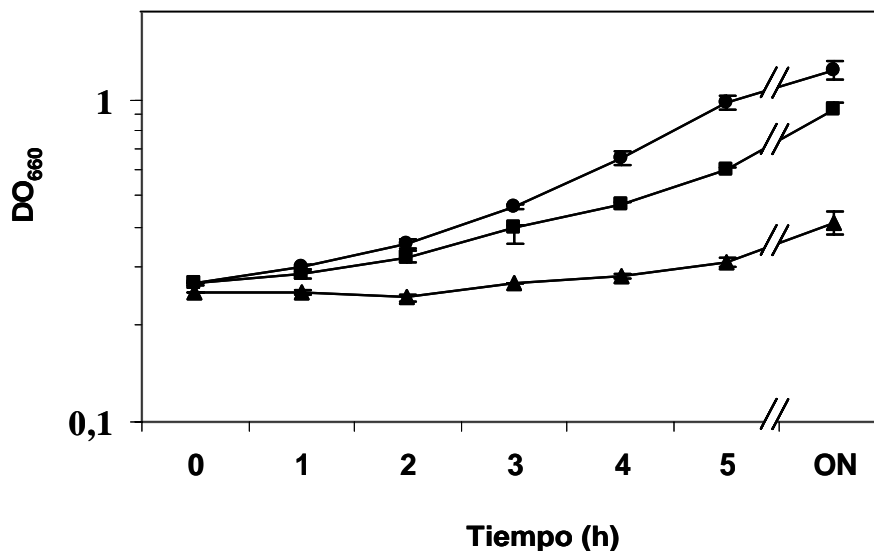


Fig. 4.27. Crecimiento en medio líquido de la cepa salvaje (●) de *H. parasuis* y de los merodiploides construidos utilizando los plásmidos pUA1077(■) y pUA1088 (▲).

Dicho crecimiento mejoró al añadir al medio de cultivo hierro a 100 μM , mientras que a una concentración de 10 μM , se observaron pocas diferencias (Fig. 4.28).

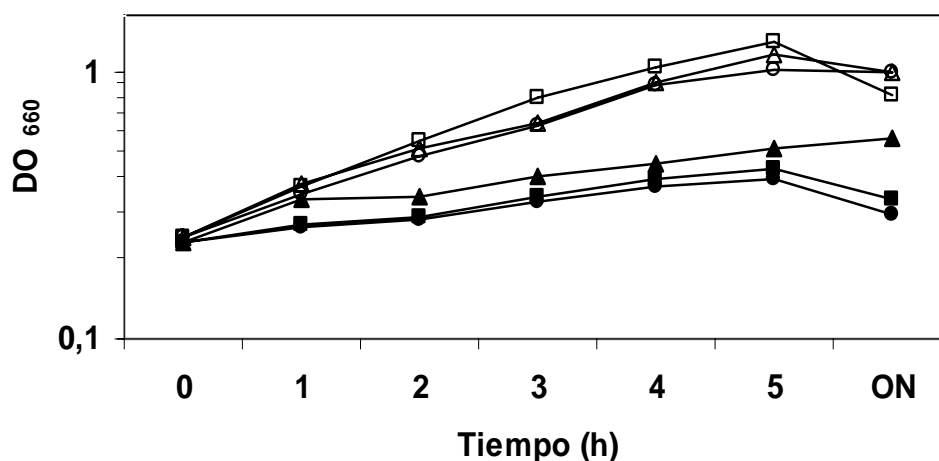


Fig. 4.28. Crecimiento en medio líquido TyE + NAD-Cys, de la cepa salvaje (símbolo vacío) de *H. parasuis* y de la cepa merodiploide con el pUA1088 (símbolo lleno) en presencia y ausencia de hierro a 0 (○,●) 10 (□, ■) y 100 (Δ,▲) μM . La desviación estándar de cada uno de los puntos en ningún caso supera el 2% de su valor.

Estos resultados fueron corroborados al determinar la absorbancia de los cultivos a tiempo 0 y a las 24 horas de incubación en medio TyE suplementado con hierro a 100 μM . Así, la adición de hierro no afecta a la biomasa obtenida a las 24 h de incubación de la cepa salvaje ni del merodiploide que porta el plásmido pUA1077, mientras que, en estas condiciones, la biomasa obtenida para el merodiploide con el plásmido pUA1088 es significativamente superior.

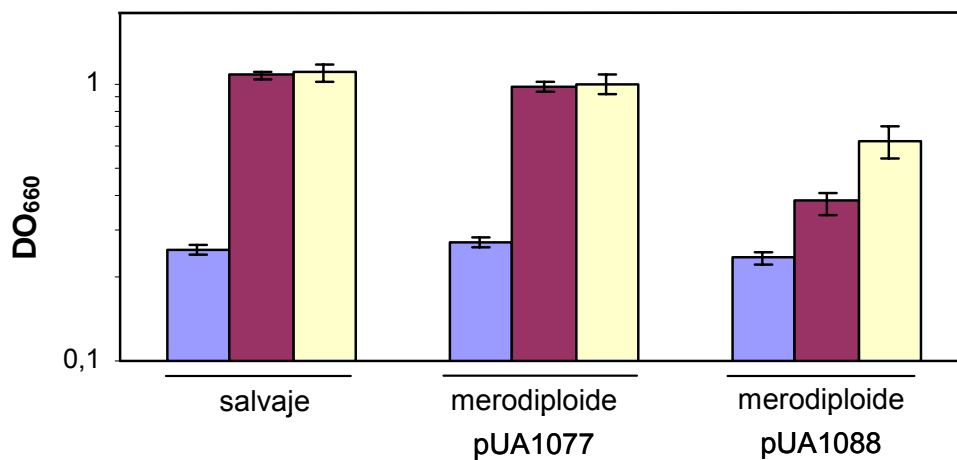


Fig. 4.29. Crecimiento de las tres cepas (salvaje y merodiploides) en medio TyE + NAD-Cys. Los valores representados corresponden al tiempo 0 horas (■) y 24 horas con 100 μM de hierro (□) o sin hierro (■).

Una posible explicación a estos resultados puede derivarse del hecho de que la cepa merodiploide con el pUA1088 contiene el gen *fur* bajo el control del promotor fuerte *P_{tac}* de *E. coli*, el cual, como ya se ha indicado, no cambia su pauta de transcripción por la adición de IPTG al medio. Por lo tanto, si no existe variación de la transcripción significa que el represor del sistema (*lacI*) no funciona correctamente en *H. parasuis* y, en consecuencia, y a pesar de que el promotor no es propio de *H. parasuis*, deben haber altos niveles de síntesis de la proteína Fur. Dado que ésta tiene la capacidad de unir el hierro presente en el interior de la célula, si incrementa la concentración intracelular de proteína Fur también quelará más hierro, pudiendo dejar a la célula sin el suficiente hierro para su crecimiento.

