

UNIVERSIDADE DA CORUÑA



CICA
CENTRO DE INVESTIGACIÓNS
CIENTÍFICAS AVANZADAS

“Clonaje, expresión y purificación de FrpA_{ang}, una nueva proteína de membrana receptora de sideróforos en *Vibrio anguillarum*”

“Clonaxe, expresión e purificación de FrpA_{ang}, una nueva proteína de membrana receptora de sideróforos en *Vibrio anguillarum*”

“Cloning, expression and purification of FrpA_{ang}, a novel membrane protein siderophore receptor in *Vibrio anguillarum*”

Máster en Biotecnología Avanzada

Trabajo de Fin de Máster

Febrero, 2019



Juan Manuel Cabaleiro Amil

AUTORIZACIÓN DE LOS TUTORES

El Dr. Carlos Jiménez González y el Dr. Jaime Rodríguez González en calidad de tutores del presente trabajo titulado:

“Clonaje, expresión y purificación de FrpA_{ang}, una nueva proteína de membrana receptora de sideróforos en Vibrio anguillarum”

“Clonaxe, expresión e purificación de FrpA_{ang}, una nueva proteína de membrana receptora de sideróforos en Vibrio anguillarum”

“Cloning, expression and purification of FrpA_{ang}, a novel membrane protein siderophore receptor in Vibrio anguillarum”

autorizan su presentación ante el Tribunal evaluador.

A Coruña 4 de febrero de 2019 Facultad de Ciencias, Universidad de La Coruña.

Fdo. Jaime Rodríguez González Fdo. Carlos Jiménez González

Trabajo final de Máster realizado por Juan M. Cabaleiro Amil, en el grupo de Química Molecular y de Materiales, QUIMOLMAT.
Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas, CICA.



ÍNDICE

Resumen

Introducción

Situación actual de la Acuicultura	-7-
Futuro de la Acuicultura	-8-
La vibriosis como factor limitante de la producción piscícola	-9-
Los sistemas de sideróforos como factor de virulencia	-10-
Sistema de sideróforos en <i>Vibrio anguillarum</i>	-12-

Objetivos

Material y métodos

Equipamiento	-13-
Preparación de células competentes	-14-
Transformación mediante choque térmico	-15-
Procedimiento general de clonaje	-15-
Electroforesis y secuenciación	-17-
Transferencia a cepas de expresión	-18-
Ensayos de expresión de <i>rfrpA_{ang}</i>	-18-
Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	-18-
Western blot	-19-
Cultivo bacteriano y aislamiento de las proteínas de membrana externa	-19-
Purificación por mediante IMAC	-20-

Resultados

Clonaje de <i>rfrpA_{ang}</i>	-20-
Extracción del plásmido recombinante y selección de las cepas de expresión	-22-
Ensayo de expresión de <i>rfrpA_{ang}</i>	-22-
Producción de rFrpA _{ang} en <i>E. coli</i> B121 C43 (DE3) y aislamiento de proteínas de la membrana externa	-23-
Purificación de rFrpA _{ang}	-24-

Discusión	-25-
-----------	------

Conclusiones	-29-
--------------	------

Bibliografía	-29-
--------------	------

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
Da	Dalton
FAO	Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
IMAC	Cromatografía de afinidad con iones metálicos
IPTG	β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo
KDa	Kilodalton
LB	<i>Luria Bertani</i>
M€	Millones de euros
MS	Espectrometría de masas
MT	Millones de toneladas
OD₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
PB	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>rfrpA_{ang}</i>	Gen recombinante a partir de <i>frpA</i> de <i>Vibrio anguillarum</i> RV22
rFrpA_{ang}	Proteína recombinante a partir de FrpA _{ang} de <i>Vibrio anguillarum</i> RV22
RPM	Revoluciones por minuto
SAI	Servicios de Apoyo a la Investigación
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
T	Toneladas
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBE	Tampón tris-borato-EDTA
TEMED	<i>N,N,N,N'</i> -tetrametiletilendiamina

Resumen

La creciente importancia adquirida por la industria acuícola se ve reflejada en el espectacular incremento de un 29% en su producción durante el período 2011-2016. Sin embargo, su notable expansión asociada con los efectos del cambio climático lleva pareja la dispersión de patógenos responsables de unas pérdidas anuales para el sector acuícola estimadas en más 6000 millones de dólares por la FAO.

Uno de los patógenos más relevantes es *Vibrio anguillarum* responsable de la vibriosis, una septicemia hemorrágica capaz de afectar a más de 50 especies de peces y moluscos entre los que se encuentran algunos de interés piscícola a nivel mundial. Dentro de sus principales factores de virulencia encontramos a los sistemas de captación de Fe (III) mediados por sideróforos. Estos sistemas han sufrido adaptaciones desde su función ancestral de captación de hierro en condiciones de baja solubilidad en el medio externo, hacia la captación de hierro en el medio interno de los organismos, un medio en donde la disponibilidad de hierro en estado libre alcanza concentraciones attomolares.

Recientemente se ha descubierto un nuevo sistema de sideróforos en *V. anguillarum*. Este sistema es responsable de la síntesis de la piscibactina, sideróforo caracterizado previamente en otro importante patógeno acuícola; *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*. El nuevo sistema se une a otros descubiertos previamente en *V. anguillarum* como son los de la vancrobactina y la anguibactina.

La importancia de este nuevo elemento se ha hecho patente tras la secuenciación de un gran número de cepas de *V. anguillarum*. En este análisis se ha comprobado que el sistema de la piscibactina está presente en buena parte de las cepas con mayor mortalidad asociada (RV22, HI610, DSM 21597, 90-11-286). Esta evidencia ha sido puesta a prueba en ensayos de virulencia con la cepa RV22. En ellos se ha apuntado hacia el sistema de la piscibactina como un importante factor de virulencia, lo que supone una nueva posibilidad de cara a la generación de estrategias frente a *V. anguillarum*. Por todo ello, en el presente trabajo se propone el clonaje del supuesto receptor de la piscibactina, el gen *frpA_{ang}*, su producción en *E. coli* y su purificación de cara a un futuro ensayo de vacunación.

Summary

The growing importance acquired by the aquaculture industry is reflected in its recent production increase of 29% over the period of 2011-2016. However, its remarkable expansion in association with climate change effects drives to the dispersion of several associated pathogens responsible for annual losses to the industry estimated at 6000 million dollars according to the FAO.

One of the most relevant pathogens is *Vibrio anguillarum* responsible for the vibriosis, an hemorrhagic septicemia capable of affecting more than 50 species of fish and molluscs among which are some of the fish interest worldwide. One of its main virulence factors are Fe (III) uptake systems mediated by siderophores. These systems have been adapted from their ancestral role of iron uptake in the environment, towards the uptake of iron in the internal environment of the hosts, where the availability of iron in a free state is found in attomolar concentrations.

Recently a new siderophore system has been found out in *V. anguillarum*. This system is responsible for the synthesis of piscibactin, siderophore related with another important aquaculture pathogen; *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida*. The new system is added to other systems already known in *V. anguillarum* such as vancrobactin and anguibactin systems.

The importance of this new discovery seems to be noted after the recent sequencing of several *V. Anguillarum* strains. It has been observed that the system is present in much of the strains with higher associated mortality (RV22, HI610, DSM 21597, 90-11-286). This observation has been tested in virulence tests with the strain RV22.

These studies point out that the piscibactin system is an important virulence factor, which implies a new possibility for the generation of new strategies against *V. anguillarum*.

With all this knowledge about *V. Anguillarum*, the present Master Dissertation proposes the cloning of the putative receptor of piscibactin, the coding gene *frpA_{ang}*, its production and purification in *E. coli* for the development of a future vaccination assay.

Situación actual de la acuicultura

La trascendencia mundial de la pesca en general y de la acuicultura en particular se pone de manifiesto tanto por los reconocidos valores nutricionales de los productos marinos (Apromar, 2019) como por el papel que desempeñan en la economía mundial. Según los últimos datos (fig.1) ofrecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2018), en 2016 la producción mundial pesquera alcanzó la cifra de 171 millones de toneladas, de los cuales la industria acuícola fue responsable del 46,8 %. El valor de esta producción se estima en 220.000 M€.

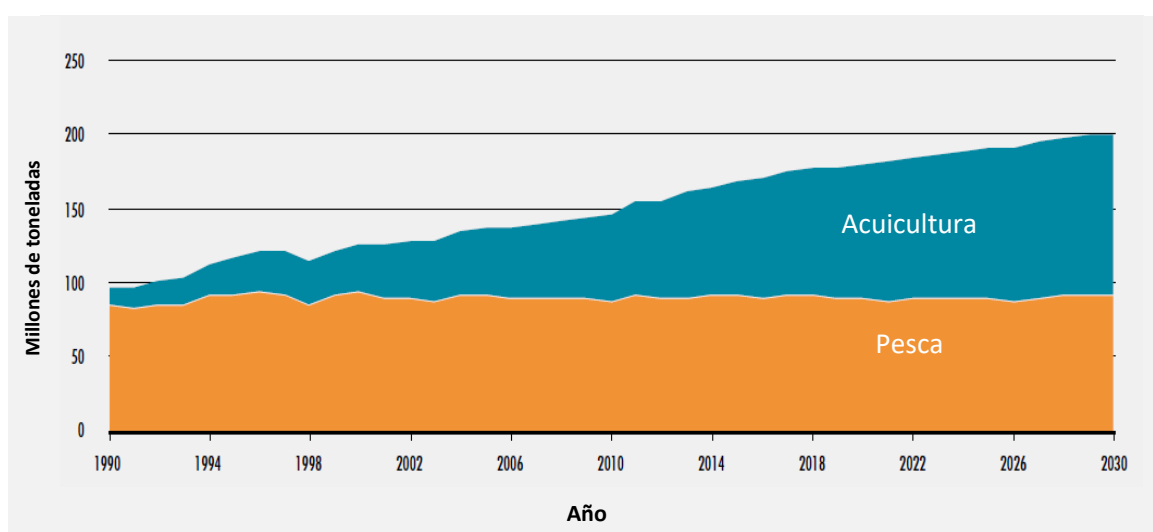


Figura 1. Datos históricos de capturas mundiales pesqueras y producción acuícola hasta 2016. Predicción de de capturas mundiales pesqueras y producción acuícola para el periodo 2017-2030 (FAO, 2018).

