



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

**Caracterización de los sistemas de captación
de zinc y de hierro en *Streptococcus suis*:
Potencial antigénico y protector**

Jesús Aranda Rodríguez

2008

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

**Caracterización de los sistemas de captación
de zinc y de hierro en *Streptococcus suis*:
Potencial antigénico y protector**

Trabajo presentado por Jesús Aranda Rodríguez para optar al grado de Doctor en Microbiología (Licenciatura de Biología) por la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Con el Visto Bueno de los Directores de la Tesis Doctoral:

Dra. Montserrat Llagostera Casas

Dr. Jordi Barbé García

Bellaterra, 2008

RESUMEN

Streptococcus suis es un importante patógeno que causa grandes pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial, siendo también un importante agente zoonótico. Aunque son varias las aproximaciones que se han desarrollado mediante vacunas vivas o recombinantes para prevenir las enfermedades provocadas por *S. suis*, los esfuerzos para controlar su infección se ven dificultados por la falta de herramientas efectivas contra este patógeno.

Diferentes tipos de transportadores implicados en la captación de cationes divalentes y asociados a la pared celular, entre ellos los transportadores ABC, se relacionan con la virulencia bacteriana y presentan propiedades inmunogénicas contra las especies bacterianas de las que derivan. Atendiendo a todas estas características, se han desarrollado estrategias para producir vacunas contra las bacterias patógenas basadas en la sobreexpresión en la superficie celular bacteriana de transportadores de cationes divalentes inducidos mediante agentes quelantes o a través de la construcción de cepas deficientes en los represores de la transcripción de estos transportadores. En este contexto, el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar los mecanismos de captación de cationes divalentes de *S. suis*, así como su papel en la virulencia y su posible uso para el desarrollo de herramientas eficaces contra este patógeno.

Para abordar el objetivo propuesto, se identificaron *in silico* diversos transportadores de *S. suis* implicados en la captación de zinc y hierro y también sus posibles reguladores (AdcR y Fur, respectivamente). Además, se clonó el gen *adcR* de *S. suis*, que codifica un posible regulador de los transportadores implicados en la captación de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} en *Streptococcus* spp., se purificó la proteína AdcR y mediante ensayos con DNasaI (*footprinting*) y de movilidad electroforética se demostró, por primera vez, que dicha proteína reconoce y se une específicamente a la secuencia TTAACNRGTTAA. Asimismo, también se ha demostrado que *in vitro* se requiere Zn^{2+} o Mn^{2+} para establecer dicha unión y que la proteína AdcR controla la expresión de los genes que codifican las proteínas SsuiDRAFT 0103 y SsuiDRAFT 1237, componentes de transportadores ABC implicados en la captación de zinc y/o manganeso.

Por otra parte, se clonó el gen *fur* de *S. suis*, que codifica el posible regulador de los transportadores implicados en la captación de Fe^{2+} , y se sobreexpresó su producto en *Escherichia coli*. Ensayos de movilidad electroforética con extracto crudo de esta cepa de *E. coli* mostraron que la proteína Fur de *S. suis* controla la expresión de los genes *feoAB*, implicados en la captación de hierro.

Seguidamente, se obtuvieron mutantes mediante la delección de los genes *adcR* y *fur* en una cepa virulenta de *S. suis* con el objetivo de caracterizar ambos regulones. Varios transportadores implicados en la captación de cationes aparecieron desreprimidos en las cepas mutantes cuando la expresión génica fue comparada con la de la cepa salvaje a través de ensayos de RT-PCR a tiempo real. En concordancia con ello, los ensayos de movilidad electroforética mostraron que estos reguladores se unen específicamente al promotor de dichos genes. Asimismo, la ausencia de los genes *adcR* y/o *fur* en un estreptococo patógeno mostró, por primera vez, una importante atenuación de su virulencia en el modelo animal de ratón.

Finalmente, se abordaron estudios de inmunogenicidad y protección. Para ello, se purificaron tres proteínas periplásmicas de *S. suis* implicadas en la captación de cationes divalentes (SsuiDRAFT 0103, SsuiDRAFT 0174 y SsuiDRAFT 1237), resultando ser todas ellas inmunogénicas, aunque sólo SsuiDRAFT 0103 confiere una protección significativa contra *S. suis* en el modelo animal de ratón. Además, las proteínas Ssu0309 y Ssu1103 asociadas a la pared celular, que están sobreexpresadas en el mutante *adcR*, fueron identificadas mediante espectrometría de masas como factores de virulencia pertenecientes a la familia de proteínas Pht (*Pneumococcal histidine triad*). Asimismo, se estudiaron las propiedades protectoras de las cepas mutantes demostrándose que aunque enteras no confieren protección contra *S. suis* en el modelo animal de ratón, las proteínas asociadas a la pared celular del doble mutante *adcR fur* sí que inducen una protección significativa ante una infección con la cepa virulenta de *S. suis* 89/1591 en dicho modelo.

SUMMARY

Streptococcus suis is an important pathogen that causes significant economical losses in the swine industry worldwide and it is also an important zoonotic agent. Although several approaches to develop either live or recombinant vaccines to prevent *S. suis*-mediated disease have been tested, efforts to control the infection are hampered by the lack of effective weapons against this pathogen.

Different cell-wall-associated transporters involved in divalent-cation uptake, including ABC transporters, have been shown to be involved in bacterial virulence and have immunogenic properties against the bacterial species from which they are derived. Accordingly, several strategies have been developed to produce vaccines against this pathogenic bacterium. One of them involves overexpression on the bacterial cell surface of divalent-cation-uptake transporters induced by chelator agents or by the construction of deficient strains in the cation-uptake repressors. In this context, the aim of this work has been to study the *S. suis*-cation-uptake mechanisms and their role in virulence as well as their putative use as a tool to achieve broad protection against this pathogen.

To achieve this purpose, several transporters involved in zinc and iron uptake and their putative regulators (AdcR and Fur, respectively) have been identified *in silico*. Furthermore, the *S. suis adcR* gene, which encodes a predicted regulator of Zn²⁺ and/or Mn²⁺ uptake in streptococci, was cloned and its protein product was purified. Footprinting and electrophoretic mobility shift assays with purified *S. suis* AdcR protein showed, for the first time, that the AdcR-DNA binding sequence corresponds to the TTAACNRGTTAA motif. In addition, the requirement for either Zn²⁺ or Mn²⁺ to establish *in vitro* binding of AdcR to its target sequence and the ability of AdcR to control the genes codifying the ABC-transporter components SsuiDRAFT 0103 and SsuiDRAFT 1237, involved in zinc and/or manganese uptake, were demonstrated.

Besides, the *S. suis fur* gene, which encodes a predicted regulator of Fe²⁺ uptake, was cloned and its protein product was overexpressed in *Escherichia coli*. Electrophoretic mobility shift assays with crude extract of this *E. coli* strain showed that *S. suis* Fur protein controls the *feoAB* genes, involved in ferric uptake.

Summary

In addition, both *adcR* and *fur* genes were deleted in a virulent *S. suis* strain in order to characterize these regulons. Several cation-uptake transporters appeared desrepressed in the knockout strains when gene expression was compared with wild-type strain through real-time RT-PCR analyses. Accordingly, EMSA results showed that these regulators specifically bind to the promoter of these genes. Moreover, the absence of *adcR* and/or *fur* genes in pathogenic streptococci showed, for the first time, an important attenuation of its virulence in mice.

Finally, immunogenic and protective analysis were carried out with the products of three genes encoding putative divalent-cation-binding lipoproteins of *S. suis* (SsuiDRAFT 0103, SsuiDRAFT 0174, and SsuiDRAFT 1237), being all of them immunogenic although only one (SsuiDRAFT 0103) induces a significant protective response against a virulent *S. suis* strain in mice. Moreover, the overexpressed cell wall-associated proteins Ssu0309 and Ssu1103 of the *adcR* mutant, were identified by mass spectrometry as putative virulence factors belonging to the Pht (Pneumococcal histidine triad) family. Likewise, protective abilities of mutant strains were analyzed showing that although mutant cells are not effective to confer protection in mice, the combination of *adcR*- and *fur*-regulated cell wall-associated proteins confers a significant protection against *S. suis* 89/1591 challenge to mice vaccinated with them.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Streptococcus suis</i>	1
1.1.1. Historia	1
1.1.2. Características generales	3
1.1.3. Factores de virulencia	4
1.1.4. Patogenia	11
1.2. Transporte de cationes a través de la pared celular y de la membrana citoplasmática	14
1.2.1. La pared celular bacteriana	14
1.2.2. Generalidades sobre el transporte a través de membranas	17
1.2.3. Transporte de cationes a través de la membrana citoplasmática	19
1.2.3.1. Importación de cationes	19
i) Transportadores ABC	19
ii) Transportadores ZIP	21
iii) Transportadores NRAMP	23
1.2.3.2. Exportación de cationes	24
i) Bombas MDR: los transportadores RND	24
ii) Facilitadores de la difusión de los cationes	27
iii) ATPasas de tipo P	28
1.2.4. Importancia del zinc en los microorganismos	30
1.2.4.1. Mecanismos de captación de zinc y su regulación	31
i) Proteínas periplásmicas de unión al sustrato	31
ii) Mecanismos de captación de zinc de baja afinidad	33
iii) Control de los sistemas de captación de zinc: los reguladores Zur y AdcR	34
1.2.4.2. Mecanismos de exportación de zinc y su regulación	39
i) Transportadores RND implicados en la exportación de zinc	40
ii) Transportadores CDF implicados en la exportación de zinc	42
iii) ATPasas de tipo P implicadas en la exportación de zinc	43

1.2.5. Importancia del hierro en los microorganismos	44
1.2.5.1. Mecanismos de captación de hierro y su regulación	46
i) Captación directa	47
ii) Sideróforos	47
iii) Receptores de proteínas transportadoras de hierro	52
iv) Receptores de hemoproteínas y del grupo hemo	54
v) Regulación de los sistemas de captación de hierro: la proteína Fur	56
1.2.5.2. Mecanismos de exportación de hierro	60
1.3. Proteínas transportadoras implicadas en la virulencia bacteriana	62
1.4. Proteínas transportadoras y diseño de vacunas	66
2. OBJETIVOS	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	71
3.1. Cepas bacterianas y plásmidos	71
3.2. Medios de cultivo, antibióticos y otros suplementos	72
3.3. Técnicas de DNA	77
3.3.1. Extracción de DNA cromosómico	77
3.3.2. Extracción de DNA plasmídico	77
3.3.3. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR	78
3.3.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	80
3.3.5. Cuantificación de ácidos nucleicos	82
3.3.6. Clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos	83
3.3.7. Obtención de mutantes de <i>S. suis</i>	88
3.4. Técnicas de RNA	93
3.4.1. Extracción de RNA	93
3.4.2. RT-PCR	93
3.4.3. RT-PCR a tiempo real	94
3.5. Técnicas de proteínas	98
3.5.1. Sobreexpresión de proteínas con el sistema pET	98
3.5.2. Clonación en pET15b e inducción con IPTG	99
3.5.3. Preparación de extractos crudos	101

3.5.4. Purificación de proteínas	101
3.5.5. Extracción de proteínas asociadas a la pared de <i>S. suis</i>	102
3.5.6. Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	103
3.5.7. Cuantificación de proteínas	105
3.5.8. Western Blot	106
3.5.9. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)	108
3.5.10. Ensayo de protección con DNasaI (<i>footprinting</i>)	113
3.5.11. Identificación de proteínas	116
3.6. Bases de datos y análisis de secuencias	117
3.7. Experimentación animal	118
3.7.1. Dosis letal 50 (DL ₅₀)	119
3.7.2. Preparación de vacunas y ensayos de protección	119
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
4.1. Identificación y organización transcripcional de genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de zinc y de hierro en <i>S. suis</i>	121
4.2. El regulador AdcR en <i>S. suis</i>	128
4.2.1. Identificación de la región de unión de la proteína AdcR al DNA	128
4.2.2. Determinación del regulón AdcR	134
4.2.3. Construcción de un mutante defectivo en la proteína AdcR y estudio de su papel regulador	136
4.3. El regulador Fur en <i>S. suis</i>	146
4.3.1. Determinación de genes regulados por la proteína Fur	146
4.3.2. Construcción de un mutante defectivo en la proteína Fur y estudio de su papel regulador	149
4.4. Efecto de las mutaciones en los genes <i>adcR</i> y <i>fur</i> en la virulencia de <i>S. suis</i>	152
4.5. Capacidad inmunogénica y protectora de las proteínas de <i>S. suis</i> reguladas por AdcR y Fur	157
4.5.1. Capacidad inmunogénica y protectora de transportadores ABC implicados en la captación de zinc y de hierro	157
4.5.2. Capacidad inmunogénica y protectora de los mutantes <i>adcR</i> , <i>fur</i> y <i>adcR fur</i>	160

4.5.3. Capacidad protectora de las proteínas asociadas a la pared celular del doble mutante <i>adcR fur</i>	162
5. CONCLUSIONES	165
6. BIBLIOGRAFÍA	167
7. AGRADECIMIENTOS	195
8. ANEXO	197

Artículo 1: Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions.

Artículo 2: Immunogenic and protective capacities of cell-wall associated proteins of *Streptococcus suis* mutants deficient in divalent-cation-uptake.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Streptococcus suis*

1.1.1. Historia

Streptococcus suis es una bacteria grampositiva perteneciente al grupo de los estreptococos, grupo compuesto por distintas especies y para el que no existe un sistema de clasificación sencillo que las diferencie. La clasificación de los estreptococos depende de la combinación de una serie de características entre las que se incluyen: patrón de hemólisis en placas de agar sangre, composición antigénica, características de crecimiento, reacciones bioquímicas y más recientemente, análisis genético.

El primer intento de diferenciar las diversas especies que componen este género de microorganismos fue llevado a cabo por Shottmuller a principios del siglo XX. Su base se fundamentaba en diferentes aspectos de las colonias crecidas en la superficie de los medios de cultivo de agar sangre (Schottmüller, 1903). Cuando las colonias de los estreptococos producen la estreptolisina O o S (hemolisinas) y son cultivadas en agar sangre, puede observarse la presencia de un halo transparente a su alrededor, hecho que indica una lisis total de los eritrocitos y que se conoce como β hemólisis. En un segundo grupo de estreptococos, puede observarse un halo verdoso o parduzco alrededor de las colonias, fenómeno que no se debe a una verdadera hemólisis, sino a una decoloración y pérdida de potasio por parte de los hematíes, causada por la liberación de peróxidos bacterianos. Este tipo de hemólisis parcial se conoce como α hemólisis. Finalmente, el término γ hemólisis se utiliza para designar aquellas especies que no producen ningún tipo de hemólisis, aunque recientemente se ha considerado preferible denominar a este grupo junto con el de los α hemolíticos como “estreptococos no β hemolíticos”, ya que si el oxígeno es eliminado del entorno, no se forma peróxido y las colonias que aparentemente eran α hemolíticas, aparecen como no hemolíticas (Facklam, 2002).

La diferenciación de los diversos tipos de estreptococos, según las características citadas, presentaba todavía numerosas dificultades, pues los resultados de las hemólisis eran variables en función del origen de los eritrocitos empleados. Aparentemente, esta problemática podía resolverse con el desarrollo de un test de tipo serológico. Así, y con

posterioridad, Rebeca Lancefield clasificó a los estreptococos en serogrupos basados en las diferencias antigénicas de los hidratos de carbono de su pared celular (Lancefield, 1933).

A mediados del siglo XX se describió por primera vez la septicemia estreptocócica en el ganado porcino del Reino Unido y Países Bajos que sufría meningitis y artritis (Jensen y van Dorssen, 1951; Field *et al.*, 1954). Años más tarde, de Moor describió estreptococos similares que habían sido aislados de cerdos que padecían septicemia, pero que podían diferenciarse bioquímica y serológicamente del resto de las especies conocidas de estreptococos, identificándolos como pertenecientes a los nuevos grupos de Lancefield R, S, RS y T (de Moor, 1963). Trabajos posteriores determinaron que estos microorganismos clasificados en los grupos de Lancefield R, S, RS y T, en realidad pertenecían al grupo de Lancefield D, demostrándose que estas bacterias estaban encapsuladas y que su caracterización estaba basada en la composición de su cápsula y no en la de su pared. La cápsula enmascaraba una pared típica del grupo D de Lancefield. Así, los serotipos capsulares 2, 1, 1/2 y 15 reemplazarían desde entonces a los grupos R, S, RS y T, respectivamente (Elliott, 1966; Windsor y Elliott, 1975; Perch *et al.*, 1983).

No fue hasta 1987 cuando se aceptó oficialmente que estos particulares estreptococos, pertenecientes al grupo D de Lancefield, constituían una nueva especie a la que se denominó *Streptococcus suis*. Para ello, fue necesario determinar, mediante estudios de hibridación DNA-DNA, que los microorganismos que formaban parte de este grupo de estreptococos serológicamente heterogéneo presentaban una similitud en más del 80% de su genoma, definiendo de esta manera su estatus taxonómico (Kilpper-Balz y Schleifer, 1987).

Hasta la fecha y en base a los polisacáridos capsulares, se han identificado 35 serotipos de *S. suis* (serotipos 1-34 y serotipo 1/2) (Higgings *et al.*, 1995). Análisis comparativos de las secuencias del gen *16S rRNA* de cepas de referencia de cada uno de estos 35 serotipos con secuencias del mismo gen de otras especies del género *Streptococcus* han puesto de relieve que, exceptuando 3 serotipos (32, 33 y 34), las cepas de referencia forman un grupo filogenéticamente distante del resto de especies del género. Además, gracias al análisis de secuencias del gen *16S rRNA* se ha determinado que la mayoría de

los serotipos de *S. suis* están estrechamente relacionados, presentando una gran divergencia con los serotipos 32, 33 y 34 (Chatellier *et al.*, 1998). De hecho, estudios bioquímicos y de las secuencias de los genes *16S rRNA* y *cpn60* ponen de manifiesto que los serotipos clasificados como 32 y 34 pertenecerían en realidad a otra especie de estreptococo del grupo de Lancefield A: *S. orisratti* (Hill *et al.*, 2005).

1.1.2. Características generales

S. suis es una bacteria grampositiva de bajo contenido en G+C, menor de 2 µm de diámetro, hemolítica, catalasa negativa, inmóvil y anaeróbica facultativa. Aunque este microorganismo crece bien en aerobiosis, el crecimiento siempre es mejor en condiciones de microaerofilia. Además, presenta una morfología cocoide u ovoide y puede encontrarse no agrupado, en pares o en cadenas cortas (Staats *et al.*, 1997). En cuanto a su clasificación taxonómica, pertenece al *Phylum Firmicutes*, clase *Bacilli*, Orden *Lactobacillales* y Familia *Streptococcaceae*.

Las colonias son pequeñas, grises o transparentes y ligeramente mucosas (Staats *et al.*, 1997). La hemólisis en esta especie es variable y depende del serotipo de la cepa y del origen de los eritrocitos utilizados en la placa de agar sangre (Hommez, 1986).

El hábitat natural de *S. suis* es el tracto respiratorio superior, particularmente las amígdalas y las cavidades nasales, así como el tracto genital y digestivo de los cerdos. Además, tiene la capacidad de sobrevivir en el ambiente durante largos períodos de tiempo (Higgins y Gottschalk, 1999; Sandford y Higgins, 1992). Cabe destacar también el incremento de los aislamientos de esta bacteria en un amplio rango de especies de mamíferos (incluyendo rumiantes, equinos y humanos) e incluso en aves, lo que sugiere nuevos conceptos sobre algunos aspectos epidemiológicos de la infección.

S. suis es sensible a diversos antibióticos incluyendo penicilinas y cefalosporinas. Sin embargo, se han descrito resistencias a una gran variedad de antibióticos. Estas resistencias pueden deberse a plásmidos; de hecho, en *S. suis* se han aislado multitud de plásmidos cuyos tamaños oscilan entre 1,5 y 35 kb (kilobases). Además, alteraciones en las proteínas de unión a la penicilina (por cambios en el peso molecular o por pérdida de

afinidad a este compuesto) también pueden dar lugar a resistencias ante diversos antibióticos (Cantin *et al.*, 1992; Cain *et al.*, 1995).

Existen vacunas comerciales para combatir las infecciones causadas por *S. suis*, sin embargo, debido al gran número de serotipos capsulares, un éxito total con éstas no será posible hasta que se conozcan los factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad de este microorganismo (Staats *et al.*, 1997; Fittipaldi *et al.*, 2007).

El genoma de la cepa de origen norteamericano 89/1591 del serotipo 2 de *S. suis* ha sido completamente secuenciado. Presenta 1.978.218 pb (pares de bases) con un contenido en G+C de un 41%. De este genoma existen 1919 genes anotados, de los cuales 1896 codifican proteínas (Genbank AAFA00000000). Aunque la función del 20-30% de estos genes es todavía desconocida, una gran variedad de ellos juega un papel importante en la patogenia de la infección de *S. suis* (Lun *et al.*, 2007). Además, el genoma de la cepa europea P1/7 del serotipo 2 de *S. suis*, también ha sido completamente secuenciado, presentando 2.007.461 pb con un contenido en G+C de 41,3% y 1969 genes anotados (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_suis/). Aunque estas dos cepas han sido aisladas de animales enfermos, también existen cepas virulentas de *S. suis* del serotipo 2 cuyos genomas se encuentran completamente secuenciados y que han sido aisladas de los brotes humanos ocurridos en China en los últimos años: 98HAH12 (2.095.720 pb y 2192 genes) y 05ZYH33 (2.096.331 pb y 2194 genes) (Chen *et al.*, 2007).

1.1.3. Factores de virulencia

La virulencia es la capacidad de un patógeno de provocar una determinada patología aprovechando una serie de circunstancias particulares, entre las que se incluyen, además de la presencia de factores de virulencia, las características del hospedador que pueden llegar a ser elementos de predisposición a infecciones graves como por ejemplo la edad, el estado de salud, los tratamientos químicos (inmunodepresores), etc. La virulencia se mide en términos de mortalidad (porcentaje de individuos de una población que mueren ante una determinada infección) y morbilidad (porcentaje de individuos de una población que desarrollan la enfermedad ante dicha infección). El conocimiento acerca de los factores de virulencia y de la patogénesis de la infección de *S. suis* es todavía

limitado a pesar de los esfuerzos realizados en este sentido durante las últimas décadas. Muchos de los posibles factores de virulencia dependen del serotipo y del origen geográfico de las cepas. Sin embargo, su presencia no debe asociarse necesariamente con la virulencia y viceversa, la ausencia de alguno de estos factores no es condición *sine qua non* para que una determinada cepa pueda ser no virulenta.

Los factores de virulencia pueden también estar presentes tanto en cepas avirulentas como en virulentas, pero es posible que sólo sean funcionales en éstas últimas. Además, existe una gran controversia acerca de la virulencia de determinadas cepas. Por ello, debe tomarse con cautela el empleo de los términos “virulento” y “avirulento” ya que, entre otras consideraciones, debe tenerse en cuenta el estado inmunológico del animal, la vía de infección y la cantidad de inóculo (Gottschalk *et al.*, 1999).

La presencia de un gran número de serotipos junto con la diversidad de los posibles factores de virulencia y su amplia distribución en cepas con diferente grado de virulencia, dificultan aún más la comprensión de los mecanismos de patogenicidad de *S. suis* y, consecuentemente, la producción de vacunas efectivas contra este microorganismo. No obstante, multitud de estudios describen y proponen posibles factores de virulencia para *S. suis*, los cuales se resumen a continuación:

i) Cápsula

Las bacterias encapsuladas son responsables de causar algunas de las infecciones invasivas más serias, incluyendo meningitis, septicemia y neumonía. El papel de la cápsula en relación con la virulencia consiste en proteger a la bacteria de la respuesta inflamatoria del hospedador, evitando la activación del complemento y la fagocitosis (Moxon y Kroll, 1990). *S. suis* posee una cápsula rígida, variable en grosor dependiendo de la cepa, que se encuentra asociada a la membrana citoplasmática (Jacques *et al.*, 1990) (Fig. 1). Los polisacáridos de la cápsula de las cepas del serotipo 1 están compuestos por 5 carbohidratos diferentes: galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) y N-acetilgalactosamina. La composición de los polisacáridos del serotipo 2 sólo difiere en un carbohidrato: la ramnosa sustituye a la N-acetilgalactosamina (Elliot y Tai, 1978).