Al adicionar hierro al medio de cultivo es posible que la concentración intracelular de hierro para el metabolismo sea más adecuada. En cambio, en el merodiploide que contiene el plásmido pUA1077, el gen *fur* está bajo control de su propio promotor y por ello la síntesis de la proteína Fur debe estar mucho mejor regulada.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que pueden extraerse del trabajo realizado en la presente tesis son los siguientes:

1. Se ha demostrado que *H. parasuis* presenta transformación natural y que la mejor eficiencia de transformación se obtiene cuando se adicionan conjuntamente con las células AMPc a 8 mM y DNA transformante a una concentración de 1 µg. Asimismo, el tiempo de expresión fenotípica más adecuado es de 5 horas.
2. Para que ocurra la transformación natural es imprescindible la presencia de una secuencia USS en el DNA transformante. Dicha secuencia es ACCGAACTC muy similar al motivo ACCGCACTT descrito en *H. influenzae*.
3. Se ha aislado y caracterizado el gen *thyA* de *H. parasuis* que codifica la timidilato sintasa y se ha obtenido un mutante *knockout* de dicho gen, mediante transformación natural.
4. En un modelo animal de cobayas se ha demostrado que la cepa mutante de *H. parasuis*, defectiva en la enzima timidilato sintasa, tiene una menor capacidad colonizadora que la cepa salvaje. Sin embargo, dicho mutante es capaz de producir una respuesta inmune en el huésped a un nivel similar al de la cepa salvaje.
5. Se han detectado anticuerpos frente a las OMPs de *H. parasuis* en los sueros extraídos de cobayas infectados tanto con la cepa salvaje como con la cepa mutante *thyA*.

6. Se ha aislado y caracterizado el gen *fur* de *H. parasuis*. En dicho gen se ha identificado la presencia del motivo altamente conservado de unión a metales, definido como H₂XHX₂CX₂CG, y de los residuos TVY, relacionados con la hélice de reconocimiento del DNA.
7. La caracterización del entorno génico del gen *fur* de *H. parasuis* ha permitido definir una unidad transcripcional de tres ORFs, siendo el gen *fur* el más distal y estando situado detrás de una proteína hipotética y del gen *fldA*.
8. La obtención de un mutante *fur* de *H. parasuis* natural es inviable por lo que dicho gen es esencial para la viabilidad de la bacteria.
9. La construcción de cepas merodiploides para el gen *fur* han permitido confirmar la letalidad del mutante *fur*, la cual sólo depende de dicho gen y no de efectos polares.

5. BIBLIOGRAFÍA

Adrait, A., Jacquamat, L., Le Pape, L., Gonzalez de Peredo, A., Aberdam, D., Hazemann, J.L., Latour, J.M. y Michaud-Soret, I., 1999. Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 38(19): 6248-6260.

Ahmad, S.I., Kirk, S.H. y Eisenstark, A., 1998. Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52: 591-625.

Ahmed, Z.U., Mahfuzur, R.S. y Sack, D.A., 1990. Protection of adult rabbits and monkeys against shigellosis by oral immunization with a thymine-requiring and temperature-sensitive mutant of *Shigella flexneri* Y. *Vaccine*, 8: 153-158.

Aisen, P., 1998. Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Metal Ions Biol. Syst.*, 35: 585-631. (Sigel, A. & Sigel, H., eds) Marcel Dekker.

Albritton, W.L., Setlow, J.K., Thomas, M., Sottnek, F. y Steigerwalt, A.G., 1984. Heterospecific transformation in the genus *Haemophilus*. *Mol. Gen. Genet.*, 193(2): 358-363.

Althaus, E.W., Outten, C.E., Olson, K.E., Cao, H. y O'Halloran, T.V., 1999. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry*, 38(20): 6559-6569.

Amano, H., Shibata, M., Takahashi, K. y Sasaki, Y., 1997. Effects on endotoxin pathogenicity in pigs with acute septicemia of *Haemophilus parasuis* infection. *J. Vet. Med. Sci.*, 59(6): 451-455.

Anderson, J.E., Sparling, P.F. y Cornelissen, S.N., 1994. Gonococcal transferrin-binding protein-2 facilitates but is not essential for transferring utilization. *J. Bacteriol.*, 176: 3162-3170.

Andrews, S.C., 1998. Iron storage in bacteria. *Adv. Microbial Physiol.*, 40: 281-351.

Andrews, S.C., Robinson, A.K. y Rodríguez-Quñones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27(2-3): 215-237.

Angen, Ø., Svensmark, B. y Mittal, K.R., 2004. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates. *Vet. Microbiol.*, 103(3-4): 255-258.

Angen, Ø., Oliveira, S., Ahrens, P., Svensmark, B. y Leser, T.D., 2007. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.*, 119(2-4): 266-276.

Angerer, A., Gaisser, S. y Braun, V., 1990. Nucleotide sequences of the *sfuA*, *sfuB*, and *sfuC* genes of *Serratia marcescens* suggest a periplasmic-binding protein-dependent iron transport mechanism. *J. Bacteriol.*, 172(2): 572-578.

Ansaldi, M., Marolt, D., Stebe, T., Mandic-Mulec, I. y Dubnau, D., 2002. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. *Mol. Microbiol.*, 44(6): 1561-1573.

Arceneaux, J.E.L. y Byers, B.R., 1980. Ferrisiderophore reductase activity in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 141(2): 715-721.

Arwet, F. y Venema, G., 1973. Transformation in *Bacillus subtilis*. Fate of newly introduced transforming DNA. *Mol.Gen. Genet.* 123: 185-198.

Avery, O.T., MacLeod, C.M. y McCarthy, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *pneumococcal* types. I. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *pneumococcus* type III. J. Exp. Med., 79: 137-158.

Bacon Schneider, K., Palmer, T.M. y Grossman, A.D., 2002. Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 184(2): 410-419.

Bagg, A. y Neilands, J.B., 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. Biochemistry, 26: 5471-5477.

Baichoo, N. y Helmann, J.D., 2002. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. J. Bacteriol., 184(21):5826-5832.

Bakos, K., 1955. Studien über *Haemophilus suis*, mit besonderer Berücksichtigung der serologischen Differenzierung seiner Stämme. D.V.M. dissertation. University of Stockholm, Stockholm, Sweden. (In German.)

