

IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INTEGRALES DE MEMBRANA CONSIDERADAS FACTORES DE PATOGENICIDAD EN LA BACTERIA INTRACELULAR *Candidatus Hepatobacter penaei* MEDIANTE ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

IDENTIFICATION OF INTEGRAL MEMBRANE PROTEINS CONSIDERED AS PATHOGENICITY FACTORS IN THE INTRACELLULAR BACTERIUM *Candidatus Hepatobacter penaei* THROUGH BIOINFORMATIC ANALYSIS

Jesús Alberto Pérez-Acosta¹, Luis Rafael Martínez-Córdova¹, Teresa Gollas-Galván², José Ángel Huerta-Ocampo³, Luis Enrique Gutiérrez-Millán¹, Marco Antonio López-Torres¹, Juan Manuel Leyva², Marcel Martínez-Porchas^{2*}

¹ Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. Blvd Luis Donaldo Colosio entre Reforma y Sahuaripa, Hermosillo, Sonora. 83000, México

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a La Victoria Km 0.6. PO Box. 1735. Hermosillo, Sonora, 83000, México.

³ CONACYT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a La Victoria Km 0.6. Hermosillo, Sonora, 83304, México.

RESUMEN

Candidatus Hepatobacter penaei se clasifica como una bacteria intracelular, Gram negativa y pleomórfica. La enfermedad que causa en camarón de cultivo representa una importante amenaza para la actividad camaronícola, por lo que se requiere conocer su mecanismo de infección. El objetivo de este trabajo fue identificar mediante análisis bioinformático, las proteínas membranales de *Candidatus Hepatobacter penaei* homólogas de los factores de patogenicidad de organismos tipo rickettsia (OTR). Para ello se realizó la predicción de genes codificantes de proteínas, utilizando el servidor público GeneMark. Para la identificación de las proteínas integrales de membrana que son factores de patogenicidad en la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei*, se empleó el software Blast2GO. Los resultados obtenidos muestran 96 proteínas integrales de membrana, reconocidas en la literatura como factores de patogenicidad bacteriana, con valores promedio de identidad mayor de 90 %. La identificación de los componentes de virulencia de *Candidatus Hepatobacter penaei* representa información relevante para entender en profundidad su mecanismo de infección.

Palabras clave: *Candidatus Hepatobacter penaei*, proteína, patogenicidad, OTR, GeneMark, Blast2GO.

ABSTRACT

Candidatus Hepatobacter penaei is classified as an intracytoplasmic, Gram negative and pleomorphic bacterium. The disease caused in shrimp represents an important threat to the aquaculture activity, therefore knowing the infection mechanism of this bacterium is relevant. The aim of this work was to identify transmembrane proteins of *Candidatus Hepatobacter penaei* homologues of pathogenicity factors of rickettsial organisms (OTR) through bioinformatics analysis. We performed prediction of coding genes using

the GeneMark public server, and the identification of the integral membrane proteins considered as pathogenicity factors in *Candidatus Hepatobacter penaei* strain using the Blast2GO software. Results obtained showed 96 integral membrane proteins, recognized in the literature as bacterial pathogenicity factors, with average values of identity near to 100%. Identification of the virulence components of *Candidatus Hepatobacter penaei* represents relevant information to understand its infection mechanism in order to create a possible model of infection.

Keywords: *Candidatus Hepatobacter penaei*, protein, pathogenicity, OTR, GeneMark, Blast2GO.

INTRODUCCIÓN

La camaronicultura es una de las actividades más rentables de la acuicultura a nivel mundial; sin embargo, esta ha sido seriamente afectada por la presencia de diversas enfermedades, entre las que destaca la hepatopancreatitis necrotizante, causada por *Candidatus Hepatobacter penaei* (Nunan *et al.*, 2013).

Por su cercanía filogenética se puede catalogar a *Candidatus Hepatobacter penaei* como un organismo tipo rickettsia (OTR), debido a que presenta características endosimbióticas al desarrollarse y multiplicarse dentro de las células hepatopancreáticas E, R, F y B de camarón (Lightner, 1996). Los síntomas observables incluyen anorexia, letargia, atrofia muscular abdominal, exoesqueleto blando, disminución de la tasa de crecimiento e intestinos vacíos (Briñez, Aranguren y Salazar, 2003), observándose en diversas especies de crustáceos como el camarón colorado *Plesionika edwardsii*, la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*, camarón tigre *Penaeus monodon* y el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Gollas-Galván *et al.*, 2013).

*Autor para correspondencia: Marcel Martínez-Porchas
Correo electrónico: marcel@ciad.mx

Recibido: 26 de septiembre de 2017

Aceptado: 27 de marzo de 2018

La membrana de los OTR juega un rol medular en el proceso de invasión e infección al hospedero, ofreciendo una interfaz física entre los compartimentos subcelulares, así como entre la célula y su entorno, jugando un papel clave en la función celular y la supervivencia por confinar espacialmente los procesos bioquímicos y definir las fronteras celulares. Las proteínas integrales que se encuentran en la membrana, funcionan como importantes receptores, canales, transportadores y enzimas, responsables de la transducción de señales, los procesos reguladores, así como la adhesión celular y las interacciones célula-ambiente (Vit y Petrak, 2017).

En diversos OTR se han descrito proteínas integrales de membrana implicadas de manera importante en adhesión, invasión, e infección a células hospederas; por lo que poder evidenciar la presencia de estos factores de patogenicidad en *Candidatus Hepatobacter penaei* aislada en México representa una poderosa herramienta para inferir un modelo de infección hacia las células del hepatopancreas de *Litopenaeus vannamei*. No obstante, la información con la que se cuenta en relación a este tipo de proteínas es escasa, debido a las limitaciones que presenta la bacteria, como ser intracelular obligada, no cultivable fuera de un organismo vivo, no existir líneas celulares disponibles para su reproducción y no contar con un método para obtener una cantidad adecuada de proteínas de membrana para su estudio a gran escala. Lo anterior, ha imposibilitado hasta de momento llevar a cabo estudios de proteómica con el fin de identificar y/o cuantificar dichas proteínas en este patógeno; sin embargo, en nuestro laboratorio ha sido posible secuenciar y ensamblar su ADN genómico, con lo que es posible inferir el tipo de mecanismos con los que cuenta el patógeno, con base en la deducción de sus proteínas, particularmente aquellas reconocidas como factores de patogenicidad.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar un análisis bioinformático comparando las proteínas de membrana de OTR relacionadas con los mecanismos de patogenicidad, con los marcos de lectura abiertos (ORFs) detectados en el genoma de la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei* aislada en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis se realizaron usando la secuencia ensamblada *de novo* del genoma de la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei*, la cual fue previamente aislada por el grupo de trabajo en el Laboratorio de Biología Experimental, de CIAD, A.C, utilizando gradiente de percoll (Leyva *et al.*, 2018).