La cápsula en *S. suis* es un factor de virulencia como muestran los modelos experimentales de ratón y cerdo. Así, la ausencia de los polisacáridos capsulares en los mutantes defectivos en la producción de la cápsula está directamente relacionada con el incremento de su hidrofobicidad y de la fagocitosis por parte de los macrófagos de los ratones y de los cerdos con respecto a las cepas salvajes estudiadas. Además, los mutantes son avirulentos en los mencionados modelos de infección animal, siendo la cepa mutante rápidamente eliminada de la circulación mientras que la cepa salvaje persiste en sangre tras más de 48 horas de infección (Charland *et al.*, 1998).

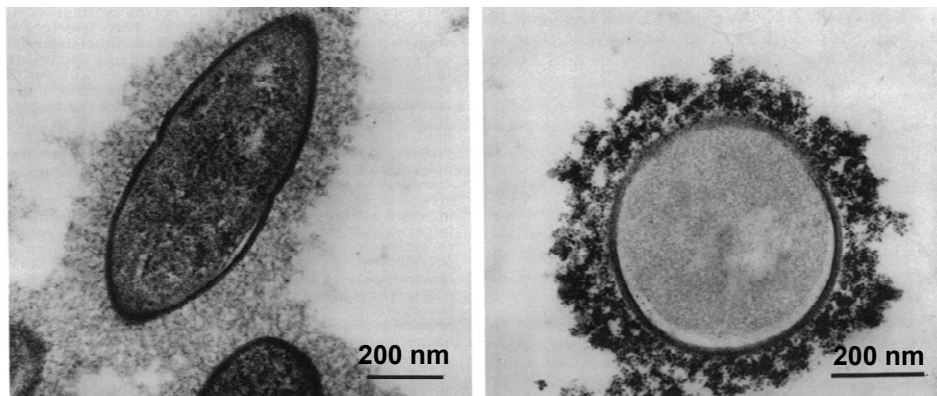


Fig. 1. Micrografías tomadas por microscopía electrónica de transmisión de finas secciones de una cepa encapsulada *S. suis* del serotipo 2. Modificado de Jacques *et al.* (1990).

La cápsula es poco inmunogénica y sólo protege parcialmente contra las infecciones de *S. suis*, siendo baja la producción de anticuerpos contra ella en los animales protegidos (del Campo Sepúlveda *et al.*, 1996; Charland *et al.*, 1997). Aunque la cápsula representa un factor de virulencia crítico, el hecho de que muchas cepas avirulentas posean cápsula junto con la existencia de cepas virulentas no encapsuladas, sugiere que son necesarios otros componentes bacterianos para la virulencia (Charland *et al.*, 1996). Además, existen estudios que sugieren que la adhesión de *S. suis*, que depende de la pared celular, disminuye considerablemente en presencia de la cápsula, por tanto, el grosor de la cápsula de la bacteria podría depender del estadio de la infección (St. Geme y Cutter, 1996).

ii) Proteínas MRP y EF

Se han identificado dos proteínas presentes en cepas europeas de *S. suis* del serotipo 2 aisladas de cerdos enfermos y relacionadas con la virulencia de este patógeno: MRP y EF (*Muramidase-Released Protein* y *Extracellular Factor*, respectivamente). MRP es una proteína asociada a la pared celular que es liberada durante el crecimiento bacteriano, mientras que EF es una proteína que sólo se detecta en los sobrenadantes de los cultivos de *S. suis* (Vecht *et al.*, 1991). Aunque ambas han sido relacionadas con la virulencia, mutantes deficientes en los genes que codifican ambas proteínas son igual de virulentos que la cepa salvaje (Smith *et al.*, 1996). Además, numerosas cepas virulentas aisladas en América del Norte resultaron ser no portadoras de los genes que codifican estas proteínas (Gottschalk *et al.*, 1998 y Chatellier *et al.*, 1999). Sin embargo, ambas proteínas son antigénicas y confieren protección ante las cepas del serotipo 2 de *S. suis* que las codifican (Wisselink *et al.*, 2001).

iii) Adhesinas

Las adhesinas bacterianas permiten una unión fuerte y específica de la bacteria a dianas celulares o superficies concretas.

Proteínas de *S. suis* que poseen capacidad de unión a moléculas específicas como la galactosa, la N-acetilgalactosamina y el ácido siálico han sido identificadas por inhibición de la hemaglutinación (Kurl *et al.*, 1989). De esta forma se ha descrito la presencia de una hemaglutinina altamente inmunogénica, denominada adhesina P, presente en todas las cepas de *S. suis* examinadas (Tikkanen *et al.*, 1996).

Por otra parte, se ha demostrado también la capacidad de unión de *S. suis* a la fibronectina y al fibrinógeno humanos gracias a las FBPs (*Fibronectin/fibrinogen Binding Proteins*), así como el papel que estas proteínas desempeñan en la colonización de los órganos específicos afectados por la infección de *S. suis* (de Greeff *et al.*, 2002). Recientemente se ha caracterizado una α -enolasa, presente en la superficie celular de *S. suis*, con la capacidad de unir fibrinógeno y plasminógeno (Esgleas *et al.*, 2008).

Todas las cepas examinadas de *S. suis* presentan una proteína asociada a la pared de 52 kDa (kilodaltons) capaz de unir IgG. Esta proteína puede interactuar con una gran variedad de IgGs de mamíferos, además de IgA humana y otras proteínas plasmáticas (Serhir *et al.*, 1995). Se cree que estas uniones permiten a *S. suis* escapar de las defensas naturales del hospedador.

Las fimbrias son importantes para la adhesión de las bacterias a las superficies, sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en las bacterias gramnegativas, en muy pocas bacterias grampositivas se ha detectado su presencia (Beachey, 1981). A pesar de ello, se ha descrito una corta y delgada fimbria en la superficie de *S. suis*, la cual se ha relacionado con la adherencia y con la hemaglutinación, aunque se ha observado una fimbria morfológicamente similar, tanto en cepas hemaglutinantes como en las que no lo son (Gottschalk *et al.*, 1990).

iv) Hemolisina (suilisina)

La actividad de la hemolisina, que en el caso particular de *S. suis* se denomina suilisina (homóloga a la hemolisina S), está asociada a la virulencia y a la patogenicidad de varias especies bacterianas, jugando un papel fundamental en la diseminación de *S. suis* y en la respuesta inflamatoria del hospedador (Segura y Gottschalk, 2004).

La suilisina está codificada en el gen *sly* de *S. suis* y es una hemolisina activada por tiol, ya que presenta características típicas de esta familia de toxinas, como la pérdida de la actividad en presencia de oxígeno, la reactivación bajo condiciones de reducción, la inhibición por la unión de colesterol y la formación de poros transmembranales (Jacobs *et al.*, 1994; Gottschalk *et al.*, 1995). Esta hemolisina presenta una alta homología genética con la pneumolisina y la citolisina de *Streptococcus pneumoniae* (Segers *et al.*, 1998). El gen *sly* se encuentra presente en la mayoría de serotipos de *S. suis* (Okwumabua *et al.*, 1999) y se ha sugerido que pudo ser adquirido por transferencia horizontal y recombinación homóloga a partir de otras especies bacterianas (Takamatsu *et al.*, 2001b).

Aunque anticuerpos contra la suilisina confieren protección ante la infección provocada por *S. suis* en los modelos animales de ratón y cerdo (Jacobs *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*,

1996), la presencia de cepas virulentas deficientes en la suilisina indica que esta hemolisina no es un factor de virulencia esencial para este patógeno. De hecho, la cepa de origen norteamericano y virulenta 89/1591 carece de ella, mientras que sí se encuentra en la cepa europea P1/7, también virulenta.

v) Hialuronidasas

La hialuronidasa o hialuronato liasa de *S. suis* es una proteína de secreción que degrada el ácido hialurónico, un polisacárido de alto peso molecular que representa el principal componente polisacárido del tejido conectivo (Laurent y Fraser, 1992). El gen que codifica esta enzima, *hyl*, ha sido identificado en todas las cepas de *S. suis* estudiadas. Sin embargo, su actividad enzimática ha sido detectada en menos de un 30% de las cepas estudiadas de este patógeno (King *et al.*, 2004). Existe una llamativa ausencia de actividad de esta enzima en la mayoría de los aislados invasivos de *S. suis*, lo cual sugiere que esta proteína no es un factor de virulencia crucial, aunque su actividad se encuentra presente en un gran número de aislados asociados a neumonía (King *et al.*, 2004).

vi) Bacteriocinas

Las bacteriocinas son un heterogéneo grupo de péptidos con propiedades antimicrobianas caracterizado por su capacidad de inhibir el crecimiento de otras cepas de microorganismos relacionados o no con las bacterias que las producen, además de poseer un papel fundamental en los sistemas de defensa de varias especies bacterianas (Jack *et al.*, 1995). Se han detectado moléculas similares a las bacteriocinas en cepas del serotipo 2 de *S. suis* aisladas de cerdos enfermos, observándose que sus niveles de secreción son máximos alrededor de la mitad de la fase de crecimiento exponencial y que, asimismo, son capaces de actuar contra diferentes cepas de su misma especie (Mélançon y Grenier, 2003).

vii) Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima antioxidante que convierte los aniones superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno para que puedan ser

metabolizados por las catalasas y las peroxidasas. Estas enzimas constituyen uno de los más importantes mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, hecho que las convierte en posibles factores de virulencia para ciertas bacterias (Segura y Gottschalk, 2004). La presencia de un gen que codifica la superóxido dismutasa, así como su actividad, han sido identificadas en *S. suis* (Poyart *et al.*, 1998). El superóxido es la mayor sustancia antibacteriana presente en los fagolisosomas de los macrófagos y la capacidad de secretar esta enzima podría ser importante en la virulencia. No obstante, no se ha observado correlación entre actividad SOD y virulencia, por lo que es poco probable que esta enzima tenga un papel fundamental en la supervivencia intracelular de *S. suis* en los macrófagos (Langford *et al.*, 1991).

viii) Proteasas

Las enzimas proteolíticas han sido identificadas como importantes factores de virulencia en numerosas bacterias patógenas. Las proteasas bacterianas tienen la capacidad potencial de destruir proteínas estructurales y funcionales que constituyen los tejidos del hospedador, así como proteínas que participan en la defensa de éste. Se han identificado varias proteasas en *S. suis* que pueden ser útiles para alcanzar sus requerimientos nutricionales y también para neutralizar las defensas del hospedador, además de contribuir a la invasión y destrucción de sus tejidos (Jobin y Grenier, 2003).

ix) Proteínas de respuesta al estrés

En general, las proteínas de respuesta al estrés pertenecen a una familia de proteínas esenciales que son sintetizadas por una gran cantidad de microorganismos. Después de una situación de estrés celular, protegen contra la desnaturalización actuando como chaperoninas o proteínas acompañantes. Estas proteínas se encuentran reguladas positivamente en respuesta a diferentes formas de estrés celular y, tanto en cepas virulentas como en no virulentas de *S. suis* del serotipo 2, se ha identificado una proteína de respuesta al estrés de 60 kDa (Benkirane *et al.*, 1997).

x) Sortasas

Muchas proteínas celulares presentes en la superficie de las bacterias grampositivas están covalentemente ancladas a la pared celular mediante un mecanismo que requiere un motivo C-terminal “LPXTG” (leucina-prolina-X-treonina-glicina) donde “X” puede ser cualquier aminoácido (Fischetti *et al.*, 1990). Tras el reconocimiento de esta secuencia y después del procesamiento de la proteína, ésta se une a un grupo amino del peptidoglicano, mediante una enzima denominada sortasa. Esta proteína se encuentra codificada en el gen *srtA* en numerosas especies de bacterias grampositivas y se encarga de unir covalentemente proteínas a la pared celular, como por ejemplo las adhesinas. La inactivación del gen *srtA* en *Staphylococcus aureus* disminuye la virulencia debido a que afecta el anclaje de las proteínas implicadas en la adhesión, en la resistencia a la fagocitosis y en la invasión de las células hospedadoras (Mazmanian *et al.*, 2000). En el caso de *S. suis*, existen evidencias de que en el sistema de anclaje de proteínas a la pared celular también participa la sortasa (Osaki *et al.*, 2002).

1.1.4. Patogenia

De los más de 30 serotipos descritos de *S. suis*, el número 2 es el más aislado de cerdos enfermos, aunque cepas pertenecientes a otros serotipos también pueden causar enfermedad. *S. suis* es uno de los principales patógenos porcinos, responsable de grandes pérdidas económicas en el sector ganadero a nivel mundial; causando artritis, meningitis, neumonía, septicemia y endocarditis (Staats *et al.*, 1997). Se han hallado factores de predisposición a la infección por *S. suis* en animales criados bajo condiciones de insalubridad. Además, la situación puede agravarse si los animales están sometidos a condiciones de estrés, lo que puede conducir a una inmunosupresión.

La patogénesis de las infecciones causadas por *S. suis* es aun, en gran parte, desconocida y, además, los estudios realizados hasta el presente se han limitado al serotipo 2 y conciernen mayoritariamente al desarrollo de la meningitis (Vanier *et al.*, 2004; Gottschalk y Segura, 2000).

Durante el parto, los cochinitos adquieren *S. suis* mediante transmisión vertical desde la madre. *S. suis* se transmite por vía respiratoria y permanece localizado en las amígdalas palatinas. Algunos animales son portadores sanos y nunca desarrollan la enfermedad, mientras que otros, antes o después, acaban desarrollando bacteriemias, que pueden ocasionar septicemia y finalmente meningitis. La enfermedad se desarrolla normalmente en cerdos jóvenes de menos de 16 semanas, siendo más frecuente en animales de 3 a 12 semanas de edad (Reams *et al.*, 1996).

Las fases fundamentales del desarrollo de la enfermedad son: colonización e invasión del epitelio respiratorio, diseminación en sangre y penetración a través de la barrera endotelial de los tejidos diana (Chanter *et al.*, 1993; Gottschalk y Segura, 2000). *S. suis* coloniza el tracto respiratorio superior gracias a estructuras como las adhesinas. Para acceder a los tejidos profundos debe invadir el epitelio respiratorio a través de las células, o bien de las uniones intercelulares. Existen algunos estudios preliminares que describen que *S. suis* puede invadir células HEP-2, una línea celular obtenida a partir del epitelio laríngeo, aunque no existen demasiados datos que soporten contundentemente esta hipótesis (Norton *et al.*, 1999). Alternativamente, *S. suis* podría abrirse paso entre las uniones intercelulares de manera similar al modelo propuesto para *Streptococcus pyogenes*, en el que la reorganización del citoesqueleto del hospedador, promovida por el patógeno, permitiría la invasión (Cywes y Wessels, 2001). De cualquier forma, lo que sí parece claro es el efecto de algunos factores de virulencia que contribuirían al proceso de invasión, como por ejemplo la hialuronidasa.

En cuanto a la diseminación a través del torrente sanguíneo, existen también diversas hipótesis. La primera propuesta es la conocida como *Trojan horse theory*, que sugiere que *S. suis* sería fagocitado por los macrófagos y gracias a su capacidad de supervivencia intracelular podría invadir el sistema nervioso central (Williams y Blackmore, 1990). Esta captación de *S. suis* también podría tener lugar por los macrófagos de las amígdalas. En cualquier caso, se ha observado que tras la fagocitosis de *S. suis*, gran parte de la población de este patógeno se encuentra libre en sangre. Además, la cápsula confiere resistencia a la fagocitosis y la ausencia de ésta provoca la destrucción del patógeno tras la fagocitosis. Todo esto ha llevado a proponer otras hipótesis entre las que se incluye la posibilidad de que *S. suis* viaje libre por el torrente sanguíneo (Smith *et al.*, 1996; Charland *et al.*, 1998). Por último, la denominada

Modified Trojan horse theory, se basa en la observación de un alto nivel de adherencia de *S. suis* a los macrófagos (sin fagocitosis), y defiende que la bacteria podría viajar en sangre unida a los macrófagos, causando de esta manera una persistente bacteriemia con una consecuente diseminación de la infección (Gottschalk y Segura, 2000).

De una u otra forma, *S. suis* es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, llegando al espacio subaracnoideo. Una vez en el líquido cefalorraquídeo, estimula la producción de citocinas, conllevando una potente respuesta inflamatoria que provoca un infiltrado de células sanguíneas hacia el sistema nervioso central (Chanter *et al.*, 1993). El incremento del infiltrado celular en el líquido cefalorraquídeo puede aumentar la presión intracraneal desencadenando un extenso daño neuronal, provocado por la intensa reacción inflamatoria a nivel meníngeo.

El primer caso de infección documentado de *S. suis* en humanos se describió en 1968 en Dinamarca (Arends y Zanen, 1988). La infección de *S. suis* en humanos ocurre principalmente en ciertos grupos de riesgo que están frecuentemente en contacto con los cerdos. La enfermedad en humanos es poco común, aunque en los últimos años se han producido varios brotes en China. El mayor brote en humanos ocurrió en el año 2005 en la provincia de Sichuan (China), donde 215 personas se infectaron y 39 de ellas murieron (Yu *et al.*, 2006). En total, hay documentados alrededor de 400 casos de infección por *S. suis* en humanos en China, Tailandia y Países Bajos, en los que fallecieron 73 personas (Lun *et al.*, 2007).

Las infecciones en humanos se manifiestan frecuentemente con meningitis purulenta, aunque también ha sido descrito el choque séptico con fallo multiorgánico, endocarditis, neumonía, artritis y peritonitis. La sordera es la secuela más común después de la recuperación de una meningitis en humanos. Recientemente, se ha reconocido a *S. suis* como un nuevo agente etiológico del síndrome del choque tóxico, originariamente sólo asociado a *Streptococcus pyogenes* dentro del género de los estreptococos (Chen *et al.*, 2007). La infección humana está directamente relacionada con el contacto directo con los animales portadores o enfermos, siendo la frecuencia de infección hasta 1500 veces mayor en este grupo de personas con respecto a la población general (Arends y Zanen, 1988).

1.2. Transporte de cationes a través de la pared celular y de la membrana citoplasmática

1.2.1. La pared celular bacteriana

Las bacterias poseen paredes celulares que, además de ser responsables de la forma y rigidez de las células, les permiten resistir la considerable presión a la que están sometidas a causa de la alta concentración de solutos disueltos en el interior de su citoplasma. Debido a las diferencias estructurales de las paredes celulares entre las bacterias gramnegativas y las bacterias grampositivas, existen ciertas disimilitudes en el transporte de iones y de otras moléculas.

La pared celular de las bacterias gramnegativas consta de una bicapa lipídica, conocida como membrana externa. Esta membrana junto con la membrana citoplasmática (también llamada membrana interna en las bacterias gramnegativas) delimita el denominado espacio periplásmico o periplasma, en el que se encuentra el peptidoglicano, que constituye sólo el 10% de la pared celular. En cambio, las bacterias grampositivas carecen de membrana externa y el peptidoglicano representa entre el 40% y el 90% de la pared celular (Rogers, 1970).

El peptidoglicano (o mureína) constituye una capa rígida que es la responsable de la resistencia de la pared celular. Esta rígida capa tiene una composición química similar en las bacterias grampositivas y en las gramnegativas. Básicamente, está formada por finas láminas compuestas por dos aminoazúcares: N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, y un pequeño grupo de aminoácidos. Estos compuestos se unen entre sí para formar una estructura repetitiva que se denomina tetrapéptido de glicano.

La tinción de Gram, desarrollada por el médico danés Hans Christian Joachim Gram en 1884, pone de manifiesto las diferencias estructurales entre las bacterias grampositivas y gramnegativas, siendo, desde hace ya mucho tiempo, un dato fundamental en la identificación bacteriana. La reacción se basa en la retención de un complejo cristal violeta-yodo insoluble en el citoplasma de las bacterias grampositivas después del lavado con etanol. Sin embargo, en las bacterias gramnegativas, este complejo se pierde

tras el lavado con etanol, por lo que las bacterias se han de contrastar mediante un colorante como la safranina. Estas diferencias se deben a que el etanol deshidrata las paredes celulares de las bacterias grampositivas ya que presentan varias capas de peptidoglicano, provocando el cierre de los poros de las paredes e impidiendo el escape del complejo insoluble. En cambio, en las bacterias gramnegativas, el alcohol penetra rápidamente a través de la capa externa, muy rica en lípidos, sin que la fina capa de peptidoglicano evite el paso del solvente, permitiendo de esta manera la eliminación del complejo insoluble.

Las bacterias grampositivas presentan polialcoholes en su pared celular, a los que se les denomina ácidos teicoicos (Fig. 2), los cuales están compuestos por fosfato de glicerol o de ribitol, unidos por ésteres de fosfato, y que contienen residuos de glúcidos y aminoácidos. Estos polialcoholes pueden estar unidos covalentemente al ácido N-acetilmurámico del peptidoglicano o bien a los lípidos de la membrana citoplasmática, constituyendo los ácidos lipoteicoicos. La principal función de los ácidos teicoicos es la de dar soporte estructural a la pared celular, además de aportar una carga neta negativa a la superficie celular.

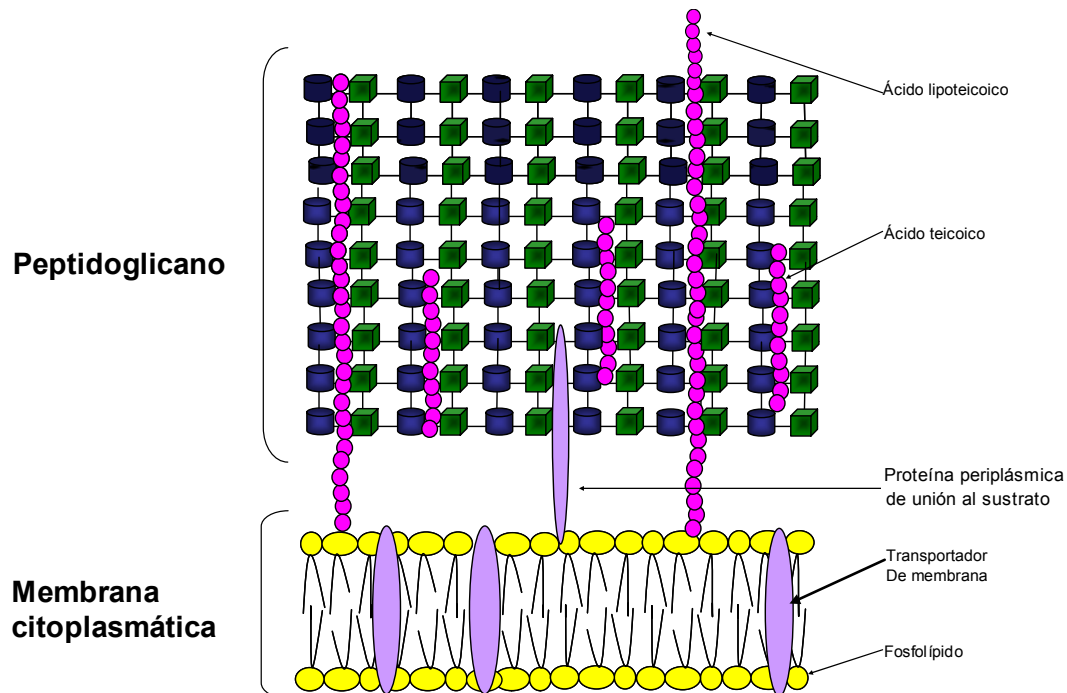


Fig. 2. Estructura de la pared celular de las bacterias grampositivas.

Las bacterias gramnegativas carecen de ácidos teicoicos pero presentan una membrana externa que constituye una segunda bicapa lipídica que presenta polisacáridos y OMPs (*Outer Membrane Proteins*), entre las que destacan las porinas (Beveridge, 1999) (Fig. 3). Los lípidos y los polisacáridos están tan estrechamente unidos en la membrana externa que forman estructuras lipopolisacáridas específicas que contribuyen a la integridad estructural de la pared bacteriana. La parte lipídica del lipopolisacárido (LPS) se conoce como “lípidos A” y suele ser una potente endotoxina para los animales, mientras que la parte polisacárida se divide en dos secciones: el núcleo (más interno) y la cadena O (altamente inmunogénica). Cabe señalar también la presencia de lipoproteínas cuya función es la de unir la membrana externa con el peptidoglicano, situado en el espacio periplásmico. El periplasma contiene varios tipos de proteínas, entre ellas: (i) enzimas hidrolíticas, que llevan a cabo la degradación inicial de algunos tipos de nutrientes, (ii) quimiorreceptores, que son proteínas implicadas en las respuestas quimiotácticas y (iii) proteínas periplásmicas de unión al sustrato, que como se explicará más adelante, participan en el proceso de transporte. Todas estas proteínas alcanzan el periplasma a través de los sistemas de secreción situados en la membrana citoplasmática.