Belfort, M., Maley, G., Pedersen-Lane, J. y Maley, F., 1983. Primary structure of the *Escherichia coli thyA* gene and its thymidylate synthase product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80(16): 4914-4918.

Bergé, M., Moscoso, M., Prudhomme, M., Martin, B. y Claverys JP., 2002. Uptake of transforming DNA in Gram-positive bacteria: a view from *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Microbiol., 45(2): 411-421.

Biberstein, E.L. y White, D.C., 1969. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. J. Med. Microbiol., 2(1),75-78.

Biswas, G.D., Sox, T., Blackman, E. y Sparling, P.F., 1977. Factors affecting genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol., 129(2): 983-992.

Blackall, P.J., Trott, D.J., Rapp-Gabrielson, V. y Hampson, D., 1997. Analysis of *Haemophilus parasuis* by multilocus enzyme electrophoresis. *Vet. Microbiol.*, 56(1-2): 125-134.

Blakley, R. L., 1969. The biochemistry of folic acid and related pteridines. Vol. 13 in the series “Frontiers of Biology” North Holland, Amsterdam.

Bosch, M., Tarragó, R., Garrido, M.E., Campoy, S., Fernández de Henestrosa, A.R. Pérez de Rozas, A.M., Badiola, I. y Barbé, J., 2001. Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol. Lett.*, 203(1): 35-40.

Bosch, M., Garrido, M.E., Pérez de Rozas, A.M., Badiola, I., Barbé, J. y Llagostera, M., 2004. *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin-and haemoglobin-binding protein. *Vet. Microbiol.*, 99(2):103-112.

Braun, V., 1985. The iron transport systems of *Escherichia coli*. In: *The Enzymes of Biological Membranes* (Martonosi, A.N., ed.), 617-652. Plenum Press, New York.

Braun, V., Hantke, K. y Köster, W., 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics and regulation. In: *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, A. & Sigel, H., Eds.). Vol. 35: 67-145. Marcel Dekker, New York.

Braun, V. y Killmann, H., 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem. Sci.*, 24(3):104-109.º

Braun, V. y Hantke, K., 2002. Mechanisms of bacterial iron transport, 289-311. In: Winkelmann, G., (ed.), *Microbial transport systems*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Berlin, Germany.

Briat, J.F. y Lobreaux, 1999. Iron storage and ferritin in plants. *Metal Ions in Biological Systems*, 35: 564-584. *Iron Transport and Storage in Microorganisms, Plants and Animals*. New York: Marcel Dekker.

Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. y Helmann, J.D., 1998. *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol. Microbiol.*, 29(1): 189-198.

Buchanan, S.K., Smith, B.S., Venkatramani, L., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D. y Deisenhofer, J., 1999. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* 6(1): 56-63.

Budman, D.R. y Pardee, A.B., 1967. Thymidine and thymine incorporation into deoxyribonucleic acid: inhibition and repression by uridine of thymidine phosphorylase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 94(5): 1546-1550.

Burchall, J.J., 1979. The development of the diaminopyrimidines. *J. Antimicrob. Chemother.*, 5(B): 3-14.

Byers, B.R. y Arceneaux, J.E.L., 1998. Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms. In: *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, A. & Sigel, H., Eds.) Vol. 35: 37-66. Marcel Dekker.

Cabiscol, E., Tamarit, J. y Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.*, 3(1): 3-8.

Cai, X., Chen, H., Blackall, P.J., Yin, Z., Wang, L., Liu, Z. y Jin, M., 2005. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China. *Vet. Microbiol.* 111(3-4): 231-236.

Calderwood, S.B. y Mekalanos, J.J., 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J. Bacteriol.*, 169(10): 4759-4764.

Campbell, E.A., Choi, S.Y. y Masure, H.R., 1998. A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol. Microbiol.*, 27: 929-939.

Carlson, J.H. y Hill, S.A., 1997. Identification and characterization of thymidylate synthase from *Neisseria gonorrhoeae*. FEMS Microbiol. Lett., 151(2): 225-230.

Cersini, A., Salvia, A.M. y Bernardini, M.L., 1998. Intracellular multiplication and virulence of *Shigella flexneri* auxotrophic mutants. Infect. Immun., 66(2): 549-557.

Chandler, M.S., 1992. The gene encoding cAMP receptor protein is required for competence development in *Haemophilus influenzae* Rd. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(5): 1626-1630.

Chen, I. y Gotschlich, E.C., 2001. ComE, a competence protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-binding activity. J. Bacteriol., 183(10): 3160-3168.

Chen, I. y Dubanu, D., 2004. DNA uptake during bacterial transformation. Nat. Rev. Microbiol. 2(3): 241-249.

Claverys, J.P. y Havarstein, L.S., 2002. Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Front. Biosci., 7: 1798-1814.

Claverys, J.P. y Martin, B., 2003. Bacterial 'competence' genes: signatures of active transformation, or only remnants? Trends Microbiol., 11(4): 161-165.

Clifton, S.W., McCarthy, D. y Roe, B.A., 1994. Sequence of the *rec-2* locus of *Haemophilus influenzae*: homologies to come-ORF3 of *Bacillus subtilis* and *msbA* of *Escherichia coli*. Gene 146(1):95-100.

Cooksley, C., Jenks, P.J., Green, A., Cockayne, A., Logan, R.P. y Hardie, K.R., 2003. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. J. Med. Microbiol., 52: 461-469.

Cope, L.D., Thomas, S.E., Latimer, J.L., Slaughter, C.A., Muller-Eberhard, U. y Hansen, E.J., 1994. The 100 kDa heme-hemopexin binding protein of *Haemophilus influenzae*: structure and localization. *Mol. Microbiol.*, 13(5): 863-873.

Cornelissen, C.N. y Sparling, P.F., 1994. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.*, 14: 843-850.

Cox, C.D., 1980. Iron reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 141(1): 199-204.

Coy, M. y Neilands, J.B., 1991. Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry*, 30(33): 8201-8210.

Crichton, R.R., 1991. Inorganic biochemistry of iron metabolism. Ellis Horwood, New York, N.Y.

Crichton, R.R. y Ward, R.J., 1998. Iron homeostasis. *Met. Ions Biol. Syst.*, 35: 633-665.

Dailey, H.A. y Lascelles, J., 1977. Reduction of iron and synthesis of protoheme by *Spirillum itersonnii* and other organisms. *J. Bacteriol.*, 129(2): 815-820.

Davidoff-Abelson, R. y Dubnau, D., 1973. Conditions affecting the isolation from transformed cells of *Bacillus subtilis* of high molecular weight single-stranded deoxyribonucleic acid of donor origin. *J. Bacteriol.* 116(1): 146-153.