Predicción de genes codificantes de proteínas

Para la identificación de genes y deducción de proteínas, se utilizó el servidor público GeneMark (<http://opal.biology.gatech.edu/genemark/gmhmm.cgi>). La secuencia genómica se cargó en formato FASTA, siguiendo los lineamientos del servidor. Se utilizaron los parámetros de traducción para bacterias y arqueas, con la opción de salida de genes coordinados con proteínas traducidas, dando como

resultado la predicción de genes y posibles secuencias de proteínas.

Análisis de identidad y anotación funcional de las secuencias de aminoácidos deducidas

La identificación de las proteínas integrales de membrana que son factores de patogenicidad en la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei* aislada, se realizó con la ayuda del software Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005; disponible en www.blast2go.org), para la anotación de las proteínas predichas con la ayuda del servidor GeneMark se realizó el alineamiento local de las mismas contra la base de datos no redundante de proteínas del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) mediante la herramienta BLASTP (Herramienta de búsqueda de alineamientos locales de proteínas, por sus siglas en inglés, este programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local compara secuencias problema de proteína contra una gran cantidad de secuencias también de proteínas que se encuentren en una base de datos). Los parámetros empleados fueron los siguientes: Base de datos, nr; Número de hits, 30; Anotación del descriptor de Blast, permitido; Valor de expectativa de blast (E-value) 10^{-10} ; Filtro de taxonomía, ninguno (es decir se alineó contra todos los organismos de la base de datos); Programa de Blast, blastp.

La anotación funcional de los hits para proteínas de membrana reconocidos como factores de patogenicidad se realizó mediante el mapeo de los hits obtenidos de BLASTP contra la base de datos de Gene Ontology empleando la herramienta Blast2GO. Los parámetros de anotación fueron los siguientes: filtro de valor de expectativa (E-value) 10^{-25} ; punto de corte para la anotación, 55; y peso de gene ontology (GO weight), 5. Con base en los datos obtenidos se generaron los gráficos de función biológica para las proteínas reconocidas como factores de patogenicidad.

RESULTADOS

La identificación de los ORFs obtenidos a partir de la secuenciación del genoma de la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei* aislada por nuestro grupo de trabajo y el posterior alineamiento mediante BLASTP con el soporte del programa Blast2GO de las proteínas deducidas, arrojaron casi una centena de proteínas integrales de membrana reconocidas como factores de patogenicidad, cuyos datos de alineamiento contra las secuencias de proteínas de la base de datos no redundante del NCBI se resumen en la Tabla 1, en donde en todos los casos los mejores alineamientos correspondieron a proteínas de la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei* reportada por Wang y Wu (2014). También se observa que los valores de identidad, así como los de cobertura de secuencia promedio son muy cercanos al 100% los que, en conjunto con el bajo número de aminoácidos no idénticos entre las secuencias de aminoácidos de ambas cepas (menos de 3 en promedio para cada una de las 96 secuencias de proteína con una longitud promedio de cerca de 400 residuos de aminoácidos) y el hecho de que 26 de las

Tabla 1. Resumen de resultados del alineamiento BLASTP de las proteínas integrales de membrana reconocidas como factores de patogenicidad entre las secuencias deducidas del genoma de *Candidatus Hepatobacter penaei*.

Table 1. Summary results of BLASTP annealing of the 96 integral membrane proteins recognized as pathogenic factors among the protein sequences deduced from *Candidatus Hepatobacter penaei* genome.

Factores de patogenicidad	Porcentaje de Identidad*	Longitud de la secuencia consulta/problema*	No identidades*	Valor E*	Puntaje de Bit*	Cobertura de las secuencias consulta/problema*
96	99.19	377	2.86	4 ^{E-41}	759	99.30

*= Los valores representan la media obtenida a partir de los alineamientos (blastp) de las 96 secuencias de proteína identificadas como factores de patogenicidad tras un análisis en contra de la base de datos no redundante de proteínas del NCBI. En todos los casos los mejores alineamientos fueron con proteínas de la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei* reportada por Wang y Wu (2014).

96 proteínas reconocidas como factores de patogenicidad en la cepa asilada en México presenten alineamientos que arrojan una identidad y cobertura de secuencia del 100% con la cepa reportada por Wang y Wu, no deja lugar a dudas de que ambas son esencialmente el mismo organismo.

En la Tabla 2 se muestran la identidad y la anotación funcional obtenida con el software Blast2GO para las 96 proteínas integrales de membrana reconocidas en la literatura como factores de patogenicidad bacterianos y principalmente en OTR. En todos los casos los números de acceso de las proteínas con el mejor alineamiento corresponden a proteínas de la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei* reportada por Wang y Wu (2014). La Figura 1A muestra que tres cuartas partes de los factores de patogenicidad identificados, participan en funciones de transporte, así como movimiento y producción de ATP. La Figura 1B muestra que un poco más de la mitad de los factores de patogenicidad relacionados con el transporte transmembranal corresponde a transportadores ABC y transportadores de lípidos; mientras

que entre las proteínas cuya función está relacionada con el movimiento y la producción de ATP (Figura 1C), aquellas relacionadas con el cuerpo y el motor flagelar constituyen el grupo mayoritario entre este tipo de proteínas.

