



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Estudios preliminares del sideróforo vancrobactina y su receptor, la proteína de membrana FvtA

Álvaro Álvarez Estrada

Máster en Biotecnología Avanzada

Universidade de Vigo

 UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Esta redacción corresponde a la memoria del proyecto final del Máster en Biotecnología Avanzada, realizado en el grupo de investigación PRONAMAR, perteneciente al departamento de Química Fundamental de la UDC, bajo la tutoría de:

- Dr. Carlos Jiménez González

- Dr. Jaime Rodríguez González

- Dr. Antón Vila Sanjurjo

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	pag. 4
<i>Vibrio anguillarum</i> y vibriosis	pag 4
Importancia de la captación de hierro en los microorganismos	pag. 5
Captación de hierro mediante sideróforos	pag. 6
Sideróforos en bacterias Gram -	pag. 7
Transportadores de sideróforos en bacterias Gram -	pag. 8
FvtA, receptor-transportador de la vancrobactina	pag. 10
Vancrobactina, uno de los sideróforos de <i>V. anguillarum</i>	pag. 12
Importancia de los sistemas de captación de hierro en el control de enfermedades infecciosas	pag. 13
OBJETIVOS	pag.14
DESCRIPCIÓN DE EXPERIMENTOS	pag. 15
BIOENSAYOS	pag. 15
Justificación	pag. 15
Material y métodos	pag. 15
Procedimiento	pag. 17
Conclusiones	pag. 18
EXPRESIÓN DE FVTA EN <i>E. COLI</i> PARA SU POSTERIOR ESTUDIO	pag. 19
Justificación	pag. 19
Material y métodos	pag. 20
Procedimiento	pag. 22
Conclusiones	pag. 28
AISLAMIENTO DEL COMPLEJO HIERRO-VANCROBACTINA	pag. 29
Justificación	pag. 29
Material y métodos	pag. 29
Procedimiento	pag. 31
Conclusiones	pag. 35
BIBLIOGRAFÍA	pag. 36

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo trata sobre el estudio de uno de los mecanismos de captación de hierro presentes en la bacteria Gram- *Vibrio anguillarum*. Dicho mecanismo involucra a un sideróforo denominado vancrobactina y a su receptor específico FvtA localizado en la membrana externa de la bacteria¹.

La idea de esta introducción es, primero describir la bacteria sujeto de estudio, *V. anguillarum*, luego dar una visión general sobre el tipo de mecanismo de captación de hierro mediado por sideróforos, centrándose mas adelante en la propia vancrobactina y en su receptor específico. Por último se pretende justificar la importancia práctica que puede tener el estudio de este tipo de sistemas de cara al control tanto de *V. anguillarum* como de enfermedades infecciosas en general.

***Vibrio anguillarum* y vibriosis**

Características de la bacteria *Vibrio anguillarum*²:

- Género: *Vibrio*
- Bacilo curvado
- Gram –
- Anaerobio facultativo
- Presencia de flagelo polar
- Hábitat marino, distribución mundial
- 23 serotipos, pero solo 3 causantes de vibriosis

Las cepas de los serotipos O1 y O2, y algunas del O3 de esta especie, junto a otras bacterias del género *Vibrio*, actúan como agentes patógenos en peces, moluscos y

crustáceos provocando una enfermedad conocida como vibriosis, la cual es una de las patologías que mas pérdidas produce en el sector de la acuicultura marina.

La vibriosis en peces tiene una elevada tasa de mortalidad, cursando primero con anorexia y apatía seguidas en la mayoría de los casos de un cuadro septicémico y hemorrágico³.

Concretamente *V. anguillarum* es el principal agente causal de vibriosis en alevines de rodaballos, aunque también afecta a otras especies de interés en acuicultura.



Alevín de rodaballo afectado de las típicas hemorragias causadas por la vibriosis.

Importancia de la captación de hierro en los microorganismos

El hierro juega un papel fundamental en el metabolismo de los seres vivos, ya que gracias a su potencial redox, forma parte de los centros activos de enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción. El hecho de que estos enzimas sean imprescindibles para la vida convierte al hierro en un elemento esencial para prácticamente todos los organismo⁴.

A pesar de la relativa abundancia de hierro en la corteza terrestre, su disponibilidad para ser absorbido por microorganismos es baja debido a la poca solubilidad de los compuestos con Fe^{+3} (estado de oxidación mayoritario en la biosfera) en medios inorgánicos aeróbicos con pHs neutros o alcalinos. Su importancia metabólica junto a su escasa disponibilidad convierten a este elemento en un factor limitante para el crecimiento microbiano. Por ello, en el caso de los microorganismos patógenos, la capacidad para asimilar hierro se convierte en un importante factor de virulencia; habiéndose demostrado que el aumento de concentración de hierro en los hospedadores

da lugar a un incremento de la susceptibilidad a ser infectados por la mayoría de bacterias patógenas conocidas.

Además de la baja disponibilidad de Fe^{+3} , otro punto importante a tener en cuenta es que el estado reducido Fe^{+2} (mayoritario en ambientes anóxicos), aunque se encuentra soluble y disponible, resulta tóxico para la célula ya que reacciona con el oxígeno provocando la formación de radicales hidroxilos.

Es por todo esto que los seres vivos se han visto obligados a desarrollar diferentes estrategias encaminadas tanto a solucionar el problema de poder satisfacer sus necesidades de hierro a pesar de su baja disponibilidad en el medio ambiente aeróbico, como a protegerse de los efectos dañinos del Fe^{+2} . Estas estrategias consisten en la utilización de ligandos con elevada afinidad por el hierro que permiten captar, transportar, almacenar y/o secuestrar dicho elemento. Conviene aclarar que un mismo organismo emplea paralelamente mas de un mecanismo para poder captar hierro. Una de las estrategias encaminadas a satisfacer las necesidades de hierro es la producción de sideróforos por parte de bacterias⁵ y de hongos.

Captación de hierro mediante sideróforos

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular, 500 a 1500 Da, que algunos microorganismos sintetizan y liberan al medio⁶. Una vez allí se unen específicamente al hierro, ya que tienen la capacidad de actuar como agentes quelantes, dando lugar a la formación de complejos metálicos denominados ferrosideróforos. Una vez formado, el complejo es absorbido por los microorganismo productores, aunque también puede ser utilizado por otros microorganismos filogenéticamente relacionados y en algunos casos no relacionados pero si pertenecientes al mismo hábitat. Una vez en su interior el hierro será liberado enzimáticamente o por reducción a Fe^{+2} pudiendo pasar a formar parte del centro activo de proteínas de interés biológico.

En función del grupo que interviene en la unión con el ión Fe^{+3} , los sideróforos se pueden clasificar en cuatro grandes grupos:

- Catecoles
- Hidroxamatos

- Ácidos α -hidroxicarboxílicos
- Mixtos

Los catecoles son sideróforos en los que su grupo de unión al hierro deriva de un corismato, pudiendo ser un grupo catecol o un grupo fenolato. Un ejemplo de este grupo sería la enterobactina producida por algunas enterobacterias como *E. coli*.

Los hidroxamatos son sideróforos que, como su propio nombre indica, utilizan un grupo hidroxamato para unirse al hierro. Como ejemplo de ellos se puede citar la aerobactina producida por bacterias del género *Salmonella* y algunas cepas de *E. coli* entre otras.

Los ácidos α -hidroxicarboxílicos son sideróforos con un grupo similar al de un hidroxamato, pero se diferencia de éste en que se sustituye uno de los radicales por un doble enlace con oxígeno y un nitrógeno del esqueleto por un carbono.

Los sideróforos mixtos son aquellos en los que en una misma molécula se combinan dos grupos de unión diferentes, como ejemplo estaría la anguibactina, que contiene un grupo catecol y otro hidroxamato.

Como este trabajo se centra en el sideróforo vancrobactina producido por la bacteria Gram- *V. anguillarum*, a partir de ahora nos centraremos en el sistema de captación de Fe^{+3} mediado por sideróforos en bacterias Gram-.

Sideróforos en bacterias Gram -

En el caso de bacterias Gram-, los complejos formados entre los sideróforos y el hierro interactúan de forma específica con proteínas receptoras-transportadoras localizadas en la membrana externa⁷.

Esta interacción produce, mediante un sistema dependiente de energía de tipo TonB, un cambio conformacional en el receptor que introduce el ferrosideróforo en el interior celular.

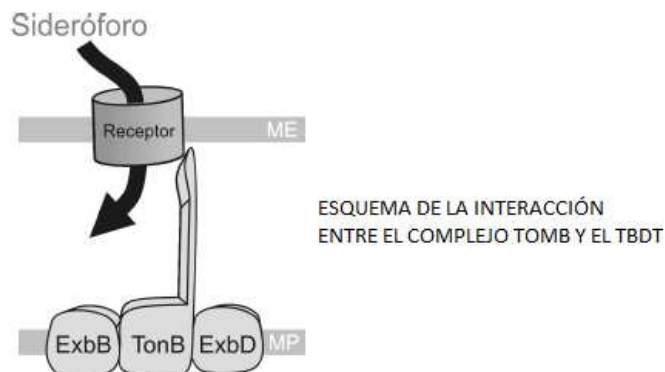
El hierro es liberado una vez dentro de la bacteria, bien por la acción de reductasas que reducen el Fe^{+3} a Fe^{+2} o bien por la acción de esterases que rompen el ferrosideróforo, permitiendo así la utilización del dicho elemento.

