

Sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*

María Luisa del Río, Jesús Navas Méndez, José Ignacio Rodríguez-Barbosa,
César B. Gutiérrez-Martín y Elías F. Rodríguez Ferri

Unidad de Microbiología e Inmunología. Facultad de Veterinaria. Universidad de León, León.
E-mail: dsamdg@unileon.es

Haemophilus parasuis es un microorganismo Gram negativo, de la familia *Pasteurellaceae*, cuyo hospedador natural es el cerdo. Produce la enfermedad de Glässer, que ha sido diagnosticada prácticamente en todo el mundo y representa en la actualidad uno de los principales problemas emergentes del ganado porcino. Esta enfermedad se manifiesta de forma esporádica, asociada al estrés (en relación con traslados y cambios en el manejo) y en animales jóvenes, especialmente a los tres primeros meses de vida. La prevalencia de esta enfermedad se ha incrementado durante los últimos años de forma espectacular, y generalmente se ha diagnosticado asociada al síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS).

Morfológicamente *H. parasuis* se presenta como pequeños bacilos o cocobacilos Gram negativos, pleomórficos, que en ocasiones presentan filamentos superficiales semejantes a fimbrias que se pierden después del subcultivo (Figuras 1A-1B). Es dependiente del factor V de coagulación de la sangre (nicotinamida adenina dinucleótido, NAD) (Figuras 1C-1D). *H. parasuis* posee actividad catalasa y oxidasa débil, pero carece de actividad ureasa. Produce ácido a partir de glucosa, manosa, maltosa y sacarosa, pero no a partir de xilosa, manitol, ramnosa, arabinosa o lactosa. No es hemolítico ni produce efecto CAMP.

La virulencia de los microorganismos patógenos, es decir, su capacidad para producir morbilidad y mortalidad, es un proceso complejo, multifactorial, que requiere la acción coordinada de muchos genes. En el caso de *H. parasuis* se desconocen muchos aspectos relativos a la virulencia. Hasta la fecha no se ha descrito la producción de toxinas, al contrario de lo que sucede con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, una especie próxima, aunque si se ha señalado la presencia de una neuraminidasa y el LPS, que se relaciona con la producción de trombosis y coagulación intravascular diseminada. Un firme candidato como factor de virulencia, lo representan los sistemas de captación de hierro.

El hierro es el elemento más abundante de los metales de transición en los eucariotas y representa un factor esencial para la supervivencia de los microorganismos. En condiciones fisiológicas, en presencia de oxígeno y a pH neutro, el hierro

disponible es muy escaso, del orden de 10-12 μM , siendo necesarias concentraciones de 0,05-0,5 μM para el crecimiento y multiplicación de las bacterias. Debido a la rápida oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} y a la formación de radicales insolubles, este elemento se convierte en el componente principal de la reacción de Haber-Weiss-Fenton, catalizando la formación de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno. Puesto que el hierro, en combinación con el oxígeno, media la generación de estos aniones tóxicos, los microorganismos han desarrollado un mecanismo que regula los niveles de hierro para lo que se requiere, por una parte, un sistema para detectar la concentración citoplasmática de hierro, y un sistema efector (regulador) que controle la homeostasis. Normalmente, ambas funciones dependen de una proteína denominada Fur (*ferric uptake regulator*) que funciona como represora del sistema de captación de hierro, mediante la unión al ADN e inhibición de la accesibilidad de la ARN polimerasa a los promotores, cuando la concentración de hierro es suficiente; sin embargo cuando la concentración de hierro intracelular es escasa, la proteína Fur pierde su capacidad para unirse al ADN y se produce la transcripción de los