DISCUSIÓN

Proteínas relacionadas con la adherencia

Las proteínas de adhesión median la unión inicial de bacterias patógenas a sus respectivas células hospederas, con el subsiguiente proceso de infección (Nguyen *et al.*, 2016). En OTR este proceso lo realizan varias proteínas de membrana (Pérez-Acosta *et al.*, 2017); algunas de ellas han sido descritas en informes previos incluyendo a la proteína de membrana externa A (OmpA) también conocida como antígeno de superficie celular 0 (Sca0), el antígeno de superficie celular 1 (Sca1), el antígeno de superficie celular 2 (Sca2) y el antígeno de superficie celular 5 (Sca5) anteriormente conocido como OmpB, SpaP, SPA o p120 (Yang *et al.*, 2016). En el presente estudio se detectó una proteína de membrana

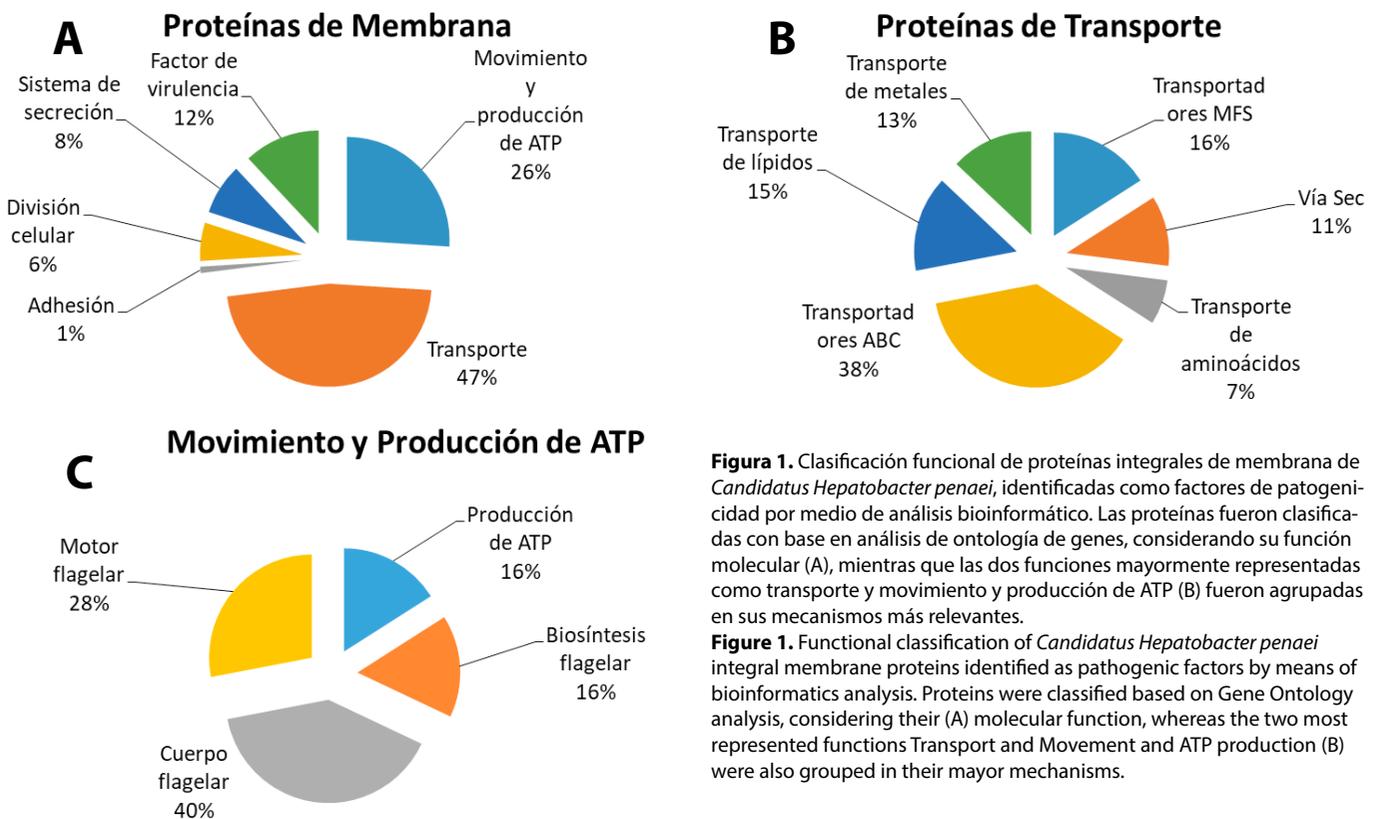


Figura 1. Clasificación funcional de proteínas integrales de membrana de *Candidatus Hepatobacter penaei*, identificadas como factores de patogenicidad por medio de análisis bioinformático. Las proteínas fueron clasificadas con base en análisis de ontología de genes, considerando su función molecular (A), mientras que las dos funciones mayormente representadas como transporte y movimiento y producción de ATP (B) fueron agrupadas en sus mecanismos más relevantes.

Figure 1. Functional classification of *Candidatus Hepatobacter penaei* integral membrane proteins identified as pathogenic factors by means of bioinformatics analysis. Proteins were classified based on Gene Ontology analysis, considering their (A) molecular function, whereas the two most represented functions Transport and Movement and ATP production (B) were also grouped in their mayor mechanisms.

idéntica a la reportada en *Candidatus Hepatobacter penaei* en la base de datos del NCBI, implicada en los sistemas de adhesión, llamada antígeno de superficie celular 0 (Sca0). La funcionalidad de este tipo de proteínas es medular para poder dar pie al proceso de invasión; a este respecto, Chan *et al.* (2009) inhibieron proteínas de membrana de células hospederas de *Rickettsia conorii* (Ku70, 6xHis, mAb, GST, cbl, caveolina-1) utilizando fármacos específicos, impidiendo la interacción de OmpB con éstas, afectando así el proceso de invasión.

Sistemas de secreción

Los sistemas de secreción se construyen inmediatamente después de producirse la interacción entre las adhesinas y los receptores de células hospederas. La función de los sistemas secretores es inyectar proteínas efectoras en el citosol de la célula hospedera, con el fin de apoderarse de su maquinaria celular (Condry y Nilles, 2016). En OTR se ha detectado el sistema de secreción tipo 4 el cual inyecta efectores como Sec7, LepA, LepB y patatinas en la célula diana, apoderándose de diversos mecanismos celulares (Wallden *et al.*, 2010).