Transportadores de sideróforos en bacterias Gram -

Para introducirse en el interior de la bacteria, los ferrosideróforos han de interactuar con proteínas de membrana externa que actúan como receptores-transportadores específicos.

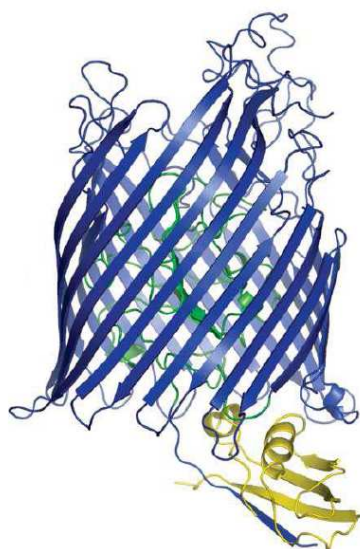
Estas proteínas de membrana forman parte de un tipo de transportadores conocidos como *transportadores dependientes de TonB (TBDTs)*⁸. Aunque la mayoría de este grupo de proteínas transportan ferrosideróforos también se encuentran transportadores para la vitamina B12, complejos de níquel, carbohidratos...

El tipo de transporte que tiene lugar en estas proteínas se trata de un proceso de transporte activo, el nombre TBDTs se debe a que el encargado de transmitir la energía necesaria, en forma de fuerza motriz de protones, es un complejo proteico de la membrana interna constituido por diferente número de copias de tres tipos de proteínas llamadas *TonB*, *ExbB* y *ExbD*.



Los TBDTs propiamente dichos constan de un barril transmembrana formado por 22 láminas β antiparalelas unidas por lazos cortos por el lado periplásmico y por lazos de longitud variable por el lado externo. Además, el barril contiene en su interior un dominio de tapón que bloquea la comunicación entre el medio externo y el periplásmico.

El extremo N-terminal de estas proteínas se localiza en el espacio periplásmico y se conoce con el nombre de *caja TonB*. Juega un papel muy importante en la transmisión de energía al transportador ya que es quien interactúa con el complejo *TonB- ExbB- ExbD* (concretamente con el extremo C-terminal de TonB) cuando se produce la unión del ligando.



ESTRUCTURA DE UN TBDT

En azul el barril de láminas β , en verde el dominio de tapón y en amarillo TonB

El sitio de unión de los ligandos a los TBDTs parece que involucraría a los ápices del dominio de tapón y, en el caso del barril, a varios lazos de unión entre láminas β de los situados en la cara externa de la membrana.

La unión con el ligando produce que la caja TonB del extremo N-terminal de los TBDTs, interactúe con el extremo C-terminal de TonB permitiendo la transmisión de energía entre el complejo *TonB- ExbB- ExbD* y el transportador. Se piensa que la energía es aportada mediante un bombeo de protones desde el espacio periplásmico hacia el medio externo que atraviesa el TBDT produciendo un cambio conformacional. Este cambio se debería al debilitamiento, fruto del bombeo, de las interacciones entre residuos responsables de la estructura terciaria, y conllevaría el transporte del ligando hacia el interior.

Todavía no hay un consenso sobre como se produce el paso del ligando a través del transportador. Por un lado está la teoría de que el dominio de tapón se desplaza total o parcialmente del interior del barril de láminas β permitiendo el paso del ligando. Por

otro lado se cree que el domino de tapón puede sufrir un cambio conformacional que produzca la formación de un poro en su interior por donde pueda pasar el ligando⁹.

FvtA, receptor-transportador de la vancrobactina

Se conocen dos sistemas funcionales de TBDT¹⁰ de ferrosideróforos en *V. anguillarum*:

- FvtA-vancrobactina: en este sistema interviene la proteína de membrana FvtA que actúa como TBDT para introducir ferrovancrobactina al interior celular. El cluster de genes que intervienen en este sistema (*vabcluster*), reguladores y codificantes del TBDT, de las proteínas de anclaje y de los enzimas de biosíntesis del sideróforo, se encuentran en el cromosoma de la bacteria.
- FatA-anguibactina: en este sistema interviene FatA que actúa como TBDT para introducir ferroanguibactina, en este caso los genes involucrados se localizan en el plásmido pJM1 perteneciente exclusivamente a cepas del serotipo O1. Sin embargo para completar la síntesis y regulación de la anguibactina son necesarios también genes localizados en el *vabcluster* del cromosoma.

Este trabajo trata sobre el sistema FvtA-vancrobactina. En estudios recientes¹¹ se ha demostrado que FvtA es realmente el TBDT encargado del transporte de la ferrovancrobactina, para ello se han amparado en los siguientes hallazgos:

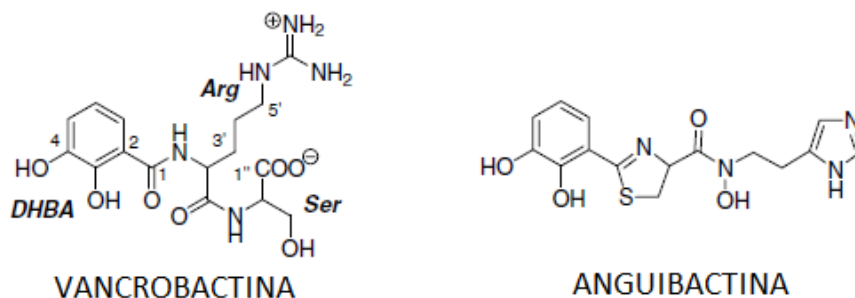
- El gen *FvtA*, codificante de la proteína homóloga, tienen gran similitud con genes codificantes de otros TBDTs encargados del transporte de ferrosideróforos.
- La expresión de este gen está regulada tanto por los niveles de hierro como por los niveles de vancrobactina extracelulares.
- Se crearon mutantes con deleciones en *FvtA* y se comparó su crecimiento tanto con cepas normales como con cepas mutantes para la síntesis de vancrobactina.

Se observó que cuando los niveles de hierro no eran restrictivos, el crecimiento era similar entre todas las cepas, mientras que cuando las condiciones de hierro se volvían restrictivas, el mutante para *FvtA* tenía un crecimiento significativamente menor que el de la cepa silvestre y similar al del mutante en vancrobactina. Además se compararon los niveles de vancrobactina en el medio externo entre la cepa mutante en *FvtA* y la cepa silvestre, resultando ser mas elevados en el mutante, lo que indica que no hay captación del sideróforo. Sin embargo, si se transformaba la cepa mutante para *FvtA* con un plásmido que portara dicho gen, se observó que tanto los niveles de crecimiento bajo restricción de hierro, como la concentración externa de vancrobactina se volvían iguales a los de la cepa silvestre.

- Por otro lado se compararon los perfiles de bandas de proteínas de membrana entre el mutante en *FvtA* y la cepa silvestre. Los TBDTs suelen estar en un rango entre 70 y 80 KDa, por lo que se centraron en ese rango. En condiciones normales de hierro no se observaron diferencias en el patrón de bandas entre las dos cepas. En cambio al limitar el hierro y volver a comparar, se vio que en la cepa silvestre aparecía una nueva banda mientras que en la cepa mutante no. Sin embargo, si se repetía el experimento con la cepa mutante transformada con el plásmido con *FvtA*, entonces si aparecía la banda.
- Por último cabe citar que el *vabcluster*, a mayores de *FvtA*, contiene otro gen llamado *Orf13* que también presenta una elevada homología con otros genes de TBDTs. Esto lo convertía en otro posible candidato a ser el TBDTs de la vancrobactina y por ello los experimentos anteriormente citados también se realizaron en cepas mutantes para *Orf13*. Pero, al contrario de lo que ocurría con los mutantes en *FvtA*, estos no presentaron diferencia alguna con las cepas silvestres, ni en valores de crecimiento, ni en concentración externa de vancrobactina en el medio, ni en expresión de proteínas. Por todo esto se rechaza la posibilidad de que sea el receptor de la vancrobactina.

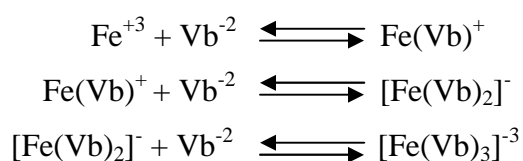
Vancrobactina, uno de los sideróforos de *V. anguillarum*

V. anguillarum produce 2 sideróforos, la anguibactina y la vancrobactina¹². El primero de ellos, presente solamente en cepas del serotipo O1, tiene la mayoría de los genes necesarios para su biosíntesis insertados en el plásmido pJM1, mientras que los genes necesarios para la biosíntesis del segundo, presente en todas las cepas de los serotipos O1 y O2, se localizan en un cluster cromosómico denominado *vabcluster*.



La vancrobactina es un sideróforo del tipo catecol, con una porción peptídica constituida por una serina y un arginina.

Estudios anteriores¹³ muestran que entre la vancrobactina y el hierro se pueden formar complejos constituidos por la quelatación de un ión de Fe^{+3} con una, dos o tres moléculas de vancrobactina en función del pH del medio.



Recientemente el grupo PRONAMAR, del área de química orgánica de la UDC, ha sido capaz de sintetizar en el laboratorio un análogo de vancrobactina¹⁴.

Importancia de los sistemas de captación de hierro en el control de enfermedades infecciosas

Como se dijo anteriormente, la capacidad de asimilar hierro juega un papel muy importante en la virulencia de las bacterias patógenas. Esto se debe a que, además de la ya de por sí baja disponibilidad de hierro en el ambiente, hay que sumar que los hospedadores eucariotas también tienen sus propios agentes captadores. Estos actúan transportando (lactoferrina, ovotransferrina, transferrina sérica, grupo hemo...) o almacenando hierro (ferritinas) y como consecuencia limitan aún más la accesibilidad al elemento, haciendo que se vuelva prácticamente nula.