Si analizamos la composición de la producción acuícola mundial (FAO, 2018) en 2016 encontramos que aproximadamente el 57 % de los ingresos (125.910 M€) proceden de la producción de pescado, lo que pone de relieve el peso de la producción piscícola dentro del sector acuícola. Este papel se acentúa más si tenemos en cuenta la situación del sector dentro de la Unión Europea (fig.2), donde en el año 2014 se produjeron cerca de 640.000 T de pescado, con un valor asociado de 2.739 M€, lo que supone más del 70% del valor de la producción acuícola en la Unión Europea (Eurostat, 2017).

Por su parte, España ocupa el primer lugar como el mayor productor acuícola (Eurostat, 2017; Apromar, 2019), con 283.831 T en 2016 (22,0 % del total de la Unión Europea), seguido por el Reino Unido con 194.492 T y Francia con 166.640 T. Si analizamos las principales especies explotadas en España encontramos que la producción de mejillón

(271.842 T y 128 M€) sobrepasa al resto de especies como son la trucha arcoíris (12.523 T) o la lubina (20.957 T). Sin embargo, su peso económico se encuentra por debajo de esta última, estimado en 133 M€. Las siguientes especies en importancia económica son el atún rojo (69 M€), el rodaballo (58 M€), la dorada (58 M€) y la trucha arcoíris (19 M€) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019).

Si bien España ocupa un papel destacado como principal productor acuícola en la UE, Galicia se sitúa como la región más productiva de España siendo responsable del 81 % (280.302 T en 2017) con un valor de 207 M€, lo que representa el 40% del valor de la producción española (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019).



Figura 2. Distribución de la producción de acuicultura en los Estados miembros de la UE (Aproamar, 2019)

Las principales especies explotadas en esta comunidad son el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) con 266.925 T producidas en 2017 y un valor de 122 M€ y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) cuya producción en 2017 se estimó en unas 8.616 T y valorada en 58 M€ (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019).

Futuro de la acuicultura

Según las previsiones presentadas por la FAO, la acuicultura mantendrá su progresión (fig.1) alcanzando una producción acuícola mundial estimada en 110 millones de toneladas en la próxima década (FAO, 2018). Por el contrario, los pronósticos para industria pesquera indican que su producción mundial se mantendrá en los mismos valores que lleva alcanzando desde inicios de la década de los 90 (FAO, 2018).

Este aparente estancamiento del sector podría estar asociado a que el número de reservas pesqueras en las que podrían aumentar la explotación han alcanzado la cifra del 7% (fig.3) (FAO, 2018). Este hecho unido a un contexto de cambio climático en el que factores como la acidificación de los océanos o la caída de los niveles de oxígeno disuelto, suponen un

hándicap de cara a la sostenibilidad de la pesca en las próximas décadas (Gattuso et al., 2015).

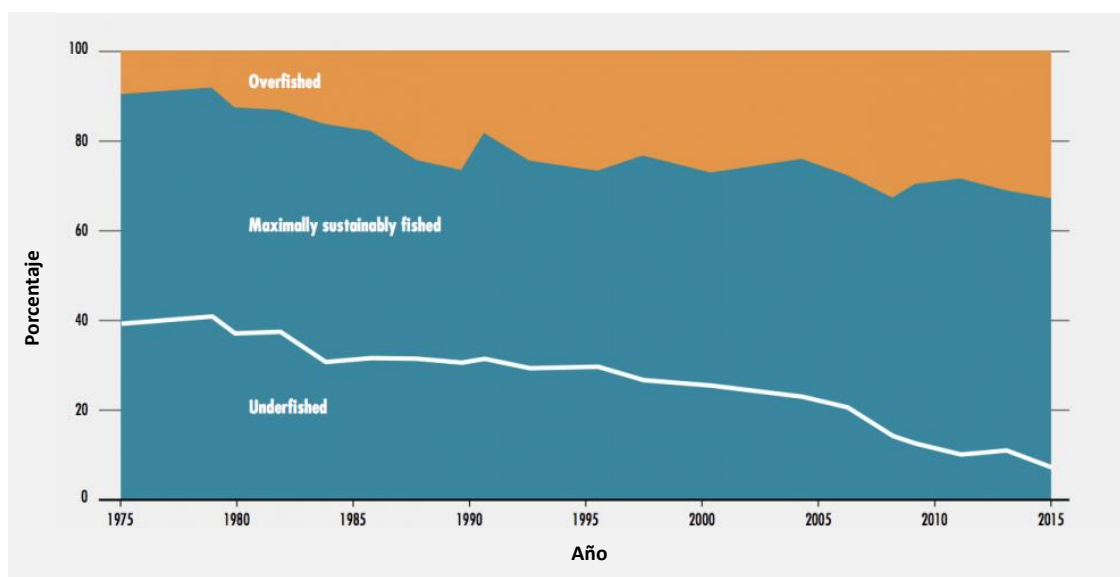


Figura 3. Estimación de los stocks de pesca entre el año 1975 y el 2015. (FAO, 2018).

Entre los efectos del cambio climático encontramos a la subida del nivel del mar. Este evento modificará la salinidad en áreas de importante producción piscícola como son los estuarios (Baker-Austin et al., 2013). Estos cambios conducen a transiciones en las comunidades que en ocasiones facilitan la proliferación de bacterias patógenas hacia entornos en los que hasta la fecha no habían sido prevalentes (Gattuso et al., 2015). Uno de los casos mejor documentados corresponde a las bacterias del género *Vibrio* (Baker-Austin et al., 2013; Gattuso et al., 2015). La proliferación de patógenos como los pertenecientes al anterior género representan un serio problema para la pesca en general y la acuicultura en particular, siendo responsables de pérdidas estimadas en 6000 millones de dólares (Stentiford et al., 2017; Assefa et al., 2018)

La vibriosis como factor limitante de la producción piscícola

Actualmente las enfermedades infecciosas suponen la principal causa de pérdidas en la producción piscícola (Stentiford et al., 2017; Assefa et al., 2018). Este hecho unido a la prevalencia del monocultivo en acuicultura (Santos et al., 2018; Park et al., 2018) y a la aparición de resistencias microbianas sitúa a la acuicultura mundial en una situación compleja de cara a mantener su crecimiento actual (Pérez-Sánchez et al., 2018).

A pesar de que existe cierta diversidad de bacterias que pueden comportarse como patógenas (Whoolhouse et al., 2005), únicamente un grupo reducido supone un verdadero problema a nivel mundial. Una de ellas es *V. anguillarum*, principal responsable de una septicemia hemorrágica (fig.4) conocida como vibriosis (Lemos et al.,



Figura 4. Ejemplar de Lubina afectado por Vibriosis (Haenen et al., 2014).

2010). Ejemplos de las especies que puede afectar son la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el salmón (*Oncorhynchus spp.* y *Scophthalmus salar*), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*), el bacalao (*Gadus morhua*) o la anguila (*Anguilla japonica* y *Anguilla anguilla*) (Toranzo et al., 2005).

Actualmente el tratamiento habitual para su eliminación se basa en el empleo de antibióticos como la quinolona o la flumequina (Ina-Salwany et al., 2018). Sin embargo, estas medidas han perdido paulatinamente su eficacia debido al desarrollo de resistencias (Santos et al., 2018). Por este motivo, son necesarios nuevos estudios para el desarrollo de métodos alternativos como son los probióticos o la vacunación (Ina-Salwany et al., 2018).

A pesar de la variabilidad intrínseca presente en *V. anguillarum*, de los 23 serotipos reconocidos en el Sistema de Serotipado europeo, solamente los pertenecientes a los grupos O1, O2 y O3 están implicados en procesos infecciosos (Castillo et al., 2017). El éxito en la consecución de estos procesos depende en parte de la capacidad del patógeno para desplegar factores de virulencia (Chen et al., 2016) que le permitan invadir al huésped, evadir sus defensas y desencadenar dicho proceso patológico (Peterson, 1996).

Los sistemas de sideróforos como factor de virulencia

Entre los principales factores de virulencia encontramos a los sistemas de sideróforos (Li et al., 2017), estos partiendo de su función ancestral de captación de Fe (III) en el medio ambiente han mantenido su objetivo en un nuevo entorno: el medio interno de los animales. En el caso de los vertebrados superiores, la disponibilidad de Fe (III) en estado libre es ínfima debido a que la mayor parte se encuentra bien formando complejos dentro de hemoproteínas o bien se encuentra unido a proteínas como la transferrina, lactoferrina o

la ferritina (Schaible et al., 2004). Estas estrategias hacen caer la concentración de hierro en estado libre en el medio interno a 10^{-18} M (Li et al., 2017).

Los sistemas de sideróforos (Thode et al., 2018) se componen de los elementos necesarios para la síntesis, la secreción y la recaptación del sideróforo una vez que éstos se han unido al hierro extracelular. El quelante de hierro puede ser sintetizado por propia bacteria receptora o por otras presentes en el entorno. Su importancia en el eficiente mundo procarionta se manifiesta en que, de forma general, las bacterias presentan varios sistemas de sideróforos (fig.5) o al menos varios receptores para captar sideróforos sintetizados tanto por ellas como por otras bacterias del entorno (Thode et al., 2018). Este hecho ha sido analizado recientemente mediante la búsqueda de secuencias de receptores y genes de biosíntesis conocidos en una gran variedad de los genomas secuenciados de bacterias del orden Vibrionaceae (Thode et al., 2018).