Deich, R.A. y Smith, H.O., 1980. Mechanism of homospecific DNA uptake in *Haemophilus influenzae* transformation. *Mol. Gen. Genet.*, 177(3):369-374.

Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. y Scarlato, V., 2001. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.*, 42(5): 1297-1309.

Delany, I., Ieva, R., Alaimo, C., Rappuoli, R. y Scarlato, V., 2003. The iron-responsive regulator Fur is transcriptionally autoregulated and not essential in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.*, 185(29): 6032–6041.

de la Puente-Redondo, V.A., Garcia del Blanco, N., Gutiérrez-Martín, C.B., Mendez, J. y Rodríguez Ferri, E.F., 2000. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes. *Res. Microbiol.*, 151(8): 669-681.

de la Puente Redondo, V.A., Navas, J., Garcia, N., Ladron, N., Gutiérrez-Martín, C.B. y Rodríguez Ferri, E.F., 2003. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene. *Vet. Microbiol.*, 92(3): 253-262.

de Lorenzo, V., Wee, S., Herredo, M., and Neilands, J.B., 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J. Bacteriol.*, 169(6): 2624-2571.

del Río, M.L., Gutiérrez, C.B. y Rodríguez Ferri, E.F., 2003. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.*, 41(2): 880-882.

del Río, M.L., Gutiérrez-Martín, C.B., Rodríguez-Barbosa, I. Navas, J., y Rodríguez Ferri, E.F., 2005. Identification and characterization of the TonB region and its role in transferrin-mediated iron acquisition in *Haemophilus parasuis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 45(1): 75-86.

del Río, M.L., Martín, C.B., Navas, J., Gutiérrez-Muniz, B., Rodríguez Barbosa, J.I. y Rodríguez Ferri, E.F., 2006a. *aroA* gene PCR-RFLP diversity patterns in *Haemophilus parasuis* and *Actinobacillus* species. *Res. Vet. Sci.*, 80(1): 55-61.

del Río, M.L., Navas, J., Martín, A.J, Gutiérrez, C.B., Rodríguez-Barbosa, I. y Rodríguez Ferri, E.F., 2006b. Molecular characterization of *Haemophilus parasuis* ferric hydroxamate uptake (*fhu*) genes and constitutive expression of the FhuA receptor. *Vet. Res.*, 37(1): 49-59.

de Luca, N., Wexler, M., Pereira, M.J., Yeoman, K.H. y Johnston, A.W., 1998. Is the fur gene of *Rhizobium leguminosarum* essential? FEMS Microbiol. Lett., 168(2): 289-295.

D'Enfert, C., Diaquin, M., Delit, A., Wuscher, N., Debeaupuis, J.P., Huerre, M. y Latge, J.P., 1996. Attenuated virulence of uridine-uracil auxotrophs of *Aspergillus fumigatus*. Infect. Immun., 64(10): 4401-4405.

Dorocicz, I.R., Williams, P.M. y Redfield, R.J., 1993. The *Haemophilus influenzae* adenylate cyclase gene: cloning, sequence, and essential role in competence. J. Bacteriol., 175(22): 7142-7149.

Drechsel, H. y Winkelmann, G., 1997. Iron chelation and siderophores. In: Transition Metals in Microbiol Metabolism, ed. Winkelmann, G., Carrano, C.J., pp. 1-9. Amsterdam, the Netherlands: Harwood Acad.

Drechsel, H. y Jung, G., 1998. Peptide siderophores. J. Pept. Sci., 4(3): 147-181.

Dubnau, D., y Cirigliano, C., 1972a. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. III. Formation and properties of products isolated from transformed cells which are derived entirely from donor DNA. J. Mol. Biol. 64: 9-29.

Dubnau, D., y Cirigliano, C., 1972b. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. IV. The endwise attachment and uptake of transforming DNA. J. Mol. Biol. 64: 31-46.

Dubnau, D., 1976. Genetic transformation of *Bacillus subtilis*: a review with emphasis on the recombination mechanism. In: Microbiology, ed. D Schlessinger, pp. 14-27. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.

Dubnau, D. y Cirigliano, C., 1974. Uptake and integration of transforming DNA in *Bacillus subtilis*. In: Mechanisms in Recombination, ed. RF Grell. London/New York: Plenum.

Dubnau, D., 1999. DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 217-224.

Dubrac, S. y Touati, D., 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J. Bacteriol.*, 182(13): 3802-3808.

Elkins, C., Totten, P.A., Olsen, B. y Thomas, C.E., 1998. Role of the *Haemophilus ducreyi* Ton system in internalisation of heme from haemoglobin. *Infect. Immun.*, 66(1): 151-160.

Elkins, M.F. y Earhart, C.F., 1989. Nucleotide sequence and regulation of the *Escherichia coli* gene for ferrienterobactin transport protein FepB. *J. Bacteriol.*, 171(10): 5443-5451.

Ernst, J.F. y Winkelmann, G., 1977. Enzymatic release of iron from sideramines in fungi: NADH: sideramine oxidoreductase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 500(1): 27-41.

Escolar, L., Pérez-Martín, J. y De Lorenzo, V., 1999. Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.*, 181(20): 6223-6229.

Farmer, J.L. y Rothman, F., 1965. Transformable thymine-requiring mutant of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 89: 262-263.

Fascius, D. y Meyer, T.F., 1993. A novel determinant (*comA*) essential for natural transformation competence in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* 10(4): 699-712.

Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W., Diederichs, K. y Welte, W., 1998. Siderophore-mediated iron transport: Crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science*, 282(5397): 2215-2220.

Ferguson, A.D., Chakraborty, R., Smith, B.S., Essr, L., Van der Helm, D. y Deisenhofer, J., 2002. Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science*, 295(5560): 1715-1719.

Fields, P.I., Swanson, R.V., Haidaris, C.G. y Heffron, F., 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Acad. Proc. Natl. Sci. USA*, 83: 5189-5193.

Fisher, E., Strehlow, B., Hartz, D. y Braun, V., 1990. Soluble and membrane-bound ferrisiderophore reductases of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.*, 153(4): 329-336.

Fitzmaurice, W.P., Benjamin, R.C., Huang, P.C. y Scocca, J.J., 1984. Characterization of recognition sites on bacteriophage HP I cl DNA which interact with the DNA uptake system of *Haemophilus influenzae*. *Gene*, 31: 187-196.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Fult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, R., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Fuhrmann, J.L., Goeghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O. y Venter, J.C., 1995. Whole genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269: 496-512.

Foster, J.W. y Hall, H.K., 1992. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.*, 174(13): 4317-4323.

Franza, T., Sauvage, C. y Expert, D., 1999. Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12(2): 119-128.