Todo esto conlleva que el estudio de las vías de captación de hierro mediante sideróforos permita obtener una información importantísima a la hora de diseñar y desarrollar nuevas estrategias para la lucha contra microorganismos patógenos.

Dentro de estas nuevas estrategias se encontraría la denominada *caballo de troya*, la cual consiste en aprovecharse de los sistemas de transporte de ligandos para poder introducir un antibiótico en la bacteria. Por ejemplo, enlazando el antibiótico al sideróforo para que éste, al ser introducido a través de su transportador específico, lo arrastrase con él al interior de la célula, donde posteriormente sería liberado y actuaría.

Como la interacción entre antibiótico y bacteria sería mucho más directa, permitiría por un lado disminuir su concentración necesaria para tener efecto, lo cual es muy importante desde el punto de vista legislativo cuando se están tratando animales cuyo destino es el ser humano, y por otro lado en algunos casos puede permitir saltarse los mecanismos de resistencia que están surgiendo por el abuso en el uso de antibióticos¹⁵.

Obviamente para poder diseñar una estrategia de este tipo es necesario un completo conocimiento estructural y funcional tanto del sideróforo, para saber donde anclar el antibiótico, como de su receptor, para saber cuál es la parte involucrada en la interacción con el sideróforo.

Otra posibilidad sería explotar la capacidad de la vancrobactina como hapteno, es decir fusionar el sideróforo a una proteína carrier para dotarla de actividad inmunogénica¹⁶.

Es por todo esto por lo que se considera importante aumentar el conocimiento sobre el mecanismo de captación de hierro mediado por la vanrobactina, sobretodo si se tienen en cuenta las pérdidas productivas que *V. anguillarum* causa en varias especies marinas destinadas al consumo humano. Otro importante aspecto a tener en cuenta es que algunas cepas de *V. anguillarum* están comenzando a mostrar resistencias debido al uso de antibióticos.

OBJETIVOS

El objetivo a largo plazo de esta línea de investigación es el estudio de la interacción entre el complejo vanrobactina-Fe⁺³ y su receptor específico FvtA.

Para poder realizar esto, previamente es necesario tener la proteína FvtA y los complejos entre vanrobactina y Fe⁺³, por ello, teniendo en cuenta el tiempo de las practicas durante el master se optó por establecer los siguientes objetivos para este proyecto fin de master:

1. Construcción de vectores para la expresión de *FvtA* en *E. coli*
2. Cristalización del complejo vanrobactina-Fe⁺³

Como se verá mas adelante, el primer objetivo ha sido alcanzado, incluso en estos momentos se ha empezado con los estudios de expresión de proteínas. Mientras que el segundo objetivo, debido a problemas que se piensan analíticos, no se ha conseguido alcanzar.

DESCRIPCIÓN DE EXPERIMENTOS

BIOENSAYOS

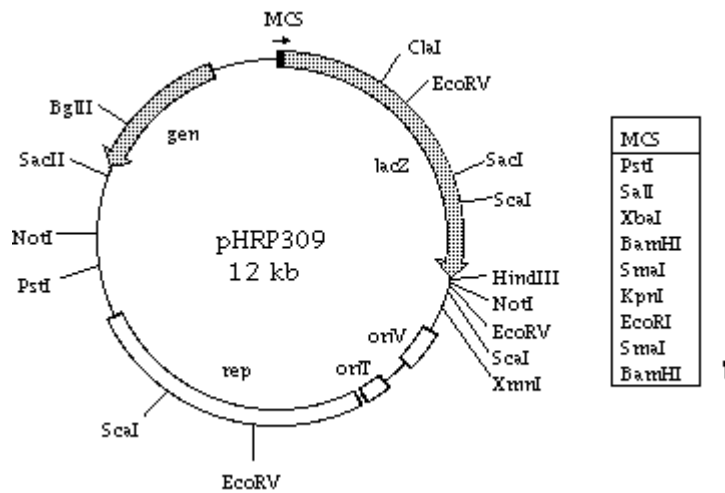
Justificación

La idea de estos bioensayos es transformar bacterias de *E. coli* con *FvtA* y posteriormente exponerlas a vancrobactina sintética en condiciones privativas de hierro. Este experimento tiene dos objetivos, por un lado sirve para determinar si la vancrobactina sintética tiene actividad biológica (ya demostrado anteriormente¹⁷), por otro lado podría permitir conocer si *E. coli* es capaz de expresar funcionalmente *FvtA*, o lo que es lo mismo, si la *FvtA* producida por esta bacteria es capaz de captar complejos de vancrobactina con hierro.

Material y métodos

Vector de expresión

Se utiliza un vector llamado pHRP309 que debería de tener el inserto de *FvtA*. Este vector ha sido construido por miembros de la Sección de Bacteriología Molecular de la Unidad de Ictiopatología de la Universidad de Santiago de Compostela.



Cepas

Primeramente se utiliza la cepa *S17* de *E. coli* que tiene sus receptores TBDTs intactos, pero posteriormente se utiliza una cepa H2887 de *E. coli* que tiene las siguientes características:

- Delección del gen *FepA*, que codifica el TBDT FepA
- Mutación en el gen *FhuA*, que codifica el TBDT FhuA
- Mutación en el gen *Cir*, que codifica el TBDT Cir
- Mutación en el *entA*, implicado en la biosíntesis del sideróforo enterobactina, propio de *E. coli*.
- Delección del gen *RecA*, implicado en la recombinación.

Vancrobactina

Se utiliza vancrobactina sintetizada por el Grupo PRONAMAR.

Medio mínimo M9 con dipiridil

Para realizar los bioensayos, las bacterias son sembradas en un medio mínimo conocido como M9, el cual consta de los siguientes componentes por litro:

Agarosa 7 – 8 g (0.7-0.8 %)

Sales M9 10X → 100 ml

Glucosa 20% → 25 ml

Casaminoácidos 20% → 10 ml

Cl₂Ca 1M → 10 μl

SO₄Mg 1 M → 100 μl

H₂O destilada → 865 ml

Además, para crear unas condiciones restrictivas de hierro, se añade al medio dipiridil, el cuál es capaz de secuestrar el poco hierro que haya en el medio impidiendo su utilización por parte de las bacterias. La vancrobactina debería de tener mas afinidad por el hierro que el dipiridil, pudiendo formar complejos y, si las bacterias fueran capaces de captarlos, les permitiría crecer en esas condiciones. Es necesario utilizar este agente secuestrante de hierro porque, aunque se use agua destilada, siempre va haber trazas de este elemento, que serán suficientes para satisfacer las necesidades de las bacterias. Se puede decir que en este experimento el dipiridil jugaría el mismo papel que las proteínas secuestradoras de hierro en los organismos hospedadores.

Procedimiento

Las bacterias de la cepa S17 fueron transformadas con el plásmido pHRP309 por miembros de la Sección de Bacteriología Molecular de la Unidad de Ictiopatología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Estas bacterias, junto con bacterias de la misma cepa no transformadas, fueron sembradas por nosotros en medio líquido LB con o sin gentamicina 50 μg/ml, en función de si tenían plásmido o no, ya que ésta es el antibiótico de selección. Se dejaron incubar un día y pasado ese tiempo se sembró en masa 1 ml de este cultivo saturado en placas petri con medio mínimo M9, dipiridil 150 μg/ml y si procedía con gentamicina 50 μg/ml. Una vez solidificado el medio, se colocó en cada placa un disco impregnado con vancrobactina y otro impregnado con FeCl₃, el cual actuará como control positivo de la formación de halo de crecimiento en torno a disco sin limitaciones de hierro. Las bacterias no transformadas actúan como control negativo de la expresión funcional de FvtA en *E. coli*.

Al día siguiente se formó halo de crecimiento en torno a los disco con FeCl₃ y vancrobactina, tanto en la placa con bacterias transformadas como en la placa con

bacterias sin transformar. Además los halos en torno a la vancrobactina son exactamente iguales en ambos tipos de bacterias. Por un lado se confirma que la vancrobactina sintética tiene actividad biológica y que además su complejo con hierro puede ser captado por TBDTs diferentes que FvtA ya que las bacterias no transformadas no tienen dicho receptor y aún así pueden captarla. Lo que resultó curioso es que el halo de crecimiento fue igual entre los dos tipos de bacterias, con y sin FvtA, ya que aunque la vancrobactina pueda ser captada por otros receptores, sería de esperar que el halo en la placa con bacterias transformadas fuera mayor que en la placa con bacterias sin plásmido. Con estos resultados no era posible pronunciarse si *E. coli* es capaz de expresar funcionalmente FvtA.

Para salir de dudas se repitió exactamente el mismo experimento pero esta vez utilizando la cepa H2887, ya que al carecer de receptores TBDTs específicos para los sideróforos propios de *E. coli*. En estas bacterias debería de verse impedida, o por lo menos muy reducida, la capacidad de captación de vancrobactina por una vía diferente a FvtA. Traduciéndose en que en la placa con bacterias sin transformar, no se debería formar un halo de crecimiento en torno al disco con vancrobactina, o por lo menos, éste debería de ser significativamente menor al de la placa con la misma cepa transformada. Sin embargo los resultados no concordaron con lo anterior, ya que se formó un pequeño halo en ambas placas.