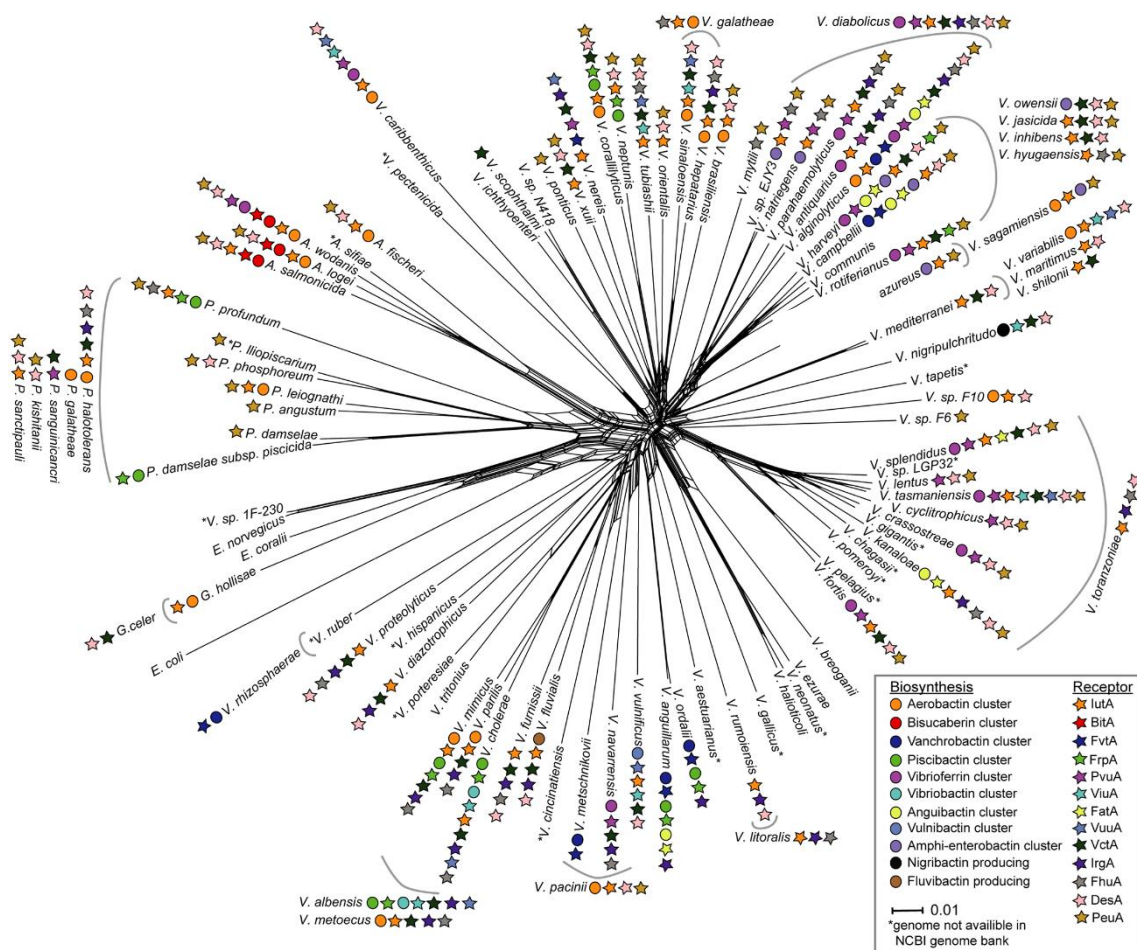


Figura 5. Distribución filogenética del orden Vibrionaceae en base a clústeres de biosíntesis de sideróforos y receptores encontrados mediante análisis bioinformático de sus genomas (Thode et al., 2018).

El mecanismo por el que funcionan los sistemas de sideróforos es el siguiente:

Tras su síntesis, los sideróforos son secretados y una vez unidos al hierro (fig.6) el complejo es reconocido por un receptor específico en la superficie de la membrana externa (Payne et al., 2016). El transporte ocurre gracias a la energía protón-motriz aportada por las proteínas de membrana interna TonB y sus proteínas asociadas ExbB y ExbD (Payne et al., 2016).

Una vez en el periplasma, los complejos de hierro se asocian con proteínas de unión periplásmica que son liberados hacia permeasas presentes en la membrana interna que lo transportan mediante gasto de energía (Payne et al., 2016). Una vez dentro, el hierro es liberado del sideróforo bien por reducción o bien rotura enzimática del sideróforo (Payne et al., 2016).

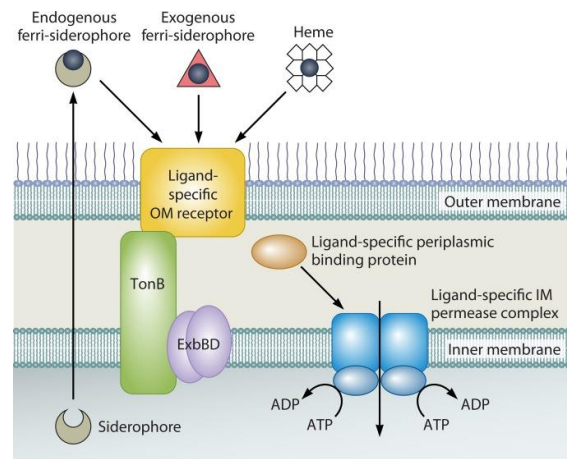


Figura 6. Componentes de los sistemas de sideróforos en bacterias del género *Vibrio* (Payne et al., 2016).

Sistemas de sideróforos en *Vibrio anguillarum*

Hasta la fecha, en *V. anguillarum* se han descrito dos sistemas de captación de hierro mediante sideróforos: el de la anguibactina y el de la vancrobactina (Li et al., 2017). El primero se encuentra restringido a cepas O1 portadoras del plásmido tipo pJM1. El último, ubicado en el cromosoma 1, se encuentra en todas las cepas examinadas pertenecientes a los distintos serotipos, exceptuando a las portadoras del propio plásmido pJM1 debido a una inactivación provocada por la inserción de la secuencia transponible RS1 en secuencias de biosíntesis de la vancrobactina (Li et al., 2017).

Recientemente, se ha descrito el sistema de la piscibactina en *V. anguillarum*, el cual había sido caracterizado previamente en otro importante patógeno piscícola; *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida*. Dicho sideróforo fue predicho inicialmente a partir de *genome mining* (Balado et al., 2018; Thode et al., 2018) y posteriormente fue detectado *in vivo* (Balado et al., 2018). Este sistema parece tener una especial importancia sobre el nivel de virulencia, como se evidenció tanto tras la secuenciación de las cepas que más

mortalidad acuícola causan (Rønneseth et al., 2017; Castillo et al., 2017; Balado et al., 2018), como en los ensayos de virulencia desarrollados *in vivo* (Balado et al., 2018), en los cuales las infecciones provocadas por bacterias que solamente presentaban activo este sistema de sideróforos se asociaron con bajos porcentajes de supervivencia (12-20%). La asociación de sistema a cepas virulentas (Rønneseth et al., 2017; Castillo et al., 2017; Balado et al., 2018) hace pensar que el desarrollo de una estrategia vacunal basado en el receptor de la piscibactina, la proteína de membrana FrpA_{ang}, podría reducir la mortalidad asociada a las cepas de *V. anguillarum* que lo producen (Santos et al., 2018; Ina-Salwany et al., 2018)

Objetivos

Los objetivos fundamentales de este Trabajo de Fin de Máster son:

- Realizar el clonaje del gen *frpA_{ang}* de *Vibrio anguillarum* en bacterias *Escherichia coli*.
- Producir la proteína recombinante rFrpA_{ang} en *Escherichia coli*.
- Purificar la proteína recombinante rFrpA_{ang}.

Material y métodos

Equipamiento

- Esterilizador a vapor SC502 E-1 l (Matachana).
- Termociclador T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad).
- Bio-espectrofotómetro para microgota y cubeta - MySPEC Twin (VWR).
- Fotodocumentador - Chemidoc MP Imaging System (Bio-rad).
- Secuenciador 3130xl (Applied Biosystems).
- Centrífuga refrigerada CR22N (Hitachi).
- Ultracentrífuga refrigerada CP100NX (Hitachi).
- Disruptor celular (Biospec Products) con partículas de zirconia/sílice de 0.1 mm.
- Tubos de filtración por centrifugación de 30 kDa (Amicon).
- Sonicador Ultrasound Technology UP200S (Hielscher).
- Equipo de cromatografía líquida (FPLC) - NGC Quest 10 Plus (Bio-rad).
- Columnas His TrapTM HP (GE Healthcare).

Materiales y metodología

Cepas bacterianas empleadas

- *Vibrio anguillarum* RV22
- *Escherichia coli* Top10
- *Escherichia coli* BL21(DE3)
- *Escherichia coli* BL21 C43(DE3)

Características

- Patógeno obtenido de peces con vibriosis
- Cepa de propagación de plásmidos
- Cepa de expresión
- Cepa de expresión

Medios de cultivo

Soja Triptona modificada	Luria Bertani (LB)	Terrific broth (TB)
Peptona de Soja: 3,0 g/L Glucosa: 2,5 g/L Triptona: 17,0 g/L K ₂ HPO ₄ : 2,5 g/L NaCl: 15,0 g/L	Triptona 10 g/L Extracto de levadura 5 g/L NaCl 10 g/L	Triptona 12g Extracto de levadura 24 g Glicerol 4 mL KH ₂ PO ₄ 2,31 g/L K ₂ HPO ₄ 12,25 g/L

El medio de Soja Triptona modificado fue empleado para el cultivo de *V. anguillarum*, mientras que el LB y el TB fueron empleados para el cultivo de las distintas cepas de *E. coli* (Rosano et al., 2014). Los medios fueron esterilizados en una autoclave a 121°C durante 20 minutos. En el caso del medio TB se autoclavarón separadamente los nutrientes y las sales para evitar su precipitación. Para el mantenimiento del plásmido, los medios fueron suplementados con ampicilina 100 µg/mL. La expresión de las proteínas recombinantes se indujo con una disolución 1 mM de β-D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG).