Friedkin, M. y Kornberg, A., 1957. The enzymatic conversion of deoxyuridylic acid to thymidylic acid and the participation of tetrahydrofolic acid. In: A Symposium on the Chemical Basis of Heredity, ed. WD Mc Elroy, B Glass, p. 609. Baltimore, MD: John Hopkins Univ. Press.

Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64: 97-112.

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

Furano, K., y Campagnari, A.A., 2003. Inactivation of the *Moraxella catarrhalis* 7169 ferric uptake regulator increases susceptibility to the bactericidal activity of normal human sera. *Infect. Immun.*, 71(4): 1843-1848.

Gaines, C.G., Lodge, J.S., Arceneaux, J.E.L. y Byers, B.R., 1981. Ferrisiderophore reductase activity associated with an aromatic biosynthetic complex in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 148(2): 527-533.

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

Ghassemian, M. y Straus, N.A., 1996. Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology*, 142(6): 1469-1476.

Goodgal, S. y Herriott, R., 1961. Studies on transformations of *Haemophilus influenzae*: I. Competence. *J. Gen. Physiol.* 44: 1201-1227.

Goodman, S.D. y Scocca, J.J., 1988. Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(18): 6982-6986.

Grossman, A.D., 1995. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.*, 29: 477-508.

Gruer, M.J. y Guest, J.R., 1994. Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 140(10): 2531-2541.

Guerry, P., Pérez-Casal, J., Yao, R., McVeigh, A. y Trust, T.J., 1997. A genetic locus involved in iron utilization unique to some *Campylobacter* strains. *J. Bacteriol.*, 179(12): 3997-4002.

Hamoen, L.W., Venema, G. y Kuipers, O.P., 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis* shared use of regulators. *Microbiology*, 149(1): 9-17.

Hamza, I., Chauhan, S., Hassett, R. y O'Brian, M.R., 1998. The bacterial Irr protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. *J. Biol. Chem.*, 273(34): 21669-21674.

Hantke, K. y Braun, V., 2000. The art of keeping low and high iron concentrations in balance. In: *Bacterial Stress Responses* (Storz, G. & Hengge-Aronis, R., eds), pp 275-288. ASM Press, Washington, DC.

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

Higgs, P.I., Larsen, R.A. y Postle, K., 2002. Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transducing system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol. Microbiol.*, 44(1): 271-281.

Hill, C.E., Metcalf, D.S. y MacInnes, J.I., 2003. A search for virulence genes of *Haemophilus parasuis* using differential display RT-PCR. *Vet. Microbiol.*, 96(2): 189-202.

Hirono, I., Tange, N. y Aoki, T., 1997. Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. Mol. Microbiol., 24(4): 851-856.

Hitchins, G.H., 1973. Mechanism of action of trimethoprim-sulfamethoxazole. I.J. Infect. Dis., 128 (Suppl.): 433-436.

Hjärre A. y Wramby G., 1943. Über die fibrinöse SerosaGelenkentzündung beim Schwein. Z. Infektionskr Parasitenkd Krankheit Hyg. Haustiere, 60, 37-64.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. y Pease, L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene, 77(1):51-59.

Huovinen, P., 1987. Trimethoprim resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 31(10): 1451-1456.

Inamine, G.S. y Dubnau, D., 1995. ComEA in *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. J. Bacteriol. 177(11): 3045-3051.

Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J.L., Latour, J.M. y Michaud-Soret, I., 1998. X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein from *Escherichia coli*. Biochemistry, 37(8): 2564-2571.

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

Jacobsen, I., Gerstenberger, J., Gruber, A.D., Bossé, J.T., Langfor, P.R., Hening-Pawka, I., Meens, J. y Gerlack, G.F., 2005. Deletion of the ferric uptake regulator Fur impairs the in vitro growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun., 73(6): 3740-3744.

Jin, H., Zhou, R., Kang, M., Luo, R., Cai, X. y Chen, H., 2006. Biofilm formation by field isolates and reference strains of *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.*, 118(1-2): 117-123.

Jung, K. y Chae, C., 2004. In-situ hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in naturally infected pigs. *J. Comp. Pathol.*, 130(44): 294-298.

Jung, K., Ha, Y., Kim, S.H. y Chae, C., 2004. Development of polymerase chain reaction and comparison with in situ hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Med. Sci.*, 66(7): 841-845.

Kahn, M.E. y Smith, H.O., 1984. Transformation in *Haemophilus*: a problem in membrane biology. *J. Membr. Biol.* 81: 9-103.

Kielstein, P., Rosner, H. y Müller, W., 1991. Typing of heat-stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of agar gel precipitation and the dot-blot procedure. *J. Vet. Med. Ser. B.*, 38: 315-320.

Kielstein, P. y Rapp-Gabrielson, V.J., 1992. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts. *J. Clin. Microbiol.*, 30(4): 826-865.

Kilian, M., 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.*, 93(1):9-62.

Koebnik, R., Bäuml, A.J., Heeseman, J., Braun, V. y Hantke, K., 1993. The TonB protein of *Yersinia enterocolitica* and its interactions with TonB-box proteins. *Mol. Gen. Genet.*, 237(1-2): 152-160.

Köster, W. y Braun, V., 1990. Iron (III) hydroxamate transport into *Escherichia coli*: substrate binding to the periplasmic FhuD protein. *J. Biol. Chem.*, 265(35): 21407-21410.

Köster, W., 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B₁₂. *Res. Microbiol.*, 152(3-4): 291-301.

Lancashire, J.F., Turni, C., Blackall, P.J., y Jennings, M.O., 2007. Rapid and efficient screening of a Representational Difference Analysis library using reverse Southern hybridisation: Identification of genetic differences between *Haemophilus parasuis* isolates. *J. Microbiol. Methods*, 68(2): 326-330.

Larsen, R.A., Myers, P.S., Skare, J.T., Seachord, C.L., Darveau, R.P. y Postle, K., 1996. Identification of TonB homologs in the family *Enterobacteriaceae* and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes. *J. Bacteriol.*, 178(5): 1363-1373.

Larsen, R.A., Thomas, M.G. y Postle, K., 1999. Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.*, 31: 1809-1824.

Lavrrar, J.L., Christoffersen, C.A. y McIntosh, M.A., 2002. Fur-DNA interactions at the bi-directional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 322: 983-995.

Lavrrar, J.L. y McIntosh, M.A., 2003. Architecture of a *fur* binding site: a comparative analysis. *J. Bacteriol.*, 185(7):2194-2202.

Lazazzera, B.A. y Grossman, A.D., 1998. The ins and outs of peptide signalling. *Trends Microbiol.* 6(7): 288-294.

