

Asimilación de hierro mediante sideróforos en patógenos bacterianos de peces

Manuel L. Lemos

 manuel.lemos@usc.es

Dpto. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología e Instituto de Acuicultura. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela

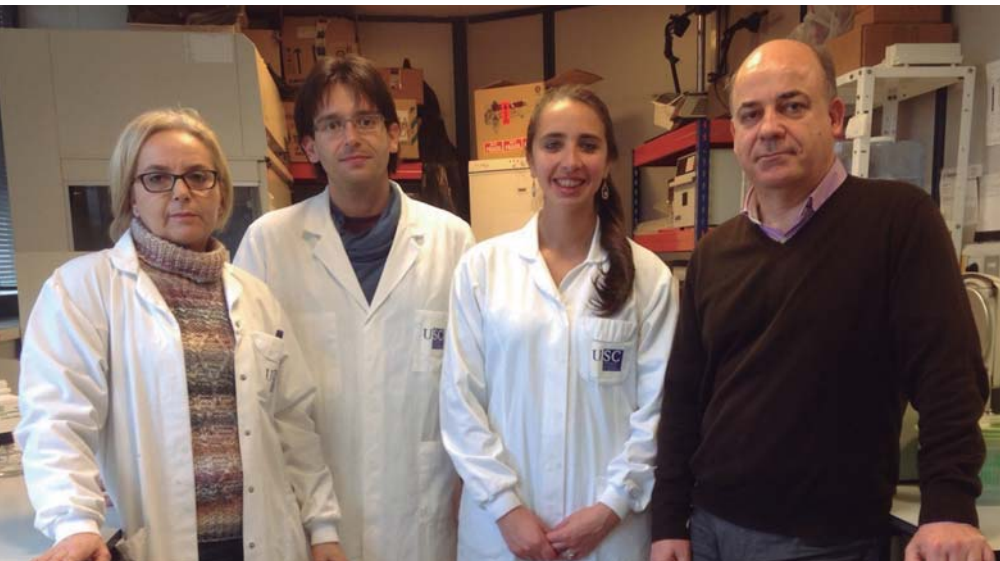


Foto de grupo.

Algunos miembros y colaboradores del grupo. De izquierda a derecha Soledad Núñez, Miguel Balado, Pamela Ruiz y Manuel Lemos.

La adquisición de hierro es un proceso indispensable para todas las bacterias, ya que es un elemento fundamental en el metabolismo celular. Sin embargo, a pesar de la concentración micromolar requerida para el crecimiento celular, el hierro es un compuesto biológicamente limitante debido a su baja solubilidad (10^{-18} M) en los ambientes aerobios y de pH neutro. Por esta razón los seres vivos han desarrollado complejos mecanismos para la asimilación de este elemento fundamental. Uno de los más importantes en las bacterias es la biosíntesis de agentes quelatantes, denominados sideróforos. Estos compuestos de bajo peso molecular (300-2.000 Da) son secretados al medio circundante donde quelatan muy eficazmente al Fe^{3+} . Los microorganismos adquieren luego el complejo Fe^{3+} -sideróforo mediante un transporte activo específico a través de receptores de la pared, situados en la membrana externa en las bacterias Gram-negativas. Existen cientos

de sideróforos distintos producidos por bacterias y hongos, pero se pueden agrupar por su estructura química en catecoles, hidroxamatos y alfa-hidroxicarboxilatos.

Está demostrado que la producción de sideróforos es un factor de virulencia clave para que una bacteria potencialmente patógena pueda desarrollar el proceso infeccioso. Las bacterias que causan infecciones en los peces en cultivo no son una excepción y nuestro grupo, en estrecha colaboración con el grupo del Prof. Carlos Jiménez del Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña, ha contribuido a esclarecer algunos de estos mecanismos de asimilación de hierro en diferentes patógenos de peces, desgranando la genética y bioquímica de estos sistemas, así como determinando la estructura química de los sideróforos sintetizados (Fig. 1) (Soengas *et al*, 2006; Souto *et al*, 2012; Balado *et al* 2015).