En este trabajo se obtuvo evidencia de proteínas relacionadas con los sistemas de secreción (Tabla 2 y Figura 2). El Sistema de secreción tipo 1 (T1SS) participa en la secreción de proteínas del tipo I, como también, participa en el flujo de salida de moléculas más pequeñas (Thomas *et al.*, 2014). La proteína del sistema de secreción tipo IV / VI de la familia DotU, se une firmemente a lcmF, permaneciendo anclados a la membrana interna en un extremo y la capa de peptidoglicano en el otro (Marchler-Bauer *et al.*, 2017). La proteína que contiene el dominio T6SS_VipA y VipB forma parte del sistema de secreción patogénica tipo VI (Kapitein *et al.*, 2013). Las proteínas de secreción tipo II, transportan generalmente hidrolasas asociadas a virulencia, a través de la membrana externa de la célula bacteriana (Desvaux *et al.*, 2009). La proteína del sistema de secreción tipo II/IV se conoce como aportador proteínas de secreción (Peabody *et al.*, 2003). La proteína de biogénesis y competencia del pilus tipo IV, se requiere tanto para la estabilidad y función pilus, como para la adherencia a las células (Hospenthal *et al.*, 2017). La proteína VasE de secreción tipo de VI, es una familia de proteínas bacterianas que son esenciales para el sistema de secreción patogénica tipo VI (Basler *et al.*, 2012).

División celular

La división celular bacteriana es un proceso complicado, que se basa en un complejo multi-proteínico compuesto de un núcleo de proteínas ampliamente conservadas y generalmente esenciales, así como de proteínas accesorias que varían en número e identidad en diferentes bacterias. El montaje de este complejo y en particular, la iniciación de la constricción, es un proceso regulado que ha estado bajo intenso estudio (Osorio *et al.*, 2017).

Se identificaron seis proteínas implicadas en procesos de división celular (FtsA, FtsE, FtsH, FtsQ, FtsW y Fic). Por ejemplo, la proteína FtsA es esencial para la división celular

bacteriana, y co-localiza al anillo septal con FtsZ (Mura *et al.*, 2017). FtsE se localiza junto con FtsX en el sitio de división celular (Marchler-Bauer *et al.*, 2017). FtsH también conocida como HflB, es una proteína pleiotrópica necesaria para la correcta división celular en bacterias (Marchler-Bauer *et al.*, 2017). FtsW es esencial para la división celular y está implicada en la biosíntesis del peptidoglicano (Pastoret *et al.*, 2004). La proteína Fic está involucrada en un mecanismo regulador de la división celular a través del metabolismo del folato (Kokaska *et al.*, 2015).

Transportadores

Las proteínas de transporte bacterianas median el transporte pasivo y activo de pequeños solutos a través de membranas para el suministro de nutrientes externos y la eliminación de compuestos indeseables. Las secuencias de aminoácidos están altamente conservadas entre los transportadores bacterianos. Los sustratos que pueden ser transportados incluyen iones, aminoácidos, péptidos, azúcares y otras moléculas que son en su mayoría hidrofílicas (Goffeau *et al.*, 2013).

Los transportadores ABC son uno de los grupos de proteínas más grandes y omnipresentes, (Tian *et al.*, 2017), a menudo consisten en múltiples subunidades, una o dos de las cuales son proteínas transmembrana y ATPasas asociadas a la membrana (ter Beek *et al.*, 2014). En este trabajo se demostró la presencia de diecisiete transportadores ABC, entre los que se encuentran, principalmente, transportadores ABC de unión a ATP (Tabla 2 y Fig. 2).

Por otro lado, los transportadores de aminoácidos, son proteínas de transporte de membrana que trasladan aminoácidos, mediando la homeostasis, la activación y la diferenciación celular (Ren *et al.*, 2017), como la permeasa de aminoácidos, aminotransferasa dependiente de piridoxal fosfato y el transportador de la familia EamA / RhaT detectados en este estudio (Tabla 2). También se encontraron siete proteínas transportadoras de lípidos (Tabla 2), que son proteínas encargadas de transportar lípidos, proteínas lipídicas, lipopolisacáridos, hormonas esteroides, bilinas, retinoides, entre otras, a través de las membranas biológicas (Ren *et al.*, 2017).

Los transportadores de metales son las proteínas encargadas de trasladar los diversos componentes metálicos, entre otras funciones dentro y fuera de la célula (Ren *et al.*, 2017). En el presente trabajo se localizaron seis transportadores de metales: el transportador de magnesio, ZnuB transportador ABC de metales con unión al sustrato, CorB transportador de Mg²⁺/Co²⁺, permeasa transportador ABC de metal, transportador de potasio y la proteína de la familia ZnuC.

Finalmente, siete de las proteínas de la superfamilia de los facilitadores mayores (MFS) fueron encontrados (Tabla 2), estos permiten el transporte a través de membranas citoplasmáticas o internas de una variedad de sustratos incluyendo iones, fosfatos de azúcar, fármacos, nucleósidos, aminoácidos y péptidos (Quistgaard *et al.*, 2016).

Tabla 2. Identificación mediante análisis bioinformático de proteínas integrales de membrana reconocidas como factores de patogenicidad en la cepa de *Candidatus Hepatobacter penaei* aislada en México.

Table 2. Identification of integral membrane proteins recognized as pathogen factors of *Candidatus Hepatobacter penaei* isolated in México, through bioinformatics analysis.