Lecce, J.G., 1960. Porcine polyserositis with arthritis: isolation of a fastidious pleuropneumoniae like organism and *Haemophilus influenzae suis*. *Ann. NY Acad. Sci.*, 79, 670-376.

Lee, M.S. y Morrison, D.A., 1999. Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J. Bacteriol.*, 181:5004–5016.

Legrain, M., Mazarin, V., Irwin, S.W., Bouchon, B., Quentin-Millet, M.J., Jacobs, E. y Schryvers, A.B., 1993. Cloning and characterization of the *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 i Tbp2. *Gene*, 130(1): 73-80.

Lehman, I.R., Bessman, M.J., Simms, E.S. y Kornberg, A., 1958. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrate and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 233: 163-167.

Létoffé, S., Ghigo, J.M. y Wandersman, C., 1994. Iron acquisition from heme and haemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9876-9880.

Leung, K.Y. y Finlay, B.B., 1991. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(24): 11470-11474.

Levine, J.S. y Strauss, N., 1965. Lag period characterizing the entry of transforming deoxyribonucleic acid into *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 89: 281-287.

Lichtensteiger, C.A. y Vimr, E.R., 1997. Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 152(2): 269-274.

Little, T.W.A. y Harding, J.D.J., 1971. The comparative pathogenicity of two porcine *Haemophilus* species. *Veterinary Record*, 87: 399-402.

Litwin, M. y Calderwood, S.B., 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6(2): 137-149.

Lorenz, M.G. y Wachernagel, W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic information in the environment. *Microbiol. Rev.* 58(3): 563-602.

Luo, P. y Morrison, D.A., 2003. Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. ,185(1): 349-358.

Ma, C. y Redfield, R.J., 2000. Point mutations in a peptidoglycan biosynthesis gene cause competence induction in *Haemophilus influenzae*. J. Bacteriol., 182(12): 3323-3330.

MacFayden, L.P., Dorocicz, I.R., Reizer, J., Saier, M. H., Jr. y Redfield, R.J., 1996. Regulation of competence development and sugar utilization in *Haemophilus influenzae* Rd by a phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase system. Mol. Microbiol., 21(5): 4401-4405.

MacFayden, L.P. y Redfield, R.J., 1998. A 3',5' Cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase modulates cAMP levels and optimizes competence in *Haemophilus influenzae* Rd. J. Bacteriol., 180(17): 4401-4405.

MacFayden, L.P., Chen, D., Vo, H.C., Liao, D., Sinotte, R. y Redfield, R.J., 2001. Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors. Mol. Microbiol. 40(3): 700-707.

Madigan, M.T, Martinko, J.M. y Parker, J., 2004. Brock. Biología de los Microorganismos. 10a edición. Pearson Educación, S.A.

Mekalanos, J., Goldberg, I., Miller, V., Pearson, G., Swartz, D., Taylor, R., Harford, N., Gathoye, A.M., Simoen, E., Boon, B. y de Wilde, M., 1985. Genetic construction of cholera vaccine prototypes. In: Lerner, R.A., Chanock, R.M., Brown, F. (eds). Vaccines 85: Molecular and chemical basis of resistance to parasitic, bacterial and viral diseases. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York, pp.101-105.

Melnikow, E., Dornan, S., Sargent, C., Duszenko, M., Evans, G., Gunkel, N., Selzer, P.M. y Ullrich, H.J., 2005. Microarray analysis of *Haemophilus parasuis* gene expression under in vitro growth conditions mimicking the in vivo environment. *Vet. Microbiol.*, 110(3-4): 255-263.

Mercenier, A. y Chassy, B.M., 1988. Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie.*, 70(4):503-517.

Mietzner, T.A., Tencza, S.B., Adhikari, P., Vaughan, K.G. y Nowalk, A.J., 1998. Fe (III) periplasm-to-cytosol transporters of gram-negative pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 225: 113-135.

Miller, J.H., 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. NY, Cold Spring Harbor.

Miller, M.B. y Bassler, B.L., 2001. Quorum Sensing in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 165-199.

Mintz, C., Chen, J. y Shuman, H., 1988. Isolation and characterization of auxotrophic mutants of *Legionella pneumophila* that fail to multiply in human monocytes. *Infect. Immun.* 56(6): 1449-1455.

Modun, B., Evans, R.W., Joannou, C.L. y Williams, P., 1998. Receptor-mediated recognition and uptake of iron from human transferrin by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.*, 66: 3591-3596.

Modun, B., Kendall, D. y Williams, P., 1994. Staphylococci express a receptor for human transferrin: identification of a 42-kilodalton cell wall transferrin-binding protein. *Infect. Immun.*, 62: 3850-3858.

Modun, B. y Williams, P., 1999. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect. Immun.*, 67: 1086-1092.

Modun, B., Morrissey, J. y Williams, P., 2000. The staphylococcal transferrin receptor: a glycolytic enzyme with novel function. *Trends Microbiol.*, 8: 231-238.

Möllmann, U., Ghosh, A., Dolence, E.K., Dolence, J.A. y Miller, M.J., 1998. Selective growth promotion and growth inhibition of gram-negative and gram-positive bacteria by synthetic siderophore- β -lactam conjugates. *Biometals*, 11: 1-12.

Moody, M.D. y Dailey, H.A., 1983. Aerobic ferrisiderophore reductase assay and activity stain for native polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 134(1): 235-239.

Morozumi, T., Hiramune, T. y Kobayashi, K., 1981. Glasser's disease in piglets produced by intraperitoneal inoculation with *Haemophilus parasuis*. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, 21: 121-128.

Morozumi, T., Hiramune, T. y Kobayashi, K., 1982. Experimental infections of mice and guinea pigs with *Haemophilus parasuis*. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, 22: 23-31.

Morozumi, T. y Nicolet, J., 1986a. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 23(1): 138-142.

Morozumi, T. y Nicolet, J., 1986b. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification. *J. Clin. Microbiol.*, 23(6): 1022-1025.

Morton, D.J. y Williams, P., 1989. Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins. *FEMS Microbiol. Lett.*, 53(1-2): 123-127.

Munch, S., Grund, S. y Kruger, M., 1992. Fimbriae and membranes on *Haemophilus parasuis*. *Zentralbl Veterinarmed B*, 39,59-64.

Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L. y Fee, J.A., 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.*, 172(4): 2624-2630.

Neilands, J.B., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270(45): 26723-26726.

Nelson, D.J. y Carter, C.E., 1969. Purification and characterization of thymidine 5'-monophosphate kinase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.*, 244: 5254-5262.