Vibrio anguillarum es uno de los principales agentes causales de vibriosis en peces. Sus aislados se clasifican según el antígeno O en 23 serotipos diferentes, siendo los aislados de los serotipo O1, O2 y, en menor medida, O3 los causantes de los brotes infecciosos. En esta especie se han descrito dos sistemas de sideróforos diferentes: el de la anguibactina, presente únicamente en las cepas virulentas del serotipo O1 que portan el plásmido pJM1, y el de la vancrobactina (Fig. 1), codificado en el cromosoma y que se cree que es el sideróforo primigenio de esta especie (Lemos *et al*, 2010) y que ha sido caracterizado por nosotros. El sideróforo vancrobactina está codificado por el clúster de genes *vab*, donde *vabABCDEFGG* participan en los procesos de síntesis, mientras que *fvtA* codifica el receptor de la ferri-vancrobactina FvtA (Balado *et al*, 2006; 2008; 2009). En contraposición con la gran variedad serológica de los aislados, se ha comprobado que las

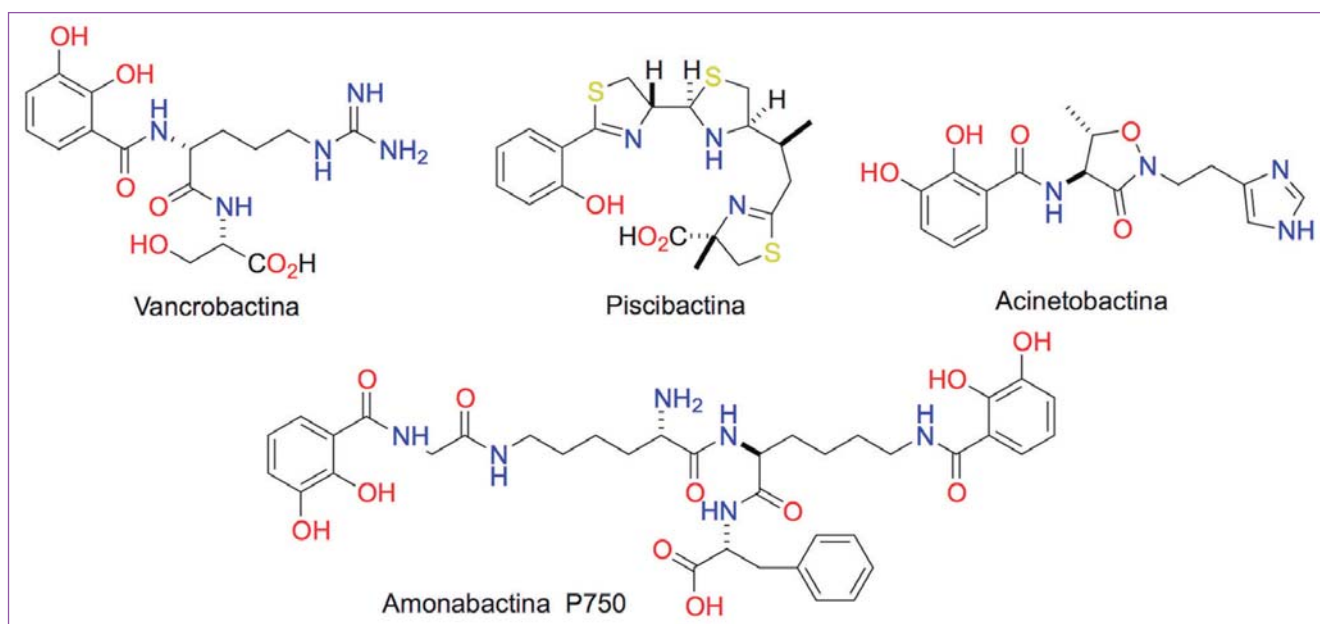


Figura 1.