#	Proteína ^a	Transportador ABC	Identidad ^c	Cobertura ^d	Función ^e
1	ABCD_peroxisomal_ALDP del transportador ABC	WP_031933696.1	98.25	99	Transportador ABC
2	MlaF del transportador ABC con unión al ATP	WP_052545706.1	100	100	Transportador ABC
3	YejF del transportador ABC con unión al ATP	WP_031934595.1	97.96	99	Transportador ABC
4	LptB del transportador ABC con unión al ATP	WP_052545548.1	100	100	Transportador ABC
5	LoID del transportador ABC con unión al ATP	WP_052545693.1	99.58	99	Transportador ABC
6	MdIB 1 del transportador ABC con unión al ATP	WP_052545555.1	99.16	100	Transportador ABC
7	AAA1 superfamilia del transportador ABC	WP_031934580.1	100	100	Transportador ABC
8	SunT 1 de la superfamilia del transportador	WP_031934525.1	99.31	100	Transportador ABC
9	YejE de la permeasa	WP_031933736.1	100	100	Transportador ABC
10	MlaE de la permeasa	WP_031934350.1	99.61	99	Transportador ABC
11	MdIB 2 de la permeasa	WP_031934196.1	99.48	99	Transportador ABC
12	SunT 2 Superfamilia de la permeasa	WP_052545520.1	99.83	100	Transportador ABC
13	Proteína de unión al sustrato	WP_082191986.1	99.84	100	Transportador ABC
14	Proteína de la superfamilia AAA 2	WP_052545530.1	98.77	100	Transportador ABC
15	Permeasa exportadora de LPS de transportador ABC	WP_031934250.1	99.73	100	Transportador ABC
16	Proteína que mantiene la asimetría lipídica de membrana	WP_082191968.1	100	100	Transportador ABC
17	Permeasa de transportador ABC	WP_052545643.1	99.16	100	Transportador ABC
18	OmpA de la membrana externa	WP_031934458.1	100	100	Adhesión
19	Permeasa de aminoácidos	WP_031934043.1	99.53	100	Transportador de aminoácidos
20	Aminotransferasa dependiente de piridoxal fosfato	WP_031934215.1	99.75	100	Transportador de aminoácidos
21	EamA/RhaT familia de transportadores	WP_031933955.1	98.05	99	Transportador de aminoácidos
22	FtsE con unión a ATP de la división celular	WP_031934456.1	99.16	100	División celular
23	FtsA de la división celular	WP_031934614.1	97.51	100	División celular
24	FtsH de la división celular	WP_082192097.1	99.68	98	División celular
25	FtsW de la división celular	WP_031934673.1	99.73	100	División celular
26	FtsQ de la división celular septal	WP_082192099.1	100	100	División celular
27	Fic de la filamentación celular	WP_052545591.1	99.03	99	División celular
28	Proteína del anillo-P del cuerpo basal flagelar	WP_052545541.1	100	100	Cuerpo flagelar
29	Proteína de la varilla del cuerpo basal flagelar	WP_082192064.1	100	100	Cuerpo flagelar
30	FlgC de la varilla del cuerpo basal flagelar	WP_052545614.1	98.6	100	Cuerpo flagelar
31	FlgG de la varilla del cuerpo basal flagelar	WP_031934324.1	100	100	Cuerpo flagelar
32	FliL de la varilla del cuerpo basal flagelar	WP_052545700.1	100	96	Cuerpo flagelar
33	Gancho Flagelar	WP_031933945.1	97.39	100	Cuerpo flagelar
34	FlgK asociada a ganglios flagelares	WP_031934106.1	97.78	100	Cuerpo flagelar
35	FliK de control de la longitud del gancho Flagelar	WP_031933943.1	98.73	100	Cuerpo flagelar
36	Proteína del anillo-L flagelar	WP_031934321.1	100	100	Cuerpo flagelar
37	FliF del anillo M flagelar	WP_040333182.1	99.62	100	Cuerpo flagelar
38	MotA_ExbB del motor Flagelar	WP_031934318.1	99.64	100	Motor flagelar
39	MotB del motor Flagelar	WP_031934707.1	100	100	Motor flagelar

Continúa en la página 122

#	Proteína ^a	Transportador ABC	Identidad ^c	Cobertura ^d	Función ^e
40	Proteína tipo OmpA_C de la rotación del motor flagelar	WP_052545680.1	98.98	100	Motor flagelar
41	MotA del estator del motor flagelar	WP_031934708.1	100	100	Motor flagelar
42	FliG del interruptor del motor flagelar	WP_031934702.1	99.71	100	Motor flagelar
43	FliM del interruptor del motor flagelar	WP_031934326.1	99.71	100	Motor flagelar
44	FliN del interruptor del motor flagelar	WP_052545790.1	100	100	Motor flagelar
45	FliA de la biosíntesis de proteínas del motor flagelar	WP_082192111.1	99.57	100	Biosíntesis de flagelo
46	FliQ de la biosíntesis de flagelo	WP_031934395.1	100	100	Biosíntesis de flagelo
47	FliP de la biosíntesis de flagelo	WP_031934035.1	97.59	100	Biosíntesis de flagelo
48	ATP sintasa FliI flagelo específica	WP_031934243.1	100	99	Biosíntesis de flagelo
49	Apolipoproteína N-aciltransferasa	WP_082192069.1	99.81	100	Transporte de Lípidos
50	Lipocalina	WP_031934001.1	100	97	Transporte de Lípidos
51	LoLC subunidad del sistema liberador de lipoproteínas	WP_031933741.1	100	100	Transporte de Lípidos
52	Transferasa Lipoil(octanoil)	WP_031933680.1	99.52	95	Transporte de Lípidos
53	LoLA acarreadora de lipoproteínas de la membrana	WP_031934074.1	99.21	100	Transporte de Lípidos
54	Transportador de magnesio	WP_082192112.1	100	100	Transporte de metales
55	Transportador ZnuB de metal ABC de unión al sustrato	WP_052545529.1	99.83	99	Transporte de metales
56	CorB Transportador de Mg ²⁺ /Co ²⁺	WP_052545594.1	99.76	100	Transporte de metales
57	Permeasa transportador ABC de metales	WP_031934549.1	94.57	100	Transporte de metales
58	Transportador potasio	WP_082192078.1	99.57	100	Transporte de metales
59	Proteína de la familia ZnuC	WP_052545668.1	96.52	100	Transporte de metales
60	Transportador 2MFS	WP_082192091.1	99.63	100	Transportador MFS
61	Permeasa de la familia de MFS	WP_082192091.1	100	100	Transportador MFS
62	Transportador pfam07690 1	WP_031934320.1	100	100	Transportador MFS
63	Transportador pfam07690 2	WP_031934253.1	99.09	100	Transportador MFS
64	Transportador 1	WP_082192086.1	100	100	Transportador MFS
65	Transportador pfam07690 3	WP_031934154.1	99.75	100	Transportador MFS
66	Transportador 3	WP_031934649.1	99.5	100	Transportador MFS
67	Preproteína de subunidad SecA de la translocasa	WP_052545729.1	99.32	100	Transportador Sec
68	Preproteína de subunidad SecE de la translocasa	WP_031934082.1	100	100	Transportador Sec
69	Preproteína de subunidad SecG de la translocasa	WP_031934175.1	100	100	Transportador Sec
70	Preproteína de la translocase subunidad SecY	WP_031934502.1	100	100	Transportador Sec
71	Subunidad SecF de translocasa	WP_052545743.1	100	100	Transportador Sec
72	Proteína del Sistema de secreción tipo 1 (T1SS)	WP_031934240.1	99.79	100	Sistema de secreción
73	Proteína del SS tipo IV / VI de la familia DotU	WP_052545560.1	99.65	99	Sistema de secreción
74	Proteína que contiene un dominio VipA y VipB	WP_082191990.1	100	100	Sistema de secreción
75	Proteína del Sistema de secreción tipo II	WP_082192076.1	95.34	100	Sistema de secreción
76	Proteína de Sistema D del Sistema de secreción tipo II	WP_082192082.1	99.24	100	Sistema de secreción
77	Proteína de sistema de secreción tipo II/IV	WP_082192075.1	97.17	70	Sistema de secreción
78	Proteína de biogénesis y competencia del pilus tipo IV	WP_031934340.1	99.05	98	Sistema de secreción
79	Proteína VasE del sistema de secreción tipo VI	WP_031933928.1	100	97	Sistema de secreción
80	Proteína de la familia LicD	WP_031933946.1	96.52	100	Transportador