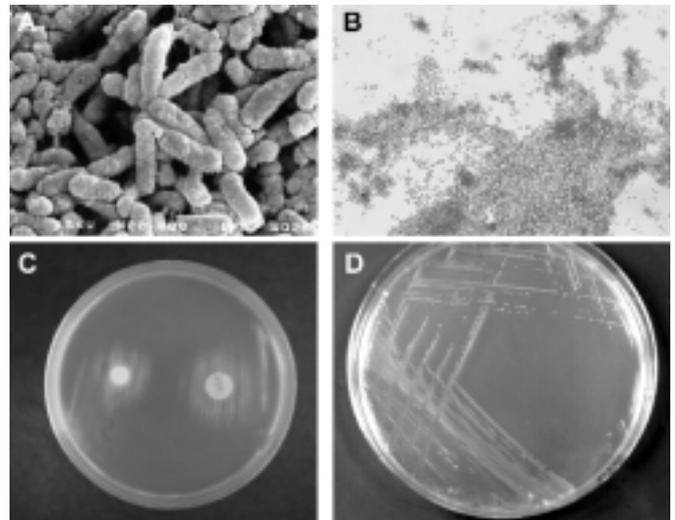


Figura 1. *H. parasuis*. A) Fotografía al microscopio electrónico ($\times 20.000$). B) Fotografía al microscopio óptico ($\times 100$) de la tinción de Gram. C) Crecimiento NAD-dependiente. D) Colonias sobre medio PPLO enriquecido con NAD.

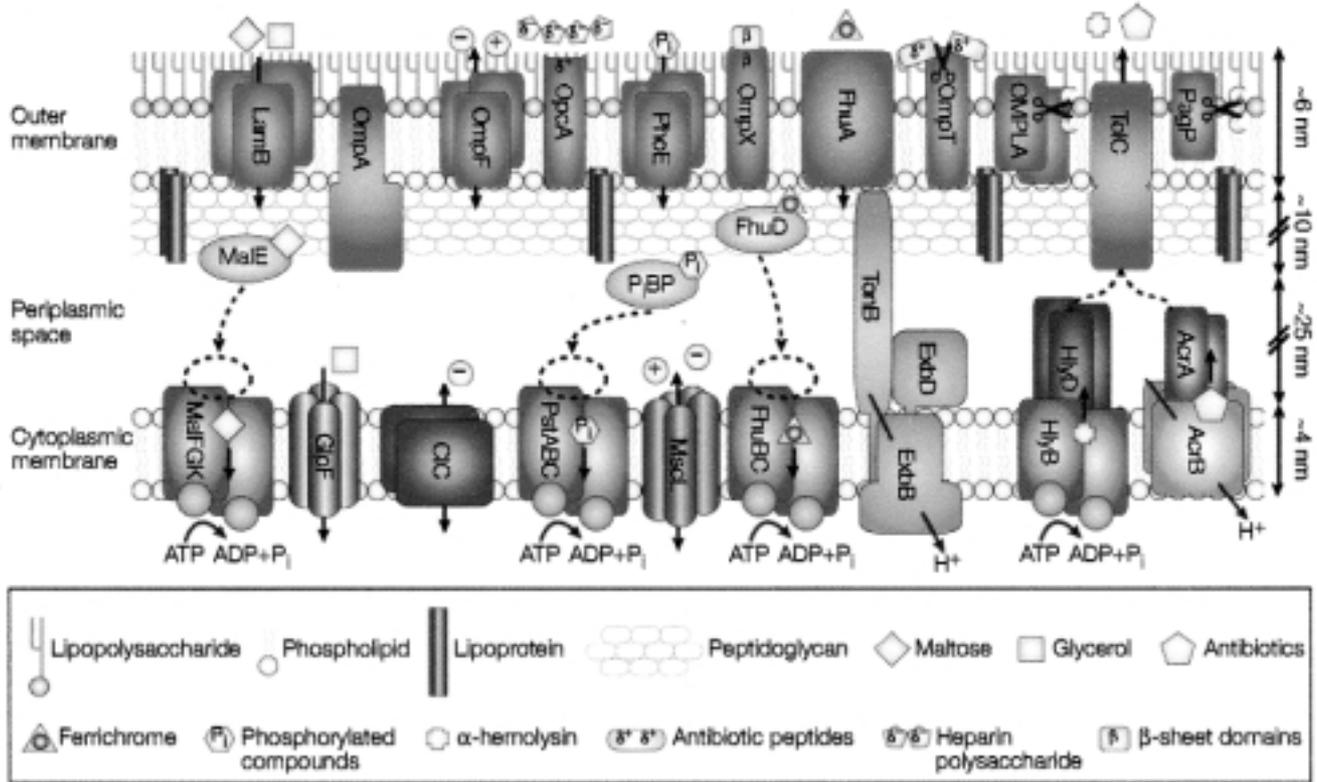


Figura 3. Esquema que muestra las funciones biológicas de las proteínas de membrana externa de bacterias Gram-negativas (3).

matos (ferricromo), que utilizan ácidos hidroxámicos y los α -hidroxicarboxilatos representados por el citrato férrico.