Esto en un primer momento se podría pensar que resulta indicativo de que *FvtA* no se expresa funcionalmente en *E. coli*. Sin embargo al realizar una PCR sobre los plásmidos con primers que deberían amplificar *FvtA* se encontró con que el amplicón resultante no coincidía con el tamaño de *FvtA*. Por ello se mandó el amplicón a secuenciar y se observó que se trataba de *FepE*. Éste es un gen que codifica una proteína de membrana interna de *E. coli*. Se amplifica con los primers diseñados para *FvtA* porque tiene cierta homología con éste. Es decir se ha estado trabajando con un inserto equivocado.

Conclusiones

El hecho de que se halla estado trabajando con un inserto equivocado no nos permite sacar conclusiones de estos bioensayos en relación con FvtA. Será necesario repetir un bioensayo similar cuando nosotros hayamos conseguido crear un vector de expresión

adecuado que realmente contenga *FvtA*. Solo de esa manera podremos confirmar o descartar que *E. coli* expresa funcionalmente *FvtA*.

Ahora bien, independientemente de que el inserto fuera incorrecto, este bioensayo ha demostrado dos cosas:

- La vancrobactina sintética tiene actividad biológica. Esto ya se había demostrado anteriormente.
- *E. coli* es capaz de captar complejos de hierro-vancrobactina a través de sus TBDTs. Esto resulta muy importante, ya que en caso de diseñar una estrategia de caballo de Troya, que utilice análogos de vancrobactina para introducir antimicrobianos al interior celular, ésta sería útil no solo contra *V. anguillarum* sino que seguramente también contra otras bacterias Gram- filogenéticamente relacionadas como es el caso de *E. coli*.

EXPRESIÓN DE FVTA EN *E. COLI* PARA SU POSTERIOR ESTUDIO

Justificación

Previo paso a realizar el estudio del receptor *FvtA*, tanto solo como en interacción con el sideróforo vancrobactina, es necesario aislar la proteína.

Resultaría lógico pensar en aislarla a partir de cultivos de *V.anguillarum*, pero en principio se opta por hacerlo a partir de cultivos de *E. coli* por las siguientes razones:

- Las condiciones de cultivo de *V.anguillarum* no están tan implementadas como las de *E. coli* u otras bacterias.
- Para que se induzca la producción de *FvtA* en cepas silvestres de *V.anguillarum* es necesario trabajar con condiciones restrictivas de hierro, lo que complica aún más su cultivo. En cambio transformado *E. coli* con el vector adecuado podremos inducir a nuestro antojo la expresión.
- Por último, lo mejor es obtener la mayor cantidad posible de proteína. Esto también resulta más fácil alcanzarlo con *E. coli* transformada que con *V. anguillarum*.

El hecho de que todos los TBDTs de las bacterias Gram- estudiados presenten entre ellos una gran homología estructural, hace pensar que *E. coli* podría ser capaz de ensamblar correctamente FvtA en su membrana externa y acoplarla a los demás componentes propios de un sistema TBDT de manera que sea totalmente funcional. En caso de que esto sea así se podría utilizar *E. coli* para estudios en vivo del sistema FvtA-Vancrobactina. Para poder determinar esto se repetirán los bioensayos anteriormente explicados cuando se obtengan bacterias transformadas.

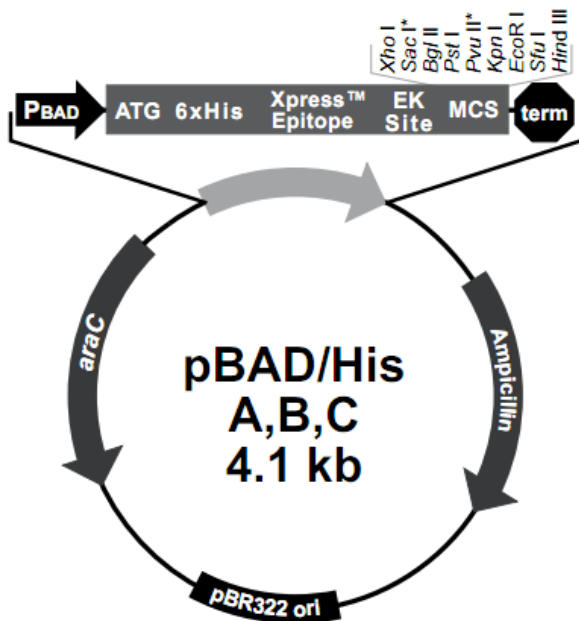
Independientemente de que FvtA sea o no funcional en *E. coli*, es lógico pensar que no habrá problema ninguno en poder expresar la proteína en esta bacteria con el objetivo de ser aislada posteriormente. Y en el caso de que surgiera algún problema, en último caso siempre se podría recurrir a la propia *V. anguillarum*.

Material y métodos

Vector de expresión

Para expresar el TBDT FvtA en *E. coli* es necesario transformarla previamente con un vector que contenga el gen *FvtA*.

El vector elegido es un plásmido derivado del plásmido de expresión pBAD/His.



El plásmido pBAD/His tienen las siguientes características:

- Promotor PBAD inducible por arabinosa.
- MCS con los enzimas que se muestran en el esquema.
- Etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal. Nosotros al final obtendremos dos tipos de plásmidos, unos con el inserto sin etiqueta de histidina y otros con la etiqueta en el extremo C-terminal, esto se consigue utilizando una nueva técnica de construcción de vectores.
- Como antibiótico de selección contiene el gen de resistencia a la ampicilina.

La diferencia entre pBAD/His y su plásmido derivado consiste en que este último ya contiene un inserto con un gen que codifica una proteína denominada Tfam, y por lo tanto tampoco contiene MCS. Este gen se debe de perder durante la inserción del nuevo inserto.

Cepas

Para obtener el inserto de *FvtA* que posteriormente se introducirá en el plásmido pBAD se utilizó ADN procedente de una cepa silvestre de *V.anguillarum* aislada en la ría de Vigo y denominada RV22.

Una vez introducido el inserto en el plásmido, éste será clonado en bacterias de la cepa TG-1 de *E. coli*. Posteriormente, una vez purificadas colonias de esta cepa que hayan

sido transformadas correctamente, los plásmidos serán extraídos y se utilizarán para transformar bacterias de la cepa H2887 de *E. coli*. Se elige esta última cepa porque no tiene la capacidad de expresar sus TBDTs, esta cepa está descrita mas detalladamente en el apartado de bioensayos.

Nuevo método para introducir insertos en vectores

El método elegido para insertar *FvtA* en el vector se trata de una técnica nueva desarrollada por la Doctora María Lourdes Dominguez Gerpe, investigadora Parga Pondal de la USC.

Debido a que esta técnica se halla en proceso de patente y de publicación no es posible describirla en este momento.

Software

Para el diseño de primers y tratamiento de datos de secuencias se utilizó el programa CLC Sequence Viewer 6 y diversas herramientas on-line como las presentes en:

- expasy.org
- http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
- http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html
- <http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html>
- <http://www.attotron.com/cybertory/analysis/trans.htm>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

Procedimiento

Construcción de los vectores

Utilizando el programa **CLC Sequence Viewer 6** junto con la herramienta on-line **OligoAnalyzer** (<http://eu.idtdna.com/>) se diseñaron los primers necesarios para, mediante la nueva técnica de montaje de vectores , poder introducir el gen *FvtA* en el derivado del plásmido pBAD/His. Se diseñaron una pareja de primers para conseguir un plásmido que solo tuviera *FvtA* sin etiqueta de histidina y otra pareja para obtener un plásmido con *FvtA* seguido de una etiqueta de 10 histidinas.. (Nota: no es posible

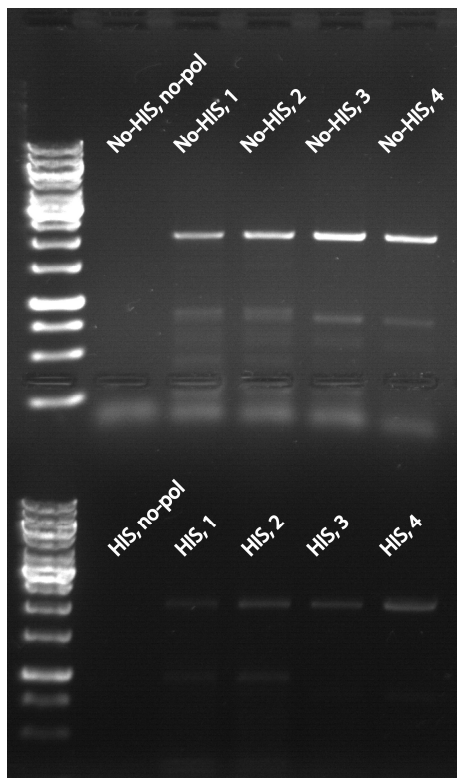
mostrar los primers ya que el elemento innovador de la nueva técnica radica precisamente en los primers utilizados).

Además se diseñaron otras dos parejas de primers, una de ellas flanqueantes al inserto, de forma que hibridaran en zonas de pBAD cercanas a los extremos de donde se introduce al inserto. La función de esta pareja de primers es la secuenciación de los insertos resultantes pero de manera que también se secuencia la porción de vector que lo flanquea y a mayores, también se puede usar para realizar una PCR sobre los plásmidos con inserto para poder saber si realmente contienen el inserto correcto. La otra pareja de primers diseñados hibridan hacia la zona central de *FvtA* y su función es secuenciar la porción central de dicho gen ya que con los anteriores primers no permitirían alcanzar la región central.