Preparación de células competentes

Para la transformación de *E. coli* con ADN plasmídico se prepararon células competentes como se indica a continuación: 50 mL de medio LB fueron inoculados con un cultivo saturado de la cepa bacteriana a transformar (Top10, BL21 (DE3) o BL21 C43(DE3)) y se dejaron crecer a 37 °C hasta una OD₆₀₀ de 0.6. Posteriormente se incubaron sobre hielo

durante 10 minutos y pasado este tiempo se centrifugaron a 7000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 25 mL de CaCl₂ 50 mM, y glicerol al 15 % y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. El sedimento generado se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 50 mM más glicerol al 15% y se incubó a 0 °C durante una hora. Posteriormente se repitió la centrifugación a 7000 g y el sedimento se resuspendió en 1 mL de de CaCl₂ 50 mM. La suspensión de bacterias competentes obtenidas se dividió en alícuotas de 100 µL para su conservación a -80 °C.

Transformación mediante choque térmico

Para este procedimiento se añadieron 5 µL de ADN plasmídico a 100 µL de una suspensión de células competentes. Las células se incubaron durante 30 min a 0 °C, tras lo cual se llevaron a 42 °C durante un período de 10 a 45 seg. (tiempo variable según la cepa a transformar) y se devolvieron al hielo. Posteriormente, se añadió 1 mL de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 250 rpm. Tras la etapa anterior se centrifugaron a 14000 g durante 2 minutos y se retiraron 900 µL de medio. Finalmente, el sedimento se disolvió en los 205 µL restantes, se transfirió a placas de medio LB agar con 100 µg/mL de ampicilina y se dejaron crecer a 37 °C durante toda la noche.

Procedimiento general de clonaje

Se diseñaron *primers* (Sigma-Aldrich) para el clonaje y la secuenciación teniendo en cuenta las dianas de restricción necesarias (BamHI y XhoI representadas en rojo) y el *tag* de histidinas. Los *primers* se solubilizaron agua Milli-Q hasta alcanzar una concentración de 100 µM y posteriormente se prepararon alícuotas de trabajo a 10 µM.

Clonaje		5' → 3'	Tamaño amplicon (pb)
Primers C-term His	FrpAv-C Fw	TATAGGATCCGAAAACAGGAGAAGAGCTT	1825
	FrpAv-C Rev	ATATCTCGAGCCACTCAAGTTTGATGTT	
Primers N-term His	FrpAv-N Fw	TATAGGATCCAGCACCACCACCACCA CCACAAAACAGGAGAAGAGCTT	1844
	FrpAv-N Rev	ATATCTCGAGTTACCACTCAAGTTTGATG	

Detección del inserto en el plásmido

5' —————> 3'

T7 promoter primer Fw	TAATACGACTCACTATAGG	Sin inserto 267
T7 promoter primer Rv	GCTAGTTATTGCTCAGCG	Con inserto 2111

Secuenciación

5' —————> 3'

FrpAv 1-608 Rev	ATATTCAGCTTGGGTGAGATACCACT
FrpAv 608-1232 Fw	TATAAATTTGACCAAAAAATGACGAGC
FrpAv 608-1232 Rev	ATATTCTCCATTAAGGGATTTCTCAGC
FrpAv 1232-1824 Fw	TATAAGTTGGGCTGGCGTACTCG



Figura 7. Secuencia de la región de clonaje y del plásmido pET20b(+).expresión. Figura extraída de Nova Lifetech Inc.

A partir del DNA genómico de *V. anguillarum* RV22 extraído con el kit NZYMiniprep (NZYTech) se realizó la amplificación en gradiente (entre 60 y 80 °C) del gen *frpA_{ang}* codificante del receptor de piscibactina (NZ_AEZB01000030; región 33272...35095) con un tamaño de 1824 pb, para seleccionar la temperatura más adecuada de hibridación. Se empleó para ello la Taq polimerasa en mezcla con tampón de carga Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYtech).

Las condiciones generales para la realización de las PCRs mostradas a continuación:

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	30 s	98 °C	30 s	1
Desnaturalización	95 °C	10 s	98 °C	10 s	25
Hibridación	X	30 s	X	30 s	1
Extensión	72 °C	1 min/Kb	72 °C	1 min/Kb	
Extensión Final	72 °C	10 min	72 °C	10 min	

Tabla 1. Condiciones empleadas para la realización de la PCR. La temperatura de hibridación varía en función de la secuencia del primer.

Para la amplificación del gen *frpA_{ang}* en las condiciones de hibridación escogidas se empleó la polimerasa de Q5 de alta fidelidad (New England Biolabs) seleccionada por su baja tasa de error de 1 por cada $7,1 \times 10^5$ bases incorporadas según la casa comercial.

Posteriormente el plásmido pET20b(+) (fig.7) (Novagen) y los amplicones formados por *rfrpA_{ang}*, y sus secuencias adyacentes (dianas de restricción y la secuencia codificante para tag de histidinas en el caso de la N-terminal) fueron digeridos con las enzimas BamHI y XhoI Speedy (NZYtech) durante 30 min a 37 °C. Las enzimas fueron inactivadas a 80 °C durante 20 minutos. Los fragmentos obtenidos se ligaron con ligasa T4 (Speedy) a 22 °C durante 15 min. Pasado este tiempo se inactivó la ligasa a 65 °C durante 10 min y posteriormente se transformó a bacterias *E. coli* Top10 con los productos de la ligación. Estos últimos se cultivaron en placas de LB agar suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Posteriormente se verificó la presencia del plásmido recombinante mediante PCR *colony* y electroforesis en geles de agarosa para las colonias capaces de desarrollarse en la placa con ampicilina. Asimismo, para la PCR se empleó la Taq polimerasa con tampón de carga Supreme NZYtaq II 2x Green Master Mix (NZYtech).

Electroforesis y secuenciación

Para identificar y purificar los fragmentos de ADN analizados se usaron geles de agarosa al 1 %, tampón tris-borato-EDTA (TBE, Tris: 108 g, ácido bórico: 55 g y 80 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0) y para la tinción se empleó RealSafe Staining solution (NZYTech). El gel fue colocado en la cubeta de electroforesis Mini-Sub® GT cell (Bio-Rad) y se cubrió con el tampón TBE. El tamaño de las bandas de ADN fue estimado por medio del marcador DNA Ladder III (NZYtech). La electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 65 min usando la fuente PowerPac™ (Bio-Rad). A partir de la PCR *colony* se seleccionaron 4 colonias (2 con el tag de histidinas en N-terminal y otras 2 en C-terminal) y con ellas se prepararon 5 mL de cultivo saturado para extraer *prFrpA_{ang}* mediante el kit NZYMiniprep (NZYTech) y buscar la presencia de mutaciones mediante secuenciación de ADN. Dicha secuenciación fue llevada a cabo en los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidade da Coruña (SAI) utilizando el Sistema de análisis genético 3130xl (Applied Biosystems). Finalmente, las secuencias fueron comparadas con la secuencia WT de *V. anguillarum* mediante los programas en línea GENOME COMPILER y LALIGN (Huang et al., 1991).

Transformación de las cepas de expresión

Para la producción de la proteína rFrpA_{ang}, se seleccionaron las cepas *E. coli* BI21 C43 (DE3) y *E. coli* BI21 (DE3). A partir del plásmido recombinante y tras verificar su secuencia, se realizó la transformación de ambas cepas. A continuación, se cultivaron en placas LB con ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C. Posteriormente, las cepas que crecieron fueron testadas mediante PCR *colony* para comprobar si portaban la secuencia de interés.

Ensayos de producción de rFrpA_{ang}

A partir de la cepa *E. coli* BI21 C43 (DE3) transformada con plásmidos recombinantes se prepararon 8 tubos con 5 mL de cultivo (4 con LB y 4 con TB) que fueron inoculados con 25 µl de un cultivo saturado, 4 tubos fueron inoculados con cepas que codifican el *tag* de histidinas en N-terminal y otros 4 tubos con cepas que codifican el *tag* de histidinas en C-terminal. Posteriormente se dejaron crecer a 37 °C o 25 °C y 200 rpm y se comprobó mediante espectrofotometría (Myspec-VWR) que su absorbancia había alcanzado una OD₆₀₀ de entre 0,4 y 0,6. En ese momento se indujo la expresión con IPTG 1 mM. Después de 3 horas de inducción en el caso de los cultivos a 37 °C y 16 horas en el caso de los cultivos a 25 °C, se tomaron los 5 mL de cultivo, se centrifugaron a 6000 g y 4 °C durante 5 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en buffer de lisis y se sonicaron 5 veces en pulsos de 10 segundos y 10 segundos de reposo en hielo a amplitudes máximas de 80%. El sobrenadante se resuspendió en tampón Laemmli de carga para geles de poliacrilamida. Finalmente, las muestras se analizaron mediante western blot.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Para la SDS-PAGE se preparó el gel de separación de poliacrilamida al 12% con 8.7 mL de agua Milli-Q, 6 mL de acrilamida al 40% (NZYtech), 5 mL de tampón Tris-HCl pH 8.8, 200 µL de dodecilsulfato de sodio al 10%, 100 µL de persulfato de amonio (PSA) y 10 µL de TEMED. El gel concentrador al 4% se preparó mezclando 6.3 mL de agua Milli-Q, 2.5 mL de tampón Tris-HCl pH 6.8, 1 mL de acrilamida 40% (NZYtech), 100 µL de dodecilsulfato de sodio al 10%, 50 µL de persulfato de amonio (PSA) y 10 µL de TEMED. La electroforesis se llevó a cabo a 150 V durante 70 min usando la fuente PowerPac™ (Bio-Rad) y tampón tris-Glicina. La tinción se realizó añadiendo Blue Safe (NZYTech).