El transporte, a través de la membrana externa, de nutrientes presentes en baja concentración y que son demasiado grandes para difundir a través de las porinas, debe llevarse a cabo mediante moléculas transportadoras de alta eficiencia, que interactúan con varias proteínas situadas en el periplasma y en la membrana citoplasmática. Así, los sideróforos cargados con hierro, como por ejemplo el ferricromo, son importados a través del receptor de membrana externo FhuA, unidos a la proteína de unión periplasmática FhuD, e internalizados al citoplasma mediante las proteínas FhuB y FhuC. En la Figura 3 se presenta un esquema general en el que se integran, en las bacterias Gram negativas, las proteínas mencionadas (3).

La proteína FhuA fue identificada en primer lugar como receptor de ferricromo. Más tarde se comprobó que actuaba también como receptor para los fagos T5, ϕ 80, T1 y UC-1, para la colicina M y algunos antibióticos como la albomicina (análogo estructural del ferricromo) y rifamicina CGP 4832.

La comparación de secuencias correspondientes al extremo N-terminal de tres proteínas conocidas de membrana externa de *A. pleuropneumo-*

niae (TbpA, FhuA y HgbA), que intervienen en la captación de hierro procedente de la transferrina, ferricromo y hemoglobina, respectivamente, reveló que existe una secuencia consenso en los tres genes compuesta de seis residuos de aminoácidos (TbpA, EQAVQLNDVYVTG; FhuA, QETAVLDEVS VS; HgbA QEQMQLDTVIVKD). Esta región consenso podría funcionar como sitio de interacción física (TonB box) entre algunas proteínas de membrana externa y la proteína TonB, que aporta la fuerza protón motriz necesaria para internalizar el hierro desde la membrana externa a la membrana citoplasmática.

La proteína FhuD es la responsable del transporte de ferricromo desde el receptor de membrana externa (FhuA) a la proteína FhuB que se encuentra localizada en la membrana citoplasmática. Ésta última, junto con la proteína FhuC son proteínas de membrana citoplasmática componentes de un sistema transportador ABC dependiente de energía que internalizan el hierro al interior del citoplasma.

En *H. parasuis* se ha detectado mediante PCR la presencia de los genes que intervienen en la captación de hierro mediada por proteínas de unión a sideróforos de tipo hidroxamato que forman parte de la región *fhu*. Los cuatro genes se disponen de forma consecutiva en el cromosoma

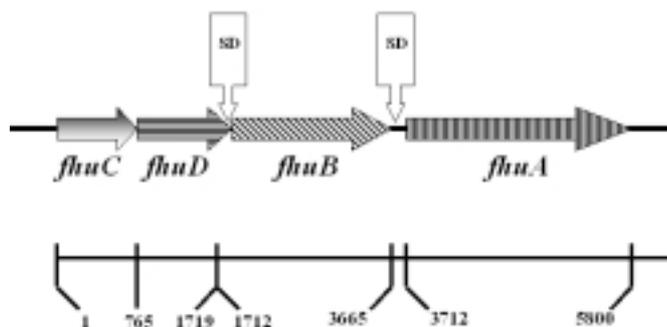


Figura 4. Disposición de la región *fhuC-fhuD-fhuB-fhuA* en *H. parasuis*, con el tamaño de cada uno de los genes. SD, secuencia de Shine-Dalgarno.

bacteriano (Figura 4), con idéntica localización a la descrita en otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* (*A. pleuropneumoniae*). El gen que se sitúa en primer lugar es el *fhuC*, seguido por los genes *fhuD*, *fhuB* y *fhuA*. La región tiene un tamaño de 5.800 pares de bases (pb) y a lo largo de esta secuencia no se ha encontrado ninguna secuencia consenso de promotores, ni tampoco ninguna caja Fur (4,5).