Para diseñar estos primers se tuvo en cuenta la secuencia GenBank: DQ779149.1.

Primeramente se pusieron a crecer bacterias de *V. anguillarum* de la cepa RV22 y al día siguiente se realizó una Colony-PCR sobre varias colonias, como primer paso de la nueva técnica de construcción de vectores.

Para comprobar que se había amplificado el inserto correcto, se hizo una electroforesis en gel de agarosa y se pudo observar que aparecía una banda de un tamaño compatible al de *FvtA* (en torno a 2100 pb). Una vez comprobado esto se utilizaron estos amplicones para, sobre una dilución de plásmidos derivados de pBAD, introducirle *FvtA* mediante la nueva técnica. Esto se hizo por duplicado con las 2 parejas de primers diseñadas (con y sin histidina).



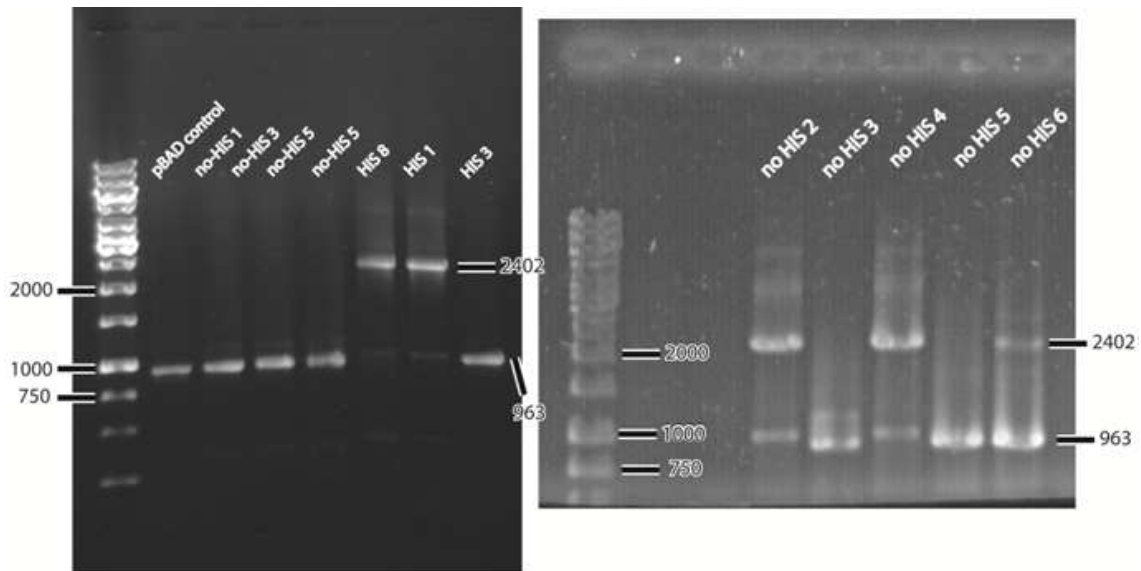
Electroforesis en gel de agarosa sobre la reacción de Colony-PCR donde se aprecia bandas de un tamaño compatible a FvtA

Transformación de *E. coli* de la cepa TG-1

Una vez construidos los dos tipos de vectores (con y sin histidina) mediante la nueva técnica, estos fueron utilizados para transformar, mediante choque térmico, bacterias de la cepa TG-1 de *E. coli*, que previamente se habían hecho competentes por lavados sucesivos con CaCl_2 . Posteriormente éstas fueron sembradas en placas de medio LB con ampicilina $200\mu\text{g/ml}$ (antibiótico de selección) y se dejaron crecer un día, se utilizó una placa para las bacterias transformadas con el vector con etiqueta de histidina y otra para las transformadas con el vector sin etiqueta.

Conviene tener en cuenta que en la preparación con los plásmidos, además de haber plásmidos con *FvtA* también habrá plásmidos con *Tfam*, esto nos obliga a tener que realizar un cribado sobre las bacterias transformadas con ellos para seleccionar las que hayan introducido el correspondiente a *FvtA*. Este cribado se realizó sobre varias colonias que se formaron en las placas de selección de transformantes, sobre ellas se realizó una colony-PCR con los primers flanqueantes anteriormente citados y posteriormente se hizo una electroforesis para ver las colonias que generaban una banda

de un tamaño compatible con *FvtA*. En un primer momento se encontraron varias colonias transformadas con éxito con el plásmido con *FvtA* y etiqueta de histidina, sin embargo para encontrar colonias transformadas con éxito con plásmidos con *FvtA* pero sin etiqueta de histidina fue necesario repetir la colony-PCR de nuevo sobre nuevas colonias.



IZQ. Electroforesis sobre el primer pase de colony-PCR en el que se puede apreciar una banda de un tamaño compatible al de *FvtA* en las colonias 1 y 8 previamente transformadas con *pBAD-FvtA* con etiqueta de histidina.

DER. Segundo pase de Colony-PCR en el que se aprecia una banda compatible con *FvtA* en las colonias 2, 4 y 6 previamente transformadas con *pBAD-FvtA* sin etiqueta de histidina.

Al realizar dicha electroforesis se encontró un problema inesperado, ya que las colonias que generaban una banda compatible con *FvtA* (sobre 2100 pb) también generaban una banda compatible con *Tfam* (sobre 1000 pb), esto ocurre tanto para los vectores con histidina como sin ella. El hecho de que todas las bacterias que se transformaron con el vector con *FvtA* se hallan transformado también con el vector con *Tfam* resulta muy poco probable, por ello se piensa que durante el montaje del vector ocurre algún suceso que provoca que los dos plásmidos se mantengan unidos. Una posibilidad podría ser que

se hayan fusionado formando un plásmido doble, otra posibilidad podría ser que se hallen encadenados.

Para saber cuál de las dos posibilidades es la correcta, se opta por realizar un estudio de fragmentos de restricción sobre plásmidos de la preparación. Mirando el mapa de restricción de los dos plásmidos (con *FvtA* y *Tfam*), se encontró con que la enzima PstI cortaba en la secuencia de *FvtA* pero no en *Tfam* ni en el resto del vector. Por lo tanto si se tratan los plásmidos con esta enzima, en caso de que los dos tipos de plásmidos estén encadenados, al hacer una electroforesis se vería una banda correspondiente al plásmido con *FvtA* linealizado, en torno a 6100 pb. En cambio si los dos tipos de plásmidos están fusionados, al cortar con PstI se generaría una banda significativamente mayor que la anterior, aproximadamente de unas 11000 pb.

Mientras se consigue PstI se opta por continuar con las cepas que contienen el plásmido con *FvtA*. Estas bacterias fueron sembradas en placas nuevas con antibiótico de selección y al día siguiente se les realizó una extracción por fenol-cloroformo de ADN plasmídico, el cual posteriormente fue congelado a -20 °C y debidamente etiquetado.

Secuenciación de plásmidos pBAD con *FvtA*

Varias muestras de los plásmidos con *FvtA* y etiqueta de histidina extraídos de las cepas transformadas con éxito fueron enviados a la Unidad de Biología Molecular del Servicio de apoyo a la investigación de la UDC para su secuenciación.

Esto mismo no se pudo hacer con plásmidos procedentes de colonias transformadas con *FvtA* sin etiqueta de histidina porque, como se mencionó anteriormente, se tardó más tiempo en localizar estas colonias y extraerles los plásmidos. Lo único que se pudo enviar a secuenciar fue el amplicón resultante de la colony-PCR hecha para confirmar la presencia de *FvtA*.

Los primers flanqueantes delimitan una secuencia que contiene *FvtA* y aproximadamente unas 110 pb propias del vector corriente arriba de *FvtA* y otras 70 pb corriente abajo. En total, el número total de pb entre los dos primers está en torno a 2300 pb, variando en función de si la secuencia porta o no la etiqueta de histidina.

Si se divide el fragmento de 2300 pb en tres tercios, con esta secuenciación se consiguieron secuenciar los dos tercios laterales, quedando el central sin secuenciar.

Para analizar los resultados se emplearon las siguientes herramientas on-line:

- http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html (para el cálculo de secuencias complementarias y reversa)
- http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html (para hacer alineamientos)
- <http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html> (para traducción)
- <http://www.attotron.com/cybertory/analysis/trans.htm> (para transcripción y traducción)
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (para hacer blasts)

En el análisis de resultados se prestó especial interés tanto a la integridad de *FvtA* como a la zona de unión entre el inserto de *FvtA* y el plásmido. También se tradujeron a aminoácidos las secuencias obtenidas para medir su homología con *FvtA*.

Excepto en dos muestras, todas las secuencias dieron resultados relativamente buenos, aunque aparecen varias inserciones y deleciones que alteran la ORF, todas ellas se localizan en los extremos (100 pb iniciales o finales) por lo que no se consideran significativas al poder tratarse de fallos de la polimerasa durante la secuenciación. Esto se vería reafirmado en que de todas las inserciones y deleciones observadas, solo una está presente en todas las muestras, la cual se trata de la pérdida de un timidina en una región de siete timidinas consecutivas, que se localiza fuera de la ORF y por lo tanto carece de interés.