Western blot

Se realizó la transferencia del gel a la membrana empleando tampón tris-glicina (200 mL de etanol, 3 g de tris-aminometano, 14.4 g de glicina y 1 mL de SDS al 20% en 1 L de agua). La membrana se lavó usando tampón PBS con tween 20 al 0.05% y se bloqueó con una solución al 5% de leche desnatada en PBS durante 1 hora. Pasado este tiempo, se lavó 3 veces con PBS tween 20 al 0.05% 5 min de cada vez. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo primario (Anti-polyHistidine, Clone HIS-1 producido en ratón, Sigma-Aldrich), el cual se dejó en contacto con la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó con tampón PBS tween 20 al 0.05%, 3 veces durante 5 min de cada vez y se añadió el anticuerpo secundario (ECL Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab, GE Healthcare Life Sciences) que se dejó en contacto con la membrana durante 45 minutos. Finalmente, la membrana se lavó con tampón PBS tween 20 al 0.05%, 3 veces durante 5 min de cada vez, se reveló usando Luminata clásico, western HRP Sustrate (Millipore) y se visualizó en el fotodocumentador CHEMIDOC MP (Bio-Rad).

Cultivo bacteriano y aislamiento de las proteínas de membrana externa

Se inocularon 4 L de medio TB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) con 400 mL de cultivo saturado, se dejaron crecer a 25 °C y 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ 0,4-0,6 y posteriormente se indujo la expresión con IPTG alcanzando una concentración final de 1 mM. El cultivo se mantuvo bajo dichas condiciones durante 16 horas y luego se centrifugó a 6760 g, 4 °C durante 15 min.

Para el aislamiento de las proteínas de membrana se siguió un procedimiento similar al desarrollado previamente para la purificación de otros receptores de sideróforos (Valderrama, 2016; Martínez-Matamoros, 2018). Primero se resuspendió el sedimento con tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, lisozima 0,1%, ADNasa al 0,004% inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free).

A continuación, se lisaron las células con partículas de zirconia/sílice de 100 µm y un disruptor celular (Biospec Products). Los restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 5170 g durante 15 min. Al sobrenadante se le adicionó lauril sarcosinato de sodio al 2 %. Para solubilizar el detergente se sonicó durante 2 minutos y se incubó a 4 °C en agitación durante 2 horas.

Posteriormente se centrifugó a 134200 g, 4 °C durante 1 hora. El sedimento donde se encontraban las membranas externas se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, Elugent al 5% y se mantuvo en agitación a 4 °C durante toda la noche. Pasado este tiempo, se repitió la centrifugación a 134200 g, 4 °C durante 1 hora. El sobrenadante obtenido compuesto se mantuvo a 4 °C para su posterior purificación.

Purificación por medio de cromatografía de afinidad en columna de níquel (IMAC)

La proteína rFrpA_{ang} presente en el sobrenadante obtenido en la etapa anterior (y que contiene además el resto de las proteínas de membrana externa solubilizadas con Elugent al 5%) se purificó mediante FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) NGC Quest 10 Plus (Bio-Rad) y una columna de níquel de 1 ml (GE Healthcare Life Sciences). Para ello se empleó una metodología de purificación similar a la empleada previamente con otros receptores de sideróforos de tamaño similar (Martínez-Matamoros, 2018).

De este modo se emplearon como fases móviles el tampón A compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 50 mM y Elugent al 0,25%, y como tampón B Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM y Elugent al 0,25%. Ambas disoluciones se filtraron previamente usando membranas de 0,45 µm (FilterLab) con desgasificación al vacío. Durante la purificación la muestra se cargó en la columna y se lavó con 10 mL de tampón A. Posteriormente se llevó a cabo la elución con 6 mL de 100% de tampón B. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE y western blot.

Resultados

Clonaje del gen *frpA_{ang}*

Partiendo del ADN genómico de RV22 de *V. anguillarum* se realizó una PCR en gradiente para buscar las mejores condiciones de amplificación para el gen *frpA_{ang}* empleando para ello *primers* con dianas de para enzimas de restricción en 5' y una secuencia codificante de 6 histidinas para la purificación (Loughran et al., 2017). En base a los resultados, se realizó la amplificación con una polimerasa de alta fidelidad a 61,5 °C como temperatura de hibridación. A continuación, los productos de la amplificación y el plásmido pET20b(+), seleccionado por su alto nivel de expresión y por su secuencia de exportación a periplasma

denominada *pelB* (Sletta et al., 2007) fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y XhoI, ambas presentes tanto en el plásmido como en los extremos de la secuencia amplificada. Tras la inactivación térmica de las enzimas, los fragmentos obtenidos se unieron mediante ligasa T4, y tras la inactivación de esta, se transformaron células competentes *E. coli* Top10, cepa seleccionada para la propagación del plásmido por su alta capacidad de transformación (1×10^9 ufc/ μ g de ADN plasmídico) y su estabilidad genómica (según la casa Thermo Fisher).

Posteriormente los productos de la transformación se cultivaron en placas de agar suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina y las colonias que crecieron gracias a la resistencia a ampicilina presente en el plásmido, fueron seleccionadas para comprobar la presencia del constructo mediante PCR *colony* y electroforesis en gel de agarosa.

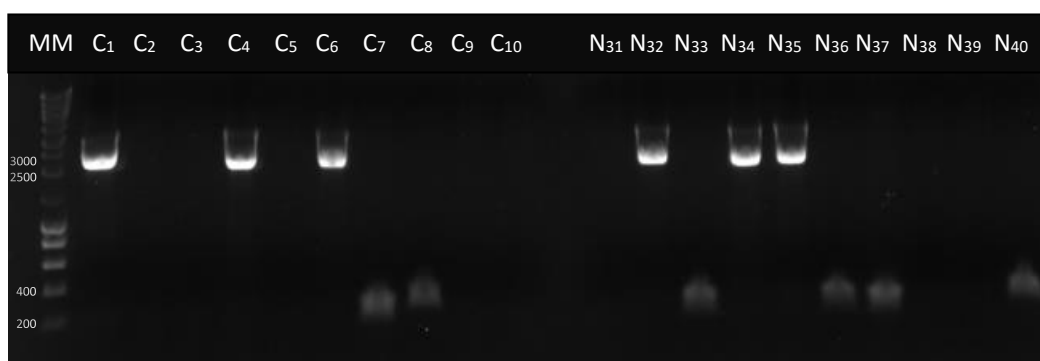


Figura 10. PCR *colony* 2. Identificación mediante electroforesis en gel de agarosa de las colonias portadoras del plásmido con la secuencia de interés.

Como resultado (fig.10) se obtuvieron 6 colonias candidatas a portar el plásmido recombinante (2111 pb), 6 colonias con el plásmido vacío (267 pb) y 8 posibles colonias satélite, probablemente originadas por la degradación de la ampicilina por parte de las β -lactamasas generadas por las bacterias que si incorporaron el plásmido.

A continuación de la PCR *colony* se seleccionaron 4 colonias portadoras del plásmido recombinante, 2 que codifican el *tag* de histidinas en N-terminal y otras 2 que lo codifican para C-terminal. Con cada una se prepararon 5 mL de cultivo saturado para extraer el plásmido recombinante y así verificar mediante secuenciación la ausencia de mutaciones en el gen *rfrpA_{ang}*. La comparación entre las secuencias de *FrpA_{ang}* WT y la de *rFrpA_{ang}* dio como resultado un 100 % de identidad y un 100% de solapamiento entre la secuencia WT del gen *frpA_{ang}* y la secuencia presente en las 4 cepas de *E. coli* Top10 transformadas.

Extracción del plásmido recombinante y selección de las cepas de expresión

Con los plásmidos recombinantes (cuya secuencia fue verificada mediante secuenciación) se transformaron mediante choque térmico las cepas *E. coli* BL21 C43 (DE3) y *E. coli* BL21(DE3). Estas cepas se seleccionaron por su especial tolerancia hacia la expresión de proteínas tóxicas e insolubles (Morra et al., 2017). Posteriormente los productos de la transformación se cultivaron en placa de agar LB con 100 µl/mL de ampicilina y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Pasado este tiempo solamente se observaron colonias en *E. coli* BL21 C43 (DE3), por lo que se realizó una PCR *colony* y el producto de amplificación fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (fig.11).

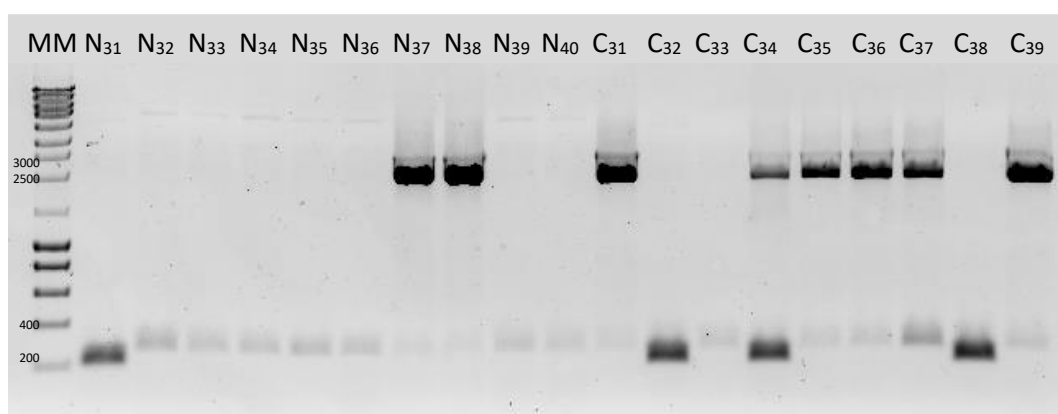


Figura 11. Segunda etapa de la PCR *colony* para comprobar que colonias de las cepas *E. coli* BL21 C43 (DE3) portaban la secuencia de interés. MM representa el marcador de peso molecular. Las letras N y C hacen referencia a la ubicación del tag de histidinas en la secuencia aminoacídica. Los subíndices señalan el número asociado a cada colonia.