Continúa en la página 123

#	Proteína ^a	Transportador ABC	Identidad ^c	Cobertura ^d	Función ^e
81	Permeasa de la familia YjgP/YjgQ	WP_031934251.1	99.73	100	Transportador
82	Sintasa de Lípidos-A-disacáridos	WP_082191969.1	97.08	100	Factor de virulencia
83	Lipoproteína SlyB de la membrana exterior	WP_031934100.1	98.03	100	Factor de virulencia
84	Proteína de la subunidad C de la ATPsintasa	WP_031934423.1	98.65	99	Factor de virulencia
85	Proteína de la subunidad alfa de la ATPsintasa	WP_031933701.1	100	100	Factor de virulencia
86	F0F1 de la subunidad beta de la ATPsintasa	WP_082191972.1	99.82	100	Factor de virulencia
87	F0F1 de la subunidad I de la ATPsintasa	WP_082191970.1	100	100	Factor de virulencia
88	Efector antiapoptótico de resistencia	WP_031933691.1	98.29	100	Factor de virulencia
89	Proteína de la familia AcrB/AcrD/AcrF	WP_052545750.1	99.52	100	Factor de virulencia
90	BamD factor de ensamblaje de proteína de membrana	WP_082191979.1	99.21	100	Factor de virulencia
91	BamA factor de ensamblaje de proteína de membrana	WP_052545712.1	98.94	100	Factor de virulencia
92	Hemolisina LPLAT	WP_052545503.1	99.26	100	Factor de virulencia
93	Hemolisina D HlyD_3	WP_031934587.1	96.77	100	Factor de virulencia
94	Proteína de la cápside mayor	WP_052545726.1	98.68	100	Factor de virulencia
95	Factor de inserción de la superfamilia hemolítica	WP_082192096.1	95.65	93	Factor de virulencia
96	Proteína YidC insertarse de membrana	WP_031933875.1	99.82	100	Factor de virulencia

^aLas anotaciones de proteínas se obtuvieron después del análisis blastp de los ORF deducidos

^bNúmeros de acceso según la base de datos de proteínas NCBI, todos ellos corresponden a la cepa *Candidatus Hepatobacter penaei* reportada por Wang y Wu (2014)

^cIdentidad entre la consulta (proteínas deducidas del análisis del genoma) y la que mejor se alinee en blastp

^dCobertura de consulta de proteínas

^eFunción molecular asignada por el análisis de Ontología Genética.

La vía de secreción general (Sec) comprende una maquinaria de exportación esencial, omnipresente y universal para la mayoría de las proteínas que se integran o se trasladan a través de la membrana plasmática. En este trabajo se encontraron cinco proteínas relacionadas con Sec (Tabla 2). En el caso de SecA se une a la membrana plasmática donde interactúa con proOmpA para soportar la translocación de proOmpA a través de la membrana. La proteína SecA consigue esta translocación, en asociación con la proteína SecY, de una manera dependiente de ATP. SecDF utiliza la fuerza motriz del protón para completar la translocación de proteínas después de la ATP-función dependiente de SecA. En cuanto a SecG, esta familia de proteínas forma un complejo con SecY y SecE. SecA luego recluta el complejo SecYEG para formar un canal activo de translocación de proteínas. SecE es parte del núcleo heterotrímero, SecYEG, preproteína translocasa del sistema Sec. Otros componentes son el SecA ATPasa, SecB una chaperona citosólica y un complejo accesorio de SecDF y YajC (Tsirigotaki *et al.*, 2016).

Movimiento y producción de ATP

El flagelo es un organelo locomotor para la propulsión bacteriana (Figura 2). La motilidad, así como la producción de ATP comprenden procesos vitales para la patogenicidad de *Candidatus Hepatobacter penaei*, involucrando una alta diversidad de proteínas. En este sentido, se detectó una amplia gama de proteínas que componen el sistema flagelar. Entre ellas se encontraron siete proteínas que conforman el

cuerpo basal, que actúa como un motor rotativo reversible para el movimiento flagelar (Tabla 2); tres proteínas que conforman el gancho (hook), que funciona como una articulación universal; siete que integran el motor flagelar, y cuatro implicadas en la biosíntesis flagelar (Terashima *et al.*, 2010).

La identificación de las proteínas productoras de ATP, implicadas en el movimiento bacteriano de *Candidatus Hepatobacter penaei* permiten conocer a detalle la producción de energía y motilidad de la especie. En este trabajo se detectaron cuatro proteínas implicadas en este proceso, formando parte de las ATP sintasas (Tabla 2), la cuales están conformadas de diferentes subunidades proteicas que utilizan un gradiente de protones para impulsar la síntesis e hidrólisis de ATP (Junge *et al.*, 2015).