Estructuras de los sideróforos aislados e identificados por nuestro grupo en *Vibrio anguillarum* (vancrobactina), *Photobacterium damsela subsp piscicida* (piscibactina) y *Aeromonas salmonicida subsp salmonicida* (acinetobactina y amonabactina) (J. Rodríguez).

cepas de los serotipos O1, O2, y O3, producen o no vancrobactina, expresan el receptor FvtA (Balado *et al*, 2009). El aislamiento de este sideróforo a partir de sobrenadantes nos permitió determinar su estructura química y proponer una metodología exitosa de síntesis química en laboratorio (Soengas *et al*, 2006). También se diseñaron análogos estructurales capaces de interactuar con el receptor FvtA que, en un futuro, podrían ser utilizados para el diseño de nuevos agentes terapéuticos (Soengas *et al*, 2008; Balado *et al*, 2009).

Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida es el agente causal de la forunculosis, una enfermedad devastadora que afecta de modo recurrente principalmente a salmón y rodaballo de cultivo causando importantes pérdidas económicas. Aunque se conoce desde hace décadas que los aislados de *A. salmonicida* producen al menos un sideróforo de tipo catecol, es en trabajos realizados por nuestro grupo donde se demostró que *A. salmonicida* produce simultáneamente acinetobactina y 4 formas diferentes de amonabactina (Fig. 1), dos sideróforos previamente descritos en *Acinetobacter baumannii* y *Aeromonas hydrophila*, respectivamente. Hay que destacar que ambos sideróforos son de tipo catecol y que su producción depende de la síntesis del ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA), codificada

por los genes *entABCDE*. Una vez sintetizado el DHBA (que es el grupo de unión al hierro) los genes *asbDF* codifican la síntesis de acinetobactina y los genes *amoGH* codifican las amonabactinas. Aunque ambos sistemas de sideróforos están presentes en todas las cepas analizadas, ciertas cepas portan una mutación en el gen *amoG* que inactiva la síntesis de amonabactina. Sorprendentemente todos los aislados estudiados procedentes de rodaballo portan esta mutación inactivante, sin embargo, son capaces de utilizar amonabactina como fuente de hierro pues mantienen intactos los componentes para su transporte. En contraposición, todas las cepas aisladas de salmón producen y utilizan acinetobactina y amonabactina simultáneamente (Balado *et al*, 2015). Si este hecho tiene algún significado biológico en la selección de hospedadores es todavía una incógnita por resolver.

Photobacterium damsela es un miembro de la familia *Vibrionaceae* que está dividido en dos subespecies: *damsela* y *piscicida*. Ambos son patógenos marinos pero causan enfermedades muy diferentes y afectan a hospedadores muy distintos. La subsp *damsela* causa una forma de vibriosis en una amplia variedad de especies marinas, y es incluso un patógeno oportunista para el hombre. Por

el contrario la subsp *piscicida* infecta únicamente a varias especies de peces, pero tiene una gran repercusión al afectar a especies de alto interés comercial como dorada, lubina o lenguado. Nuestro grupo ha descrito y caracterizado el sideróforo piscibactina en *P. damsela subsp. piscicida* (Osorio *et al*, 2006; Souto *et al*, 2012). Dicho sistema está codificado en el plásmido pPHDP70, que es movilizable por conjugación y porta todos los determinantes necesarios para la síntesis y utilización de la piscibactina (Fig. 2) (Osorio *et al*, 2015). Mediante ensayos de mutagénesis hemos demostrado que la síntesis de este sideróforo es un factor de virulencia clave para la subsp *piscicida*. Este plásmido puede ser transmitido y expresado en otras especies como *Vibrio alginolyticus*, lo que demuestra su posible expansión por transferencia horizontal. En la subsp *damsela* hemos podido demostrar la producción del sideróforo vibrioferrina, ya descrito en otros vibrios como *V. parahaemolyticus* o *V. alginolyticus*, pero únicamente es producido por algunas cepas, por lo que el sistema utilizado por el resto de cepas permanece aún desconocido.