De las dos muestras que no mostraron resultados correctos, una se trata de una secuenciación de *Tfam* y la otra arroja una secuencia sin sentido. Todo ello parece coincidir con lo observado anteriormente de que las colonias que contenían el plásmido correcto con *FvtA*, también contenían *Tfam*, dado que los primers flanqueantes pueden amplificar ambos insertos, no resulta extraño que puedan aparecer tanto *Tfam* como secuencias sin sentido fruto de una doble secuenciación. En realidad lo que resulta extraño es que la mayoría de las secuencias se correspondan con *FvtA* en vez de ser secuencias sin sentido debido a la presencia de los dos insertos. Esto se podría explicar si el plásmido con *FvtA* estuviera presente en mucha mayor proporción que el plásmido con *Tfam* o que además de la existencia de plásmidos híbridos (encadenados o fusionados) con *FvtA* y *Tfam* también estuvieran presentes plásmidos simples con *FvtA* que resultaran en una mayor proporción neta de *FvtA* con respecto a *Tfam*.

Como quedaba por secuenciar el tercio interno de *FvtA* se diseñó una pareja de primers antiparalelos pero no complementarios que hibriden en torno hacia la mitad de *FvtA*. Como la zona que hibrida con el primer no se secuencia y además el inicio del amplicón no es muy fiable, es necesario diseñar los primers de manera que su amplificación se solape, para que así se pueda secuenciar los inicios de los amplicones sin riesgo de errores (ya que quien secuencia ese inicio es el otro amplicón antisentido que en ese punto ya es mucho más largo), es decir, asegurarse de que la amplificación pase por el centro. Para ello se diseñaran los primers de manera que hibriden con una región situada unas 100 pb corriente arriba antes del centro. De esta manera los dos amplicones resultantes se solaparán unos 200 pb, correspondientes a la región central. Además como hay suficiente margen ya que la porción de secuencia es relativamente pequeña (unas 700 - 800 pb), esta nueva secuenciación además de secuenciar la zona central también nos dará una secuenciación bastante fiable de la región que en la anterior secuenciación quedaba en el extremo terminal (últimos 100 pb). Si se hubiera tratado de una secuencia algo más grande, no nos hubiera bastado con una sola pareja de primers y se necesitaría por lo menos otra. Estos primers se encargan, por lo que esta secuenciación final. Además se volverá a repetir la secuenciación anterior, pero esta vez usando los vectores con *FvtA* sin etiqueta de histidina extraídos a colonias TG1 transformadas con éxito, ya que la anterior secuenciación se hizo a partir de amplicones.

Mientras se reciben los nuevos primers solicitados se opta por continuar con el experimento y transformar la cepa H2887 para poder expresar la proteína.

Transformación de la cepa H2887 de *E. coli* con pBAD-FvtA para la posterior expresión de FvtA

La razón de utilizar la cepa H2887 es que ésta tiene los genes de tres TBDTs propios de *E. coli* mutados o deletionados de manera que no es capaz de expresarlos. La falta de estas proteínas debería facilitar la posterior identificación y aislamiento de la banda FvtA en electroforesis en gel de poliacrilamida debido a que todos los TBDTs tienen un tamaño similar (70 -80 KDa).

Se utilizaron los plásmidos extraídos de las bacterias TG1 transformadas con éxito (tanto con etiqueta de histidina como sin ella) y se utilizaron para transformar, mediante un protocolo de choque térmico, bacterias de la cepa H2887 que previamente se habían hecho competentes por lavados sucesivos con CaCl₂. Como aún no se terminó de secuenciar toda la longitud del vector, se opta por utilizar todas las preparaciones de plásmidos que se mandaron secuenciar para en un futuro poder descartar las líneas bacterianas incorrectas si procediera.

Una vez transformadas se sembraron en placas de selección de transformantes con ampicilina 200 µg/ml y se dejaron crecer un día. Pasado ese tiempo se repican las colonias formadas para su posterior almacenamiento por congelación a -80 °C y su posterior uso para la expresión de proteínas. En este caso no es necesario un cribado previo de las bacterias transformadas porque no contienen el plásmido libre con *Tfam*, aunque seguramente lo contienen fusionado o hibridado al plásmido con *FvtA*.

Conclusiones

Antes de poder afirmar que se ha sido capaz de transformar con éxito cepas de *E. coli* con *FvtA* es necesario esperar al análisis de los resultados de las secuenciaciones pendientes.

Además para saber si realmente se expresa se procederá a la inducción de la expresión de *FvtA* con arabinosa para, si fuese el caso, poder detectar y aislar la proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para saber si la proteína obtenida es funcional en *E. coli* se repetirán los bioensayos anteriormente descritos, pero en este caso utilizando estas nuevas cepas transformadas. En caso que no resultara funcional en *E. coli* no se tendría que deber a que la proteína no fuera realmente funcional sino simplemente a una imposibilidad de *E. coli* de utilizar una proteína no propia. Independientemente de que *E. coli* pueda utilizar o no *FvtA*, esta bacteria se podría utilizar para producir la proteína en grandes cantidades para su posterior estudio por técnicas estructurales.

En caso de que no resulte funcional en *E. coli* un sistema alternativo para demostrar su funcionalidad sería transformar con estos plásmidos cepas de *V. anguillarum* mutantes para el gen *FvtA* y ver si son capaces de utilizar la vancrobactina.

Es muy importante resolver el problema de la aparición de la banda de *Tfam* junto a *FvtA*. Para ello, una vez que se tenga la enzima *PstI*, se realizará el estudio por análisis de fragmentos de restricción, en caso de que solo se deba a que los dos tipos de plásmidos están encadenados se podrá liberar el plásmido con *FvtA* y utilizarlo para crear líneas bacterianas que solo contengan dicho plásmido.

AISLAMIENTO DEL COMPLEJO HIERRO-VANCROBACTINA

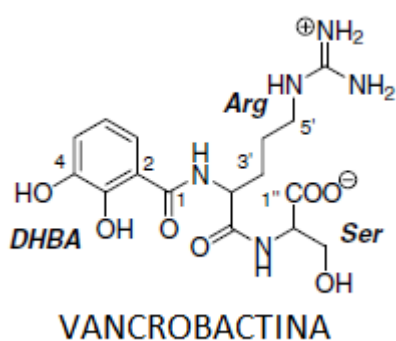
Justificación

Como el objetivo a largo plazo es estudiar la interacción entre el complejo hierro-vancrobactina y su receptor *FvtA*, es necesario previamente aislar dicho complejo.

Material y métodos

Sideróforo sintético

El grupo de investigación PRONAMAR ha sido capaz de sintetizar vancrobactina, la cuál ha sido ensayada mediante bioensayos que han demostrado que tiene actividad como sideróforo. Por ello se opta por formar el complejo a partir de la vancrobactina sintética.



Fuente de hierro y de galio

Como fuente de hierro se utilizó FeCl₃ hexahidratado y como fuente de galio GaBr₃.

Técnicas instrumentales

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

Se emplearon los siguientes equipos cromatográficos:

Agilent Technologies Serie 1200 acoplado a un detector de fotodiodos y un *Thermo Scientific Accela* acoplado a un espectrómetro de masas *Thermo Scientific LTQ orbitrap discovery*.

Se emplearon las siguientes columnas cromatográficas:

Columna de fase reversa C18 *Atlantis*®, (5 μm, con unas dimensiones de 4'6 x 100 mm).

Columna HILIC TSK Gel Amida 80

columna de intercambio iónico

Como fase móvil se utilizaron mezclas de acetonitrilo-agua, trabajando la mayoría de las veces en régimen de gradiente 0 → 50 ó 100 % de acetonitrilo, excepto en modo HILIC que se usó un gradiente 50 → 100 % de agua. También en una ocasión se trabajó en régimen de isocrático.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

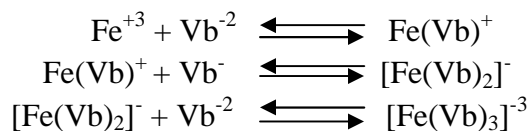
Para detectar la presencia del sideróforo se utilizó el equipo de espectrometría de masas *Thermo Scientific LTQ Orbitrap Discovery* realizando infusiones directas de las reacciones montadas. Además también se utilizó este equipo como detector acoplado a un HPLC.

Procedimiento

Importancia del pH

Con el fin de llevar a cabo la quelatación de vancrobactina con Fe⁺³ se realizaron estudios del pH, ya que este juega un papel muy importante en el proceso de quelatación.

Estudios previos¹⁸ de la influencia del pH en la formación del complejo vancrobactina-Fe⁺³ realizados por métodos espectrofotométricos, mostraron la presencia de tres reacciones de complejación secuenciales, correspondientes a la formación de complejos de hierro mono, bis o tris-vancrobactina, los cuales se muestran a continuación:



A medida que aumenta el pH, se aprecia un incremento del complejo [Fe(Vb)₃]⁻³, hasta llegar a pH 7'45, a partir del cual sus niveles se mantienen constantes. Conforme desciende el pH de 7'45 a 5'07, se observa un dominio del equilibrio entre los complejos [Fe(Vb)₂]⁻ y [Fe(Vb)₃]⁻³. Mientras que entre pH de 5 y 3'99 se observa un predominio del equilibrio entre los complejos [Fe(Vb)₂]⁻ y Fe(Vb)⁺. Por debajo de pH 4 el complejo se vuelve inestable. Mencionar además que se ha observado que la vancrobactina se degrada irreversiblemente por debajo de pH 3 dando lugar a semiquinonas ferrosas, mientras que a pH por encima de 11, se produce la hidrólisis alcalina del sideróforo.

Para obtener un pH próximo al fisiológico, en que se supone que nos encontraríamos con el tipo de complejo que interacciona con FvtA, fue necesario utilizar tampones debido a que la adición de FeCl₃ al medio de reacción provoca su acidificación, incluso adicionándolo en concentraciones relativamente bajas se alcanza un valor de pH 5. En nuestro caso se emplearon el tampón fosfato y el Tris-ClH.