De las 19 las colonias testadas mediante PCR *colony* se encontraron 3 colonias con el plásmido vacío, 8 probables colonias satélite, 6 colonias con el plásmido recombinante y 2 colonias mixtas que parecen portar tanto el plásmido recombinante y como plásmido sin inserto. De las colonias con resultado positivo, se seleccionaron a las colonias N37, N38, C31 y C39 para la producción de rFrpA_{ang} por obtener mejores resultados cualitativos en cuanto a intensidad de banda con un tamaño compatible con el del plásmido recombinante.

Ensayo de producción de rFrpA_{ang}

Para buscar las condiciones más óptimas de cara a la producción de rFrpA_{ang} se desarrolló un ensayo. Para ello se prepararon 5 mL de cultivo en medios LB y TB de las 4 cepas

seleccionadas previamente (N37, N38, C31 y C39), se incubaron a 37 °C o a 25 °C y mediante un espectrofotómetro se monitorizó la OD₆₀₀ de cada cultivo hasta que alcanzó valores de entre 0,4 y 0,6. En ese momento se indujo la expresión con IPTG 1 mM. Tras 3 horas de cultivo en el caso de los cultivos a 37 °C y 16 horas en el caso de los cultivos a 25 °C, se centrifugaron a 6000 g durante 10 minutos a 4 °C. Los sedimentos se resuspendieron en buffer de lisis y se sonicaron.

A partir del sobrenadante se realizó una SDS-PAGE, una electrotransferencia y un análisis mediante western blot (fig.12). Finalmente, el ensayo dio como resultado que los mayores niveles de producción suceden a 25 °C y en medio TB. Por otro lado, no se observaron diferencias de producción entre los diseños de la proteína con el *tag* de histidinas en N-terminal o en C-terminal.

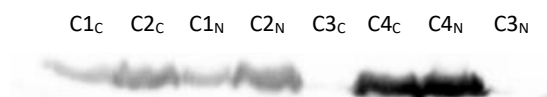


Figura 12. Western blot resultado del ensayo de expresión de rfrpA_{ang}. C1 representa ensayo en medio LB a 37 °C durante 3 h. C2 Representa ensayo en medio LB a 25 °C durante 16h. C3 representa ensayo en medio TB a 37°C durante 3 h. C4 representa ensayo en medio TB a 25 °C durante 16 h. Los subíndices N y C representan la ubicación del tag de histidinas en la secuencia aminoacídica.

Producción de rFrpA_{ang} en *E. coli* Bl21 C43 (DE3) y aislamiento de las proteínas de la membrana externa

Para ello se inocularon 4 L de medio TB (suplementado con ampicilina) con 400 ml de cultivo saturado, se dejaron crecer a 25 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6 y posteriormente se indujo con IPTG hasta 1 mM. El cultivo se mantuvo bajo dichas condiciones durante 16 horas, tras lo cual fue centrifugado, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento.

A continuación, se incubó durante en una disolución tamponada que contenía lisozima, ADNasa e inhibidor de proteasas. La lisozima busca debilitar la pared celular, la ADNasa busca hidrolizar el DNA y los inhibidores de proteasas buscan evitar la degradación por las propias enzimas bacterianas. Posteriormente, se lisaron mecánicamente las bacterias y se centrifugaron. Tras la etapa anterior se aisló el sobrenadante al que se le adicionó lauril

sarcosinato de sodio al 2% para solubilizar las membranas internas (Valderrama, 2016; Martínez-Matamoros, 2018). Luego se centrifugó y el sedimento generado, en el cual se encontraban las membranas externas, fue resuspendido en una disolución tamponada con Elugent al 5%, una mezcla glucósidos de alquilo apropiada para solubilizar las proteínas de membrana (Valderrama, 2016; Martínez-Matamoros, 2018).

De cada una de las fases distintas etapas del aislamiento se tomaron alícuotas y se analizaron mediante SDS-PAGE (fig.13) para seguir el rendimiento de las distintas etapas de aislamiento. Finalmente, la disolución con Elugent al 5 % se centrifugó y el sobrenadante obtenido se empleó a para la fase de purificación.

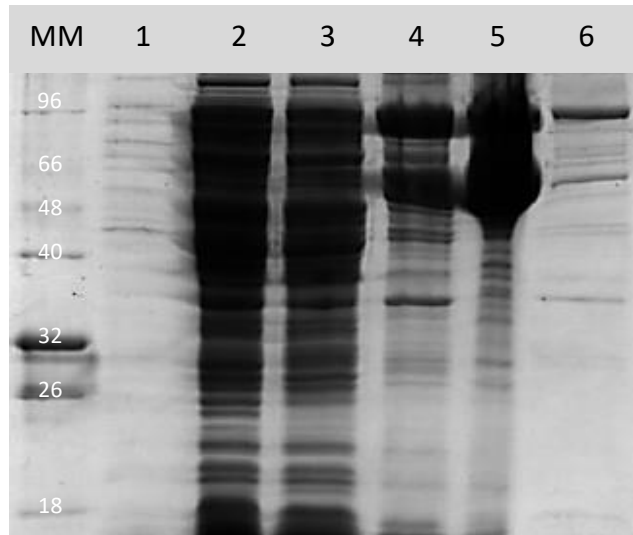


Figura 13. SDS-PAGE de las distintas etapas del aislamiento de *rFrpA_{ang}*. 1 Preinducción. 2 lisado. 3 Fracción soluble en Sarkosyl al 2%. 4 Fracción insoluble en Sarkosyl al 2%. 5 Fracción insoluble en Elugent al 5%. 6 Fracción soluble en Elugent al 5%.

Purificación de *rFrpA_{ang}*

El sobrenadante con las proteínas de membrana externa solubilizadas en Elugent se purificó mediante FPLC con una columna de níquel de 1 mL para tratar de retener *rFrpA_{ang}* mediante su *tag* de hisdinas. Las fracciones eluídas fueron analizadas por SDS PAGE (fig.14) mostrando una serie de bandas con tamaños próximos a los 66 kDa que se corresponden con el tamaño de la proteína de interés (69,7 kDa).

Posteriormente se seleccionaron las fracciones que dieron mayor intensidad de banda de interés en la SDS-PAGE y se pasaron por un filtro de 30 kDa para retirar impurezas de pesos moleculares inferiores y concentrar la proteína. Finalmente, tras calcular los coeficientes de extinción molar de *FrpA_{ang}* se midió la concentración mediante espectrofotometría a 280 nm, dando como resultados 0,975 mg de proteína total a partir de 4 L de cultivo en TB a 25 °C.

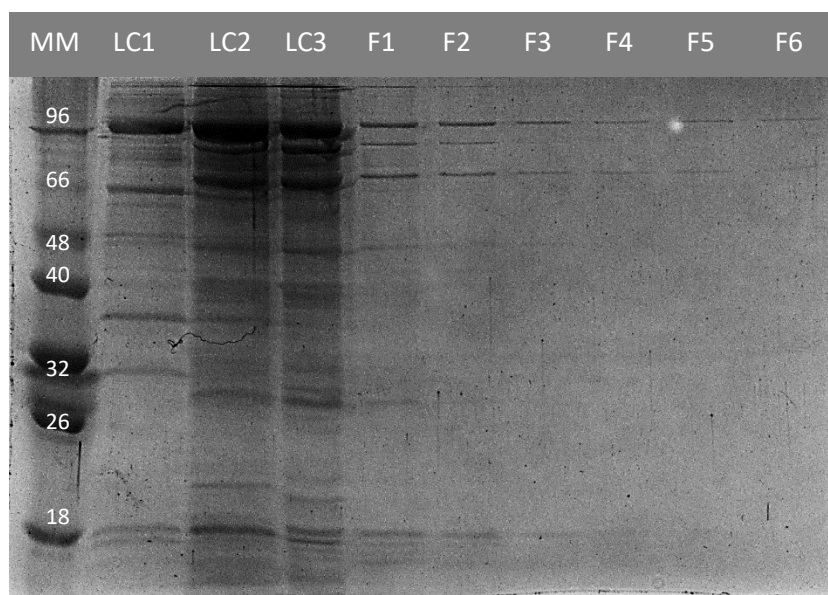


Figura 14. SDS-PAGE representando la purificación de las proteínas de membrana externa solubilizadas en Elugent. MM representa el marcador de peso molecular en KDa. LC1, LC2 y LC3 representan las 3 etapas de lavado de la columna previas a la elución, cuyas fracciones se representan de F1 a F6.

Discusión

En un contexto de aumento de la población global (según Naciones Unidas, 2018), las reservas pesqueras son desde hace décadas insuficientes para cubrir la demanda de productos marinos (FAO, 2018). Sin embargo, del mismo modo que la ganadería reemplazó a la caza en la mayoría de las sociedades humanas, la acuicultura parece más destinada al reemplazamiento de la pesca que a servir de mero complemento productivo. Por otro lado, la presión que la pesca está ejerciendo sobre el medio marino unido a la inestabilidad provocada por los efectos del cambio climático (Gattuso et al., 2015) ha activado numerosas señales de alarma en las últimas décadas acerca de la sostenibilidad de la pesca (Brander, 2007).