La regulación de la expresión del receptor de membrana externo FhuA no está condicionada por la concentración de hierro existente en el medio de cultivo, como hemos podido demostrar mediante la utilización de anticuerpos policlonales generados frente a la proteína FhuA de *A. pleuropneumoniae*, con la que reacciona cruzadamente. La regulación de la expresión de FhuA coincide con lo descrito en *A. pleuropneumoniae*, sin embargo en otras especies como *Escherichia coli* o *Campylobacter jejuni*, la expresión de FhuA está regulada positivamente en función de la concentración de hierro presente en el medio de cultivo.

María Luisa del Río González

Es Licenciada en Veterinaria por la Universidad de León, donde también se doctoró en 2004. Ha sido becaria predoctoral en la Facultad de Veterinaria y es actualmente becaria posdoctoral en el Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca" de Murcia. Ha realizado estancias en el Dpt. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y en el *Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen* de Hannover (Alemania), habiendo obtenido para esta última una beca FEMS para científicos jóvenes. Su actividad investigadora se ha centrado en los patógenos porcinos, fundamentalmente *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*.



Ello puede ser debido, por una parte, a la ausencia de una caja Fur en la región *fhu* de *H. parasuis* y *A. pleuropneumoniae*, que sí está presente en las regiones *fhu* de *E. coli* y *C. jejuni*. Por otra, a que la disposición de los genes en estas especies es diferente, ya que en *E. coli* y *C. jejuni*, FhuA se dispone al inicio de la región (*fhuACDB*), mientras que en *H. parasuis* y *A. pleuropneumoniae* la disposición es al final de la misma (*fhuCDBA*). Por tanto, se necesita conocer más a fondo la región que precede al inicio del codón de iniciación del gen *fhuC* de *H. parasuis* y *A. pleuropneumoniae*, para la búsqueda de la región promotora en estas dos especies.

Sistemas de captación de hierro independientes de sideróforos en *H. parasuis*. Proteínas de unión a transferrina

Los miembros de las familias *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae* son capaces de obtener hierro a partir de la **transferrina** y, en algunos casos, de la **lactoferrina**. En este caso, y contrariamente a lo que sucede con la captación de hierro mediada por sideróforos, la captación de hierro se produce sin la internalización de la transferrina.

La transferrina es una glucoproteína de aproximadamente 80 kDa que transporta hierro a los tejidos. Cada uno de los extremos amino y carboxilo se pueden dividir en dos dominios que flanquean un sitio de unión para una molécula de hierro y un anión bicarbonato. Cada molécula de transferrina puede unir, por tanto, dos iones de hierro de forma reversible. La síntesis de la transferrina tiene lugar fundamentalmente en el hígado y su expresión ha sido detectada también en tejidos extrahepáticos, incluyendo los linfocitos T, el cerebro y células de Sertoli. La concentración de transferrina en el suero es de aproximadamente 25 M, estando saturada de hierro solamente un 30%.

El receptor de transferrina está formado por dos proteínas localizadas en la membrana externa, denominadas Tbps (*transferrin binding proteins*), que se identificaron por primera vez en *N. meningitidis*. La mayor de ellas posee un peso molecular aproximado de 100 kDa y se denomina TbpA (antes denominada Tbp1 o TfbB), mientras que la menor presenta un peso molecular de 60 a 85 kDa y se denomina TbpB (antes denominada Tbp2 o TfbA).

La proteína TbpA es una proteína integral de membrana, TonB dependiente, que funciona como un canal a través del cual pasa la transferrina al espacio periplásmico. Una de las regiones que se

extiende hacia la membrana externa, contiene diez residuos de aminoácidos altamente conservados, de secuencia GAINIEIYEN, que se encuentran tanto en las proteínas TbpAs de *A. pleuropneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, como en las proteínas LbpAs de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Esta región conservada podría facilitar el paso de hierro libre a través del canal de la TbpA.

La proteína TbpB presenta un tamaño más variable, incluso dentro de la misma especie, aunque en todas, las variantes son más pequeñas que la TbpA, de aproximadamente 70 kDa. Se trata de una lipoproteína, ya que posee una secuencia señal delimitada por un sitio de reconocimiento para la peptidasa II, cerca del extremo N-terminal. Se localiza expuesta en la superficie de la bacteria, siendo posible la presencia de dominios transmembrana que le permitirían extenderse hacia la membrana externa. A diferencia de la TbpA discrimina entre la forma cargada y no cargada de hierro de la transferrina, presentando una elevada especificidad por la holotransferrina.