Neuhard, J., Price, A.R., Schack, L. y Thomassen, E., 1978. Two thymidylate synthetases in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(3): 1194-1198.

Neuhard, J. y Kelln, R.A., 1996. Biosynthesis and conversions of pyrimidines. In *Escherichia coli* and *Salmonella*, pp. 580-599. Edited by F.C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Nicholson, M.L. y Beall, B., 1999. Disruption of *tonB* in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* prevents utilization of ferric siderophores, haemin and haemoglobin as iron sources. *Microbiology*, 145: 2453-2461.

Nicolet, J., Paroz, P.H. y Krawinkler, M., 1980. Polyacrilamide gel electroforesis of whole-cell proteins of porcine strains of *Haemophilus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30: 69-76.

Nicolet, J., Morozumi, T. y Bloch, I., 1986. Proposal for a serological classification of *Haemophilus parasuis*, p. 260. *Proc. 9th Int. Pig Vet. Soc. Congr.* Barcelona, Spain.

Nielsen, R., 1993. Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serovars. *Acta Vet. Scand.*, 34(2): 193-198.

Notani, N. y Goodgal, S.H., 1966. On the nature of recombinants formed during transformation in *Hemophilus influenzae*. *J. Gen. Physiol.*, 49(6):197-209.

Occhino, D.A., Wyckoff, E.E., Henderson, D.P., Wrona, T.J. y Payne, S.M., 1998. *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol. Microbiol.*, 29(6): 1493-1507.

Okada, T., Yanagisawa, K. y Ryan, F.J., 1960. Elective production of thymine-less mutants. *Nature*, 188: 340-341.

Okada, N., Sasakawa, C., Tobe, T., Yamada, M., Nagai, S., Talukder, K.A., Komatsu, K., Kanegasaki, S. y Yoshikawa, M., 1991. Virulence associated Chromosomal loci of *Shigella flexneri* identified by random Tn5 insertion mutagenesis. *Mol. Microbiol.*, 5(1): 187-195.

Oliveira, S., Galina, L. y Pijoan, C., 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J. Vet. Diagn. Investig.*, 13(6): 495-501.

Oliveira, S., Galina, L., Blanco, I., Canals, A. y Pijoan, C., 2003. Naturally farrowed colostrum-deprived pigs as an alternative model for experimental infection by *Haemophilus parasuis*. *Can. J. Vet. Res.*, 46: 146-150.

Oliveira, S. y Pijoan, C., 2004a. Computer-based analysis of *Haemophilus parasuis* protein fingerprints. *Can. J. Vet. Res.*, 68: 161-167.

Olvera, A., Calsamiglia, M. y Aragon, V., 2006a. Genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* field strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(6): 3984-3992.

Olvera, A., Cerda-Cuellar, M. y Aragon, V., 2006b. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing. *Microbiology*, 152(12): 3683-3690.

O'Reilly, T. y Niven, D.F., 1986. Tryptone-yeast extract broth as a culture medium for *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* to be used as challenge inocula. *Can. J. Vet. Res.*, 50(3):441-443.

Ochsner, U.A., Vasil, A.I. y Vasil, M.L., 1995. Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters. *J. Bacteriol.* 177(24): 7194-7201.

Ochsner, U.A., Johnson, Z. y Vasil, M.L., 2000. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 146(1): 185-198.

Otto, B.R., Verweij-van Vught, A.M. y MacLaren, D.M., 1992. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 18(3): 217-233.

Parales, R.E. y Harwood, C.S., 1993. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram- bacteria. *Gene*, 133(1):23-30.

Piechowska, M. y Fox, M.S., 1971. Fate of transforming deoxyribonucleate in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 108(2): 680-689.

Poole, K. y Braun, V., 1988. Iron regulation of *Serratia marcescens* hemolysin gene expression. *Infect. Immun.*, 56(11): 2967-2971.

Pradel, E., Guiso, N., Menozzi, F.D. y Locht, C., 2000. *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect. Immun.*, 68(4): 1919-1927.

Printer, K., Davisson, V.J. y Santi, D.V., 1988. Cloning, sequencing, and expression of the *Lactobacillus casei* thymidylate synthase gene. *DNA*, 7(4): 235-241.

Provvedi, R., Chen, I. y Dubnau, D., 2001. NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 40(3):634-644.

Raetz, C.R. y Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 635-700.

Rafiee, M., Bara, M., Stephens, C.P. y Blackall, P.J., 2000. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.*, 78(12): 846-849.

Rafiee, M. y Blackall, P.J., 2000. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme from *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.*, 78(3): 172-174.

Rapp-Gabrielson, V.J. y Gabrielson, D.A., 1992. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am. J. Vet. Res.*, 53(5): 951-956.

Rapp-Gabrielson, V.J., Gabrielson, D.A. y Schamber, G.J., 1992. Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 987-993.

Ratledge, C. y Dover, L.G., 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54: 881-941.

Reinhart, K. V. y Copeland, J.C., 1973. Evidence that thymine is not a normal metabolite in wild-type *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 294:1-7.

Ruiz, A., Oliveira, S., Torremorell, M. y Pijoan, C., 2001. Outer membrane profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites. *J. Clin. Microbiol.*, 39(5): 1757-1762.

Sakai, A., Nakanishi, M., Yoshiyama, K. y Maki, H., 2006. Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Genes Cells*, 11(7): 767-778.

Schryvers, A. y Stojiljkovic, I., 1999. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.*, 32(6): 1117-1123.

Singh, R.M., 1972. Number of deoxyribonucleic acid uptake sites in competent cells of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 110(1): 266-272.

Sisco, K.L. y Smith, H.O., 1979. Sequence-specific DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 76(2): 972-976.

Smart, N.L., Miniats, O.P. y MacInnes, J.I., 1988. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting. *Can. J. Vet. Res.*, 52: 319-324.

Smith, H.O., Gwinn, M.L. y Salzberg, S.L., 1999. DNA uptake signal sequences in naturally transformable bacteria. *Res. Microbiol.*, 150(9-10): 603-616.

Smith, H.W. y Tucker, J.F., 1976. The virulence of trimethoprim-resistant thymine- requiring strains of *Salmonella*. *J. Hyg. Camb.*, 76: 97-109.

Solomon, J.M., Magnuson, R., Srivastava, A., y Grossman, A.D., 1995. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.*, 9:547–558

Solomon, J.M., Lazizzera, B.A. y Grossman, A.D., 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.*, 10(16):2014–2024.

Staudenmaier, H., van Hove, B., Yaraghi, Z. y Braun, V., 1989. Nucleotide sequence 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.

Stewart, G.J. y Carlson, C.A., 1986. The biology of natural transformation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 40: 211-235.