En los últimos años se ha evidenciado que un mismo sistema de sideróforos puede estar presente en varias especies bacterianas distintas, y que una misma bacteria puede pro-

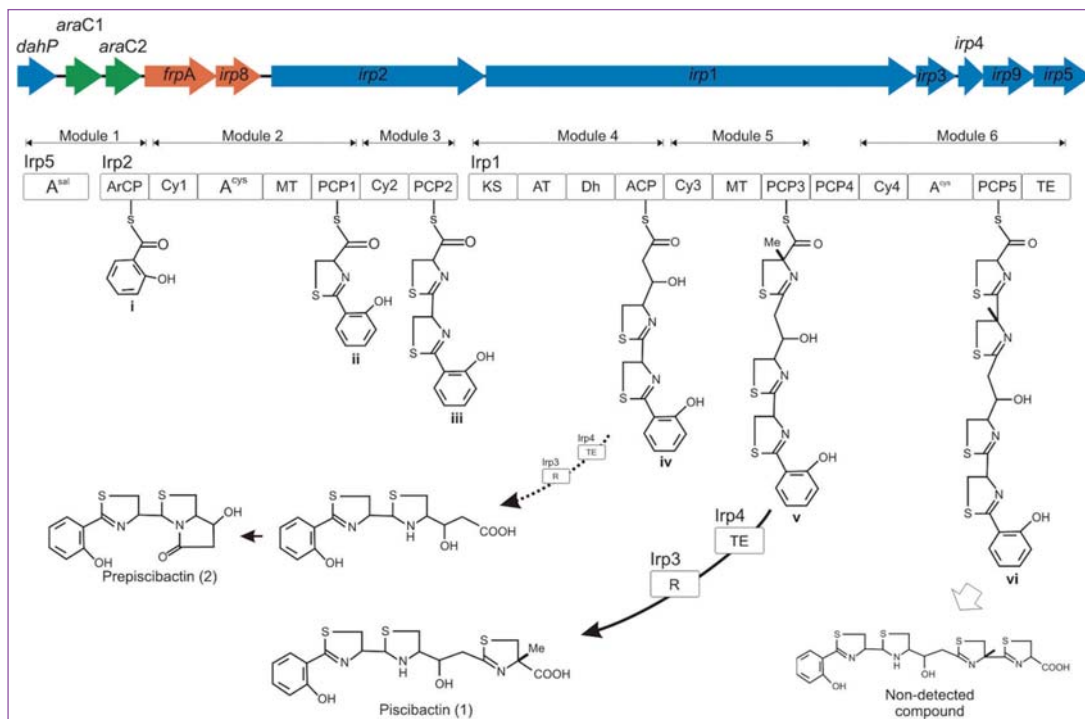


Figura 2. Mapa genético y ruta bioquímica de síntesis del sideróforo piscibactina mediante enzimas multimodulares de tipo NRPS en *P. damsela* subsp. *piscicida* (Souto et al, Eur J Org Chem, 2012).

ducir más de un sideróforo. Así, ciertas cepas virulentas de *V. anguillarum* tienen insertado en el cromosoma II los genes de síntesis de la piscibactina (identificado en *P. damsela* subsp. *piscicida*), así como un homólogo de su receptor FrpA. Por otra parte, se ha detectado la producción de mono- di- y tri-vancrobactina en aislados ambientales de *V. campbellii* (Sandy et al, 2010). Además, nosotros hemos demostrado que el gen *fvfA*, que codifica el receptor de vancrobactina, está presente en todas las cepas de *V. anguillarum* (Balado et al, 2009). Asimismo, una búsqueda detallada en el *GenBank* de los genes que codifican el sistema de la vancrobactina, demuestra que estos genes o homólogos cercanos, están presentes en otros *Vibrios* como *V. metschnikovii*, *V. harveyi* o *V. ordalii*. Por tanto, el sistema de la vancrobactina está presente en todas las cepas de *V. anguillarum* pero también en otros *vibrios* patógenos. Asimismo, resultados recientes de nuestro grupo demuestran la producción de piscibactina por cepas virulentas de *V. ordalii*, especie responsable de la vibriosis atípica en salmones que, en países Latinoamericanos como Chile, causa grandes pérdidas económicas (Ruiz et al, 2016).

