

## Diferencias en el perfil proteico de la mutante *fur* de *Gallibacterium anatis* 12656-12 en respuesta al estrés por hierro

Chantes Guerra A<sup>1</sup>., Vázquez Cruz C<sup>1</sup>., Sánchez Alonso M. P.G.<sup>1</sup>, Negrete Abascal E<sup>2</sup>., Vaca Pacheco S<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de ciencias, BUAP. Edificio 103 J C.U. San Manuel, Puebla Pue. CP 72570. <sup>2</sup>Carrera de Biología, FES Iztacala UNAM, Los Reyes Iztacala, Edo. de México. [albxguerra@yahoo.com.mx](mailto:albxguerra@yahoo.com.mx)

**Introducción.** *Gallibacterium anatis* 12656-12 es una bacteria Gram-negativa, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae* que afecta a aves, se encuentra en aves sanas, como biota normal, sin embargo también se ha encontrado como aislado único de lesiones en tracto respiratorio, aparato reproductivo, hígado, bazo, corazón etc., entre otras (1), provocando pérdidas económicas a la industria avícola. En *G. anatis*, se han descrito varios factores de virulencia, pero se desconocen los mecanismos de regulación molecular de ellos y las condiciones que determinan su expresión durante la infección. La proteína Fur (ferric uptake regulator), es un regulador transcripcional, que en condiciones de suficiencia de hierro reprime los genes que realizan la captación de hierro, lo mismo que a otros genes del metabolismo general o de virulencia; en tanto que permite su expresión en estado de estrés nutricional, por carencia de hierro, como ocurre durante el proceso infeccioso (2).

El objetivo de este trabajo es analizar las mutantes *fur* y *rrf2* de *G. anatis* 12656-12 con especial interés para determinar la importancia del regulador *fur* en los mecanismos de captación de hierro y de expresión de factores de virulencia.

**Métodos.** La mutante  $\Delta fur$  de *G. anatis* 12656-12, obtenida por Maldonado *et al.*, 2014, la mutante *rrf2* y la cepa silvestre, fueron cultivadas en medio infusión cerebro-corazón (BHI). Para eliminar restos de hierro el material de cristal fue tratado toda la noche con 0.5% de EDTA y lavado con agua desionizada. Para evaluar el efecto del hierro un precultivo de toda la noche fue diluido 1:100 e incubado a 37°C en agitación hasta

alcanzar la fase log media, se adiciono 0.35mM del agente quelante de hierro dipiridyl y se encubo 24 horas para obtener proteínas totales. El sobrenadante del cultivo fue precipitado toda la noche con 2 volúmenes de metanol y por centrifugación se recobraron las proteínas (12,000gX20 min. A 4°C) y se resuspendieron en 100µl de Tris-HCl 50mM pH 7.5. Negrete *et al.*, 2009.

**Resultados.** En geles de poliacrilamida-SDS al 10%, se observó una expresión diferencial en el perfil de proteínas totales de la mutante *fur* de *G. anatis* (de aprox. 65 y 140kDa), y algunos cambios en la expresión de proteínas secretadas, esto posiblemente a la ausencia de regulación por *fur*.

**Conclusiones.** La cepa mutante  $\Delta fur$  de *G. anatis* 12656-12, se comporta de manera similar a otras mutantes  $\Delta fur$  en miembros de la familia *pasteurellacea* y otros microorganismos, además se observó que al ser mutado el gen *fur*, hay cambios en la expresión de proteínas, indicando que este gen es funcional y que el hierro es un regulador en *G. anatis*.

### Agradecimiento.

PAPIIT IN222313 y PAPCA FESI, UNAM.

### References.

1. Bojesen AM., Torpdahl M., Christensen H., Olsen JE., Bisgaard M. (2003). Genetic diversity *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. *J Clin Microbiol.* 41:2737-40.
2. Troxell B. and Hosni MH. (2013). Transcriptional regulation by ferric uptake regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:1-13.
3. Kristensen BM., Sinha S., Boyce JD., Bojesen AM., Mell JC. and Redfield RJ. (1012). Natural transformation of *Gallibacterium anatis*. *Appl. Environ Microbiol* 78(14):4914-22.