Stoebner, J.A. y Payne, S.M. 1988. Iron regulated hemolysin production and utilization of heme and haemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 56 (11): 2891-2895.

Stojiljkovic, I., Baumler, A.J. y Hantke, K., 1994. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay *J. Mol. Biol.*, 236: 531-545.

Stojiljkovic, I. y Hantke, K., 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol. Gen. Genet.*, 247(2): 199-205.

Stojiljkovic, I. y Srinivasan, N., 1997. *Neisseria meningitidis tonB, exbB* and *exbD* genes: Ton-dependent utilization of protein-bound iron in *Neiseeriae*. *J. Bacteriol.*, 179(3): 805-812.

Tadjine, M., Mittal, K.R., Bourdon S. y Gottschalk, M., 2004a. Development of new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America. *J. Clin. Microbiol.*, 42(2): 839-840.

Tadjine, M., Mittal, K.R., Bourdon S. y Gottschalk, M., 2004b. Production and characterization of murine monoclonal antibodies against *Haemophilus parasuis* and study of their protective role in mice. *Microbiology*, 150: 3935-3945.

Takahashi K., Nagai, S., Yagihashi, T., Ikehata, T., Nakano, Y., Senna K., Maruyama, T. y Murofushi, J., 2001. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of bivalent vaccine under laboratory and field conditions. *J. Vet. Med. Sci.*, 63(5): 487-491.

Telford, J. R. y Raymond, K. N., 1996. Siderophores. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, ed. J. L. Atwood, J. E. D. Davis, D. D. MacNicol, F. Vogtle. Vol. 1, pp. 245-266. Oxford, UK: Elsevier Sci.

Thomas, C.E. y Sparling, P.F., 1996. Isolation and analysis of a *fur* mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Bacteriol., 178(14):4224-4232.

Timmerman, M.M y Woods, J.P., 1999. Ferric reductase is a potential iron acquisition mechanism for *Histoplasma capsulatum*. Infect. Immun., 67(12): 6403-6408.

Tiss, A., Barre, O., Michaud-Soret, I. y Forest, E., 2005. Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV crosslinking and mass spectrometry. FEBS Letters, 579(25): 5454-5460.

Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L. y Despied, S., 1995. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta *fur* mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. J. Bacteriol., 177(9): 2305-2314.

Touati, D., 1999. Iron and Oxidative Stress in Bacteria. Arch. Biochem. And Biophys., 373: 1-6.

Tsolis, R. M., Baumler, A. J., Stojiljkovic, I. y Heffron, F., 1995. Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. J. Bacteriol., 177(16): 4628-4637.

Turgay, K., Hamoen, L.W., Venema, G. y Dubanu, D., 1997. Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. Genes Dev. 11: 119-128.

Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J. y Dubnau, D., 1998. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. EMBO J. 17(22): 6730- 6738.

Turni, C. y Blackall, P.J., 2005. Comparison of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.*, 106(1-2): 145-151.

Vahle, J.L., Haynes, J.S. y Andrews, J.J., 1995. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriologic, and morphological findings. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 1176-1179.

Valle, E., Ledon, T., Cedre, B., Campos, J., Valmaseda, T., Rodriguez, B., Garcia, L., Marrero, K., Benitez, J., Rodriguez, S. y Fando, R., 2000. Construction and characterization of a nonroliferative El Tor cholera vaccine candidate derived from strain 638. *Infect. Immun.* 68(11): 6411-6418.

van Sinderen, D., Luttinger, A., Kong, L., Dubnau, D., Venema, G. y Hamoen L., 1995. *comK* encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 15(3): 455-462.

Vasil, M.L. y Ochsner, U.A., 1999. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.*, 34(3) : 399-413.

Wackett, L.P., Orme-Johnson, W.H. y Walsh, C.T., 1989. Transition metal enzymes in bacterial metabolism. 165-206. In Beveridge, T.J. and Doyle, R.J. (ed.), *Metal ions and bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Wandersman, C. y Stojiljkovic, I., 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr. Opin. Microbiol.*, 3(2): 215-220.

Wang, Y., Goodman, S.D., Redfield, R.J. y Chen, C., 2002. Natural transformation and DNA uptake signal sequences in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Bacteriol.*, 184(13): 3442-3449.

Wessling-Resnick, M., 2000. Iron Transport. *Annu. Rev. Nutr.*, 20: 129-151.

Williams, H.D. y Poole, R.K., 1987. Reduction of iron (III) by *Escherichia coli* K12: lack of involvement of the respiratory chains. *Curr. Microbiol.*, 15: 310-324.

Winkelmann, G., 1991a. ed CRC Handbook of Microbial iron Chelates. Boca Raton, FL: CRC 366pp.

Winkelmann, G., 1991b. Structural and stereochemical aspects of iron transport in fungi. *Biotechnol. Adv.*, 8(1): 207-231.

Winkelmann, G. y Drechsel, H. 1997. Microbial Siderophores. *Biotechnology*, ed. Rehm, H.J., Reed, G., 2nd ed, 7: 199-246. Weinheim, Germany: Verlag Chem.

Winkelmann, G., 2002. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.*, 30(4): 691-696.

Wise, E.M., Jr., Alexander, S.P. y Poxers, M., 1973. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate as a regulator of bacterial transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 471-474.

Yoshikawa, M., Sasakawa, C. y Okada, O., 1995. Construction and evaluation of a *virG thyA* double mutant of *Shigella flexneri* 2^a as a candidate live-attenuated oral vaccine. *Vaccine*, 13: 1435-1440.

Yu, F., Qi, G., Liu, Y., Gao, S. y Kan, B., 2005. Construction and characterization of a *thyA* mutant derived from Cholera vaccine candidate IEM101. *Mol. Biotech.*, 29: 191-196.

Zaritsky, A., Woldringh, C.L., Einav, M. y Alexeeva S., 2006. Use of thymine limitation and thymine starvation to study bacterial physiology and cytology. *J. Bacteriol.*, 188(5): 1667-1679.

Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D. y Storz, G., 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.*, 181(15): 4639-4643.

Zoon, K.C., Habersat, M. y Scocca, J.J., 1975. Multiple regulatory events in the development of competence for genetic transformation in *Haemophilus influenzae*. J. Bacteriol. 124(3): 1607-1609.

Zucker, B.A., Baghian, A., Traux, R., O'Reilly, K.L. y Storz, J., 1996. Detection of strain-specific antigenic epitopes on the lipooligosaccharide of *Haemophilus parasuis* by use of monoclonal and polyclonal antibodies. Am. J. Vet. Res., 56, 63-67.