Reacción de formación del complejo

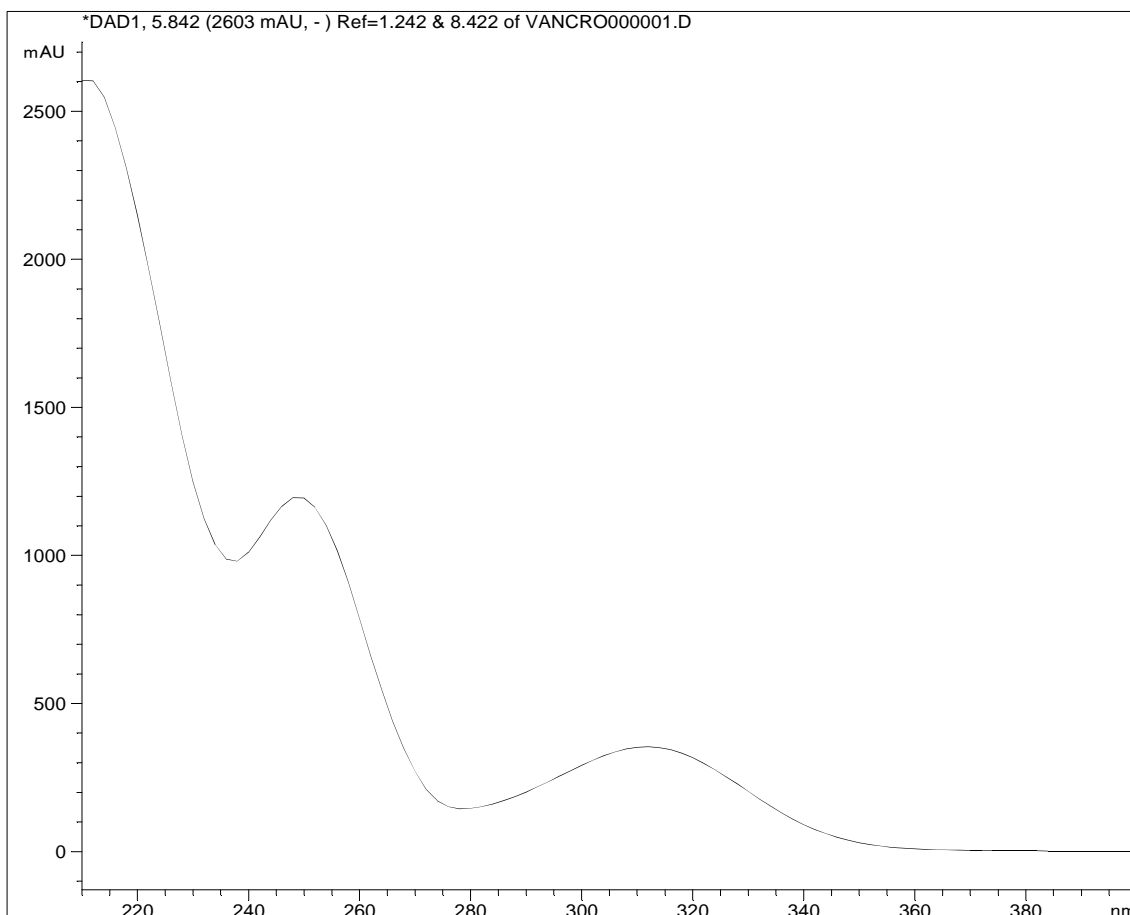
Se variaron los siguientes parámetros en las reacciones de complejación:

- pH: - en torno a 5 (sin tampón)
- en torno a 8 (con tampón fosfato o Tris)
- Diferentes proporciones Fe : vancrobactina
- Tiempo de incubación con hierro: - tiempo 0
- varias horas de incubación
- 24 horas de incubación
- Temperatura de incubación: - temperatura ambiente
- refrigeración a 4 °C.

Métodos de aislamiento y detección del complejo

En un primer momento se optó por utilizar el HPLC en fase reversa acoplado a un detector de fotodiodos para detectar la presencia de complejos de vancrobactina-Fe⁺³ basándose en las medidas y cálculos espectrofotométricos publicados en estudios anteriores.

Previamente esta misma técnica instrumental fue usada con éxito para la detección y aislamiento de vancrobactina.

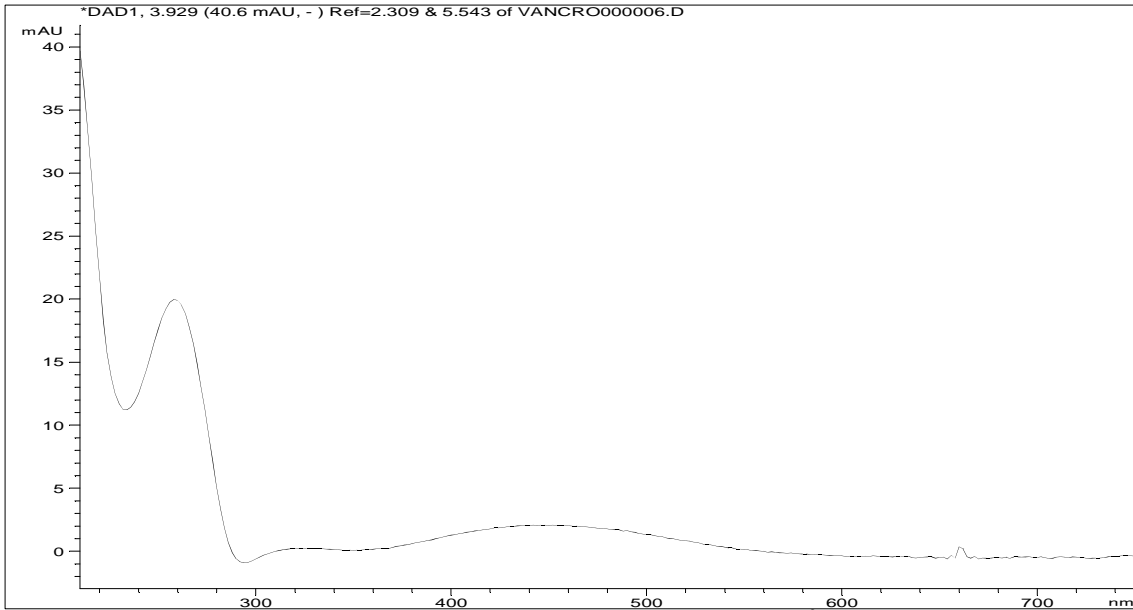


Espectro de absorción de la vancrobactina

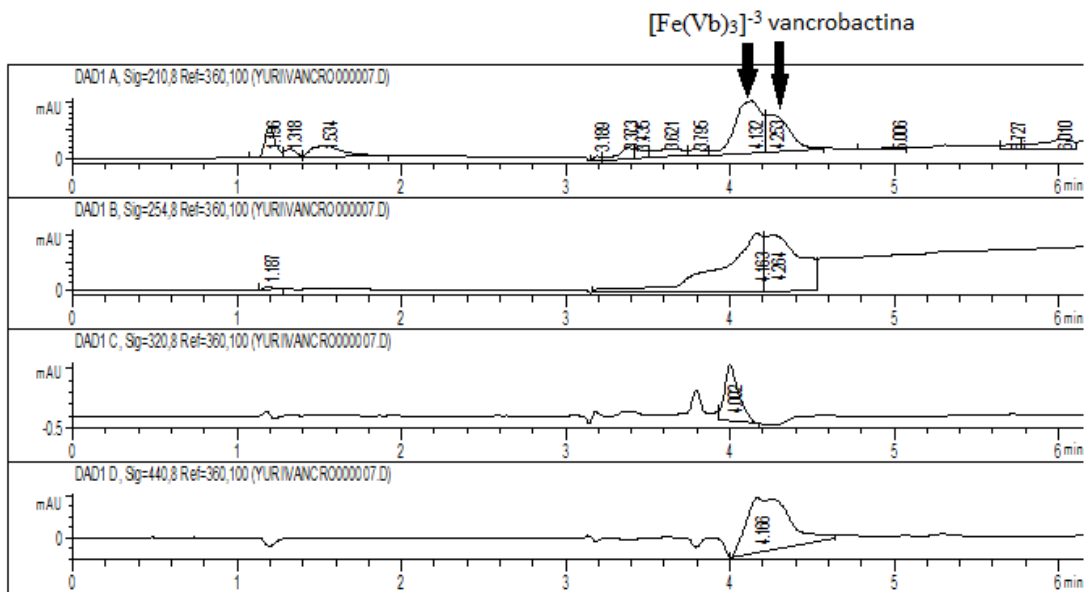
Empleando FeCl₃ como fuente de hierro, se llevaron a cabo diversas reacciones de complejación de vancrobactina y Fe⁺³ en distintas proporciones. Con una concentración de vancrobactina de 3.3×10^{-4} M, la relación vancrobactina:Fe⁺³ fue de aproximadamente 3:1 (6:2'18). Con una concentración de vancrobactina de 2.7×10^{-4} M, la relación vancrobactina:Fe⁺³ fue aproximadamente 1:2 (1:2'18).

Estas reacciones fueron realizadas tanto sin tampón, resultando en un pH en torno a 5 – 6, como con tampón fosfato 0'01 M o tampón Tris-ClH 0'1 M, resultando ambas en un pH en torno a 8. Además las reacciones fueron estudiadas mediante HPLC, inmediatamente después de su montaje y tras 24 horas de incubación.