En este contexto la acuicultura ha aumentado su producción de forma constante desde sus inicios hasta suponer en la actualidad el 53 % de la producción dedicada a alimentación (FAO, 2018). Sin embargo, el propio cambio climático, favoreciendo el desplazamiento de patógenos a nuevos entornos, unido a la prevalencia del monocultivo (Santos et al., 2018; Park et al., 2018), conduce a un aumento en el empleo de antibióticos (Santos et al., 2018). Bajo estas circunstancias el aumento de las resistencias microbianas puede poner en serias dificultades gran parte de la producción acuícola actual (Santos et al., 2018). Por todo ello,

se buscan otros planteamientos terapéuticos como son el uso de probióticos, prebióticos o el desarrollo de programas de vacunación (Assefa et al., 2018; Santos et al., 2018)

El trabajo actual se enmarca dentro de este último planteamiento. Para ello es necesario la selección inicial de los antígenos adecuados. En este caso se seleccionó a un nuevo receptor de sideróforos predicho en *Vibrio anguillarum*. La correspondencia entre la secuencia y su función como receptor ha sido sugerida en base a comparaciones *in silico* entre el sistema de la piscibactina encontrado previamente en *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* y el genoma de *V. anguillarum* (Balado et al., 2018; Thode et al., 2018) (fig. 15).

Esta proteína pertenece a la familia de receptores dependientes de tonB y generalmente su secuencia se encuentra al lado de los genes que codifican las proteínas biosíntesis del sideróforo al que se unen (Thode et al., 2018). Estas proteínas de membrana externa se caracterizan por una conformación estructural de tipo barril- β (Koebnik et al., 2000).

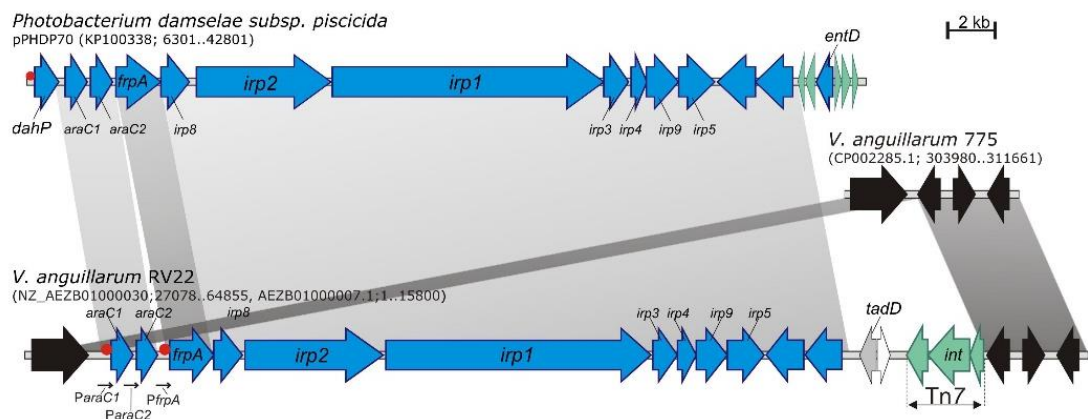


Figura 15. Predicción del sistema de la piscibactina en *Vibrio anguillarum* RV22 a partir de la comparación de su genoma con la región codificante para el sistema de la piscibactina presente en *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* (Balado et al., 2018).

El sistema de sideróforos del que parece formar parte el receptor bautizado como FrpA_{ang} se considera un importante factor de virulencia en base ensayos realizados *in vivo* (Balado et al., 2018). En ellos se comprobó como las cepas que solo presentaban activo el sistema de sideróforos de la piscibactina ($\Delta vabF$) hacían caer los niveles de supervivencia a niveles similares a los de la cepa WT de *Vibrio anguillarum* RV22, cepa caracterizada por su alta virulencia (Pazos et al., 1993). Por este motivo el desarrollo de una vacuna recombinante a partir de un receptor de membrana presente en cepas altamente virulentas supone una

interesante estrategia (Assefa et al., 2018). Las vacunas recombinantes se basan en la selección de uno o varios antígenos cuyos genes codificantes son clonados y expresados generalmente en microorganismos destinados a la producción de cantidades de proteína gracias al empleo de vectores de expresión (Dadar et al., 2017).

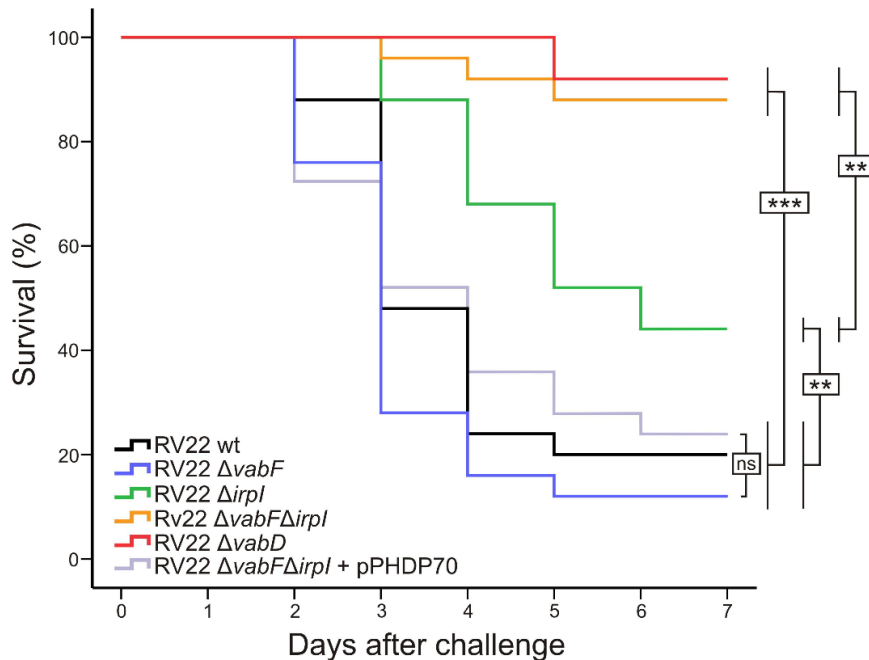


Figura 16. Porcentaje de supervivencia a los 7 días tras la inoculación de $2-4 \times 10^4$ UFC/pez de bacterias de la cepa salvaje *V. anguillarum* RV22 y de los mutantes para los distintos sistemas de sideróforos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las cepas: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, si no se encontraron diferencias significativas entre las entre cepas (Balado et al., 2018).

Como preámbulo al desarrollo de la estrategia anterior (Dadar et al., 2017), son necesarias una serie de etapas previas que culminan con la purificación de la proteína de interés. Para ello inicialmente se realizó el clonaje del gen *frpA_{ang}* al que se le incorporó una secuencia codificante para un *tag* de histinas (Loughran et al., 2011) de cara a facilitar una futura etapa de purificación. Ya que el vector empleado (pET20b(+)) ya contiene un tag en el sitio de policlonaje, una secuencia codificante de histinas que iría en la zona C-terminal, la secuencia codificante para las histidinas solo se añadió al gen para proporcionar otro *tag* de purificación en el N-terminal y de este modo poder analizar la influencia de la localización del *tag* sobre la producción y purificación de la proteína. El plásmido recombinante además porta la secuencia de exportación periplásmica *pelB* (Sletta et al., 2007), lo que facilita la inserción de la proteína en la membrana externa y por tanto su purificación. El vector destaca además la capacidad para una elevada expresión que tiene el promotor T7

(Morra et al., 2017). La RNA polimerasa T7 necesaria es codificada por las cepas de expresión seleccionadas: *E.coli* B121 (DE3) y BL21 C43 (DE3), bacterias especialmente adaptadas para la producción de proteínas de membrana (Morra et al., 2017).

A pesar de la realización de varios ensayos de transformación no se observó el crecimiento de ninguna colonia de la cepa *E.coli* B121 (DE3). Se barajó la posibilidad de que se tratara de una pérdida de competencia. Sin embargo, tras preparar nuevas células competentes se obtuvo el mismo resultado. Por lo tanto, se propone que a pesar de que las bacterias fueron transformadas, los bajos niveles de transcripción basal de la *rFrpA_{ang}* presentes fueron suficientes para el desarrollo de toxicidad (Morra et al., 2017). La situación fue diferente en el caso de la cepa *E.coli* B121 C43 (DE3) ya que se consiguieron hasta 6 colonias correctamente transformadas con el plásmido recombinante

A continuación, tras seleccionar las mejores condiciones, se procedió con la expresión, el aislamiento de las proteínas de membrana externa, y finalmente con la purificación mediante IMAC. Para ello teniendo en cuenta que las evidencias apuntan hacia una estructura de tipo barril- β (Koebnik et al., 2000; Valderrama 2016; Morra et al., 2017) se empleó una estrategia de purificación que ya había dado buenos resultados con otras proteínas de membrana de estructura y masa molecular similar como son los receptores FstC de *Aeromonas salmonicida* (71,6 KDa), FvtA de la propia *V. anguillarum* (77,2 KDa) y con FrpA de *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* (71,6 KDa) (Valderrama, 2016; Martínez-Matamoros, 2018).

De esta forma se purificaron los extractos de proteína de membrana externa disueltos previamente en Elugent, un detergente no iónico formado por glucósidos de alquilo que destaca por su buen rendimiento y su biodegradabilidad (Von Rybinski et al., 1998). Esta característica permitiría su presencia en bajos niveles en los inyectables generados para un futuro ensayo de vacunación.