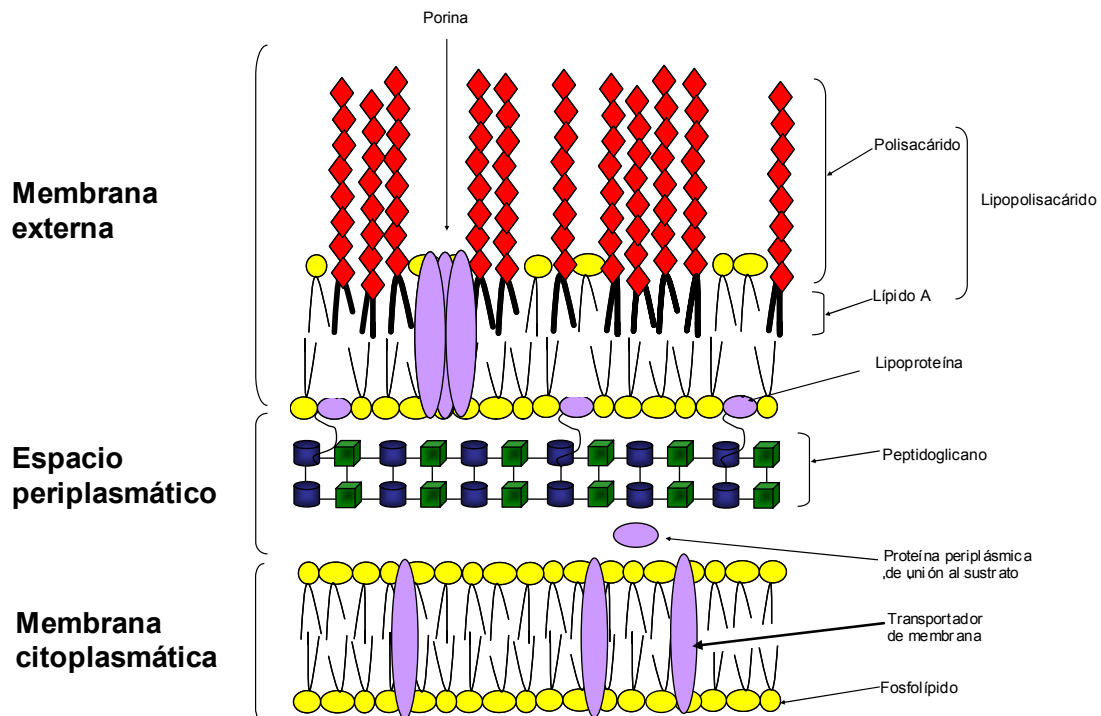


Fig. 3. Estructura de la pared celular de las bacterias gramnegativas.

La mayoría de las bacterias grampositivas no presentan un espacio periplásmico claramente definido como ocurre en las bacterias gramnegativas, por lo que se ha sugerido que el periplasma de estas bacterias podría encontrarse sumergido entre los polímeros de la pared celular (Beveridge y Graham, 1991; Beveridge, 1999; Beveridge *et al.*, 2000). Esta interdigitación de las proteínas periplásmicas con los componentes de la pared celular podría tener un profundo efecto en la distribución y conformación de los polímeros que la conforman. No obstante, estudios recientes han puesto de manifiesto, mediante técnicas de crioelectromicroscopía, la existencia de un espacio periplásmico que se encuentra entre la membrana citoplasmática y la gruesa capa de peptidoglicano en algunas bacterias grampositivas (Valério y Beveridge, 2005).

1.2.2. Generalidades sobre el transporte a través de membranas

Las características hidrofóbicas de la membrana citoplasmática le permiten funcionar como una barrera de permeabilidad, evitando la pérdida pasiva de componentes del citoplasma y la entrada indiscriminada de constituyentes. Sin embargo, algunas pequeñas moléculas hidrofóbicas pueden atravesar la membrana por difusión simple (transporte pasivo) siempre que sean transportadas a favor de su gradiente de concentración, mientras que las moléculas hidrofílicas y las que presentan carga eléctrica no la atraviesan y deben ser transportadas de un modo específico. Así pues, las membranas celulares son permeables a las moléculas pequeñas no polares tales como el oxígeno o el dióxido de carbono y a algunas pequeñas moléculas polares no cargadas como el etanol o el ácido acético. Por el contrario, las bicapas lipídicas son altamente impermeables a todas las moléculas cargadas, por muy pequeñas que sean. La carga y el elevado grado de hidratación de tales moléculas, les impiden penetrar en la fase hidrocarbonada de la bicapa. Una molécula que atraviesa la membrana por difusión simple es el agua, que es lo suficientemente pequeña como para pasar entre las moléculas de fosfolípidos. Sin embargo, el transporte del agua a través de la membrana puede acelerarse a través de las aquaporinas. Estas proteínas forman canales transmembranales que transportan específicamente el agua al interior y al exterior del citoplasma de manera pasiva, sin gasto de energía, mediante la difusión facilitada (Borgnia y Agre, 2001).

La mayoría de sustancias no son capaces de entrar en la célula de modo pasivo, por lo que los procesos de transporte resultan esenciales para el funcionamiento celular. Por tanto, se requiere la presencia de ciertas proteínas para transportar moléculas polares e iones a través de las membranas celulares. Dichas proteínas permiten a estas moléculas cruzar la membrana sin interactuar directamente con su interior hidrofóbico (Anderson, 1978; Finkelstein, 1984; Walter y Gutknecht, 1986). Estas proteínas son capaces de transportar sustancias en contra de su gradiente de concentración. La función de estos transportadores es acumular sustancias a concentraciones superiores a las del medio externo. Una característica importante del transporte mediado por transportadores es la naturaleza altamente específica de este proceso. Muchas proteínas transportadoras reconocen solamente un único tipo de molécula, mientras que otras muestran distintas afinidades para una clase química determinada de moléculas. Existen diversos sistemas de transporte, desde los más simples, aquellos que comprenden una sola proteína transmembranal; hasta los más complejos, que son los que implican una serie de proteínas que cooperan en el proceso de transporte, pudiendo llegar incluso a modificar químicamente (mediante fosforilación, por ejemplo) la sustancia transportada. Todos estos sistemas requieren energía, bien sea en forma de fuerza motriz de protones, de ATP o de algún otro compuesto de alta energía.

A diferencia de la membrana citoplasmática, la membrana externa de las bacterias gramnegativas es relativamente permeable a pequeñas moléculas pese a ser básicamente una bicapa lipídica. Esto se debe a la presencia en la membrana externa de las porinas, proteínas que actúan como canales para la entrada y la salida de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular. Los cationes divalentes difunden libremente por difusión facilitada (gracias a las porinas) a través de la membrana externa y del periplasma de las bacterias gramnegativas. Sin embargo, para introducirlos en el citoplasma celular es necesaria su internalización a través de la membrana citoplasmática (Köster, 2001). Lo mismo ocurre en las bacterias grampositivas, que aunque carecen de membrana externa, deben internalizar los iones directamente desde su particular región periplásmica, ya que la porosa estructura del peptidoglicano permite que los solutos solubles en el agua se desplacen por difusión simple a través de él. Además, la carga negativa de la superficie celular aportada por la presencia de los ácidos teicoicos de la pared celular de las bacterias grampositivas contribuye al transporte de cationes a través de ella.

1.2.3. Transporte de cationes a través de la membrana citoplasmática

El control del paso a través de la membrana citoplasmática es el nivel clave para el mantenimiento de la homeostasis de los metales, tanto en condiciones de carencia, como de exceso. Para ello, las células disponen de numerosas familias de transportadores que controlan la expulsión e incorporación de estos micronutrientes, en numerosas ocasiones, con gran especificidad. Asimismo, el hecho de que casi todos estos transportadores se encuentren en la mayoría de los seres vivos, pone de manifiesto que ya en los orígenes de la evolución celular, se hizo necesario el desarrollo de mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis de metales. Cabe señalar, como se verá más adelante, que ciertas familias de transportadores no están exclusivamente limitadas a la importación o exportación de los iones, sino que pueden participar activamente en un sentido u otro, dependiendo de la disponibilidad o carencia de estas moléculas.

1.2.3.1. Importación de cationes

Todas las células, tanto las procariotas como las eucariotas, presentan diversos sistemas de transporte en sus membranas involucrados en la captación de nutrientes esenciales. A continuación se presentan las principales familias de transportadores que participan en la captación de iones:

i) Transportadores ABC

Los sistemas de transportadores de tipo ABC (*ATP Binding Cassette*), utilizan la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP para transportar sustratos a través de las membranas celulares. Típicamente, estos sistemas son específicos para un determinado ligando como iones inorgánicos, aminoácidos, glúcidos o polipéptidos, entre otros (Higgins, 1992). Estos transportadores están presentes en todos los organismos vivos y comprenden una de las familias más grandes de proteínas. De hecho, aproximadamente el 5% de los genomas de *Escherichia coli* y de *Bacillus subtilis* se encargan sólo de codificar los componentes de este tipo de transportadores (Linton y Higgins, 1998; Young y Holland, 1999).

En procariotas se han identificado centenares de sistemas de transporte ABC, y en cada caso, los análisis de la estructura de los componentes relacionados funcionalmente ponen de manifiesto que forman una familia de proteínas homólogas. Todos ellos están compuestos por sistemas con una organización estructural similar, incluyendo al menos una proteína periplásmica de unión al ligando y un componente translocador. Éste último consta de un elemento transmembranal localizado en la membrana citoplasmática y de un elemento asociado a la cara interna de la membrana citoplasmática que contiene algún dominio (o casete) de unión al ATP (Fath y Kolter, 1993).

El componente translocador de los transportadores ABC está formado por dos dominios transmembrana y dos dominios de unión al ATP intracelulares (Fig. 4). Cada uno de los dominios transmembrana consta de múltiples hélices- α (generalmente seis) que se expanden a través de la membrana citoplasmática, constituyendo el canal transmembranal a través del cual las sustancias transportadas atraviesan la membrana citoplasmática (Higgins, 1992). Las subunidades individuales pueden expresarse como polipéptidos separados o bien fusionados en cualquier combinación. En bacterias es más común encontrar homodímeros de moléculas que poseen un dominio transmembranal y un dominio de unión al ATP, mientras que en mamíferos existen transportadores ABC que contienen los cuatro dominios fusionados en un único polipéptido.

En procariotas, los transportadores ABC involucrados en la captación de solutos, emplean una proteína periplásmica de unión al ligando. Estas proteínas, denominadas SBPs (*Substrate-Binding Proteins*), fueron identificadas en las bacterias gramnegativas, donde residen de forma soluble en el espacio periplásmico o ancladas a la membrana citoplasmática (Ames, 1986). Una propiedad importante de estos sistemas de transporte es precisamente la elevada afinidad de estas proteínas de unión por sus respectivos sustratos, ya que son capaces de unirlos incluso cuando éstos están presentes en muy bajas concentraciones. Estas proteínas actúan como lanzadera, en las bacterias gramnegativas recogen el sustrato liberado del receptor de la membrana externa y lo transfirieren al componente transmembranal correspondiente de la membrana interna. Así, tras la unión del sustrato a la proteína correspondiente, el complejo interacciona con el componente transmembranal respectivo teniendo lugar el transporte hacia el citoplasma, gracias a la energía liberada por la hidrólisis del ATP. Cabe señalar que en

las bacterias grampositivas y en las *Archaea*, las proteínas periplásmicas de unión al sustrato son en realidad lipoproteínas con un característico lípido N-terminal anclado en la superficie exterior de la membrana citoplasmática (Gilson *et al.*, 1988; Sutcliffe y Russell, 1995; Albers *et al.*, 1999).

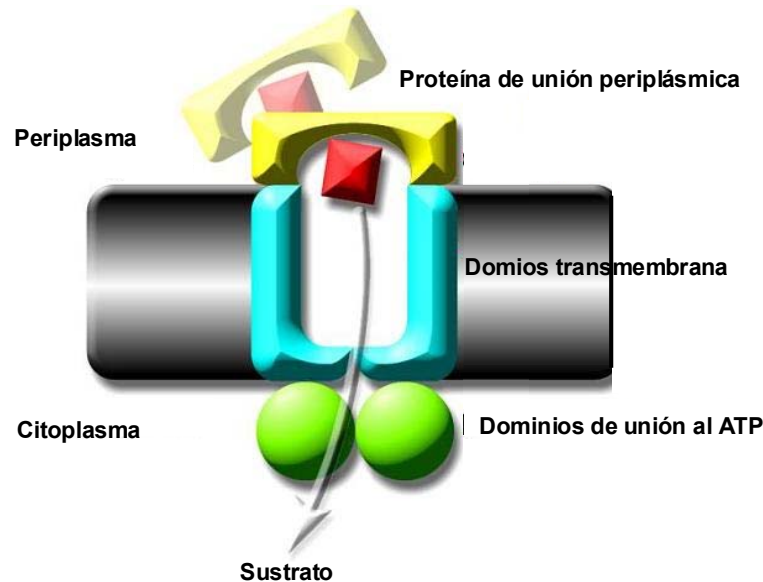


Fig. 4. Representación esquemática de un transportador de tipo ABC. Imagen modificada de: http://moose.bio.ucalgary.ca/index.php?page=CK_Projects.

ii) Transportadores ZIP

Todos los transportadores ZIP (*Zrt-*, *Irt-like Protein*) caracterizados hasta la fecha introducen cationes divalentes en el citoplasma. Estos transportadores parecen estar codificados por familias multigénicas, lo que sugiere que cada uno de ellos tiene una función específica que justifica su mantenimiento a lo largo de la evolución (Gaither y Eide, 2001). La naturaleza exacta del ión que transportan puede ser muy diversa, así como su especificidad, pero típicamente incluyen Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} (Eide *et al.*, 1996; Zhao y Eide, 1996; Korshunova *et al.*, 1999), aunque también pueden transportar cationes no esenciales como el Cd^{2+} (Weber *et al.*, 2004). La función de estos transportadores está orientada hacia la absorción de micronutrientes esenciales del medio exterior.

Los miembros de esta familia de transportadores deben su nombre a los dos primeros descritos: Irt1 (*Iron responsive transporter 1*) de *Arabidopsis thaliana* (Eide *et al.*,

1996) y Zrt1 (*Zinc responsive transporter 1*) de *Saccharomyces cerevisiae* (Zhao y Eide, 1996). Los transportadores ZIP presentan ocho dominios transmembrana, siendo los extremos N- y C-terminal extracitoplasmáticos (Fig. 5). Entre los pasos de membrana se forman bucles de diferente extensión, el mayor de ellos, localizado entre el tercer y cuarto dominio transmembrana, se caracteriza porque presenta una secuencia (histidina-X)₃₋₅ que podría estar involucrada en la captación del catión a transportar. Entre el segundo y tercer paso de membrana se encuentran bucles de menor extensión, aunque también importantes ya que, al menos en Irt1, se localizan los aminoácidos que determinan la especificidad por el sustrato. Por último, el bucle formado por los pasos de membrana cuarto y quinto podría estar implicados en la formación del canal por el cual se introducirían los cationes en el citoplasma (Rogers *et al.*, 2000).

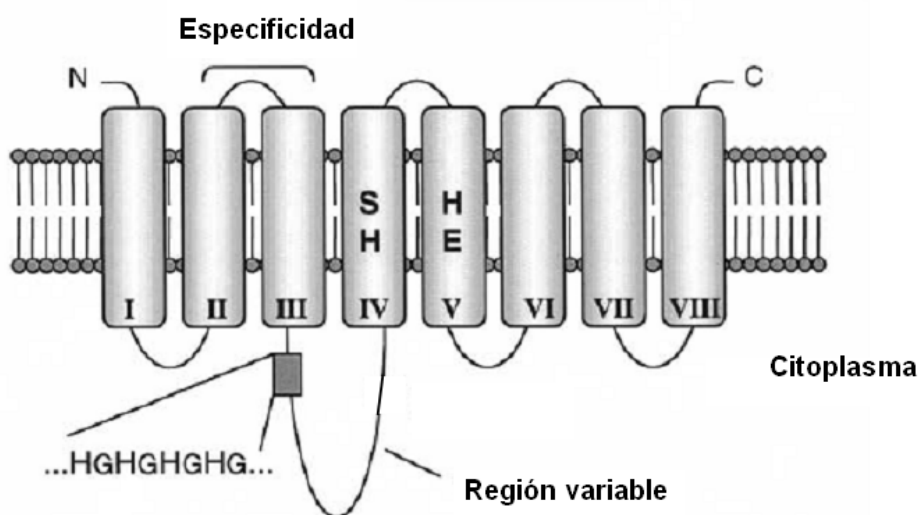


Fig. 5. Topología de membrana predicha para el transportador ZIP Irt1. Se indican los residuos conservados y funcionalmente importantes (dominios IV y V). También se muestra la localización de la región rica en histidinas potencialmente implicada en la unión de metales y la región con especificidad de sustrato. H: histidina, G: glicina, S: serina, E: glutamato. Figura modificada de Gaither y Eide (2001).

En cuanto a la utilización de energía, estos transportadores están acoplados a un gradiente iónico. El mejor conocido es el Zrt3 de *S. cerevisiae*, cuya capacidad de transportar Zn^{2+} depende del antiporte de un protón (MacDiarmid *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha observado que otros transportadores ZIP pueden estar acoplados a un simporte de carbonato (Gaither y Eide, 2000) e incluso a un antiporte de sodio o potasio (Gaither y Eide, 2001).

iii) Transportadores NRAMP

El nombre de la familia de transportadores NRAMP (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein*) viene determinado por el primer miembro identificado, Nramp1. Éste es un transportador presente en las células de los mamíferos, asociado a la membrana del endosoma/lisosoma, cuya función parece ser controlar el crecimiento de las bacterias fagocitadas modificando la concentración de cationes divalentes en el fagosoma (Govoni *et al.*, 1995). Además, se ha demostrado que los genes *nramp* codifican transportadores altamente selectivos para el Mn^{2+} , que juega un papel fundamental en la respuesta al estrés oxidativo (Kehres *et al.*, 2000).

Aunque estos transportadores se describieron por primera vez en mamíferos, también han sido identificados miembros de esta familia proteica en bacterias, presentando una similitud del 35% con proteínas Nramp de eucariotas (Cellier *et al.*, 2001). Así, se han descrito los transportadores MntH (*proton (H^+)-coupled manganese transport*), acoplados a un gradiente iónico. Estos transportadores se han identificado en numerosas especies bacterianas como *Bacillus subtilis* (Que y Helmann, 2000), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Kehres *et al.*, 2000) y *E. coli* (Makui *et al.*, 2000), entre otras, presentando una gran afinidad por el transporte de Mn^{2+} .

El análisis de las secuencias de las proteínas NRAMP revela la presencia de al menos 10 dominios transmembranales formados por segmentos hidrofóbicos, mostrando un alto grado de conservación que incluye la presencia de residuos cargados positivamente (Fig. 6). La carga neta positiva de los dominios hidrofílicos formaría bucles situados en el interior citoplasmático. Además, se ha identificado una posible señal de glicosilación que se situaría en uno de los bucles extracitoplasmático y un posible motivo de transporte conservado.

La función de estos transportadores está ligada, en general, al aumento de cationes divalentes en el citoplasma, especialmente de Mn^{2+} y de Fe^{2+} , aunque también pueden transportar Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} o Ni^{2+} (Portnoy *et al.*, 2000; Delhaize *et al.*, 2003; Agranoff *et al.* 2005).

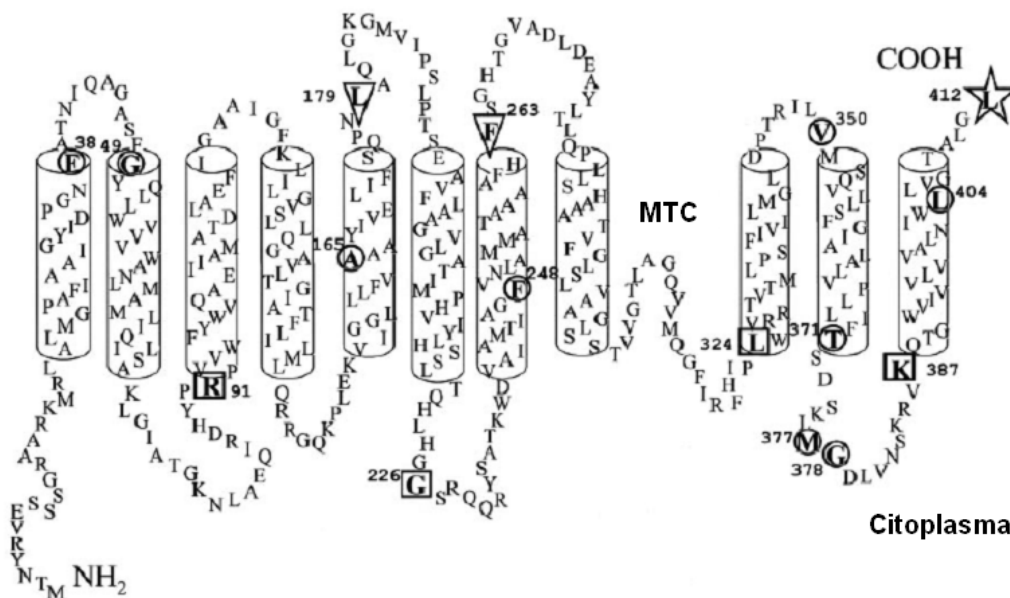


Fig. 6. Topología transmembrana de la secuencia consenso del transportador MntH de *E. coli*. Los números corresponden a las posiciones de los residuos aminoacídicos. MTC indica la localización del Motivo de Transporte Conservado. Imagen modificada de Courville *et al.* (2004).

1.2.3.2. Exportación de cationes

Gracias a las técnicas de clonación y de secuenciación, en los últimos años se ha identificado un gran número de transportadores. Entre ellos destacan las bombas de expulsión, que son sistemas proteicos que bombean con una gran eficacia compuestos nocivos hacia el exterior del citoplasma, manteniendo así concentraciones intracelulares no tóxicas de estos compuestos. A continuación, se presentan las familias de transportadores más importantes implicados en el transporte de metales hacia el exterior celular:

i) Bombas MDR: los transportadores RND

Las bombas denominadas MDRs (*Multiple Drug Resistance*), se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo bacteriano, son proteínas que tienen la capacidad de extraer fuera de la célula una gran variedad de sustancias no relacionadas. Un gran número de estudios ha demostrado que estas bombas de expulsión son un mecanismo de resistencia a antimicrobianos que se encuentran presentes en gran variedad de

microorganismos, por lo que la evolución los ha dotado con sistemas que les permiten sobrevivir en ambientes tóxicos (Zgurskaya, 2002). Existen varias familias de proteínas MDR, entre las que se incluyen los transportadores ABC, cuya principal función es la expulsión de antimicrobianos y sustancias nocivas como el exceso de metales. No obstante, en este apartado se hablará de la familia RND (*Resistance Nodulation Division*), que constituye una importante familia de transportadores que, además de excretar antibióticos, tienen la capacidad de expulsar zinc, cobalto o cadmio cuando éstos se encuentran en exceso. La organización estructural de las bombas MDR es diferente en bacterias gramnegativas y grampositivas debido, principalmente, a las diferencias estructurales de estos dos grandes grupos. En las bacterias gramnegativas los transportadores se estructuran en sistemas multicomponentes, siendo las bombas de expulsión más frecuentes las pertenecientes a la familia RND. En cambio, en las bacterias grampositivas, las bombas de expulsión presentan una organización más sencilla, con un único componente situado en la membrana citoplasmática. De hecho, la familia de proteínas RND ha sido caracterizada sólo en bacterias gramnegativas, aunque en bacterias grampositivas se han encontrado proteínas que presentan similitud con miembros de esta familia de proteínas (Tsuge *et al.*, 2001).