Factores de virulencia

Los factores de virulencia permiten a *Candidatus Hepatobacter penaei* invadir a las células diana provocando su posterior necrosis (Nunan *et al.*, 2013). Los resultados mostraron la presencia de factores de virulencia tales como adhesinas, proteínas flagelares, sistemas de secreción, proteínas de división celular y de transporte, los cuales fueron discutidos en secciones anteriores. Sin embargo, se detectaron quince factores de virulencia adicionales en la bacteria *Candidatus Hepatobacter penaei* que los más importantes serán discutidos a continuación.

Dentro de las proteínas lipídicas se encuentran la sintasa lípido-A-disacárido, que es una enzima que cataliza el

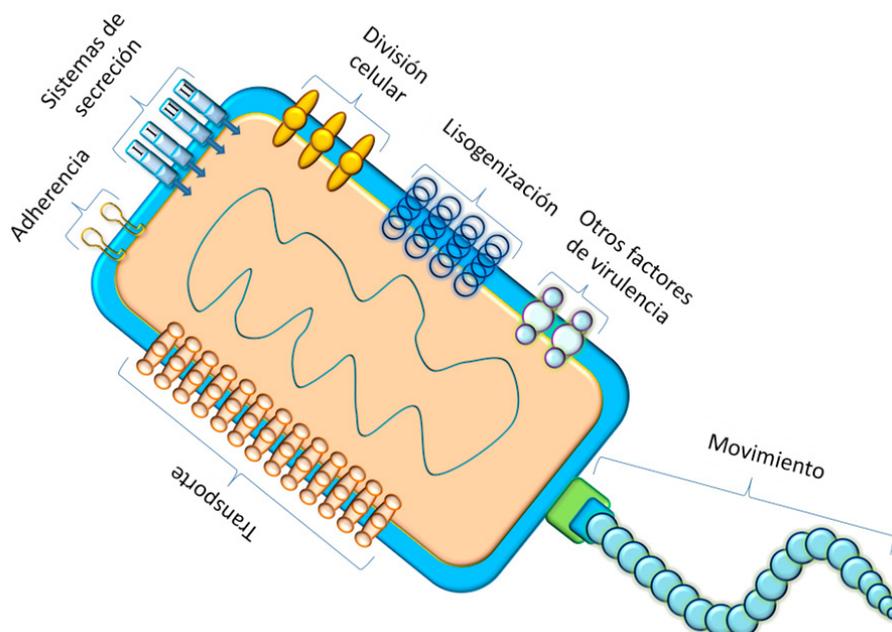


Figura 2. Esquema representativo de las principales funciones moleculares de proteínas integrales de membrana identificadas en el genoma de *Candidatus Hepatobacter penaei* que son ampliamente reconocidas en la literatura como factores de patogenicidad.

Figure 2. Scheme representing the main molecular functions of integral membrane proteins identified in the genome of *Candidatus Hepatobacter penaei* that are widely recognized in literature as pathogenicity factors.

primer paso de para la síntesis del disacárido lipídico tipo A, que participa en la biosíntesis de lipopolisacáridos (Metzger et al., 2009) y la Lipoproteína de membrana externa SlyB, que junto con SlyA, forma un complejo homo-oligomérico, requerido para la activación de genes de virulencia (Ludwig et al., 1995). La Hemolisina LPLAT es una proteína de membrana, localizada en la superficie celular (Liu et al., 2014). La Hemolisina D HlyD_3, sirve para formar un canal trans-membrana o poro a través del cual se puede transferir HlyA directamente al medio extracelular (Su et al., 2012).

La proteína de efecto antiapoptótico de resistencia al patógeno estimula la función antiapoptótica de Bcl-2 o inhibe el efecto proapoptótico de Bax (Chang et al., 2014). La proteína de la familia AcrB/AcrD/AcrF, se requiere para la autoresistencia a la surfactina (Murakami et al., 2002). Finalmente, la proteína YidC insertada de membrana, funciona como una proteína de membrana chaperona (Kuhn et al., 2017).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran la importancia de las proteínas de membrana en el ciclo biológico de *Candidatus Hepatobacter penaei*, desde su proceso de adhesión, invasión, sistemas de secreción de efectores y otros, hasta el proceso de locomoción, metabolismo energético y división celular. La identificación de los componentes de virulencia de *Candidatus Hepatobacter penaei* representa información relevante para entender en profundidad su mecanismo de infección. También representa información útil para el sector

acuícola y, por lo tanto, para desarrollar estrategias basadas en mecanismos moleculares que inhiban algunos de estos factores de virulencia.

REFERENCIAS

- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G.P., Jensen, G.J. y Mekalanos, J.J. 2012. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*. 483:182-6.
- Briñez, B., Aranguren, F. y Salazar, M. 2003. Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Diseases of Aquatic Organisms*. 55: 69-72.
- Chan, Y. G., Cardwell, M. M., Hermanas, T. M., Uchiyama, T. y Martinez, J. J. 2009. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cellular Microbiology*. 11: 629-644.
- Chang, Y., Bruni, R., Kloss, B., Assur, Z., Kloppmann, E., Rost, B., Hendrickson W. A. y Liu, Q. 2014. Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. *Science*. 344: 1131-1135.
- Condry, D.L. y Nilles, M.L. 2016. Identification of the Targets of Type III Secretion System Inhibitors. *Methods in Molecular Biology*. 1531: 203-211.
- Conesa, S.G. y García, G.J. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 21: 674-3676.
- Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R. y Henderson I.R. 2009. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends in Microbiology*. 17: 139-145.