Los rendimientos obtenidos a partir de 4 L de cultivo en medio TB a 25 °C y 16 horas de expresión se generaron rendimientos de 0,975 mg de proteína. Lo que se correspondería con un promedio de 0,24 mg/L. Este nivel de producción entra dentro de los rendimientos esperados para este tipo de proteínas (Valderrama, 2016; Martínez-Matamoros, 2018).

Sin embargo, existen una serie de factores que se podrían ensayar para mejorar el rendimiento como podrían ser la concentración de inductor, la adición de una mayor concentración de glicerol o la variación en los niveles de oxígeno (Morra et al., 2017).

Finalmente cabe destacar que a pesar de que las evidencias, como el tamaño de las bandas, la purificación o la secuenciación de ADN apuntan hacia que la proteína aislada se corresponde con rFrpA_{ang} se están realizando en la actualidad análisis de huella peptídica mediante espectrometría de masas acoplada a MALDI-TOF (Valderrama, 2016; Martínez-Matamoros, 2018).

Conclusiones

- Se clonó el gen *frpA_{ang}* de *Vibrio anguillarum* RV22 en el plásmido pET20b(+).
- Se logró la transformación de 4 cepas *E. coli* Top10 con el plásmido recombinante.
- Se obtuvieron 4 cepas *E. coli* B121 (DE3) C43 con el plásmido recombinante.
- Se ha logrado producir una proteína compatible con rFrpA_{ang}.
- Se ha realizado la purificación de la proteína rFrpA_{ang} mediante IMAC alcanzando rendimientos de 0,24 mg por L de cultivo.
- Se espera identificar definitivamente a FrpA_{ang} mediante huella peptídica.

Bibliografía

1. La Acuicultura en España 2018. [Internet] Cádiz: Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR); 2019 [acceso 6 de enero de 2019]. Disponible en: <http://www.apromar.es/content/informes-anales>.
2. Assefa, A., & Abunna, F. (2018). Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Veterinary Medicine International*. 2018: 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
3. Baker-Austin, C., Trinanés, J. A., Taylor, N. G. H., Hartnell, R., Siitonen, A., & Martínez-Urtaza, J. (2013). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change*. 3(1): 73–77. <https://doi.org/10.1038/nclimate1628>
4. Balado, M., Lages, M. A., Fuentes-Monteverde, J. C., Martínez-Matamoros, D., Rodríguez, J., Jiménez, C., & Lemos, M. L. (2018). The siderophore piscibactin is a relevant virulence factor for *vibrio anguillarum* favored at low temperatures. *Frontiers in Microbiology*. 9(AUG): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01766>
5. Brander, K. M. (2007). Global fish production and climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(50): 19709 -19714. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702059104>.
6. Castillo, D., Alvisé, P. D., Xu, R., Zhang, F., Middelboe, M., & Gram, L. (2017). Comparative Genome Analyses of *Vibrio anguillarum* Strains Reveal a Link with Pathogenicity Traits. *MSystems*. 2(1): 1-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00001-17>.
7. Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J. & Jin, Q. (2016.) VFDB 2016: Hierarchical and refined dataset for big data analysis - 10 years on. *Nucleic Acids Research*, 44(D1): pp.694-697.

8. Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., Rekha, K., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., & Joshi, S. K. (2017). Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*. 25(3): 184–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1261277>
9. Eurostats. Aquaculture statistics - Statistics Explained. [Internet] Luxemburgo: Oficina de estadística de la Unión Europea; 2019 [Acceso 7 de enero de 2019]. Disponible en: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Aquaculture_statistics
10. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. [Internet] Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO); 2018 [acceso 11 enero 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/es/>
11. Gattuso, J. P., Magnan, A., Billé, R., Cheung, W. W. L., Howes, E. L., Joos, F., Allemand, D., Bopp, L., Cooley, S. R., Eakin, C. M., Hoegh-Guldberg, O., Kelly, R. P., Pörtner, H.-O., Rogers, A. D., Baxter, J. M., Laffoley, D., Osborn, D., Rankovic, A., Rochette, J., Sumaila, U. R. Treyer, S., Turley, C. (2015). Contrasting futures for ocean and society from different anthropogenic CO2 emissions scenarios. *Science*. 349(6243): aac4722-1- aac4722-10 <https://doi.org/10.1126/science.aac4722>
12. Haenen, O. L. M., Fouz, B., Amaro, C., Isern, M. M., Mikkelsen, H., Zrncic., S, Travers, M. A., Renault, T, Wardle, Hellström R. y Dalsgaard, I. (2014). Vibriosis in aquaculture. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*. 34(4): 138–148.
13. Huang, X., & Miller, W. (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics*. 12(3): 337–357. [https://doi.org/10.1016/0196-8858\(91\)90017-D](https://doi.org/10.1016/0196-8858(91)90017-D)
14. Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Fathin-Amirah, M., Mohd, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., y Zamri-Saad, M. (2018). Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*. <https://doi.org/10.1002/aah.10045>
15. Koebnik, R., Locher, K. and Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*. 37(2): 239-253.
16. Lemos, M. L. & Osorio, C. R. (2010). Iron Uptake in *Vibrio* and *Aeromonas*. In: Cornelis, P. & Andrews, S.C. (Eds). *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, pp. 117-141.
17. Li, Y., & Ma, Q. (2017). Iron Acquisition Strategies of *Vibrio anguillarum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7(July): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00342>
18. Loughran S.T., Walls D. (2011) Purification of Poly-Histidine-Tagged Proteins. In: Walls D., Loughran S. (Eds). *Protein Chromatography. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Dublín: Humana Press, pp. 275-304.
19. [Mapa.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/produccion-de-acuicultura/default.aspx](http://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/produccion-de-acuicultura/default.aspx), Datos de producción de acuicultura [Internet]. Madrid: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca; 2019 [acceso 16 de enero de 2019] Disponible en: https://www.mapa.gob.es/app/jacumar/datos_produccion/datos_produccion.aspx
20. Martínez-Matamoros, D. Chemical study of marine bacteria: Isolation of bioactive marine natural products, recombinant siderophore receptor proteins from aquaculture fish pathogen bacteria and preparation of siderophore-magnetic nanoparticles conjugates. Universidad de A Coruña; 2018.
21. Morra R., Young K., Casas-Mao D., Dixon N., Bird L.E. (2017) Optimization of Membrane Protein Production Using Titratable Strains of *E. coli*. In: Burgess-Brown N. (eds) *Heterologous Gene Expression in E.coli. Methods in Molecular Biology*, vol 1586. New York: Humana Press, pp. 83-107.
22. Park, M., Shin, S. K., Do, Y. H., Yarish, C., & Kim, J. K. (2018). Application of open water integrated multi-trophic aquaculture to intensive monoculture: A review of the current status and challenges in Korea. *Aquaculture*. 497(July): 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.051>
23. Payne, S. M., Mey, A. R., & Wyckoff, E. E. (2016). *Vibrio* Iron Transport: Evolutionary Adaptation to Life in Multiple Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(1): 69–90. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-15>
24. Pazos, F., Santos, Y., Magarinos, B., Bandin, I., Nunez, S., & Toranzo, A. E. (1993). Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum*-related organisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(9): 2969–2976.
25. Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., & Balcázar, J. L. (2018). Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends in Microbiology*. 26(11): 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>

26. Peterson, J.W. (1996.) Bacterial Pathogenesis. In: Baron S. (Eds). Medical Microbiology, 4th ed. [Internet] University of Texas Medical Branch at Galveston. [Acceso 19 de febrero 2019]. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413346>>.
27. Rønneseth, A., Castillo, D., D'Alvise, P., Tønnesen, Ø., Haugland, G., Grotkjær, T., Engell-Sørensen, K., Nørremark, L., Bergh, Ø., Wergeland, H. I. & Gram, L. (2017), Comparative assessment of *Vibrio* virulence in marine fish larvae. *Journal of Fish Diseases*. 40: 1373-1385. doi:[10.1111/jfd.12612](https://doi.org/10.1111/jfd.12612)
28. Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 5(APR): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
29. Santos, L., & Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 52(2): 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>
30. Schaible, U.E. & Kaufmann, S.H.E. (2004). Iron and microbial infection. *Nature Reviews Microbiology*. 2(12): 946-953.
31. Sletta, H., Tøndervik, A., Hakvåg, S., Vee Aune, T. E., Nedal, A., Aune, R., Evensen, G., Valla, S., Ellingsen, T. E. y Brautaset, T. (2007). The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(3): 906–912. <https://doi.org/10.1128/AEM.01804-06>
32. Stentiford, G. D., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., Williams, B. A. P., Withyachumnarnkul, B., Itsathitphaisarn, O., & Bass, D. (2017). New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis. *PLoS Pathogens*: 13(2): 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>.
33. Thode, S. K., Rojek, E., Kozłowski, M., Ahmad, R., & Haugen, P. (2018). Distribution of siderophore gene systems on a *Vibrionaceae* phylogeny: Database searches, phylogenetic analyses and evolutionary perspectives. *PLoS ONE*. 13(2): 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191860>
34. Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*. 246(1–4): 37–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002>
35. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. *World Urbanization Prospects: The 2018 Revision, Methodology*. New York: United Nations;1994. Working Paper No. ESA/P/WP.252.
36. Valderrama Pereira, A. K. Estudio de los sideróforos y de las proteínas receptoras producidas por las bacterias patógenas de peces: *Photobacterium damsela* subsp. piscicida y *Aeromonas salmonicida* subsp. salmonicida. Universidad de A Coruña; 2016.
37. Von Rybinski, W., & Hill, K. (1998). Alkyl polyglycosides - Properties and applications of a new class of surfactants. *Angewandte Chemie - International Edition*. 37(10): 1328–1345. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980605\)37:10<1328::AID-ANIE1328>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980605)37:10<1328::AID-ANIE1328>3.0.CO;2-9)
38. Woolhouse, M., & Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 11(12): 1842-1847. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1112.050997>.