En *A. pleuropneumoniae* se ha demostrado que para que tenga lugar la internalización del hierro desde la membrana externa al interior del citoplasma se necesita que el sistema de transducción de energía TonB-ExbB-ExbD proporcione el ATP necesario. Con este fin, el ATP generado en la membrana citoplasmática, es transferido a los receptores TonB dependientes en la membrana externa a través del gradiente de protones proporcionado por las proteínas ExbB y ExbD. La caja TonB asimismo es necesaria para la adquisición de energía del receptor.

Se ha demostrado anteriormente que *H. parasuis* es capaz de unir transferrina porcina pero no bovina (2). En nuestro laboratorio hemos demostrado mediante PCR la presencia de los genes *tonB*, *exbB*, *exbD*, *tbpB* y *tbpA* en todos los serotipos de *H. parasuis*, comprobando que todos ellos presentan el mismo tamaño al descrito en *A. pleuropneumoniae*, y que estos tres genes se disponen de forma consecutiva en el cromosoma bacteriano (4,5) (Figura 5). En primer lugar se localiza el gen *tonB* seguido, en este orden, por los genes *exbB*, *exbD*, *tbpB* y *tbpA*. En *P. multocida*, *M. haemolytica* y *H. influenzae*, sin embargo, la disposición de los genes es diferente, puesto que el gen que se localiza en primer lugar es el *exbB*, seguido por los genes *exbD* y *tonB*. La localización de los genes *tbpB* y *tbpA* a continuación del gen *exbD* en *H. parasuis*, solamente se ha observado en el caso de *A. pleuropneumoniae* y *Actinobacillus suis*. En *Neisseria* spp., donde se han clonado los genes *exbBD*, no se ha visto que estén localizados ante-

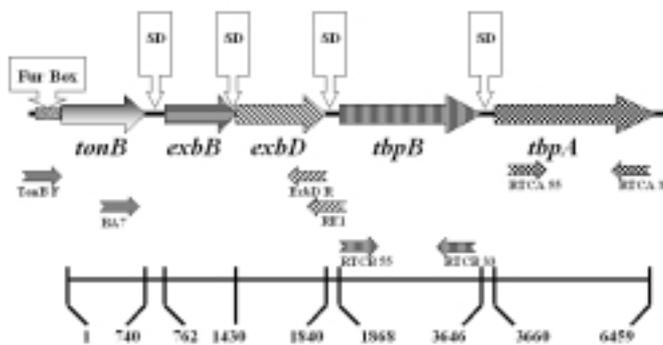


Figura 5. Disposición de la región *tonB-exbB-exbD-tbpB-tbpA* en *H. parasuis*, con el tamaño de cada uno de los genes. Fur Box, caja Fur, SD, secuencia de Shine-Dalgarno.

riormente a los genes *tbpB* y *tbpA* ni tampoco parece que estén organizados de ese modo en *H. influenzae* ni en *Mannheimia haemolytica*, ya que la secuencia anterior al gen *tbpB* no presenta ningún grado de homología con la secuencia correspondiente a los genes *exbBD* de *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* y *A. suis*. La aparición en *H. parasuis* de los cinco genes en la misma región, con un posible promotor localizado, únicamente, antes del inicio de transcripción del gen *tonB* y no entre los genes *tonB-exbB*, *exbB-exbD*, *exbD-tbpB* y *tbpB-tbpA*, coincide también con lo descrito en *A. pleuropneumoniae* y en *A. suis*. En relación con este hecho, la localización de una única secuencia consenso de promotores antes del codón de iniciación del gen *tonB*, unida a la ausencia de cualquier otra a lo largo de las 7 kb de longitud de la región *tonB*, aún después de comprobar las secuencias consenso de promotores descritas para *A. pleuropneumoniae*, podría indicar que en este microorganismo estos genes se encuentran regulados posiblemente bajo el control de un único promotor. Este posible promotor, localizado antes del inicio de transcripción del gen *tonB* en *H. parasuis*, presenta una gran homología tanto en la región consenso -10 como en la -35, con respecto a las secuencias consenso de promotores descritas para *A. pleuropneumoniae*.