- Gollas-Galván, T., Avila-Villa, L.A., Martínez-Porchas, M. y Hernandez-Lopez, J. 2013. Rickettsia-like organisms from cultured aquatic organisms, with emphasis on necrotizing hepatopancreatitis bacterium affecting penaeid shrimp: an overview on an emergent concern. *Reviews in Aquaculture* 5: 1-14.
- Goffeau, A., de Hertogh, B. y Baret, P.V. 2013. ABC Transporters. In Lane W.J, Lennarz M.D. *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Second ed.). London: Academic Press. ISBN 978-0-12-378631-9.
- Hospenthal, M.K., Costa, T.R. y Waksman, G. 2017. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews in Microbiology*. 15: 365-379.
- Junge, W. y Nelson, N. 2015. ATP synthase. *Annual Review of Biochemistry*. 84: 631-57.
- Kapitein, N., Bönnemann, G., Pietrosiuk, A., Seyffer, F., Hausser, I., Locker, J.K. y Mogk, A. 2013. ClpV recycles VipA/VipB tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type VI protein secretion. *Molecular Microbiology*. 87: 1013-1028.
- Kokaska, A.M. 2015. Assessing the Role of Fic (Filamentation Induced by cAMP) Proteins in *E. coli*. *The Journal of Purdue Undergraduate Research*. 5: Article 24.
- Kuhn, A. y Kiefer, D. 2017. Membrane protein insertase YidC in bacteria and archaea. *Molecular Microbiology*. 103: 590-594.
- Leyva, J. M., Martínez-Porchas, M., Hernández-López, J., Vargas-Albores F. y Gollas-Galván. 2018. Identifying the causal agent of Necrotizing Hepatopancreatitis in shrimp: multilocus sequence analysis (MLSA) approach. *Aquaculture Research*. 1-8. DOI: 10.1111/are.13633.
- Lightner D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society. Baton Rouge, USA.
- Liu, Y., An, H., Zhang, J., Zhou, H., Ren, F. y Hao, Y. 2014. Functional role of tlyC1 encoding a hemolysin-like protein from *Bifidobacterium longum* BBMN68 in bile tolerance. *FEMS Microbiology*. 360: 167-173.
- Ludwig, A., Tengel, C., Bauer, S., Bubert, A., Benz, R., Mollenkopf, H.J. y Goebel W. 1995. SlyA, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*. 249: 474-486.
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C.J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L.Y. y Bryant, S.H. 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research*. 45: D200-D203.
- Metzger, L.E. y Raetz, C.R. 2009. Purification and characterization of the lipid A disaccharide synthase (LpxB) from *Escherichia coli*, a peripheral membrane protein. *Biochemistry*. 48: 11559-11571.
- Mura, A., Fadda, D., Perez, A.J., Danforth, M.L., Musu, D., Rico, A.I., Krupka, M., Denapaite, D., Tsui, H.-C.T., Winkler, M.E., Branny, P., Vicente, M., Margolin, W. y Massidda O. 2017. Roles of the essential protein FtsA in cell growth and division in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. 199: e00608-16.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. y Yamaguchi A. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*. 419: 587-593.
- Nunan, L.M., Pantoja, C.R., Gomez-Jimenez, S. y Lightner, D.V. 2013. "Candidatus Hepatobacter penaei," an Intracellular Pathogenic Enteric Bacterium in the Hepatopancreas of the Marine Shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 1407-1409.
- Nguyen, V., Karunakaran, E., Collins, G. y Biggs, C.A. 2016. Physicochemical analysis of initial adhesion and biofilm formation of *Methanosarcina barkeri* on polymer support material. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 143: 518-525.
- Osorio, A., Camarena, L., Cevallos, M.A. y Poggio, S. 2017. A new essential cell division protein in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*. 199: e00811-16.
- Pérez-Acosta, J., Martínez-Porchas, M., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L. R., Gutiérrez-Millán, L.E. y López-Torres, M. 2017. Transmembrane proteins rickettsia-like organisms (RLO) in aquatic animals: Adhesion, invasion and infection factors. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 52: 19-32.
- Pastoret, S., Fraipont, C., den Blaauwen, T., Wolf, B., Aarsman, M.E., Piette, A., Thomas, A., Brasseur, R. y Nguyen-Distèche, M. 2004. Functional analysis of the cell division protein FtsW of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 186: 8370-8379.
- Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P. y Saier, M.H. 2003. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*. 149: 3051-3072.
- Quistgaard, E.M., Löw, C., Guettou, F. y Nordlund, P. 2016. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 17: 123-132.
- Ren, W., Liu, G., Yin, J., Tan, B., Wu, G., Bazer, F.W., Peng, Y. y Yin, Y. 2017. Amino-acid transporters in T-cell activation and differentiation. *Cell Death and Disease*. 8: e2655.
- Su, L., Chen, S., Yi, L., Woodard, R.W., Chen J. y Wu J. 2012. Extracellular overexpression of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by alpha-hemolysin secretion system in *E. coli* BL21(DE3). *Microbial Cell Factories*. 11: 8.
- ter Beek, J., Guskov, A. y Slotboom, D.J. 2014. Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology*. 143: 419-35.
- Terashima, H., Koike, M., Kojima, S. y Homma, M. 2010. The Flagellar Basal Body-Associated Protein FlgT Is Essential for a Novel Ring Structure in the Sodium-Driven Vibrio Motor. *Journal of Bacteriology*. 192: 5609-5615.
- Thomas, S., Holland, I.B. y Schmitt, L. 2014. The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1843:1629-1641.
- Tian, L., Song, T., He, R., Zeng, Y., Xie, W., Wu, Q., Wang, S., Zhou, X. y Zhang Y. 2017. Genome-wide analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporters in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *BMC Genomics*. 18: 330.
- Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Šoštarić N., Economou, A. y Karamanou, S. 2016. Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nature Reviews in Microbiology*. 15: 21-36.
- Vit, O. y Petrak, J. 2017. Integral membrane proteins in proteomics. How to break open the black box?. *Journal of Proteomics*. 153: 8-20.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A. y Waksman, G. 2010. Type IV

secretion systems: versatility and diversity in function. Cellular Microbiology. 12: 1203-1212.

Wang, Z. y Wu, M. 2014. Phylogenomic reconstruction indicates mitochondrial ancestor was an energy parasite. PLoS One. 9: e110685-e110685.

Yang, A., Narechania, A. y Kim, E. 2016. Rickettsial endosymbiont in the 'earlydiverging' streptophyte green alga *Mesostigma viride*. Journal of Phycology 52: 219-229.