Por tanto, parece claro que los sistemas de síntesis de sideróforos están extendidos por todas las bacterias patógenas de peces y que

algunos de ellos son compartidos por especies muy diversas, lo que avala su papel clave en el desarrollo de los procesos infecciosos. En este sentido, uno de los intereses actuales y futuros de nuestro grupo es aprovechar la ubicuidad e importancia de estos sistemas para el desarrollo de nuevos métodos de prevención y control de las enfermedades infecciosas en acuicultura.

BIBLIOGRAFÍA

Balado M, Osorio CR y Lemos ML. (2006). A gene cluster involved in the biosynthesis of vanchrobactin, a chromosome-encoded siderophore produced by *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* 152: 3517-28.

Balado M, Osorio CR y Lemos ML. (2008). Biosynthetic and regulatory elements involved in the production of the siderophore vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* 154: 1400-13.

Balado M, Osorio CR y Lemos ML. (2009). FvfA is the Receptor for the Siderophore Vanchrobactin in *Vibrio anguillarum*: Utility as a Route of Entry for Vanchrobactin Analogues. *Appl Environ Microbiol* 75: 2775-83.

Balado M, Souto A, Vences A, Careaga VP, Valderrama K, Segade Y, Rodríguez J, Osorio CR, Jiménez C y Lemos ML. (2015). Two catechol siderophores, acinetobactin and amonabactin, are simultaneously produced by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* sharing part of the biosynthetic pathway. *ACS Chem Biol* 10: 2850-60.

Lemos ML, Balado M y Osorio CR. (2010). Anguibactin- versus vanchrobactin-mediated iron uptake in *Vibrio anguillarum*: evolution and ecology of a fish pathogen. *Environ Microbiol Rep* 2: 19-26.

Osorio CR, Juiz-Rio S y Lemos ML. (2006). A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Microbiology* 152: 3327-41.

Osorio CR, Rivas AJ, Balado M, Fuentes-Monte-Verde JC, Rodríguez J, Jiménez C, Lemos ML y Waldor MK. (2015). A transmissible plasmid-borne pathogenicity island confers piscibactin biosynthesis in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Appl Environ Microbiol* 81: 5867-79.

Ruiz P, Balado M, Toranzo AE, Poblete-Morales M, Lemos ML y Avendaño-Herrera R. (2016). Iron assimilation and siderophore production by *Vibrio ordalii* strains isolated from diseased Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. *Dis Aquat Org* 118: 217-26.

Sandy M, Han A, Blunt J, Munro M, Haygood M y Butler A. (2010). Vanchrobactin and anguibactin siderophores produced by *Vibrio* sp. DS40M4. *J Nat Prod.* 73:1038-43.

Soengas RG, Anta C, Espada A, Paz V, Ares IR, Balado M, Rodríguez J, Lemos ML y Jiménez C. (2006). Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Tetrahedron Lett* 47: 7113-6.

Soengas RG, Larrosa M, Balado M, Rodríguez J, Lemos ML y Jiménez C. (2008). Synthesis and biological activity of analogs of vanchrobactin, a siderophore from the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Org Biomol Chem* 6: 1278-87.

Souto A, Montaos MA, Rivas AJ, Balado M, Osorio CR, Rodríguez J, Lemos ML y Jiménez C. (2012). Structure and Biosynthetic Assembly of Piscibactin, a Siderophore from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Predicted from Genome Analysis. *Eur J Org Chem* 2012: 5693-700.