La familia de proteínas RND fue originariamente descrita como un grupo de proteínas transportadoras involucradas en la resistencia a los metales pesados (*Wautersia metallidurans*), la nodulación (*Mesorhizobium loti*) y la división celular (*E. coli*) (Saier *et al.*, 1994). Los transportadores RND son proteínas que presentan una diversa especificidad por diferentes sustratos y, por tanto, distintos papeles fisiológicos. Sin embargo, estos transportadores no utilizan como fuente de energía la hidrólisis del ATP, sino el movimiento de protones generado por el gradiente electroquímico de la membrana (Higgins, 2007). Esta familia de proteínas consta de tres componentes que se distribuyen entre la membrana citoplasmática y la membrana externa de las bacterias gramnegativas formando un sofisticado sistema de exportación que protege al citoplasma y al espacio periplásmico de sustancias nocivas como los antibióticos o el exceso de metales (Fig. 7). Como la membrana externa no es capaz de mantener un gradiente electroquímico ni tiene acceso al ATP, la energía requerida proviene de proteínas localizadas en la membrana citoplasmática.

La presencia de la membrana externa en las bacterias gramnegativas ha condicionado la estructura de los sistemas RND. Para que el transporte sea efectivo es necesario atravesar la membrana citoplasmática, el espacio periplásmico y la membrana externa. Esto se consigue mediante un sistema de bombeo multicomponente que suele estar constituido por tres elementos: (i) una proteína transportadora en la membrana interna que está acoplada al potencial de membrana, (ii) una proteína periplásmica unida a las membranas interna y externa y (iii) una proteína de membrana externa (OMP) que forma un canal en dicha membrana (Paulsen *et al.*, 1996).

El transportador situado en la membrana citoplasmática captura su sustrato desde la cara interna de la membrana citoplasmática, transportándola hacia el medio externo gracias a la proteína localizada en la membrana externa. La proteína periplásmica posibilita la cooperación entre estas dos proteínas.

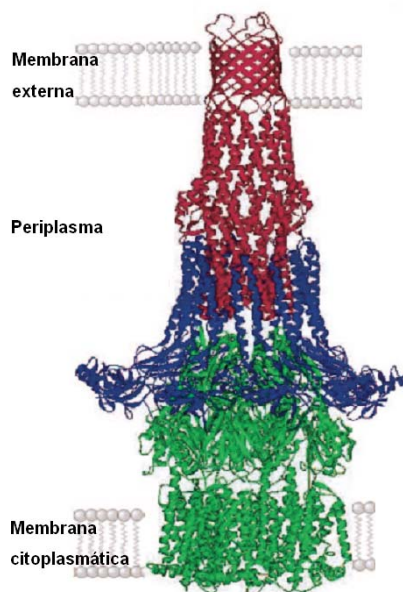


Fig. 7. Modelo de ensamblaje de un transportador de tipo RND. Imagen modificada de Piddock (2006).

La proteína situada en la membrana citoplasmática es en realidad un antiportador dependiente de protones ya que permite la expulsión de una sustancia a la vez que un protón penetra en el citoplasma (Paulsen, 2003).

La organización genética de los sistemas que codifican estas proteínas es similar en diferentes especies de bacterias gramnegativas. Generalmente, los tres componentes están codificados en genes adyacentes formando parte de un operón. Sin embargo, en ocasiones, el gen que codifica la proteína que forma el canal en la membrana externa, puede transcribirse de forma independiente y asociarse a más de un sistema de bombeo (Tsuge *et al.*, 2001).

ii) Facilitadores de la difusión de los cationes

Los facilitadores de la difusión de los cationes o CDF (*Cation Diffusion Facilitators*) son una familia de proteínas transportadoras de metales que se encuentran en una gran variedad de organismos (Nies y Silver, 1995). Esta familia de proteínas se caracteriza por transportar metales, particularmente el Zn^{2+} (Gaither y Eide, 2001; Nies, 2003).

La mayoría de los miembros de esta familia de transportadores presenta una topología característica con seis dominios transmembrana y los extremos N- y C-terminal en la región citoplasmática (Fig. 8). Otra característica común es la presencia de un gran bucle citoplasmático localizado entre los dominios transmembranales IV y V. Este bucle contiene frecuentemente un dominio rico en histidinas (H), $(HX)_n$ donde n puede variar de 3 a 6 y X es siempre serina o glicina. La función potencial de este dominio es la unión de metales. Además, un segundo posible dominio de unión se encuentra en el dominio C-terminal de la proteína (Gaither y Eide, 2001).

El alto grado de conservación entre las proteínas CDF se encuentra en los dominios transmembrana I, II y V. Estos tres dominios son anfipáticos, lo que sugiere un importante papel en el transporte de sustratos. La observación en detalle del transportador de zinc ZnT-1 de mamíferos, indica que el transporte de zinc no depende del ATP (Palmiter y Findley, 1995). Sin embargo, dado el potencial negativo de la membrana citoplasmática y que el flujo de iones se da en contra de gradiente, es necesario un transporte activo secundario mediante algún mecanismo que actúe expulsando los sustratos al espacio periplásmico en las bacterias gramnegativas y al exterior celular en las bacterias grampositivas. Además, en las bacterias gramnegativas, proteínas transportadoras como las porinas participarían en la expulsión de estos iones hacia el exterior celular.

El transporte de los iones se asocia pues, con un proceso quimiosmótico que involucra el intercambio con protones en el cual participan residuos de histidina, aspartato y glutamato de la proteína transportadora (Cervantes *et al.*, 2006). Los transportadores CDF son, por tanto, dependientes de un antiporte de protones, aunque también se han descrito en estos transportadores casos de antiporte con otros cationes como el K^+ o el Na^+ (Guffanti *et al.*, 2002; Ohana *et al.*, 2004).

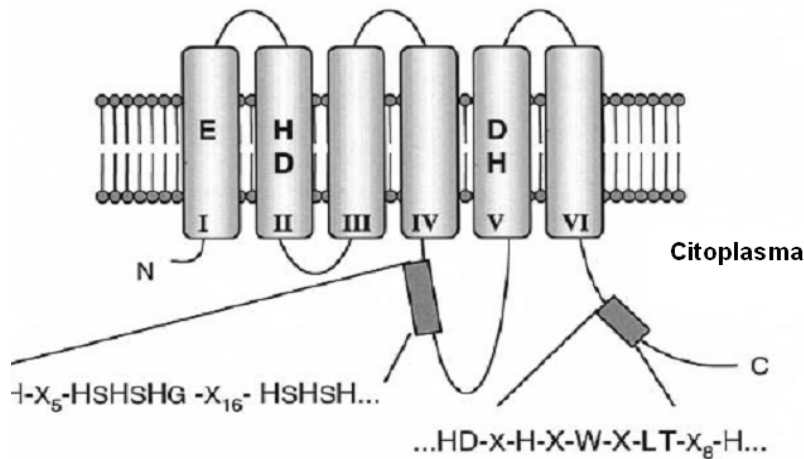


Fig. 8. Representación del CDF Zrc1. Se indican los residuos aminoacídicos conservados de los dominios I, II y V. También se muestra la localización de las regiones ricas en histidina potencialmente implicadas en la unión de metales. E: glutamato, H: histidina, D: aspartato. Figura modificada de Gaither y Eide (2001).

iii) ATPasas de tipo P

Las ATPasas de tipo P (Fig. 9) constituyen una familia de transportadores de metales, que dependen de la energía obtenida por la hidrólisis del ATP (Solioz *et al.*, 1994). Las ATPasas de tipo P (llamadas así porque el γ - fosfato liberado en la hidrólisis del ATP se une de forma covalente a la enzima intermediaria) están ampliamente distribuidas tanto en eucariotas como en procariotas y sus sustratos son iones como H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^+ , Ag^+ , Zn^{2+} o Cd^{2+} . Este tipo de ATPasas se localizan en la membrana citoplasmática y pueden transportar iones hacia el interior celular, comúnmente iones fisiológicos como el Mg^{2+} , o bien funcionar como sistemas de expulsión, desplazando metales tóxicos hacia el espacio periplásmico. Al igual que los transportadores CDF, en las bacterias gramnegativas, estas ATPasas deben asociar su función con las porinas de

la membrana externa para lograr expulsar el sustrato tóxico hasta el exterior celular. Los miembros del enorme grupo de ATPasas de tipo P involucradas en el transporte de metales pesados poseen una prolina precedida o seguida de una cisteína, motivo (CPX), esencial para su función. Estas ATPasas están formadas por seis dominios transmembrana, una gran región citoplasmática que une el ATP, y varias parejas de cisteínas que atrapan los metales que han de ser expulsados.

En humanos, las severas enfermedades de Menkes y Wilson se relacionan con la mutación de genes que codifican ATPasas de tipo P involucradas en el transporte de cobre (Mercer *et al.*, 2003).

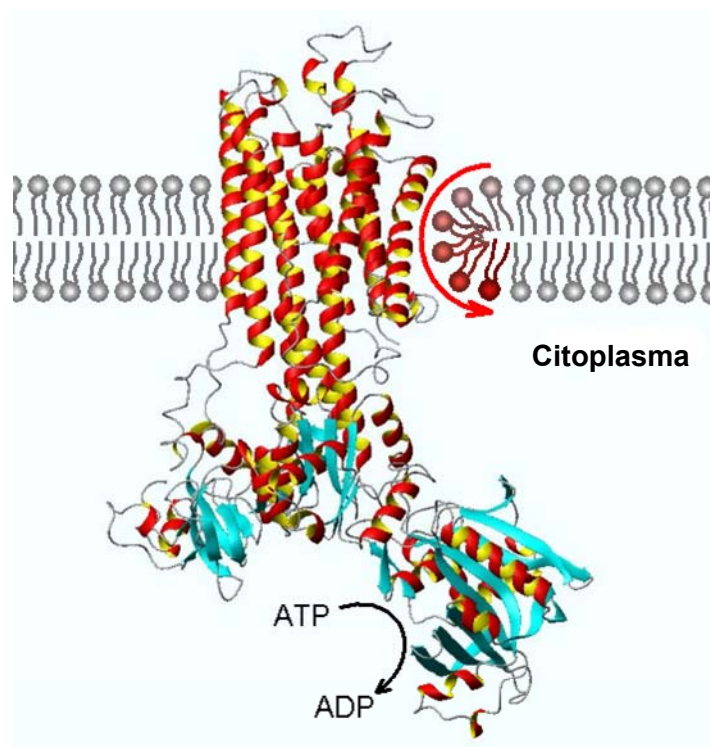


Fig. 9. Estructura cristalográfica de una ATPasa de tipo P. Figura modificada de: <http://www.me.chem.uu.nl/teaching/stages/lipidflippases.html>.

1.2.4. Importancia del zinc en los microorganismos

El zinc es uno de los cationes divalentes más abundantes en el ambiente y un elemento esencial, necesario para la vida de los organismos. Se requiere como componente de muchas proteínas, desempeñando un papel crucial en la actividad catalítica y/o estructural de éstas, entre las que se incluyen DNA polimerasas, proteasas, proteínas ribosomales y muchas proteínas que unen DNA, entre otras (Vallee y Falchuk, 1993). Cabe señalar que el zinc, junto con el magnesio y el hierro, pueden ser sustituidos por el manganeso, manteniendo las características estructurales y catalíticas de algunas metaloproteínas (Culotta *et al.*, 2006).

La cantidad total de zinc en el organismo humano es de aproximadamente 2,3 gramos (Emsley, 1998), siendo la concentración de zinc libre muy baja, del orden de 10^{-4} μM (Lindsay y Foster, 2001), ya que la mayor parte se encuentra unido a la albúmina y a la α -macroglobulina (Chen y Morse, 2001), mientras que las concentraciones requeridas de zinc para un crecimiento bacteriano óptimo son de 0,5 a 1 μM (Lu *et al.*, 1997).

Tanto el zinc como el manganeso son beneficiosos actuando contra el estrés oxidativo, producido como consecuencia de la formación de las EROs (Especies Reactivas de Oxígeno) que, como se verá más adelante, pueden dañar el DNA, las proteínas y los lípidos mediante la oxidación, por lo que la célula debe eliminarlas. Aunque existen diversos mecanismos que llevan a cabo esta función (catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa), el Zn^{2+} junto con el Mn^{2+} , puede ayudar a combatir el estrés oxidativo, desplazando cationes metálicos divalentes como el Fe^{2+} o el Cu^{2+} , implicados en la formación de EROs (Gaballa y Helmann, 2002; Horsburgh *et al.*, 2002).

La baja concentración libre de zinc en los fluidos corporales de los mamíferos dificulta la proliferación bacteriana. Sin embargo, un incremento de la concentración de zinc en el ambiente resulta tóxico para los microorganismos (Silver *et al.*, 1989). Así pues, y a pesar de su importancia, el zinc es tóxico a altas concentraciones, debido a que compite con otros metales por la unión a centros activos de enzimas, pudiendo llegar incluso a inhibir la cadena de respiración aeróbica (Beard *et al.*, 1995).

Por todo ello, los microorganismos deben regular estrictamente el transporte de zinc y del resto de metales. De hecho, como se ha comentado anteriormente, las bacterias han desarrollado mecanismos homeostáticos que controlan tanto los procesos de captación como los mecanismos de exportación de estos metales, lo que les permite mantener unos niveles intracelulares adecuados de estos cationes divalentes.

1.2.4.1. Mecanismos de captación de zinc y su regulación

Los mecanismos de captación de zinc de los que disponen la mayoría de bacterias se dividen fundamentalmente en dos grupos: los de alta afinidad, expresados cuando la presencia de zinc es limitante en el ambiente; y los de baja afinidad, que suelen expresarse constitutivamente pero que no son suficientes para proporcionar los niveles requeridos en condiciones limitantes. Tanto en las bacterias gramnegativas como en las grampositivas, se han identificado mecanismos de captación de zinc de alta y de baja afinidad, como se expone a continuación:

i) Proteínas periplásmicas de unión al sustrato

Como se comentó anteriormente, las proteínas periplásmicas de unión al sustrato (SBPs), que forman parte de los transportadores ABC, presentan una elevada afinidad por sus sustratos y son las responsables de proporcionar una alta especificidad a los transportadores de los que forman parte.

Uno de los principales sistemas de captación de Zn^{+2} de alta afinidad es el conocido como **ZnuABC** (*zinc uptake*), previamente denominado YebLMI, que fue descrito en *E. coli* (Patzer y Hantke, 1998). Este sistema es un transportador de tipo ABC compuesto por tres proteínas: ZnuA, proteína periplásmica de unión al Zn^{+2} ; ZnuB, proteína integral de la membrana citoplasmática; y ZnuC, proteína con actividad ATPasa. En el *cluster* de genes *znu*, la transcripción de *znuA* es divergente respecto a la de los genes *znuCB*, siendo la separación entre las dos unidades transcripcionales de 24 pb (Fig. 10) (Blattner *et al.*, 1997). Gracias a la similitud de secuencia que presenta la proteína ZnuA con otras proteínas, se sabe que ZnuA pertenece a una gran familia de proteínas de unión que reconocen, además de zinc, otros metales (Hantke, 2001). El sistema

ZnuABC también se encuentra en *S. enterica* serovar Typhimurium, siendo la disposición de los genes *znuA* y *znuCB* similar a la de *E. coli*, con la diferencia de la presencia de 25 pb en lugar de los 24 pb que se encuentran en *E. coli* entre los genes *znuA* y *znuCB* (Campoy *et al.*, 2002b). Mutantes *znuC* de *S. enterica* serovar Typhimurium presentan un crecimiento deficiente con respecto a la cepa salvaje cuando crecen en LB (Luria-Bertani) en presencia de agentes quelantes. Sin embargo, cuando a dicho medio se le añade Zn^{2+} en forma de $ZnSO_4$, el mutante presenta un crecimiento equiparable al de la cepa salvaje (Campoy *et al.*, 2002b). Además, el crecimiento de este mutante en LB, en ausencia de quelantes, es similar al de la cepa salvaje, indicando que el sistema Znu es necesario para la captación de zinc cuando éste se encuentra a bajas concentraciones, ya que a elevadas concentraciones actúan los sistemas de captación de zinc de baja afinidad (Campoy *et al.*, 2002b).

En varias especies de bacterias grampositivas pertenecientes al género *Streptococcus* se ha encontrado un sistema homólogo a ZnuA, denominado **AdcRCBA**, que juega un importante papel en la captación de Zn^{2+} y de Mn^{2+} , participando además en la transformación genética y en la formación de biofilm (Dintilhac y Claverys, 1997; Dintilhac *et al.*, 1997; Loo *et al.*, 2003). Tanto en *Streptococcus pneumoniae* como en *Streptococcus gordonii*, el operón *adc* codifica 4 proteínas: AdcR, que como se expondrá más adelante es un represor metal-dependiente; AdcC, proteína con actividad ATPasa y con una identidad de un 36% respecto a ZnuC; AdcB, proteína integral de membrana citoplasmática con una identidad de un 29% respecto a ZnuB; y AdcA, proteína periplásmica de unión al Zn^{2+} y al Mn^{2+} , con un 22% de identidad respecto a ZnuA y que presenta en su extremo N-terminal el lípido que típicamente ancla la proteína a la membrana citoplasmática en las bacterias grampositivas y que es homóloga a las adhesinas estreptocócicas (Dintilhac y Claverys, 1997; Hantke, 2001; Loo *et al.*, 2003). Mediante análisis de RT-PCR, se ha observado que los genes *adc* de *S. gordonii* se cotranscriben en una sola unidad transcripcional. No obstante, en *Streptococcus mutans*, el gen *adcA* está codificado en otra región del cromosoma, aunque en *S. pneumoniae* los cuatro genes se encuentran adyacentes (Loo *et al.*, 2003).

Además de las ya mencionadas, una gran variedad de bacterias también presentan sistemas de transporte de tipo ABC implicados en la captación de zinc: el sistema *tro* en *Treponema pallidum* (Lee *et al.*, 1999), *ycdHI-YceA* en *B. subtilis* (Gaballa y Helmann,

1998) y el sistema *znu* en *Pasteurella multocida* (Garrido *et al.*, 2003b), entre otras muchas.

ii) Mecanismos de captación de zinc de baja afinidad

La mayoría de los sistemas implicados en la captación de Zn^{2+} de baja afinidad se encuentran activos por debajo del umbral de la concentración tóxica de este metal, cuando los sistemas de alta afinidad están reprimidos (Hantke, 2001). Hasta el momento se han descrito diversos transportadores de zinc implicados en la captación de este metal como ZupT y Pit en *E. coli* y la proteína YciC en *B. subtilis*.

La proteína **ZupT** de *E. coli*, anteriormente conocida como YgiE, pertenece a la familia de transportadores ZIP (Grass *et al.*, 2002). ZupT es la primera proteína perteneciente a la familia ZIP caracterizada en bacterias, ya que hasta su descubrimiento estas proteínas sólo habían sido descritas en eucariotas (Gaither y Eide, 2001). Aunque el sistema ZnuABC presenta mayor afinidad por el zinc que la proteína ZupT, ambos participan en la incorporación de zinc cuando la concentración de este metal en el medio es limitante (Grass *et al.*, 2002).

La proteína **PitA** de *E. coli*, que forma parte del transportador de baja afinidad de fosfato inorgánico, parece estar también relacionada con el transporte de zinc, ya que en mutantes defectivos para esta proteína, se observa una menor acumulación intracelular de este catión con respecto a las células salvajes (Beard *et al.*, 2000). Al igual que ZupT, PitA se expresa constitutivamente en *E. coli* (Rosenberg *et al.*, 1977; Grass *et al.*, 2005a), mientras que la expresión de ZnuABC, como se verá en el siguiente apartado, se reprime en presencia de altas concentraciones de zinc (Patzer y Hantke, 1998).

La proteína **YciC** de *B. subtilis* es un transportador implicado en la captación de zinc de baja afinidad que, a diferencia de ZupT y PitA, se encuentra bajo el control de los mismos mecanismos que regulan la incorporación de zinc de alta afinidad (Gaballa y Helmann, 1998). Esta proteína se considera un transportador de baja afinidad ya que mutaciones en el gen que la codifica sólo tienen efecto en el crecimiento cuando están asociadas a deficiencias en el sistema de captación de zinc de alta afinidad y cuando la concentración de este metal en el medio es baja (Gaballa y Helmann, 1998).

iii) Control de los sistemas de captación de zinc: los reguladores Zur y AdcR

El sistema de mantenimiento de las concentraciones intracelulares de zinc consta de una serie de reguladores transcripcionales que actúan como sensores, regulando la expresión de los genes que controlan los procesos de incorporación de este metal, así como los de su expulsión. Los reguladores Zur y AdcR forman parte de los sistemas de regulación de la captación de zinc en distintos grupos bacterianos: Zur en α -Proteobacterias, γ -Proteobacterias y *Bacillus*; y AdcR en *Streptococcus* (Gaballa y Helmann, 1998; Panina *et al.*, 2003).

Para identificar el regulador de los genes *znu* de *E. coli*, se aislaron mutantes constitutivos que fueron complementados con un banco de genes de *E. coli*. De esta forma se identificó el gen *yjbK*, que fue renombrado como *zur* (*zinc-uptake regulator*). La incorporación de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ en dicho mutante resultó ser 10 veces mayor en la cepa salvaje (Patzner y Hantke, 1998). Así pues, la inactivación del gen *zur* mostró que la proteína Zur actúa como un represor y no como un activador (Hantke, 2001).

La proteína Zur de *E. coli* muestra un 27% de identidad con respecto al regulador de hierro denominado Fur (*Ferric-uptake regulator*), del cual se hablará más adelante. Cabe destacar que en la proteína Zur se encuentran conservadas las cuatro cisteínas presentes en su análoga Fur, incluyendo las dos cisteínas de unión al zinc presentes en Fur. De hecho, Fur da nombre a la familia de proteínas a la que ambos reguladores pertenecen: la familia Fur.

Zur es una proteína de localización citoplasmática que se encarga de la regulación transcripcional de algunos sistemas de importación de zinc hacia el citoplasma. De hecho, se ha demostrado su implicación directa en la regulación de la expresión del sistema de transporte de zinc de alta afinidad *znuABC* de *E. coli* o de los dos sistemas de captación de zinc de alta y baja afinidad (*ycdHI-YceA* y *yciI*, respectivamente) de *B. subtilis* (Gaballa y Helmann, 1998; Patzner y Hantke, 2000).

La proteína Zur es un homodímero que, independientemente de la unión de Zn^{2+} , presenta al menos dos iones de Zn^{2+} en su forma nativa (Patzner y Hantke, 2000). Debido a las condiciones reductoras del citoplasma, contiene más grupos reducidos que

oxidados (Gilbert 1990). Así pues, los residuos cisteína de la proteína Zur son fácilmente oxidables, perdiendo la capacidad de unirse tanto al DNA como a cantidades considerables de Zn^{2+} . Este hecho podría indicar que el Zn^{2+} se une a alguna de las nueve cisteínas que se encuentran en la proteína Zur.

Su actividad represora depende de la unión de Zn^{2+} , aunque la adición de Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} permite la desrepresión *in vivo* del sistema de transporte *znu*, siendo el Fe^{2+} menos eficiente *in vitro* que el Zn^{2+} , por lo que se descarta que pudiera haber una interacción directa entre el hierro y la proteína Zur (Patzner y Hantke, 2000).

El análisis de diferentes mutantes *zur* sugiere que el dominio N-terminal, alrededor del residuo 65, es el que lleva a cabo la interacción con el DNA, mientras que el dominio C-terminal sería el responsable de la dimerización de la proteína y de su unión al zinc (Patzner y Hantke, 1998).

Mediante estudios de protección (DNaseI *footprinting*) en la región promotora/operadora de *znuA* y *znuCB*, se ha localizado el sitio de unión de la proteína Zur de *E. coli* al DNA, determinándose que consta de 29 nucleótidos en cada cadena del operador *znu* en la que se encuentra un palíndromo imperfecto rico en A-T (Fig. 10). Además, la presencia de quelantes de zinc inhiben completamente la unión de la proteína Zur a dicha región del DNA, aunque es posible recuperarla de nuevo mediante la adición de zinc (Patzner y Hantke, 2000). Recientemente, se ha observado, como se comentará más adelante, que la proteína Zur es capaz de actuar como un activador transcripcional reconociendo la secuencia del promotor de un gen implicado en la exportación de zinc, secuencia totalmente diferente de la que suele reconocer este regulador para ejercer su papel de represor en los transportadores de metales (Huang *et al.*, 2008).