Cuando las reacciones fueron estudiadas por HPLC en fase reserva se obtuvieron cromatogramas en los que se lograron identificar picos cromatográficos cuyos espectros de UV mostraban un banda de absorbancia en torno a 450 nm que parecen indicar la presencia de $[\text{Fe}(\text{Vb})_3]^{-3}$. Estos cromatogramas se corresponden con las reacciones con una proporción vancrobactina: Fe^{+3} de 1:2'18 sin adición de tampón, tanto en tiempo 0 como tras 24 horas de incubación. También se localizaron en el cromatograma de la reacción con la misma proporción anterior pero con tampón fosfato.



Espectro de absorción de un supuesto complejo de $[\text{Fe}(\text{Vb})_3]^{-3}$ apreciándose un pico en 450 nm



Cromatograma en el que se aprecian los picos de la vancrobactina y del supuesto $[\text{Fe}(\text{Vb})_3]^{-3}$

Sin embargo, resultó imposible aislar las fracciones en las que aparecían dichos picos, debido a que los tiempos de retención de los picos variaban conforme se repetían los experimentos.

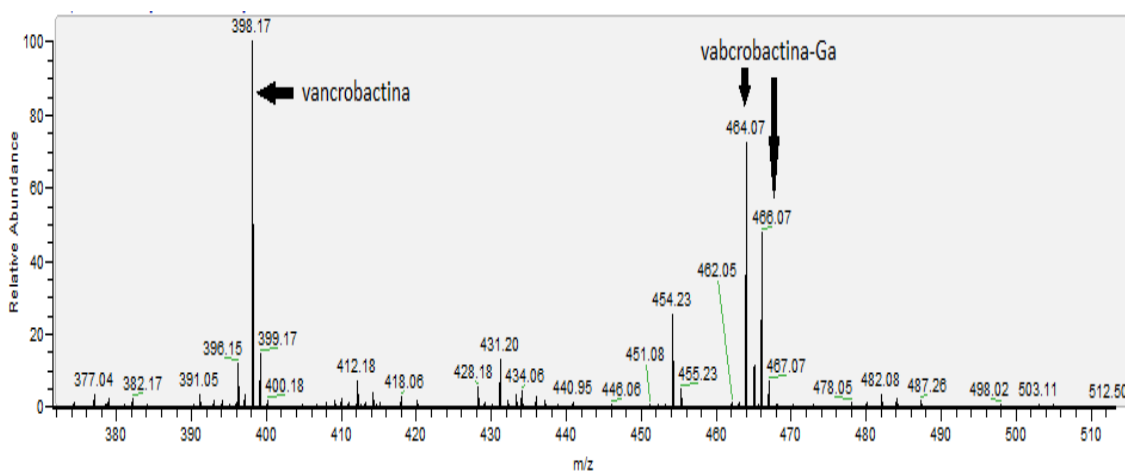
Por todo esto se optó por hacer un estudio por espectrometría de masas sobre infusiones directas de reacciones realizadas en las mismas condiciones que las anteriores.

Conociendo la masa molecular de la vancrobactina (397) es posible calcular la relación masa/carga aproximada esperada de los complejos con una (sobre 454), dos (sobre 850) y tres (sobre 1247) vancrobactinas. En caso de que los complejos adquieran dos o tres cargas, las relaciones masa/carga serían la mitad o tercera parte de las anteriores.

Una vez obtenidos los espectros, se hizo una búsqueda sistemática de esas relaciones masa/carga calculadas. Aunque se encontraron algunas relaciones que por su valor podrían tratarse de complejos, estos no presentaban el cluster característico de los complejos con hierro.

Dado que se ha demostrado mediante bioensayos que la vancrobactina posee actividad siderófora, se postula que debe haber algún problema de tipo analítico que impida la detección de estos complejos. Por ello se decidió ensayar con Ga^{+3} como elemento agente quelatante, ya que hay antecedentes¹⁹ del uso con éxito de este elemento en la formación de complejos con otros sideróforos, debido a las similitudes de propiedades que tienen con el Fe^{+3} .

Utilizando GaBr_3 como fuente de Galio, se llevaron a cabo reacciones con una proporción 1:218 de vancrobactina:Ga y se pudo observar que en el espectro aparecían señales compatibles con la relación masa/carga correspondientes al complejo formado por una vancrobactina con un ión Ga^{+3} , además en este caso los picos si mostraban un cluster específico de Galio.



Espectrograma de la infusión directa de una reacción entre vancrobactina y Ga^{+3} en la que se puede ver el pico de la vancrobactina y del complejo vancrobactina-Ga.

Para intentar aislar el complejo vancrobactina-Ga se usó el equipo de HPLC acoplado al espectrómetro de masas. Aunque se utilizaron diversas columnas, *Atlantis*®, TSK y de intercambio iónico, con ninguna de ellas se consiguió aislar el complejo ya que este quedó siempre retenido en la columna o salió al inicio con el frente de disolvente.

Conclusiones

Como se dijo anteriormente, se ha demostrado mediante bioensayos la actividad siderófora de vancrobactina, por lo que se asume que este sideróforo realmente es capaz de quelatar hierro. Sin embargo con los métodos descritos anteriormente no fue posible aislar o incluso detectar la formación de su complejo con Fe⁺³.

Una opción viable para poder estudiar la estructura del complejo fue utilizar Galio en vez de hierro, ya que gracias a la gran similitud en las propiedades de estos dos elementos, los sideróforos son capaces de quelatarlo. Aunque se logró detectar perfectamente el complejo de galio mediante infusión directa en espectrometría de masas, no se ha logrado aislarlo usando HPLC, por lo que será necesario probar otros métodos de aislamiento en el futuro. En caso de conseguir aislar este complejo, dado que el galio, al contrario que el hierro, no es paramagnético, se podría estudiar su estructura por RMN.

BIBLIOGRAFÍA

¹ **Balado, M., Osorio, C. R., Lemos, M. L.** FvtA Is the Receptor for the Siderophore Vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*: Utility as a Route of Entry for Vanchrobactin Analogues. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. 75: 2775-2783.

² **Toranzo, A. E., and J. L. Barja.** 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Org.* 9:73-82.

³ **Toranzo, A. E., and J. L. Barja.** 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Org.* 9:73-82.

⁴ **Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodríguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215-237.

⁵ **Neilands, J.B.** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723-26726

⁶ **Neilands, J.B.** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723-26726

⁷ **Nicholas Noinaj, Maude Guillier, Travis J. Barnard, and Susan K. Buchanan.** TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. 64:43-60

⁸ **Nicholas Noinaj, Maude Guillier, Travis J. Barnard, and Susan K. Buchanan.** TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. 64:43-60

-
- ⁹ **Ranjan Chakraborty, Erin Storey, Dick van der Helm** Molecular mechanism of ferricsiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of *Escherichia coli*. *Biometals* (2007) 20:263–274
- ¹⁰ **Balado, M., Osorio, C. R., Lemos, M. L.** FvtA Is the Receptor for the Siderophore Vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*: Utility as a Route of Entry for Vanchrobactin Analogues. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. 75: 2775–2783.
- ¹¹ **Balado, M., Osorio, C. R., Lemos, M. L.** FvtA Is the Receptor for the Siderophore Vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*: Utility as a Route of Entry for Vanchrobactin Analogues. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. 75: 2775–2783.
- ¹² **Raquel G. Soengas, Cristina Anta, Alfonso Espada, Vanessa Paz, Isabel R. Ares, Miguel Balado, Jaime Rodriguez, Manuel L. Lemos and Carlos Jimenez,** Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Tetrahedron Letters* 47 (2006) 7113–7116
- ¹³ **Emilia Iglesias, Isabel Brandariz, Carlos Jimenez and Raquel G. Soengas** Iron(III) complexation by Vanchrobactin, a siderophore of the bacterial fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Metallomics*
- ¹⁴ **Emilia Iglesias, Isabel Brandariz, Carlos Jimenez and Raquel G. Soengas** Iron(III) complexation by Vanchrobactin, a siderophore of the bacterial fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Metallomics*
- ¹⁵ **Miller, M.j.; Malouin, F.** Siderophore-mediated drug delivery: the designed, synthesis, and study of the siderophore-antibiotic and antifungal conjugates. In the Development of iron chelators for clinical use; Bergeron, R.J., Brittenham, G.M., Ed.; *CRC: BocaRaton, Fl, 1994; pp 275-306*
- ¹⁶ **Raymond J. Bergeron, Neelam Bharti, Shailendra Singh, James S. McManis, Jan Wiegand and Linda G. Green** Vibriobactin Antibodies: A Vaccine Strategy *J. Med. Chem.*, 2009, 52
- ¹⁷ **Raquel G. Soengas, Cristina Anta, Alfonso Espada, Vanessa Paz, Isabel R. Ares, Miguel Balado, Jaime Rodriguez, Manuel L. Lemosc and Carlos Jimenez,** Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Tetrahedron Letters* 47 (2006) 7113–7116
- ¹⁸ **Emilia Iglesias, Isabel Brandariz, Carlos Jimenez and Raquel G. Soengas** Iron(III) complexation by Vanchrobactin, a siderophore of the bacterial fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Metallomics*
- ¹⁹ **M. Bilayet Hossain, Mahbulul A. F. Jalal, and Dick van der Helm** Gallium-complex of anguibactin, a siderophore from fishpathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of Chemical Crystallography*, Vol. 28, No. 1, 1998