Al inicio de la secuencia de la región *tonB* de *H. parasuis* se localizó una única caja Fur (*ferric uptake repressor*), situada antes del codón de iniciación del gen *tonB*. Por tanto, podría postularse que la regulación de los genes que se encuentran en la región *tonB* de *H. parasuis*, precedidos por una caja Fur al comienzo de la misma, estaría controlada por la proteína Fur. Finalmente, las secuencias de iniciación de la traducción (Shine Dalgarno) que preceden a los cinco genes que forman parte de la región *tonB* de *H. parasuis* y la ausencia de promotores específicos de cada gen son

indicios de que los cinco genes forman parte de un operón, como sucede en *A. pleuropneumoniae* (6).

No se han descrito hasta la fecha las proteínas que transportan el hierro desde la membrana externa a las proteínas citoplasmáticas encargadas de la liberación del mismo al citoplasma.

Hasta la fecha, el hierro es el único componente con influencia demostrada en la expresión de las proteínas que forman parte del receptor de transferrina. De este modo la captación de hierro mediada por proteínas de unión a transferrina en *H. parasuis* está regulada positivamente en función de la concentración de hierro presente en el medio de cultivo. Así, las proteínas ExbB, TbpA y TbpB aumentan su nivel de expresión en medios carentes de hierro, mientras que cuando la concentración de hierro es suficiente en el medio de cultivo existe una expresión basal de las mismas. La proteína Fur inhibe la transcripción de los genes que están implicados en el proceso de captación de hierro en condiciones de hierro suficientes en el medio de cultivo, y desempeña la función contraria, cuando el hierro está ausente.

La obtención de mutantes delecionados en un gen particular o en aquellos en los que se ha suprimido su función por inactivación, nos ayuda a conocer su función en la bacteria y por extensión, su participación en la patogénesis de las enfermedades. Con dicho propósito se están ensayando la utilización de mutantes en los genes descritos anteriormente que intervienen en la captación de hierro mediante proteínas de unión a transferrina y a sideróforos en *H. parasuis*. En *A. pleuropneumoniae* se han obtenido y caracterizado mutantes deficientes en los genes *tbp* (1), demostrándose que las proteínas TbpA y TbpB son factores de virulencia en esta especie bacteriana. También en *A. pleuropneumoniae* se ha conseguido obtener mutantes de uno de los genes que intervienen en el aporte energético necesario para la internalización del hierro, el gen *exbB*. La pér-

didada de virulencia en el mutante *exbB*⁻, se debe a la imposibilidad por parte de la bacteria de utilizar transferrina porcina (6).

En cualquier caso debe señalarse, que la descripción en *H. parasuis* de sistemas de captación de hierro a partir de proteínas receptoras Tbp y sideróforos, no excluye la existencia de otras alternativas, como viene enseñando el estudio de modelos de Gram-negativos próximos, pues la trascendencia de este elemento en la biología de las bacterias obliga a éstas a desarrollar varias posibilidades. En *A. pleuropneumoniae*, por ejemplo, que dispone de toxinas Apx, se ha demostrado la capacidad para obtener hierro de la hemoglobina liberada por la acción hemolítica de las toxinas.

Bibliografía

1. Baltés N, Hennig-Pauka I, Gerlach GF (2002) Both transferrin binding proteins are virulence factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 infection. FEMS Microbiol Lett 209:283-7
2. Charland N, D'Silva CG, Dumont RA, Niven DF (1995) Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis*. Can J Microbiol 41:70-4
3. Faraldo-Gomez JD, Sansom MS (2003) Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. Nat Rev Mol Cell Biol 4:105-16
4. del Río González, ML (2004) Sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
5. del Río González, ML (2004) Proteínas de unión a transferrina y a sideróforos como sistemas de captación de hierro en *Haemophilus parasuis*. V Reunión del Grupo de Microbiología Molecular, Jaca
6. Tonpitak W, Thiede S, Oswald W, Baltés N, Gerlach GF (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport: a set of *exbBD* genes is transcriptionally linked to the *tbpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron. Infect Immun 68:1164-70