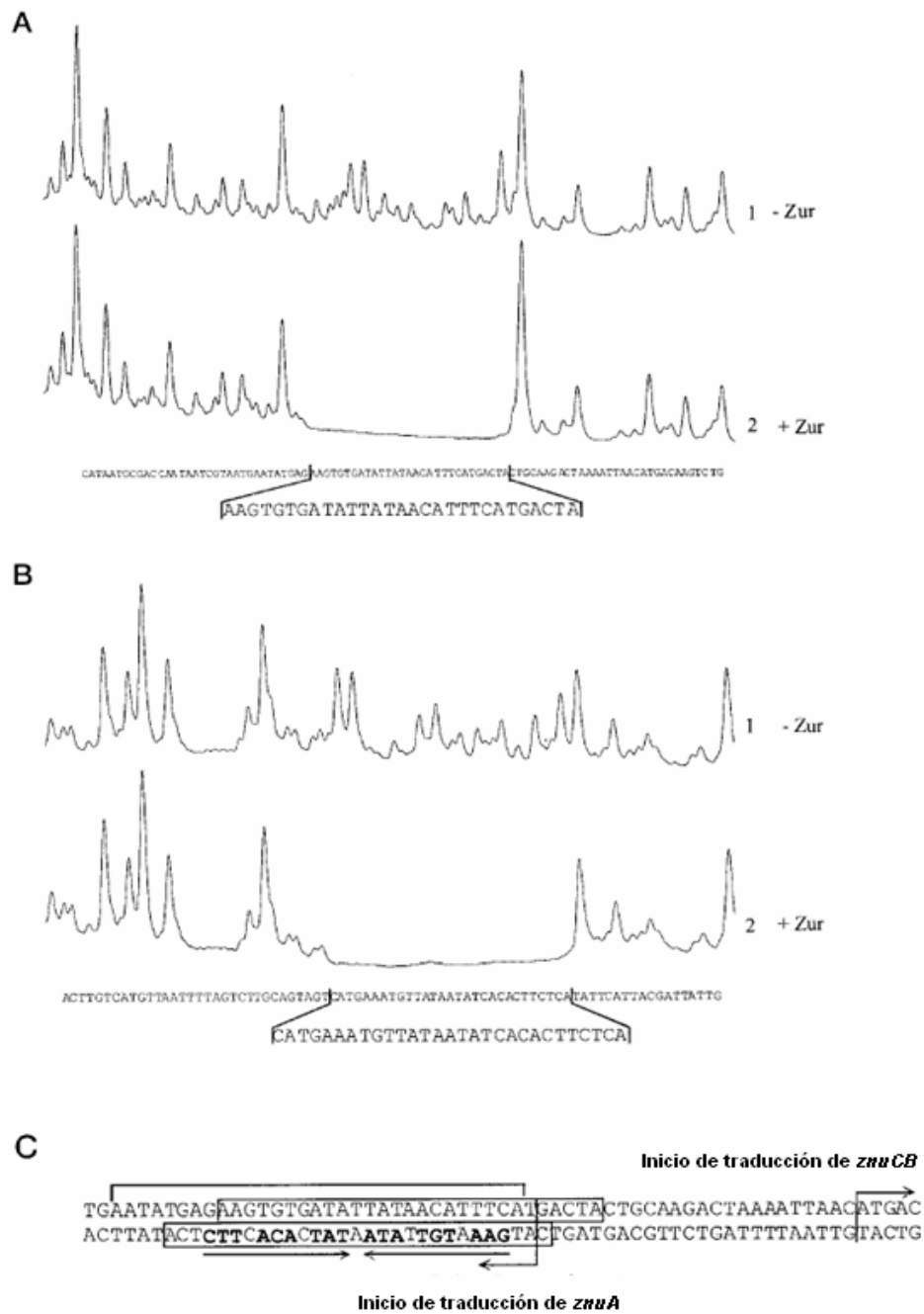


Fig. 10. Ensayos de protección (DNaseI *footprinting*) de la región operadora de *znuCB* (A) y *znuA* (B) en ausencia de la proteína Zur (-Zur) o en su presencia (+Zur), mostrándose las zonas de protección de sus respectivas cadenas codificantes. (C) Secuencia de nucleótidos del operador *znu*, con los inicios de la traducción de cada uno de los genes divergentes. Las regiones protegidas por la proteína Zur se muestran en cajas. El palíndromo imperfecto se indica mediante flechas convergentes, con las bases complementarias señaladas en negrita. Figura modificada de Patzer y Hantke (2000).

La presencia del regulador Zur, al igual que ocurre con la proteína Fur, parecía estar ampliamente extendida entre las bacterias, como indicaban los resultados de las búsquedas por similitud de secuencia. Sin embargo, sólo en las siguientes especies bacterianas se ha demostrado la existencia de un regulador funcional Zn^{2+} -dependiente: *B. subtilis*, en el que el regulador Zur era anteriormente conocido como YqfV y presenta mayor identidad con el regulador Fur (29%) que con el propio Zur (<25%) de *E. coli* (Gaballa y Helmann, 1998), *Staphylococcus aureus* (Lindsay y Foster, 2001), *Listeria monocytogenes* (Dalet *et al.*, 1999), *S. enterica* serovar Typhimurium (Campoy *et al.*, 2002b), *Xanthomonas campestris* (Tang *et al.*, 2005), *Mycobacterium tuberculosis* (Maciag *et al.*, 2007) y *Streptomyces coelicolor* (Shin *et al.*, 2007). Además, en muchos de los genomas total o parcialmente secuenciados se han encontrado posibles genes *zur* y, puesto que muchos de ellos presentan genes homólogos a los genes *znu*, se ha propuesto que posiblemente estos genes pueden estar regulados por Zur (Hantke, 2001). No obstante, ya que se sabe que pequeños cambios en la secuencia de *zur* pueden dar lugar a variaciones en la especificidad por el metal, debe estudiarse cada caso para poder corroborar que realmente se trata de una proteína Zur. Cabe mencionar que las proteínas Zur de las bacterias grampositivas con respecto a las de las gramnegativas presentan una media de identidad de un 25%. En cuanto al control de Zur, no existen evidencias de la existencia de otros reguladores que actúen sobre él, sin embargo se sabe que su transcripción está bajo su propio control en *S. aureus* (Lyndsay y Foster, 2001) y *L. monocytogenes* (Dalet *et al.*, 1999), aunque no es así en *E. coli* (Patzner y Hantke, 2000) ni en *S. enterica* serovar Typhimurium (Campoy *et al.*, 2002b).

Como se ha comentado anteriormente, la proteína Zur regula los mecanismos de captación de zinc en el grupo de bacterias grampositivas de *Bacillus* spp., además de en las bacterias gramnegativas, aunque poco se sabe acerca de la regulación de estos mecanismos en el resto de bacterias grampositivas.

No obstante, en el grupo de los estreptococos no se ha encontrado ningún gen que codifique la proteína Zur. Sin embargo, se ha identificado una proteína perteneciente a la familia MarR (*Multiple antibiotic resistance*), denominada AdcR, que podría actuar de forma homóloga a la proteína Zur en este grupo de bacterias grampositivas (Dintilhac y Claverys, 1997).

La proteína AdcR, presente en gran variedad de especies de estreptococos, contiene una región rica en histidinas, lo que podría constituir un posible dominio de unión a metales. Además, mediante diversos estudios, se ha observado que la proteína AdcR es un regulador transcripcional metal-dependiente implicado en la regulación del transporte de zinc y de manganeso (Loo *et al.*, 2003).

A partir de la búsqueda de genes implicados en la captación de zinc en diversas especies de estreptococos, como por ejemplo los constituyentes del anteriormente mencionado sistema *adcRCBA*, se ha observado la presencia de un palíndromo de 12 pares de bases, presente en la región promotora de varios de los genes estudiados, cuya secuencia consenso es TTAACYRGTTAA (Panina *et al.*, 2003). Además, dicha secuencia ha sido localizada en la región promotora del gen *adcR* de multitud de especies de estreptococos (Fig. 11). No obstante, hasta la fecha, todos los datos obtenidos en relación a esta posible secuencia de unión de la proteína represora AdcR son *in silico*, por lo que todavía no existen evidencias experimentales de su funcionalidad.



Fig. 11. Alineamiento de las secuencias de las regiones promotoras del gen *adcR* de diversos estreptococos: *S. gordonii* (A), *S. equi* (B), *S. agalactiae* (C), *S. mutans* (D), *S. pyogenes* (E), *S. pneumoniae* (F) y *S. mitis* (G). Las zonas sombreadas señalan las posiciones en las que los nucleótidos son idénticos. Las regiones repetidas e invertidas se indican mediante flechas convergentes; la región I está presente en *S. gordonii*, *S. equi*, *S. agalactiae*, *S. mutans* y *S. pyogenes*; mientras que la región II se encuentra presente en *S. pneumoniae* y *S. mitis*. Los posibles sitios de unión de los ribosomas (RBS o *R*ibosome *B*inding *S*ites) y los potenciales sitios -10 y -35 de la región promotora se muestran subrayados. Los posibles codones de inicio se muestran en cajas. Figura modificada de Loo *et al.* (2003).

Mediante estudios *in silico* se han identificado diversos genes que presentan en su región *upstream* posibles secuencias de unión de la proteína AdcR que codifican proteínas denominadas Pht (*Pneumococcal histidine triad*), presentes en numerosos estreptococos (Panina *et al.*, 2003). Análisis funcionales de estas proteínas sugieren que estarían implicadas en el proceso invasivo y que presentan conservado y repetido el *histidine triad motif* (HxxHxH), probablemente implicado en la unión al DNA y/o metales. Además, estas proteínas proporcionan protección frente diversos tipos capsulares de pneumococos en el modelo animal de ratón (Adamou *et al.*, 2001).

Finalmente, también mediante análisis *in silico*, se han identificado genes parálogos que codifican proteínas ribosomales con posibles secuencias de unión de la proteína AdcR. Los productos de las copias originales de estos genes contienen motivos de unión al zinc, mientras que no se encuentran en los productos de los genes parálogos. Así, se ha sugerido que la inducción de estos genes parálogos en condiciones de carencia de zinc permitirían la incorporación de sus productos en los ribosomas en lugar de las proteínas originales, que serían degradadas con la consiguiente liberación de zinc. El metal liberado durante este proceso sería utilizado por enzimas esenciales que lo necesitan para su funcionamiento, como por ejemplo las DNA polimerasas (Panina *et al.*, 2003).

1.2.4.2. Mecanismos de exportación de zinc y su regulación

Los microorganismos han desarrollado también mecanismos de expulsión de zinc hacia el exterior celular con la finalidad de evitar el acúmulo de altas concentraciones de este metal en el citoplasma, previniendo así sus posibles efectos tóxicos. La bacteria gramnegativa *Ralstonia metallidurans*, anteriormente conocida como *Alcaligenes eutrophus* y actualmente renombrada *Wautersia metallidurans* (Vanechoutte *et al.*, 2004), es un microorganismo aislado de los tanques de decantación de una industria dedicada al zinc, cuya CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) para el Zn^{2+} es de 12 mM (Hantke, 2001), mucho mayor que la concentración de zinc necesaria para inhibir completamente el crecimiento de *E. coli*: 0,35 mM (Lee *et al.*, 2005). *W. metallidurans* puede ser considerada como el paradigma de la regulación de la homeostasis de los metales en las bacterias ya que, como se verá a continuación, presenta mecanismos de

resistencia a metales pertenecientes a las tres familias más importantes de transportadores implicados en la exportación de metales.

i) Transportadores RND implicados en la exportación de zinc

W. metallidurans presenta el cluster de genes *czcNICBADRS*, localizado en el plásmido pMOL30 de 238 kb (Dressler *et al.*, 1991; Mergeay *et al.*, 1985). Este cluster de genes se transcribe formando cinco unidades transcripcionales (*czcN*, *czcI*, *czcCBA*, *czcDRS* y *czcE*), que codifican dos sistemas para la exportación de Zn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} (CzcCB₂A, un sistema de transporte de tipo RND; y CzcD, un transportador CDF), además de las proteínas reguladoras de este sistema (Anton *et al.*, 1999; Grosse *et al.*, 1999; Grosse *et al.*, 2004).

Los productos de los genes *czcA*, *czcB* y *czcC* forman el complejo **CzcCB₂A**, un transportador RND, siendo CzcA el antipuerto catión-protón localizado en la membrana citoplasmática (permite la salida de un catión a la vez que penetra un protón); CzcB, la proteína periplásmica conectora; y CzcC, la proteína situada en la membrana externa (Nies, 1995; Rensing *et al.*, 1997b).

La regulación de la resistencia a estos metales en *W. metallidurans* es un proceso complejo (Fig. 12). Tanto la concentración citoplasmática como la periplásmica de estos cationes sirven como señales para la regulación del operón *czc*. Czc es el sistema más importante de defensa de *W. metallidurans* contra los metales pesados (Legatzki *et al.*, 2003a) y su control requiere la regulación por parte de las proteínas que se codifican junto a los transportadores. Dos posibles reguladores del sistema *czc* (CzcN y CzcI), están codificados en la región *upstream* de *czcCBA*, mientras que tres de ellos se encuentran en la región *downstream* de este operón (CzcR, CzcS y el CzcE). CzcN y CzcI podrían regular la actividad de un hipotético factor sigma (un iniciador de la transcripción), mientras que los dos reguladores CzcR (regulador de la respuesta) y CzcS (sensor histidina quinasa), regulan la expresión de CzcN (Grosse *et al.*, 1999). Así, CzcR, que se une al promotor *czcN*, pero no a ningún otro promotor *czc*, se activa por la fosforilación llevada a cabo por la histidina quinasa de membrana CzcS, cuya autofosforilación ya ha sido demostrada (Nies y Brown, 1998; Grosse *et al.*, 2004). La proteína CzcE, anteriormente denominada ORF131 (van der Lelie *et al.*, 1997), ha sido

identificada como una proteína periplásmica de unión a metales. Su función es reprimir indirectamente el promotor *czcN* (*pczcN*) mediante la inhibición de la fosforilación de CzcS cuando la concentración de cationes en el periplasma es baja. Este hecho indica que la concentración periplásmica de metales pesados está relacionada con el control del promotor de *czcN*.

El efecto de CzcE en el mencionado promotor podría llevarse a cabo vía CzcS y CzcR. Así, la regulación de la homeostasis de metales mediante este sistema vendría determinada por la cadena de transducción $CzcE \rightarrow CzcS \rightarrow CzcR \rightarrow pczcN$, que podría detectar la concentración de cationes periplásmicos para una óptima expresión del complejo $CzcCB_2A$ (Grosse *et al.*, 2004), por lo que a bajas concentraciones de metales el sistema estaría reprimido por la acción de CzcE. En cambio, a altas concentraciones, CzcR activaría la transcripción de los genes *czcNI* y éstos a su vez la de los que codifican los transportadores implicados en la exportación de cationes divalentes.

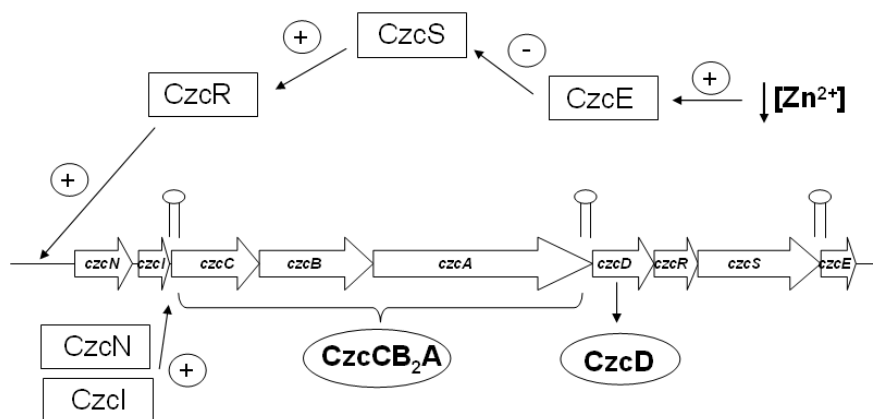


Fig. 12. Representación esquemática del operón *czc* de *W. metallidurans* y su sistema de regulación. Véase la explicación en el texto. Los símbolos Π representan posibles terminadores transcripcionales.

ii) Transportadores CDF implicados en la exportación de zinc

La proteína **CzcD**, también presente en *W. metallidurans*, está codificada por uno de los genes del *cluster czcNICBARDS (czcD)*, es miembro de la familia CDF y es uno de los sistemas de este microorganismo que se encarga del transporte de Zn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} a través de la membrana citoplasmática (Anton *et al.*, 1999). Estudios recientes han puesto de manifiesto que el regulador Zur es capaz de actuar como un activador positivo de la transcripción del gen homólogo *czcD* de *Xanthomonas campestris* mediante el reconocimiento de una secuencia de más de 50 nucleótidos rica en G-C (Huang *et al.*, 2008).

El análisis del genoma completamente secuenciado de *W. metallidurans* revela la presencia de dos genes que codifican CDFs. En contraste con el transportador CzcD, estos dos genes no están localizados en un plásmido, sino en el cromosoma. El primero de ellos **dmeF** (*divalent efflux metal*) participa principalmente en la detoxificación de Fe^{2+} aunque también interviene en la resistencia contra Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} y Ni^{2+} ; y el segundo, llamado **fieF** (*ferrous iron efflux*), muestra el mismo rango de sustratos, aunque con diferentes preferencias (Munkelt *et al.*, 2004).

Otro miembro de la familia de transportadores CDF es la proteína **ZntA**, identificada en la bacteria grampositiva *S. aureus* (no confundir con la ATPasa de tipo P de mismo nombre de *E. coli*). La proteína ZntA de *S. aureus* presenta un 38% de identidad con la proteína CzcD de *Wautersia eutropha* (Xiong y Jayaswal, 1998). Un mutante *zntA* es sensible a una concentración de zinc de sólo 0,5 mM, siendo la cepa salvaje resistente a una concentración de zinc 10 veces superior (Hantke, 2001).

Otra proteína de esta familia es **ZitB** de *E. coli*, anteriormente conocida como YbgR, la cual pertenece a la familia de los facilitadores de la difusión de cationes que transporta Zn^{2+} hacia el exterior citoplasmático y cuya expresión está específicamente inducida por este catión (Grass *et al.*, 2001).

iii) ATPasas de tipo P implicadas en la exportación de zinc

La ATPasa de tipo P responsable del transporte de Zn^{2+} y de Cd^{2+} en *E. coli* se conoce como **ZntA** (*Zinc tolerance*) (Beard *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 1997a). La identificación de este transportador se llevó a cabo gracias al estudio realizado con mutantes espontáneos que presentaban mayor sensibilidad a diferentes metales que la cepa salvaje. Así, la cepa portadora de una mutación en el gen *zntA* mostraba una clara sensibilidad a la presencia de Zn^{2+} en el medio, que se suprimía cuando la mutación se complementaba en *trans* (Beard *et al.*, 1997). También se observó una mayor sensibilidad de este mutante a otros cationes divalentes (Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} y Ni^{2+}), aunque en menor grado que la observada para el zinc (Beard *et al.*, 1997). La regulación del gen *zntA* la realiza la proteína ZntR, que permite su transcripción cuando la concentración de Zn^{2+} o de Cd^{2+} llega a 100 μM y a 19 μM , respectivamente (Noll y Lutsenko, 2000). En presencia de estos metales, la proteína ZntR se convierte en un regulador transcripcional que cambia la conformación de la región promotora del gen *zntA*, convirtiéndolo en un mejor sustrato para la RNA polimerasa (Outten *et al.*, 1999). ZntR es un regulador similar a MerR, que interviene en el sistema de detoxificación de Hg^{2+} (Brocklehurst *et al.*, 1999).

Los genes *cadA* y *cadC* determinan la resistencia al Cd^{2+} y al Zn^{2+} en *S. aureus* y se encuentran en el operón *cadCA* del plásmido pI258 (Nucifora *et al.*, 1989). **CadA** es una ATPasa de tipo P (Tsai *et al.*, 1992), mientras que CadC es importante para la resistencia de *S. aureus* a los mencionados metales. En realidad CadC es una proteína represora dimérica, miembro de la familia de proteínas metaloreguladoras ArsR/SmtB (Busenlehner *et al.*, 2003; Xu y Rosen, 1999). La desrepresión implica la disociación de CadC del promotor *cad*, después de un cambio de conformación de la proteína provocado por la unión de Cd^{2+} o Zn^{2+} en cada uno de sus monómeros (Endo y Silver, 1995; Sun *et al.*, 2001). Este sistema de transporte (CadA/C), también ha sido encontrado en la bacteria gramnegativa *Stenotrophomonas maltophilia*, presentando un 96% de identidad con respecto a la secuencia del sistema homólogo de *S. aureus*. Este alto grado de identidad entre las secuencias de estas proteínas, indica una reciente transferencia horizontal entre una bacteria grampositiva y una gramnegativa (Alonso *et al.*, 2000).

Ambas ATPasas de tipo P (ZntA y CadA), también se hallan presentes en *W. metallidurans* (Legatzki *et al.*, 2003b).

1.2.5. Importancia del hierro en los microorganismos

El hierro es un oligoelemento esencial que forma parte de una gran variedad de proteínas entre las que se incluyen las catalasas, las peroxidasas, las oxidasas y los citocromos; participa en la síntesis de pirimidinas y aminoácidos, en el ciclo de los ácidos carboxílicos, en la cadena de transporte de electrones y es un importante cofactor debido a su potencial redox (Braun y Killman, 1999; Crosa, 1997; Ratledge y Dover, 2000).

El hierro existe en un dinámico equilibrio entre la forma ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}), dependiendo de su entorno, de manera que a pH ácido o en condiciones anaeróbicas, el equilibrio se desplaza hacia la forma soluble (Fe^{2+}) (Aisen, 1976). En su forma soluble, el hierro se encuentra biodisponible para los microorganismos, requiriendo solamente su transporte a través de la membrana citoplasmática. No obstante, en presencia de oxígeno o a pH básico se oxida a Fe^{+3} convirtiéndose en insoluble y, por tanto, no biodisponible (Andrews *et al.*, 2003).

Aunque la limitación de hierro resulta un problema para el crecimiento bacteriano, un exceso de este metal también representa un problema ya que el hierro en presencia de oxígeno en el citoplasma celular es una fuente de especies reactivas de oxígeno (EROs) que incluyen radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), radicales superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), y peróxidos (RO_2), que pueden provocar graves daños en el DNA, las proteínas y los lípidos, mediante la oxidación llevada a cabo a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Fig. 13) (Touati, 2000).

Los mecanismos de defensa utilizados por los microorganismos para eviar el daño oxidativo consisten en la expresión de diversas enzimas como las catalasas, las peroxidasas y las reductasas, especialmente en aquellos microorganismos capaces de sobrevivir en el interior de los macrófagos (Andrews, 1998).

Como se verá a continuación, el hospedador dispone de mecanismos especializados para disminuir la concentración de hierro libre a través de diversas proteínas dificultando el crecimiento bacteriano. Cabe mencionar en este punto a la proteína Nramp1, que si bien no forma parte específicamente de los sistemas de captación de hierro, sí que parece desempeñar un importante papel en la defensa del hospedador. Esta proteína se encuentra anclada en la membrana del fagosoma de los macrófagos permitiendo una tasa de adquisición de hierro mayor de la que se da en el resto de células. De esta manera aumentaría la concentración intracelular de hierro favoreciéndose la formación de EROS a través del ciclo Haber-Weiss, lo que provocaría daños en los patógenos intracelulares que pueden sobrevivir en su interior después de ser fagocitados (Ratledge y Dover, 2000).

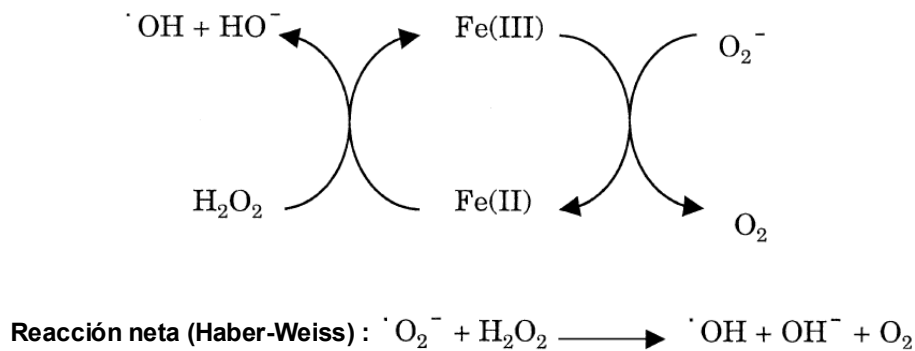


Fig. 13. Reacciones químicas que involucran al hierro en la formación de EROs. La parte izquierda de la figura representa la reacción de Fenton. El esquema completo se conoce como ciclo Haber-Weiss. Figura modificada de Ratledge y Dover (2000).

En los tejidos del hospedador, la limitación de hierro libre juega un papel importante en su propia defensa restringiendo el crecimiento bacteriano (Ratledge y Dover, 2000; Weinberg, 2000). La mayor parte del hierro presente en el hospedador, se encuentra unido a proteínas de forma que su concentración libre en solución suele ser de 10^{-24} M (Palyada *et al.*, 2004), valor muy por debajo de los requerimientos bacterianos, que oscilan entre 10^{-6} y 10^{-8} M (Pradel *et al.*, 2000).

La cantidad total de hierro en el organismo humano es de aproximadamente 4,2 gramos (Emsley, 1998). La hemoglobina es la proteína encargada del transporte de oxígeno a

los tejidos, se encuentra en los eritrocitos y el hierro que forma parte de ella representa el 65% del total presente en el organismo. La principal proteína de almacenamiento de hierro es la ferritina, que lo almacena intracelularmente en diversos tejidos, aunque principalmente en el hígado, lo que representa del 15 al 30% del hierro total del organismo humano. La mioglobina contiene el 4% del total de hierro y el 1% se encuentra en compuestos que controlan los procesos de oxidación intracelular como los citocromos. Finalmente, el 0,1 % del total de hierro del organismo es secuestrado por proteínas transportadoras conocidas como transferrinas (serotranferina en el plasma sanguíneo, lactoferrina en los fluidos extracelulares) (Guyton, 1996; Ratledge y Dover, 2000).

Al igual que en los mamíferos, los microorganismos poseen mecanismos que se ocupan del almacenamiento de hierro, que además de permitir a la célula disponer de este metal en condiciones de carencia, evitan también la formación de EROs, previniendo de esta manera el estrés oxidativo. Existen tres clases de proteínas bacterianas con esta función: las ferritinas (presentes también en los eucariotas), las bacterioferritinas y las proteínas Dps (Andrews, 1998). Estos tres tipos de proteínas pueden encontrarse en una misma bacteria y se caracterizan por presentar 24 subunidades idénticas (ferritinas y bacterioferritinas) o 12 subunidades idénticas (proteínas Dps). Todas ellas forman una proteína esférica con una cavidad central que actúa como reservorio de hierro en su forma Fe^{3+} , aunque es la forma Fe^{2+} en la que el metal es captado por estas proteínas que catalizan su oxidación a Fe^{3+} (Andrews *et al.*, 2003). Además, la proteína Dps utiliza peróxido de hidrógeno como agente oxidante por lo que su función no solamente estaría relacionada con el almacenamiento de hierro sino también con la defensa frente al estrés oxidativo. Cabe mencionar que recientemente se ha caracterizado una proteína de tipo Dps en *S. suis* a la que se ha denominado Dpr (Kauko *et al.*, 2006).

1.2.5.1. Mecanismos de captación de hierro y su regulación

Debido a la importancia del hierro en el metabolismo, los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos que les permiten acceder al hierro del hospedador de una manera eficiente. El hierro, a diferencia del resto de cationes, no se encuentra

disponible para los microorganismos en el hospedador. Por ello las bacterias poseen diferentes mecanismos para su captación.

Aunque como se verá a continuación, algunas bacterias, bajo determinadas circunstancias, son capaces de transportar hierro mediante la captación directa, la mayoría de las bacterias gramnegativas requieren receptores específicos dependientes de TonB en la membrana externa que internalicen el hierro hacia el periplasma y una vez allí, y al igual que ocurre en las bacterias grampositivas, un sistema de transporte de tipo ABC que internalice el hierro hacia el citoplasma.

i) Captación directa

Algunos microorganismos anaeróbicos, como *Clostridium perfringens*, pueden captar hierro creando microambientes anaeróbicos ácidos en los tejidos del hospedador, movilizándolo el Fe^{2+} desde proteínas transportadoras como las transferrinas hacia el espacio periplásmico (Griffiths y Williams, 1999). La captación de iones ferrosos solubles ha sido descrita en microorganismos anaeróbicos facultativos como *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium, involucrando a las proteínas **FeoA** y **FeoB** (Kammler *et al.*, 1993; Tsolis *et al.*, 1996). La proteína FeoB se localiza en la membrana citoplasmática y presenta un motivo de unión al ATP, lo que sugiere que la captación de Fe^{2+} se realizaría mediante un sistema de transporte activo, como ocurre con el resto de cationes divalentes.

ii) Sideróforos

Los sideróforos, del griego *sideros* (hierro) y *phoros* (portador), son moléculas de bajo peso molecular (<1 kDa) que se caracterizan por unir hierro (en su forma Fe^{3+}) con alta afinidad y especificidad. Además, su síntesis suele verse incrementada cuando el microorganismo se encuentra en un entorno pobre en dicho metal (Ratledge y Dover, 2000). Estas moléculas son producidas por diversas bacterias, hongos e incluso vegetales, en respuesta a la restricción ambiental de hierro. La mayoría de sideróforos son pequeñas moléculas peptídicas que contienen grupos funcionales con una alta afinidad por los iones férricos (Fig. 14). Fundamentalmente, existen tres tipos de grupos funcionales: aminoácido N-hidroxi (como en el caso de la anguibactina), los hidroxilos

adyacentes a los anillos catecol (como ocurre en la enterobactina y en la acinetobactina) y por último, los átomos de hidrógeno de los anillos tiazolin y oxazolin (piochelina, yersiniabactina, vibriobactina y acinetobactina). Además, en ocasiones es posible encontrar los tres grupos funcionales en el mismo sideróforo (como ocurre en la micobactina T y en la anguibactina) (Crosa y Walsh 2002).

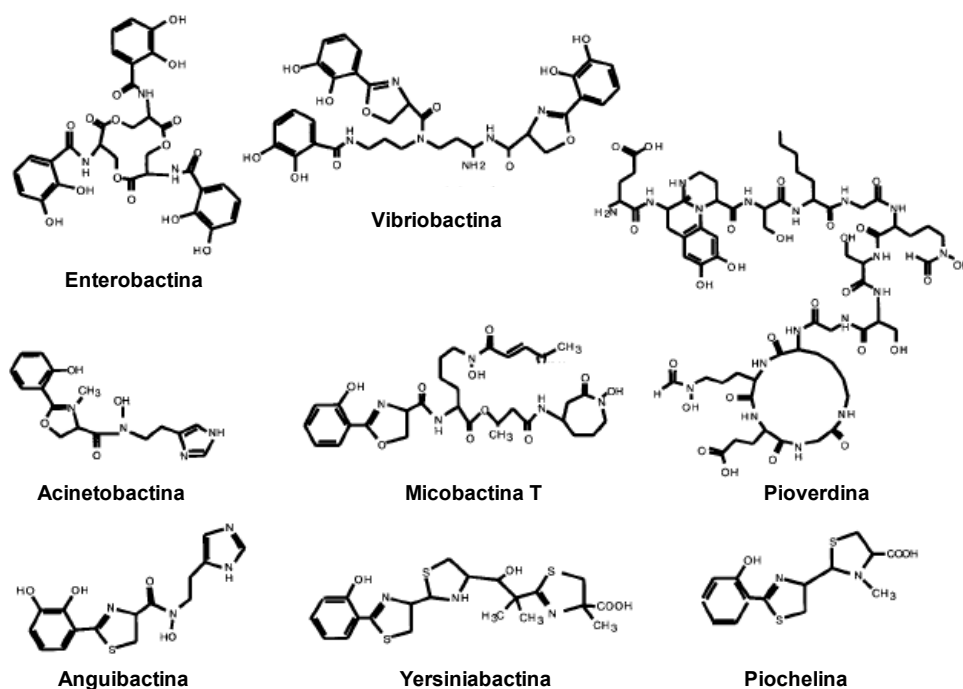


Fig. 14. Estructura de diversos sideróforos bacterianos. Enterobactina de *E. coli*, vibriobactina de *Vibrio cholerae*, acinetobactina de *Acinetobacter calcoaceticus*, micobactina T de *Mycobacterium tuberculosis*, pioverdina y piochelina de *Pseudomonas aeruginosa*, anguibactina de *Vibrio anguillarum* y yersiniabactina de *Yersinia pestis*. Figura modificada de Crosa y Walsh (2002).

Los sideróforos son generalmente secretados hacia el exterior, aunque algunos están permanentemente asociados a la pared celular. Reconocen específicamente moléculas que contienen Fe^{3+} (tales como las sales férricas insolubles, incluido el hidróxido férrico) y lo secuestran gracias a que presentan una elevada constante de disociación del hierro. Esta afinidad tan elevada les permite secuestrar al hierro de proteínas del hospedador como la ferritina, la transferrina o la lactoferrina, aunque son incapaces de captar el hierro de las hemoproteínas (Ratledge y Dover, 2000).

Como se ha visto anteriormente, la mayoría de cationes difunden libremente por la membrana externa de las bacterias gramnegativas hacia el espacio periplásmico mediante las porinas. No obstante, el hierro debido a su insolubilidad en su forma más común en el hospedador (Fe^{3+}) debe atravesar esta membrana unido a moléculas transportadoras como los sideróforos hacia el espacio periplásmico.

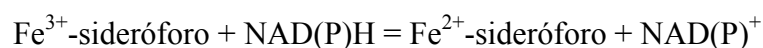
Estos sustratos suelen encontrarse a muy bajas concentraciones, por lo que requieren receptores específicos de superficie celular. Los sideróforos asociados a sus sustratos (Fe^{3+}) requieren para su internalización la presencia de receptores específicos ya que los complejos sideróforos-receptor presentan constantes de disociación extremadamente bajas, permitiendo una eficiencia máxima de internalización a concentraciones muy bajas de ligando, diferenciándose claramente del transporte vía porinas. Algunos ejemplos de estos receptores son **FepA** (Larsen *et al.*, 1997) y **FhuA** (Moeck *et al.*, 1997) de *E. coli*. En ambos receptores se ha observado una interacción directa con la proteína TonB. Estas observaciones sugieren que la unión del ligando con estos receptores provoca un cambio conformacional en ellos que les permite interactuar con la proteína TonB.

Estos receptores de sideróforos necesitan energía para liberar el sustrato en el periplasma (Moeck y Coulton, 1998; Braun, 1995). Dicha energía es proporcionada por el complejo Ton en las bacterias gramnegativas, una unidad funcional anclada en la membrana citoplasmática integrada por tres proteínas (TonB, ExbB y ExbD). Estas proteínas suministran un potencial electroquímico a los receptores de la membrana externa desde la membrana citoplasmática (Braun *et al.*, 1998; Kadner, 1990; Moeck y Coulton, 1998; Postle, 1999). La proteína TonB se encuentra anclada a la membrana citoplasmática por su extremo N-terminal (Postle y Skare, 1988) y presenta dos regiones ricas en prolinas de manera que se forma una región rígida y extensa que se expande por el espacio periplásmico y permite que su dominio C-terminal interactúe con los receptores de la membrana externa (Reynolds *et al.*, 1980). Así, la proteína TonB interactuaría con el complejo ExbB-ExbD por su extremo N-terminal y con los receptores de la membrana externa por su extremo C-terminal. La proteína ExbB presenta tres dominios transmembranales, mientras que su extremo N-terminal se encuentra en el periplasma. ExbD sólo se encuentra anclada a la membrana citoplasmática por su extremo N-terminal, localizándose el resto de la proteína en el

periplasma (Braun y Killman, 1999). En cuanto al funcionamiento de este sistema, se cree que la proteína transportadora se uniría a su receptor, localizado en la membrana externa, lo que provocaría su cambio conformacional de manera que permitiría que éste interaccionase con TonB, transduciendo la energía necesaria para que el receptor formara un poro en la membrana externa mediante una serie de cambios conformacionales. Todo este proceso haría que el receptor perdiera afinidad por su ligando, permitiendo así el paso de éste a través del poro hacia el periplasma (Moeck y coulton, 1998). Las proteínas ExbB y ExbD estabilizarían a TonB y contribuirían también a su reciclaje, necesario después de sufrir el ciclo de cambios conformacionales (Pradel *et al.*, 2000).

El transporte de sideróforos hacia el citoplasma de las bacterias gramnegativas es facilitado por la proteína periplásmica de los sistemas de transporte de tipo ABC. Varias proteínas periplásmicas de *E. coli* han sido identificadas con esta función, por ejemplo FhuD, FecB y FepB (Köster y Braun, 1990; Staudenmaier *et al.*, 1989; Elkins y Earhart, 1989). Varios de estos sistemas de proteínas muestran un rango de similitud relativamente extenso: FhuD une varios sideróforos hidroximato (Köster y Braun, 1990), mientras que ViuP de *V. cholerae* une a los sideróforos catecol enterobactina y vibriobactina (Wyckoff *et al.*, 1999). Los componentes asociados a la membrana de este tipo de proteínas periplásmicas de *E. coli* están estructuralmente relacionados con otros componentes PBT (*Periplasmic Binding protein-dependent Transport*) si bien los miembros de la familia de transportadores de sideróforos presentan una topología de membrana característica que los diferencia del resto (Groeger y Köster, 1998).

Una vez en el citoplasma, las ferrireductasas se encargan de liberar el hierro de los sideróforos. Este tipo de enzimas se han identificado en varias especies bacterianas como en *E. coli* (Fischer *et al.*, 1990), *Bacillus* spp. (Arceneaux y Biers, 1980, Gaines *et al.*, 1981), *P. aeruginosa* (Cox, 1980), *Legionella pneumophila* (Poch y Johnson, 1993) y en hongos (Ernst y Winkelmann, 1977; Timmerman y Woods, 1999), entre otros. La molécula reductora es NADH o NADPH y la reacción que tiene lugar es la siguiente:



De esta forma se puede solubilizar el hierro (Fe^{2+}) para ser incorporado en porfirinas o en apoproteínas.

Uno de los sistemas de transporte de sideróforos más estudiado es el sistema *fhu* (Fig. 15) presente en varias especies bacterianas como *E. coli* (Köster y Braun, 1990), *Rhizobium leguminosarum* (Stevens *et al.*, 1999), *Yersinia pestis* (Forman *et al.*, 2007) e incluso en microorganismos grampositivos como *S. aureus* y *B. subtilis* (Clancy *et al.*, 2006). En *E. coli* este sistema está codificado por el operón *fhuCDBA*. Tras la unión del sideróforo, el receptor FhuA interacciona con el dominio periplásmico de TonB permitiendo el transporte activo del sideróforo hacia el periplasma, donde se une específicamente a la proteína periplásmica de unión al sustrato FhuD, interaccionando entonces con la permeasa FhuBC. Este complejo posibilita un transporte activo del sideróforo hacia el citoplasma, donde después de la reducción del complejo sideróforo- Fe^{3+} , el ión ferroso es quelado por un aceptor.

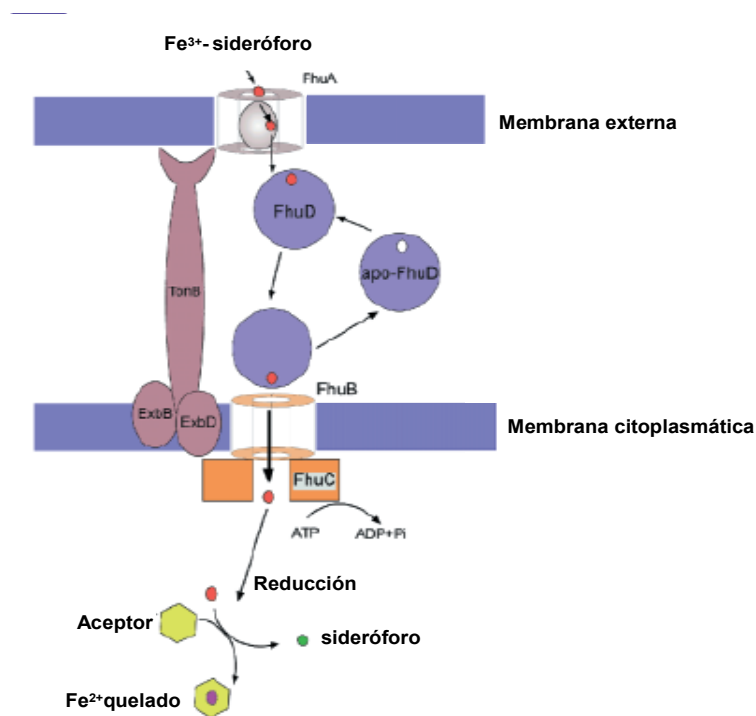


Fig. 15. Sistema *fhu* de *E. coli*, implicado en el transporte de sideróforos. Figura modificada de Ratledge y Dover (2000).

Como se ha visto, en los microorganismos grampositivos también existe un mecanismo similar para la captación de sideróforos. Si bien, la estructura de la pared es diferente ya que carecen de membrana externa, de forma que las proteínas de unión periplásmicas

encargadas de la internalización de los sideróforos en el citoplasma se encuentran ancladas a la membrana citoplasmática. Por ejemplo, en el sistema *fhu* de *B. subtilis*, la proteína periplásmica de unión al sustrato FhuD es en realidad una lipoproteína ya que contiene unido en su extremo N-terminal un lípido que le permite su anclaje a la membrana citoplasmática (Schneider y Hantke, 1993).

iii) Receptores de proteínas transportadoras de hierro

Las transferrinas constituyen una familia de proteínas homólogas captadoras de hierro que se caracterizan por ser glucoproteínas monoméricas de aproximadamente 80 kDa. Todas ellas unen dos iones férricos por molécula y un gran número de microorganismos patógenos son capaces de unir directamente transferrinas como mecanismo de adquisición de hierro de sus organismos hospedadores (Cornelissen y Sparling, 1994).

En condiciones de carencia de hierro, muchos microorganismos expresan proteínas de unión de transferrinas que unen específicamente estas glucoproteínas de sus particulares organismos hospedadores. Los miembros de la familia *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae* unen transferrinas gracias a las proteínas **TbpA** y **TbpB**. El receptor de la transferrina consiste en una proteína integral de membrana externa altamente conservada (TbpA) (Cornelissen *et al.*, 2000) y una lipoproteína variable expuesta a la superficie celular (TbpB) (Anderson *et al.*, 1994; Cornelissen *et al.*, 1997a) (Fig. 16). Estas proteínas unen específicamente transferrina, liberando el hierro mediante un mecanismo dependiente de energía que, al igual que en el caso de los sideróforos, es dependiente de TonB (Cornelissen *et al.*, 1997b). Una vez el hierro es liberado de la transferrina, éste es interiorizado en el citoplasma a través de un transportador de tipo ABC formado por una proteína periplásmica de unión al sustrato (FbpA), que lo transporta a un complejo presente en la membrana citoplasmática (FbpBC), donde es internalizado mediante un proceso dependiente de energía (Chen *et al.*, 1993).

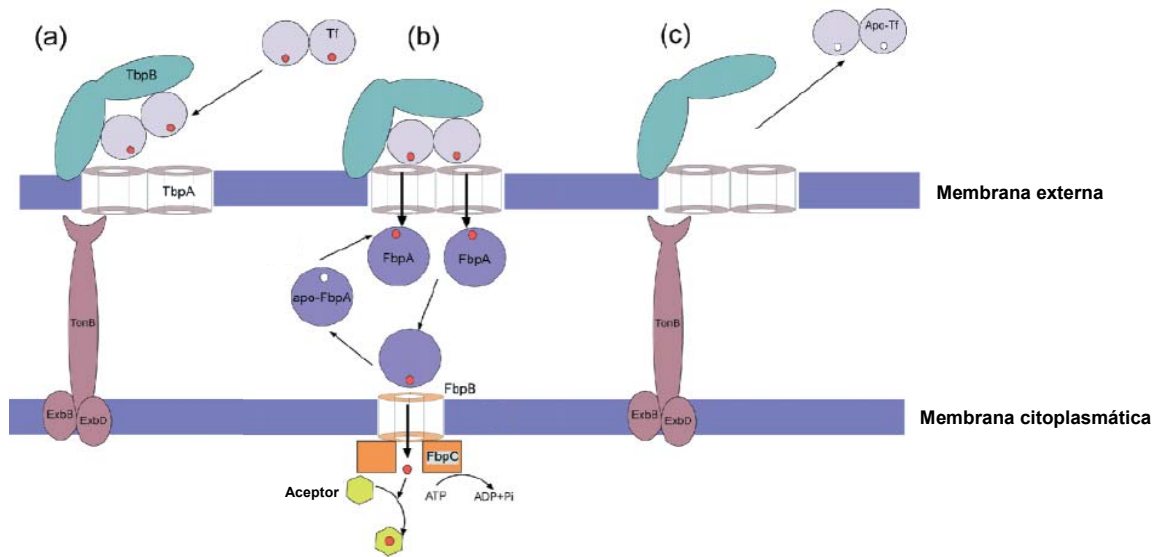


Fig. 16. Sistema implicado en el transporte de la transferrina en las bacterias gramnegativas. (a) La transferrina (Tf) unida al Fe^{3+} (círculo rojo) es reconocida por la lipoproteína TbpB en la membrana externa que la presenta al dímero TbpA. (b) El hierro es liberado de la transferrina y atraviesa la membrana externa a través de TbpA para unirse con la proteína periplásmica de unión al sustrato FbpA (en su forma apo, cuando todavía no presenta el Fe^{3+} unido). FbpA transporta el hierro hasta la membrana citoplasmática, donde es internalizado a través de la permeasa FbpBC hacia su aceptor citoplasmático. (c) Tras perder el ión férrico, la apo-transferrina es liberada del receptor de la membrana externa vía TonB. Figura modificada de Ratledge y Dover (2000).

También se han detectado receptores específicos de las transferrinas en las bacterias grampositivas patógenas como los estafilococos *S. aureus* y *S. epidermidis* (Modum *et al.*, 1994). Estas bacterias expresan receptores específicos de las transferrinas de los mamíferos. El gran tamaño de las proteínas transportadoras de hierro del hospedador (80 kDa) hace que no puedan penetrar fácilmente en la gruesa capa de peptidoglicano presente en estos microorganismos, por lo que una proteína anclada a la pared celular podría servir como contacto inicial de la transferrina (Taylor y Heinrichs, 2002). *S. aureus* produce un gran número de proteínas asociadas a la pared celular las cuales están covalentemente unidas al peptidoglicano a través del dominio conservado LPXTG (Schneewind *et al.*, 1992). Entre ellas, se incluye la proteína StbA (*Staphylococcal transferrin-binding-protein A*) que es la responsable de llevar a cabo la unión de la transferrina en este microorganismo (Taylor y Heinrichs, 2002). En cuanto a la internalización hacia el citoplasma se cree, como ocurre en las bacterias gramnegativas,

que un transportador de tipo ABC estaría implicado en el transporte de hierro de la transferrina hacia el citoplasma. De hecho, en *S. aureus*, adyacente al gen *stbA*, se encuentra un operón de 4 genes (*sirDEFG*) de los que dos de ellos (*sirF* y *sirG*) presentan una significativa similitud con transportadores de tipo ABC involucrados en la captación de hierro (Taylor y Heinrichs, 2002).

iv) Receptores de hemoproteínas y del grupo hemo

Como se comentó anteriormente, la mayor cantidad de hierro presente en el organismo se encuentra asociado al grupo hemo de la hemoglobina. Este grupo prostético forma parte de las denominadas hemoproteínas entre las que se incluyen la hemoglobina, los citocromos, las catalasas y las peroxidasas. Las porfirinas son los intermediarios en la síntesis del grupo hemo, el cual posee un átomo central de hierro y cuya síntesis ocurre mayoritariamente en las mitocondrias.

Originariamente se pensaba que la unión de las hemoproteínas a la superficie celular era el evento inicial para la obtención del grupo hemo. Sin embargo, en los últimos años, se ha reconocido la implicación de componentes extracelulares en los sistemas de captación del grupo hemo (Ratledge y Dover, 2000).

Además, se ha descrito la existencia de mecanismos que aumentan la eficacia de estos sistemas. Algunos microorganismos son capaces de lisar los eritrocitos permitiendo la liberación de su contenido y originando, consecuentemente, un aumento de la disponibilidad de la hemoglobina libre. Por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* sintetiza la proteasa Kgp que degrada hemoproteínas (Genco y Dixon, 2001).

La habilidad de usar el grupo hemo como fuente de hierro es característica de bacterias patógenas entre las que se incluyen: *V. cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Neisseria* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae* (Griffiths y Williams, 1999; Ochsner *et al.* 2000; Stoebner y Payne, 1988). En los microorganismos gramnegativos se han descrito dos mecanismos básicos para la explotación de las hemoproteínas. El primero de ellos y más común se basa en la unión directa y procesamiento del grupo hemo o hemoproteína por un receptor de membrana externa dependiente de TonB que libera el grupo hemo al

periplasma para su transporte hacia el citoplasma, mediante un transportador de tipo ABC. El segundo sistema consiste en una proteína soluble denominada hemóforo, por su analogía con los sideróforos, que interacciona con las hemoproteínas retornando el grupo hemo a la superficie celular, donde interacciona con un receptor TonB dependiente (Ratledge y Dover, 2000).

El sistema mejor caracterizado de hemóforos es el de *Serratia marcescens*. La proteína HasA es un hemóforo que se une a la hemoglobina liberando el grupo hemo (Létoffé *et al.*, 1994). Una vez formado el complejo HasA-grupo hemo, su transferencia al periplasma tiene lugar a través de un receptor anclado en la membrana externa dependiente de TonB, denominado HasR (Létoffé *et al.*, 1999). La insolubilidad y toxicidad de las porfirinas y su tendencia a precipitar a pH fisiológicos hace necesaria la implicación de transportadores de tipo ABC para llevarla hacia el citoplasma. Una vez en su interior, el grupo hemo puede ser incorporado directamente a enzimas o el hierro puede ser liberado para la degradación del anillo porfirico.

Así pues, las bacterias gramnegativas presentan receptores específicos que secuestran el grupo hemo desde complejos hemo-hemóforos o hemoproteínas del hospedador, llevándolo al espacio periplásmico mediante un proceso Ton-B dependiente. De esta manera, transportadores específicos de tipo ABC transportan este compuesto a través de la membrana citoplasmática. Los transportadores específicos de tipo ABC también son necesarios en las bacterias grampositivas para transportar el grupo hemo a través de la membrana cioplasmática en patógenos como *Corynebacterium diphteriae*, *S. pyogenes*, *S. aureus* y *S. equi*. Además, proteínas de unión al grupo hemo asociadas a la superficie celular han sido identificadas en *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. equi* y *B. subtilis*, lo que sugiere que además de los transportadores de tipo ABC, éstas proteínas son también necesarias para la adquisición del grupo hemo en las bacterias grampositivas (Liu *et al.*, 2008).

En *S. aureus*, el sistema *isd* (*iron-regulated surface determinants*) incluye a las proteínas de superficie IsdA, IsdB, IsdC, IsdH y al transportador de tipo ABC IsdDEF, constituyendo la maquinaria para la adquisición del grupo hemo (Mazmanian *et al.*, 2003; Skaar *et al.*, 2004). La maquinaria de captación del grupo hemo de *S. pyogenes* consiste en las proteínas de superficie, Shr y Shp, y el transportador de tipo ABC

HtsABC. Los componentes de superficie celular Shr y Shp de los estreptococos y los de *S. aureus*, no comparten homología. El sistema de *S. pyogenes* presenta homología con el de *S. equi* (Nygaard *et al.*, 2006), mientras que el *S. aureus* presenta homología con el de *Bacillus anthracis* (Maresso *et al.*, 2006).

v) Regulación de los sistemas de captación de hierro: la proteína Fur

Los microorganismos han desarrollado una serie de respuestas para adaptarse a las diferentes concentraciones de hierro con las que pueden encontrarse en el ambiente. Existe un considerable número de genes controlados de una manera estrechamente relacionada, lo que sugiere un regulador común a todos ellos. En *E. coli*, así como en muchas otras bacterias, este regulador es la proteína Fur (*Ferric uptake regulator*) (Ratledge y Dover, 2000). El primer indicio de que esta proteína es la responsable de llevar a cabo la regulación de los sistemas implicados en la captación de hierro fue gracias al aislamiento del mutante *fur* de *E. coli*, que se comportaba expresando constitutivamente todas las funciones implicadas en la captación de hierro (producción de sideróforos, biosíntesis de transportadores de hierro de la membrana externa, etc.) (Hantke, 1981).

Cuando el hierro se encuentra disponible en la célula, la proteína Fur forma un complejo con el Fe^{2+} que se une a un número de secuencias de operadores específicos controlando la transcripción de numerosos genes. El gen *fur* actúa mayoritariamente como un represor transcripcional de manera que bajo condiciones de exceso de hierro, la proteína Fur une al Fe^{2+} adquiriendo una conformación que le permite reconocer a sus secuencias de DNA diana (generalmente conocidas como cajas Fur), inhibiendo la transcripción de los genes encargados en la captación de hierro, ya que impide el acceso de la RNA polimerasa. Contrariamente, cuando la concentración de hierro es escasa, el equilibrio se desplaza hacia la liberación de Fe^{2+} , permitiéndose de esta manera que la RNA polimerasa acceda a los promotores de los genes que participan en la biosíntesis de los sideróforos y a los promotores de los genes que poseen otras funciones relacionadas con la captación de este catión (Klebba *et al.*, 1982; Griggs *et al.*, 1987).

La proteína Fur de *E. coli* es relativamente pequeña (17 kDa), constituida por 148 aminoácidos y se encuentra codificada por el gen *fur* (Hantke, 1981; Hantke, 1982). La

unión al DNA ocurre mediante el extremo N-terminal de la proteína Fur (Stojiljkovic y Hantke, 1995). Los sitios a los que se une el complejo Fur-Fe²⁺ son similares y se conocen como cajas Fur, los cuales están presentes en los promotores de los genes regulados por esta proteína y se hallan normalmente entre las posiciones -35 y -10. Estas secuencias de DNA presentan unas 20 pb, más o menos conservadas, y constituyen un palíndrome degenerado rico en A-T (Fuangthong y Helmann, 2003). La unión de Fur-Fe²⁺ está también mediada por otros cationes divalentes como el Co²⁺ y el Mn²⁺, aunque esta unión a otros metales es irrelevante dada su baja concentración *in vivo* (Saito, 1991). La afinidad entre el regulador Fur y el Fe²⁺ es débil, hecho que permite una capacidad rápida de reacción en caso de que sea necesaria la transcripción de los genes para la captación de hierro (Ratledge y Dover, 2000).

La proteína Fur es un homodímero, independientemente de la unión de Fe²⁺, y presenta un dominio N-terminal que interviene en el reconocimiento y unión al DNA, y un dominio C-terminal que es el responsable de la unión a los cationes metálicos, así como de las interacciones proteína-proteína que dan lugar a la dimerización (Holm *et al.*, 1994; Stojiljkovic y Hantke, 1995). Además, la proteína Fur puede asociarse con otras proteínas Fur formando multímeros (Le Cam *et al.*, 1994). La proteína Fur es una zinc-metaloproteína ya que por cada monómero contiene al menos un ión de zinc estructural unido, en la mayoría de casos, a dos cisteínas de las cuatro presentes en el dominio C-terminal (Althaus *et al.*, 1999; Pecqueur *et al.*, 2006).

La proteína Fur controla decenas de genes entre los que se incluyen aquellos que participan en la síntesis de los sideróforos y sus receptores, en la captación del grupo hemo y otros sistemas de captación de hierro, factores sigma, reguladores de la división celular y reguladores de un diverso número de mecanismos celulares. Así, la proteína Fur es un regulador pleiotrópico que controla tanto a genes implicados en la captación de hierro como a otros importantes para la vida de la célula (metabolismo, respuesta al estrés oxidativo, factores de virulencia, etc.) (Touati, 1988; Stojiljkovic *et al.*, 1994; Escolar *et al.*, 1999). Además, la proteína Fur regula de manera indirecta diversos genes, los cuales, aparentemente, no presentan una caja Fur que permita una interacción directa, como el gen *sodB* de *E. coli* (una superóxido dismutasa) (Dubrac y Touati, 2000).

Genes homólogos a *fur* han sido descritos en una gran variedad de bacterias gramnegativas, incluyendo varios géneros de patógenos humanos como *Yersinia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, *Bordetella*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*, *Legionella*, *Neisseria*, *Pasteurella* y *Haemophilus*, e incluso en géneros de bacterias grampositivas como *Bacillus* y *Staphylococcus* (Escolar *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2003a). Muchos de estos genes homólogos pueden complementar a un mutante *fur* de *E. coli*, lo que sugiere que el mecanismo molecular que controla la regulación transcripcional por hierro está compartida en muchos microorganismos. El gen *fur* es considerado esencial para algunas bacterias como *Haemophilus parasuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* y *Neisseria gonorrhoeae* (Bigas *et al.*, 2006; Venturi *et al.*, 1995; Berish *et al.*, 1993), mientras que no lo es para *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *Vibrio* spp., *Pasteurella multocida* y *Yersinia pestis* (Vasil y Ochsner, 1999; Campoy *et al.*, 2002a; Garrido *et al.*, 2008). Cabe destacar el particular caso del regulador Fur de *P. multocida*, microorganismo en el que no se ha detectado la presencia del regulador Zur, siendo el regulador Fur el responsable del control del sistema de transporte de zinc *znu* (Garrido *et al.*, 2003b).

En algunos casos se ha observado que la proteína Fur es capaz de regular positivamente varios genes mediante una activación que puede ser indirecta o bien directa (Dubrac y Touati, 2000; Lee *et al.*, 2007). Por ejemplo, en *E. coli*, la proteína Fur controla positivamente y de manera indirecta el gen que codifica la superóxido dismutasa *sodB*, encontrándose también involucrados los factores H-NS e IHF (*Integration Host Factor*) (Dubrac y Touati, 2000). De hecho, estas proteínas contribuyen también a la regulación del gen *fur* en *E. coli*, modificando la conformación del DNA para facilitar los contactos entre las proteínas reguladoras y/o la RNA polimerasa (Dubrac y Touati, 2000). Además, en algunos casos la regulación positiva e indirecta ocurre a través de la interacción de sRNAs (*small RNAs*). Por ejemplo, en *E. coli* la proteína Fur regula negativamente la expresión de *ryhB*, un sRNA que interacciona con el mRNA del gen *sodB* permitiendo su degradación (Masse y Gottesman, 2002). En *Neisseria meningitidis*, la transcripción del gen *norB* (reductasa del óxido nítrico) está activada por la presencia de hierro a través de la unión de Fur-Fe²⁺ a la caja Fur presente en el operador de *norB* (Delany *et al.*, 2004).

Los mecanismos de regulación de la expresión del gen *fur* no se pueden generalizar ya que se encuentran controlados a través de diferentes factores dependiendo del organismo. Por ejemplo, en *E. coli* la proteína Fur regula negativamente el gen que la codifica (de Lorenzo *et al.*, 1988), mientras que en *P. aeruginosa* no se ha observado autoregulación (Vasil & Ochsner, 1999). Sin embargo, en *Helicobacter pylori* y *Vibrio vulnificus* se ha descrito una regulación positiva del gen *fur* mediante la proteína Fur bajo condiciones de carencia de hierro de manera que Fur se une a una secuencia nucleotídica diferente de la caja Fur (Delany *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003b).

OxyR y SoxRS son reguladores del estrés oxidativo en *E. coli* que activan la expresión del gen *fur*, permitiendo una disminución de la captación de hierro durante el estrés oxidativo (Zheng *et al.*, 2001). En *B. subtilis* y *S. aureus* se ha identificado el regulador PerR, una metaloproteína perteneciente a la familia Fur que actúa como un represor transcripcional y que está implicado en la resistencia al estrés oxidativo (Fuangthong y Helmann, 2003; Brenot *et al.*, 2005). En *B. subtilis* y otros microorganismos grampositivos, el gen *fur* se encuentra regulado además de por PerR, por OxyR (Zheng *et al.*, 2001). Cuando OxyR se oxida mediante el peróxido de hidrógeno, este regulador se une al DNA aumentando la transcripción del gen *fur* unas 10 veces (Mongkolsuk y Helmann, 2002). PerR regula la expresión de las proteínas implicadas en el estrés oxidativo ya que la proteína Fur no lo hace en *B. subtilis*. Así pues, la regulación del gen *fur* está también relacionada con la repuesta al estrés oxidativo. Al aumentar los niveles de la proteína Fur, se incrementa la capacidad de unión al Fe^{2+} en el citoplasma, reprimiéndose el transporte de hierro hacia el interior celular e induciéndose los sistemas de almacenamiento de hierro. Todo ello conlleva una disminución de hierro libre en el citoplasma, disminuyendo la toxicidad debida a este elemento, que como se ha comentado con anterioridad, en exceso participa en la formación de EROs (Andrews *et al.*, 2003).

Además del regulador Fur, se han descrito otras proteínas que actúan sobre el control de la transcripción de diversos genes relacionados con el transporte de hierro, el estrés oxidativo e incluso con factores de virulencia, como por ejemplo el regulador IdeR de *M. tuberculosis*, la proteína Irr de *Bradyrhizobium japonicum* y la proteína DtxR, presente en *Streptomyces*, *Corynebacteria* y *Streptococcus* (Hamza *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 1996; Pohl *et al.*, 1999; Bates *et al.*, 2005).

1.2.5.2. Mecanismos de exportación de hierro

Al contrario de lo que ocurre con otros iones, poco se conoce acerca de la expulsión de hierro hacia el exterior celular y de las condiciones ambientales en las que ésta tiene lugar (Grass, 2006). A causa de las particulares propiedades de la solubilidad del hierro, muchas bacterias sufren la carencia de este metal. Sin embargo, el hierro es accesible para las bacterias que conforman la flora intestinal, como *E. coli*. Por ejemplo, en el lumen del duodeno de los ratones existe una concentración aproximada de 60 μM de este metal (Simpson y Peters, 1990). Así, *E. coli* se expone a concentraciones relativamente altas de hierro en su hábitat natural. Además, el hierro se encontraría en su forma soluble (Fe^{2+}) gracias a las condiciones anaeróbicas de este ambiente, por lo que debería ser beneficioso para *E. coli* poseer un sistema de expulsión de hierro cuando éste se encuentra en abundancia y todas las proteínas de almacenamiento de hierro se encuentran saturadas (Grass, 2006).

Se ha observado que el gen *yiiP* de *E. coli* (un CDF) se induce en presencia de Zn^{2+} y de Fe^{2+} (Grass *et al.*, 2001; Grass *et al.*, 2005b). En la bacteria magnetotáctica *Magnetospirillum gryphiswaldense*, los CDFs **MamB** y **MamM**, fueron descritos como transportadores implicados en la biosíntesis del magnetosoma (Grünberg *et al.*, 2001). En este microorganismo los CDFs probablemente transportan hierro desde el citoplasma hacia el magnetosoma para la formación de magnetita, sin embargo este transporte en *E. coli* ocurriría hacia el periplasma (Grass *et al.*, 2005b).

Estudios *in vivo* ponen de manifiesto que YiiP es una bomba de expulsión de hierro. Así pues, YiiP fue renombrado como **FieF** (*Ferrous iron efflux*) (Grass *et al.*, 2005b). No sólo la expresión de FieF disminuye la acumulación de hierro en las células de *E. coli*, sino que además es útil para la detoxificación de hierro en los mutantes *fur* que sufren una desregulación en la captación de hierro. FieF es probablemente un transportador de la membrana citoplasmática que utiliza el gradiente de protones generado en la cadena respiratoria (Grass *et al.*, 2005b).

Además, como se mencionó anteriormente, cabe destacar en este punto que *W. metallidurans* es un microorganismo capaz de resistir altas concentraciones de metales

gracias a diversos mecanismos entre los que se encuentran los CDFs **DmeF** y **FieF**, implicados en la detoxificación de Fe^{2+} y de otros cationes (Munkelt *et al.*, 2004).

1.3. Proteínas transportadoras implicadas en la virulencia bacteriana

Tradicionalmente se ha considerado que los transportadores bacterianos de tipo ABC son importantes en la captación de nutrientes y en la resistencia a los antibióticos. Sin embargo, existen evidencias de que estos sistemas de transporte también pueden jugar un papel directo o indirecto en la virulencia bacteriana (Garmory y Titball, 2004). El papel de este tipo de transportadores en la virulencia se ha relacionado con la captación de metales y de otros nutrientes, la resistencia a los antibióticos y también a la adhesión.

Los transportadores ABC implicados en la captación de metales como el hierro, el zinc o el manganeso, han mostrado jugar un importante papel en la virulencia bacteriana. De hecho, estos transportadores están considerados como elementos fundamentales para el crecimiento bacteriano y la eliminación de su funcionalidad acarrea efectos negativos en la virulencia de los microorganismos (Garmory y Titball, 2004). Por ejemplo, *Yersinia pestis* posee varios sistemas que participan en la captación de hierro. Entre ellos cabe destacar el sistema *ybtPQXS*, en el que los genes *ybtP* y *ybtQ* codifican componentes de un transportador ABC (Fetherston *et al.*, 1999). Así, mutantes *ybtP* de *Y. pestis* muestran una reducción en la acumulación de hierro, siendo avirulentos en los ratones infectados por vía subcutánea, hecho que refleja la importancia de los transportadores ABC en este patógeno (Fetherston *et al.*, 1999; Garmory y Titball, 2004). Un segundo transportador ABC requerido en la virulencia de *Y. pestis* es el sistema *yfe*, codificado por los genes *yfeABCD* (Bearden y Perry, 1999). Este sistema, que transporta tanto manganeso como hierro, es importante durante el proceso de infección de *Y. pestis*. Los mutantes *yfeAB* de *Y. pestis* presentan una disminución de la virulencia cuando se inoculan por vía subcutánea en ratones, mientras que los mutantes que han perdido los sistemas *ybt* y *yfe* son avirulentos al ser inoculados por vía intravenosa (Bearden y Perry, 1999). Sistemas similares implicados en la captación de zinc también son importantes para la virulencia de *S. enterica* serovar Typhimurium, en la que el sistema de transporte ABC involucrado en la captación de zinc (*znuABC*) es necesario para una completa virulencia (Campoy *et al.*, 2002b), al igual que sucede con este transportador en *P. multocida* (Garrido *et al.*, 2003b). Lo mismo ocurre con el sistema *mtsABC* de *S. pyogenes*, un sistema de transporte de tipo ABC implicado en la captación de

manganeso y de hierro, cuya pérdida implica una atenuación de la virulencia (Janulczyk *et al.*, 2003). Además, el papel de los transportadores ABC en la virulencia de las bacterias patógenas ha sido atribuido al requerimiento de éstos para la captación de numerosos nutrientes. Por ejemplo, en *S. pneumoniae* se han identificado clones que presentan una virulencia atenuada con respecto a la cepa salvaje debido a la mutación de los genes homólogos a *potA* y *potB* de *E. coli* (involucrados en la captación de poliaminas), *glnH* y *glnQ* de *B. subtilis* (implicados en el transporte de la glutamina) y *msmK* de *S. mutans* (que participa en el transporte de glúcidos) (Polissi *et al.*, 1998). Asimismo, en diferentes especies bacterianas pertenecientes al género *Yersinia*, mutaciones en los genes que codifican posibles transportadores ABC implicados en la captación de fosfato o de nitrógeno son menos virulentos que las cepas salvajes en modelos de infección en ratón (Darwin y Miller, 1999; Karylshev *et al.*, 2001). Lo mismo ocurre con los transportadores ABC de *S. aureus*, encargados del transporte de aminoácidos y oligopéptidos (Coulter *et al.*, 1998).

La emergencia de la resistencia a los antibióticos y su relación con graves enfermedades infecciosas ha aumentado alarmantemente en las últimas décadas (Jones, 2001). Los microorganismos han desarrollado varios mecanismos de resistencia a los antibióticos que incluyen su inactivación por hidrólisis o modificación, la alteración de sus dianas, la creación de vías alternativas, la inhibición de su entrada y la expulsión activa (Putman *et al.*, 2000). Entre estos últimos cabe destacar a los transportadores ABC. Por ejemplo, en *E. coli*, el sistema *ybjYZ* codifica un transportador ABC que proporciona una significativa resistencia a la eritromicina por lo que fue renombrado *macAB* (*macrolide specific ABC-type efflux carrier*), siendo necesaria la expresión de los dos genes que lo componen para que se manifieste la resistencia a este antibiótico (Kobayashi, 2001). Además, otros transportadores ABC son capaces de proporcionar resistencia a una gran variedad de antibióticos, como el sistema *efrAB* de *Enterococcus faecalis*, capaz de expulsar varios agentes antimicrobianos no relacionados, como la norfloxacin y la doxiciclina, entre otros (Lee *et al.*, 2003a).

La adhesión de las bacterias patógenas a las células hospedadoras es un proceso crítico en la patogénesis de muchas infecciones, especialmente cuando los patógenos están confinados en las superficies de las mucosas. Por ejemplo, la adhesión del patógeno vegetal *Agrobacterium tumefaciens* a las células hospedadoras es un atributo necesario

para su virulencia. En esta bacteria, una mutación en un operón con homología a otros que codifican transportadores ABC implica una deficiencia en la adhesión a las células hospedadoras (Matthysee *et al.*, 1996). De forma similar, un estreptococo mutante en el gen *glnQ* muestra una disminución de la adherencia a las células del epitelio respiratorio *in vitro* y un descenso de la virulencia *in vivo*, poniendo de manifiesto la importancia del transporte de la glutamina en la virulencia de los estreptococos (Tamura *et al.*, 2002). También es posible que la atenuación de la virulencia causada por la inactivación de transportadores ABC involucrados en la captación de nutrientes o de iones metálicos pueda afectar indirectamente a la adhesión de la bacteria a las células hospedadoras. Por ejemplo, la proteína PsaA de *S. pneumoniae*, una proteína periplásmica de unión al sustrato del transportador PsaABC que participa en la captación de manganeso, presenta una secuencia aminoacídica similar a varias lipoproteínas de estreptococos que pueden estar implicadas directa o indirectamente en la adhesión a las células hospedadoras. De hecho, un mutante *psaA* de *S. pneumoniae* presenta sólo el 9% de la adherencia que presenta la bacteria salvaje (Berry y Paton, 1996). Así, los mutantes *psaA* presentan carencias en el crecimiento, virulencia y adherencia, aunque estudios recientes ponen de manifiesto que PsaA no parece actuar como una adhesina, sino que más bien la pérdida de la adherencia sería una consecuencia indirecta de la disrupción en el transporte del manganeso, hecho que además implicaría una hipersensibilidad al estrés oxidativo (Johnston *et al.*, 2004).

Por otra parte, en muchas bacterias se encuentran presentes los reguladores Fur y Zur, implicados en la regulación de la homeostasis de hierro y de zinc. En un esfuerzo por determinar sus respectivos papeles en la virulencia de las bacterias patógenas que los poseen, se ha estudiado este aspecto mediante la construcción de mutantes en dichos genes en diversos patógenos. Estos estudios ponen de manifiesto que diversas bacterias con mutaciones en el gen *fur* presentan una atenuación de su virulencia como es el caso de los patógenos animales *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Campoy *et al.*, 2002a), *Vibrio cholerae* (Mey *et al.*, 2005), *Actinobacillus pleropneumoniae* (Jacobsen *et al.*, 2005) o *Bacillus cereus* (Harvie *et al.*, 2005) y de patógenos vegetales como *Agrobacterium tumefaciens* (Kitphati *et al.*, 2007) y *Pseudomonas syringae* (Cha *et al.*, 2008). Esta disminución de la virulencia puede estar provocada por una disminución del crecimiento, deficiencias en la expresión de factores de virulencia o la disminución en la resistencia al estrés oxidativo, todas ellas funciones que pueden estar reguladas por la

proteína Fur. No obstante, no se puede generalizar sobre la implicación de este gen en la virulencia bacteriana ya que patógenos como *Pasteurella multocida* deficientes en el gen *fur* no presentan una disminución de la virulencia con respecto a la cepa salvaje (Bosch *et al.*, 2001). En el caso del regulador Zur, mutantes deficientes en el gen que lo codifica presentan una atenuación de la virulencia de ciertos patógenos como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Campoy *et al.*, 2002b) y *Xanthomonas oryzae* (Yang *et al.*, 2007).

1.4. Proteínas transportadoras y diseño de vacunas

Existen diferentes aproximaciones en el desarrollo de vacunas teniendo como base los sistemas implicados en la captación de cationes divalentes como el zinc o el hierro, ya que se ha observado que, al menos, algunos de sus transportadores son inmunogénicos y además confieren protección (West *et al.*, 2001; Jomaa *et al.*, 2005; Stranger-Jones *et al.*, 2006). Una de las aproximaciones es la utilización como vacunas de células que expresan de forma constitutiva todas las proteínas receptoras de zinc y/o de hierro. Esto se puede conseguir mediante el cultivo de una determinada especie bacteriana en presencia de un compuesto quelante capaz de secuestrar los cationes metálicos presentes en el medio, con el objetivo de inducir al máximo la síntesis de todos los receptores de estos cationes. Esta aproximación se ha llevado a cabo con éxito en corderos con *P. multocida* (Gilmour *et al.*, 1991). No obstante, este enfoque presenta algunos puntos débiles, como su elevado coste económico, las complicaciones que supone llevar a cabo cultivos masivos en presencia de estos agentes y las alteraciones que se pueden producir en las estructuras de los antígenos como consecuencia del proceso aplicado. Una forma de mimetizar el efecto de estos agentes es la construcción de mutantes defectivos en los genes reguladores de la síntesis de proteínas captadoras de metales (*fur*, *zur*, *adcR*). Al tener desregulados los genes implicados en el metabolismo de hierro y de zinc, estos mutantes deberán expresar constitutivamente las proteínas que se inducen en esas condiciones de cultivo (Garrido *et al.*, 2008).

Otra alternativa, es la administración de proteínas implicadas en la captación de cationes divalentes como el zinc o el hierro. Entre estos transportadores cabe destacar los componentes de los sistemas de transporte de tipo ABC que presentan mayores posibilidades de ser inmunogénicos al estar más expuestos al exterior celular. Sin embargo, componentes de estos sistemas cuya localización se predice más interna como por ejemplo en la membrana citoplasmática o en el espacio periplásmico, también pueden ser inmunogénicos (Garmory y Titball, 2004). El hecho de que determinadas proteínas, que aparentemente no se localizan en la superficie celular, induzcan una buena respuesta inmunológica provocando la producción de anticuerpos específicos puede parecer paradójico *a priori*. Sin embargo, existen varios ejemplos de anticuerpos presentes en el suero de animales infectados, dirigidos contra las proteínas

citoplasmáticas de las bacterias causantes de dicha infección (Garmory y Titball, 2004). Esto podría ser debido a la localización en la superficie celular de, al menos, parte de la población de una proteína o a que las bacterias con la pared celular dañada o las captadas por las células presentadoras de antígenos expusieran al sistema inmunológico del hospedador proteínas citoplasmáticas o periplásmicas bacterianas (Garduno *et al.*, 1998; Hennequin *et al.*, 2001; Garmory y Titball, 2004). Así, proteínas que forman parte de los transportadores de tipo ABC, localizadas en la membrana citoplasmática de las bacterias grampositivas, pueden estimular al sistema inmunológico, como ocurre en el caso de *Enterococcus faecium* (Burnie *et al.*, 2002).

El papel de algunos transportadores ABC en la virulencia bacteriana indica que sus componentes pueden ser dianas para el desarrollo de vacunas. Por ejemplo, ratones inmunizados con un mutante de un transportador ABC de *Brucella abortus* (*exsA*), implicado en el transporte de exopolisacáridos, presenta una protección superior contra una infección de una cepa de *B. abortus* virulenta, en comparación con la protección proporcionada por las cepas vacunales comerciales (Rosinha, 2002).

Se sabe que ciertas proteínas implicadas en la captación de cationes divalentes, pertenecientes también a los sistemas de transporte de tipo ABC, son inmunogénicas y que algunas de ellas confieren protección. Por ejemplo, *S. pneumoniae* posee las lipoproteínas PiaA y PiuA (componentes de los sistemas de captación de hierro de tipo ABC *pia* y *piu*, respectivamente), siendo necesarias ambas lipoproteínas para una completa virulencia en el modelo de infección de ratón. Además, los ratones vacunados con estas lipoproteínas inducen una fuerte producción de anticuerpos contra éstas, a la vez que quedan protegidos contra la infección de *S. pneumoniae* (Jomaa *et al.*, 2005). Es poco probable que estas lipoproteínas y otras descritas en bacterias grampositivas, en muchas ocasiones encapsuladas, queden expuestas al exterior celular (Köster, 2001; Tai y Lee, 2003), por lo que también sería poco probable que estos anticuerpos tuvieran capacidad de opsonización (Nachin *et al.*, 2001). Por ello, se cree que los anticuerpos podrían difundir a través de la cápsula y de la pared celular para unirse a estas lipoproteínas, impidiendo de esta manera su función biológica (por ejemplo la captación de hierro en el caso de las lipoproteínas PiaA y PiuA). También es factible que dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentre la bacteria, se alteren los niveles de producción del polisacárido capsular, permitiendo así la presentación de estas

proteínas de manera que sean más accesibles a los anticuerpos (Nachin, *et al.*, 2001). Además, las condiciones *in vivo* son restrictivas en cuanto a la disponibilidad de hierro y de otros cationes divalentes, por lo que inhibiendo los sistemas de captación de estos cationes, mediante la acción de los anticuerpos, se podría inhibir de forma significativa el crecimiento de *S. pneumoniae*.

No existen dudas sobre la importancia de los sistemas transportadores de tipo ABC en la captación de nutrientes y la expulsión de sustancias tóxicas para la célula, así como sobre su implicación en la virulencia bacteriana. Asimismo, la localización de muchas de estas proteínas permite que queden expuestas al sistema inmune del hospedador y que algunas de ellas, consecuentemente, confieran protección. Por todo ello, los transportadores de tipo ABC, además de ser una de las familias de proteínas más estudiadas, son una valiosa herramienta a tener en cuenta para el desarrollo de nuevas vacunas, aprovechando que se encuentran presentes en todos los organismos vivos.

2. OBJETIVOS

Streptococcus suis es una bacteria grampositiva responsable de diversas enfermedades infecciosas como la meningitis, la septicemia y la neumonía, principalmente en cerdos, aunque los humanos, después del contacto con animales enfermos o portadores sanos, también pueden ser infectados (Staats *et al.*, 1997; Arends y Zanen, 1988). A pesar de que se han llevado a cabo varios intentos para la obtención de vacunas, todavía deben desarrollarse estrategias más eficaces para prevenir las enfermedades causadas por este patógeno (Staats *et al.*, 1997; Fittipaldi *et al.*, 2007).

Como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, los transportadores ABC se encuentran en todos los organismos vivos, siendo una de las familias más grandes de proteínas implicadas en el transporte de una gran cantidad de alocrios, incluyendo iones metálicos (Claverys, 2001; Garmory y Titball, 2004). Varios componentes de estos sistemas, localizados en la pared celular, presentan propiedades inmunogénicas contra las especies bacterianas de las que derivan, especialmente moléculas como las lipoproteínas. Por esta razón, se ha sugerido una posible propiedad protectora de estas moléculas, habiéndose confirmado en algunas bacterias como *Yersinia pestis* (Garmory y Titball, 2004; Tanabe *et al.*, 2006).

Debido al potencial antigénico de las proteínas captadoras de zinc y de hierro, una de las aproximaciones utilizadas actualmente para inmunizar poblaciones de animales ante un determinado microorganismo, consiste en el uso de preparados que contienen extractos de células que han crecido en condiciones de carencia de estos elementos por la presencia de agentes quelantes. Una forma de mimetizar el efecto de la adición de estos agentes es la construcción de mutantes deficientes en los genes *adcR* y *fur*. Así, al presentar desregulada la red de control de los genes implicados en la captación de ambos elementos, se espera que estos mutantes presenten una expresión constitutiva de las proteínas que se inducen en estas condiciones de cultivo, como ocurre con los mutantes *fur* de *Pasteurella multocida* (Garrido *et al.*, 2008).

Siguiendo este razonamiento, en el presente trabajo se planteó el estudio y caracterización de los mecanismos de captación de zinc y de hierro de *S. suis* con el propósito de avanzar en el desarrollo de vacunas eficaces contra este patógeno. En este contexto, y aprovechando que los genomas de las cepas virulentas 89/1591 y P1/7 del serotipo 2 de *S. suis* han sido completamente secuenciados, se definieron los siguientes objetivos:

1. Análisis de los genes de *S. suis* cuyos productos han sido anotados como posibles transportadores de zinc y de hierro.
2. Estudio de los mecanismos de regulación de los sistemas de captación de zinc y de hierro en *S. suis*.
3. Determinación de la importancia de los reguladores de los sistemas de captación de zinc y de hierro en la virulencia de *S. suis* mediante la construcción de mutantes deficientes en ellos.
4. Caracterización de los productos implicados en el transporte de zinc y de hierro en *S. suis* y estudio de su capacidad inmunogénica y protectora en el modelo animal de ratón.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las distintas cepas bacterianas utilizadas se mantuvieron viables mediante tres procedimientos distintos: (i) resiembras en sus correspondientes medios sólidos (ii), congelación de los cultivos líquidos crecidos durante toda la noche en una dilución 1/2 de glicerol (Panreac) a -20°C y (iii) resuspensión de cultivos frescos crecidos en su correspondiente medio sólido en los viales de criopreservación *Protect* (Ferrer Farma) que se conservaron a -80°C, siendo este último el método de conservación de elección para la criopreservación de las cepas durante largos períodos de tiempo. Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo

Cepa o plásmido	Características relevantes	Referencia
<i>S. suis</i> 89/1591	Cepa virulenta norteamericana del serotipo 2	GREMIP ^a
<i>S. suis</i> P1/7	Cepa virulenta europea del serotipo 2	GREMIP ^a
<i>S. suis</i> UA5000	Cepa P1/7 con una deleción en el gen <i>adcR</i>	Este trabajo
<i>S. suis</i> UA5001	Cepa P1/7 con una deleción en el gen <i>fur</i>	Este trabajo
<i>S. suis</i> UA5002	Cepa P1/7 con una deleción en los genes <i>adcR</i> y <i>fur</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE4</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Clontech
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (r_B m_B^-) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tc</i> ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> The [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Cm ^r]	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> ABLE	C <i>lac</i> (<i>LacZ</i> ω -) [<i>Kan</i> ^r <i>McrA</i> ⁻ <i>McrCB</i> ⁻ <i>McrF</i> ⁻ <i>Mrr</i> ⁻ <i>HsdR</i> ⁻ (r_k m_k)] [<i>F</i> ^r <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^r <i>Z</i> Δ M15 <i>Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene
pGEM-T	Vector de clonación de productos de PCR. Ap ^r	Promega
pET15b	Vector de expresión con cola His ₆ . Ap ^r	Novagen
pCR4-TOPO	Vector de clonación de productos de PCR. Ap ^r	Invitrogen
pSET4s	Función de replicación de pG ⁺ host3 y pUC19. <i>lacZ</i> Spc ^r	Takamatsu <i>et al.</i> , 2001b
pSET4 Δ adcR	pSET4s con el gen <i>adcR</i> deleciónado	Este trabajo
pSET4 Δ fur	pSET4s con el gen <i>fur</i> deleciónado	Este trabajo

^aGroupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Université de Montréal (Canadá).

3.2. Medios de cultivo, antibióticos y otros suplementos

La inoculación de microorganismos en medio líquido se realizó a partir de cultivos líquidos (dilución 1/20 ó 1/50, dependiendo de la cepa) crecidos durante toda la noche a una temperatura de 37°C y en agitación a 150 rpm (agitador orbital Rotabit, Selecta) para las cepas de *E. coli* y sin agitación para las cepas de *S. suis*, manteniendo en este último caso las condiciones de microaerofilia requeridas para su óptimo crecimiento. La inoculación en medio líquido de las cepas congeladas estuvo siempre precedida de una siembra en medio sólido para la comprobación de la pureza del cultivo y de la morfología celular.

Las medidas de crecimiento bacteriano fueron determinadas mediante dos procedimientos: (i) a través del recuento de células viables en medio sólido (cfu: *colony forming units*) y (ii) mediante la determinación espectrofotométrica de la densidad óptica de los cultivos líquidos (espectrofotómetro Uvikon 810 Kontron, Microbean) a una longitud de onda de 600 nm (DO₆₀₀).

La sedimentación de los cultivos líquidos de volúmenes de 10 ml se llevó a cabo mediante una centrífuga Beckman J2-21 y un rotor JA-20 a 8.000 × g. Si no se indica lo contrario, la centrifugación de los cultivos y otros líquidos de volumen igual o inferior a 1,5 ml se realizó en una microcentrífuga Mini Spin (Eppendorf) a velocidad máxima (12.000 × g).

Los medios de cultivo, el material de vidrio y algunas de las soluciones empleadas fueron esterilizados mediante calor húmedo en un autoclave durante 15 minutos a 121°C. Las soluciones que por su composición no permitían su esterilización mediante este método, como por ejemplo los antibióticos, fueron esterilizados utilizando filtros de membrana estériles de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore). El agua utilizada en todos los medios de cultivos fue agua ultrapura de grado Milli-Q (MQ) (*Ultra-pure water system Milli-Q_{plus} 185*; Millipore).

Los medios sólidos, tras su autoclavado, se dejaron enfriar hasta una temperatura de 50°C, momento en el que se añadieron los suplementos adecuados en caso de ser

necesarios y se dispensaron en placas de Petri (Sterilin) en condiciones de esterilidad. Los medios de cultivo, los antibióticos, así como todos los suplementos añadidos a los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detallan a continuación.

LB (Luria-Bertani; Miller, 1991)

Medio de cultivo líquido utilizado en este trabajo para el crecimiento de *E. coli*.

LB	
Triptona (Difco)	10 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
NaCl (Panreac)	10 g
Agua MQ	Hasta 1 L

Para la obtención de LB sólido se añadieron 15 g de agar (Difco) por litro (volumen final).

THY (Todd-Hewitt Yeast)

Medio de cultivo líquido utilizado en este trabajo para el crecimiento de *S. suis*.

THY	
TH (Difco)	30 g
Extracto de corazón (3,1 g)	
Neopeptona (20 g)	
Dextrosa (2 g)	
NaCl (2 g)	
Na ₂ HPO ₄ (0,4 g)	
Na ₂ CO ₃ (2,5 g)	
Extracto de levadura (Difco)	20 g
Agua MQ	Hasta 1 L

Para la obtención de THY sólido se añadieron 15 g de agar (Difco) por litro (volumen final).

BHI (*Brain Heart Infusion*, Oxoid)

Medio de cultivo líquido utilizado en este trabajo para la expresión fenotípica de los cultivos de *E. coli* DH5 α electrotransformados.

BHI	
BHI (Oxoid)	37 g
Extracto de cerebro (12,5 g)	
Extracto de corazón (5 g)	
Proteosa peptona (10 g)	
Glucosa (2 g)	
NaCl (5 g)	
Na ₂ HPO ₄ (2,5 g)	
Agua MQ	Hasta 1 L

TB (*Terrific Broth*; Tartoff y Hobbs, 1987)

Medio de cultivo líquido utilizado en este trabajo para el crecimiento de los transformantes de *E. coli* DH5 α a los que se realizaron extracciones plasmídicas. Para su elaboración se prepararon las soluciones A y B por separado y se mezclaron tras su autoclavado, evitando de esta manera la precipitación de las sales.

Solución A	
Triptona (Difco)	12 g
Extracto de levadura (Difco)	24 g
Glicerol (Panreac)	4 ml
Agua MQ	Hasta 900 ml

Solución B	
KH ₂ PO ₄ (Panreac)	2,31 g
K ₂ HPO ₄ .3 H ₂ O (Merck)	14,43 g
Agua MQ	Hasta 100 ml

Antibióticos y otros suplementos

Cuando fue necesario, a los diferentes medios de cultivo se les añadieron los suplementos adecuados. Las soluciones concentradas de cada antibiótico fueron preparadas siguiendo las indicaciones de la bibliografía (Sambrook y Russell, 2001).

i) *Ampicilina* (sal sódica) (Ap; Roche)

Se preparó una solución concentrada de 50 mg/ml en agua MQ, esterilizándola mediante filtración y conservándola a -20°C. Para preparar la solución de trabajo (5 mg/ml conservada a 4°C), se realizó una dilución 1/10 de la solución concentrada en agua MQ estéril y los medios de cultivo que lo requerían fueron suplementados con este antibiótico a una concentración final de 50 µg/ml.

ii) *Cloranfenicol* (Cm; Roche)

Se prepararon soluciones concentradas a 34 mg/ml en etanol absoluto conservándolas a -20°C. Para preparar la solución de trabajo (3,4 mg/ml conservada a 4°C), se realizaron diluciones 1/10 de las soluciones concentradas en etanol absoluto y los medios de cultivo que lo requerían fueron suplementados con este antibiótico a una concentración final de 34 µg/ml.

iii) *Espectinomicina* (Spc; Sigma)

Se prepararon soluciones concentradas a 50 ó 100 mg/ml en agua MQ, esterilizándola mediante filtración y conservándola a -20°C. Para preparar la solución de trabajo (5 mg/ml para *E. coli* y 10 mg/ml para *S. suis*, conservadas a 4°C), se realizaron diluciones 1/10 de las soluciones concentradas en agua MQ estéril y los medios de cultivo que lo requerían fueron suplementados con este antibiótico a una concentración final de 50 µg/ml (*E. coli*) o 100 µg/ml (*S. suis*).

iv) *IsoPropil-β-D-TioGalactopiranosida* (IPTG; Roche)

Se preparó una solución concentrada de IPTG (1 M), resuspendiendo 2,38 g de dicho compuesto en agua MQ (10 ml de volumen final), esterilizándola mediante filtración y conservándola a 4°C. Los medios que lo requerían fueron suplementados con esta solución a una concentración final de 1 mM.

v) *2,2'-DiPiriDil* (DPD; Sigma)

Se preparó una solución concentrada de DPD (15 mM), resuspendiendo 23,43 mg de dicho compuesto en etanol absoluto (10 ml de volumen final). Los medios que lo requerían fueron suplementados a una concentración final de 150 μM con esta solución siempre preparada en el momento de su uso y protegida de la luz debido a su carácter fotosensible.

vi) *5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido* (X-gal; Apollo)

Se preparó una solución concentrada 40 mg/ml en N,N-dimetil formamida (Panreac) en el momento de su uso para suplementar los medios sólidos de LB que lo requerían a una concentración final de 40 μg/ml.

3.3. Técnicas de DNA

3.3.1. Extracción de DNA cromosómico

Las extracciones de DNA cromosómico realizadas en este trabajo se llevaron a cabo con el *Easy-DNATM Kit* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras cargar la extracciones en un gel de agarosa al 0,4% y cuantificarlas, se guardaron a -20°C hasta su uso.

3.3.2. Extracción de DNA plasmídico

Esta técnica se basa en el protocolo de lisis alcalina, utilizando SDS como detergente y NaOH. Se neutralizó con acetato potásico y se desproteinizó con cloroformo y cloruro de litio (solución de 21,18 g de LiCl [Panreac] en agua MQ estéril, volumen final de 100 ml). La precipitación del DNA se llevó a cabo con etanol. Básicamente se partió de un cultivo de noche crecido en las condiciones adecuadas según la cepa y se centrifugó 1,5 ml durante 1 min. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución I a 4°C. A continuación se añadieron 200 µl de solución II y se agitó por inversión hasta la obtención de una solución viscosa causada por la lisis celular. Tras 5 min en hielo se añadieron 150 µl de solución III, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 5 min en hielo.

Solución I	
Tris-Cl 1 M pH 8 (AppliChem)	50 ml
EDTA 0,5 M pH 8	40 ml
Agua MQ	Hasta 1 L

Autoclavar

Solución II	
SDS (10 g/ hasta 100ml MQ; Merk)*	5 ml
NaOH 10 N (40 g/ hasta 100ml MQ; Panreac)	1 ml
Agua MQ	44 ml

*Ajustar a pH 7,2 con NaOH 1N

Solución III	
Acetato potásico 5 M (294,4 g/100 ml MQ; Panreac)	100 ml
Ácido acético glacial (Panreac)	115 ml
Agua MQ	Hasta 1 L

Ajustar a pH 4,8 con HCl

Se centrifugó durante 5 min y al sobrenadante se le añadieron 450 µl de isopropanol. Tras agitar por inversión se dejó reposar 5 min y se centrifugó durante 5 min, se aspiró el sobrenadante resuspendiendo el sedimento en 100 µl de TE con 2 µl de RNasa (20 mg/ml; Roche) 30 min a 37°C. A continuación se añadieron 400 µl de LiCl y 400 µl de cloroformo y se centrifugó durante 10 min, recuperando la fase acuosa en un tubo nuevo al que se le añadió 1 ml de etanol absoluto y se dejó 20 min a -80°C para precipitar el DNA. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min y se eliminó el sobrenadante añadiendo al sedimento 1 ml de etanol al 70%. Finalmente, se volvió a centrifugar durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 20 µl de RNasa (1 mg/ml) durante 30 min a 37°C. Tras cargar las extracciones en un gel de agarosa al 0,7% y cuantificarlas, se guardaron a -20°C hasta su uso.

EDTA 0,5 M pH=8	
EDTA 0,5 M (Sigma)	186,12 g
Agua MQ	Hasta 1 L

Ajustar a pH 8 con NaOH

TE	
EDTA 0,5 M pH8	2 ml
Tris-Cl 1M pH 7,4 (AppliChem)	1 ml
Agua MQ	97 ml

Autoclavar

3.3.3. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA en particular. Para catalizar la extensión de los oligonucleótidos o cebadores, se utiliza una DNA polimerasa termoestable (Taq), obtenida a partir de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta polimerasa extiende en sentido convergente a partir de dos oligonucleótidos o cebadores que hibridan con cadenas opuestas. Una vez completada la replicación del segmento delimitado por los cebadores diseñados a partir de la secuencia conocida que se pretende amplificar, las dos moléculas nuevas de doble cadena se desnaturalizan por calor y se procede a un segundo ciclo de replicación. La repetición de los ciclos de síntesis y desnaturalización lleva a un aumento exponencial del número de segmentos replicados.

Para las reacciones de amplificación de DNA mediante PCR se utilizó la DNA polimerasa termoestable Taq Expand y el tampón de amplificación con MgCl₂ (10×) suministrado junto a la enzima (Roche). Los dNTPs y los oligonucleótidos se obtuvieron de Eppendorf y Roche, respectivamente. Generalmente, la mezcla de reacción fue de 25 µl. Cuando se requirió una mayor cantidad de producto amplificado, el volumen se aumentó hasta 200 µl, manteniendo las proporciones de cada componente de la mezcla:

Mezcla de reacción (25 µl)	
Tampón (10×)	2.5 µl
dNTPs (10 mM c.u.)	2,5 µl
Oligonucleótido directo (10 pmol/µl)	1,25 µl
Oligonucleótido reverso (10 pmol/µl)	1,25 µl
DNA (200 ng/µl)	1 µl
Taq Expand	0,2 µl
Agua MQ	Hasta 25 µl

Las condiciones de amplificación (*melting Temperature* [T_m] y tiempo de extensión [te]) se determinaron según las instrucciones del fabricante de los oligonucleótidos en el primer caso y del tamaño del fragmento a amplificar en el segundo, tomándose para este último como referencia 1 minuto por cada kilobase (kb) del fragmento a amplificar. Antes del comienzo de los ciclos se procedió a la desnaturalización del DNA a 95°C durante 5 min y tras los 30 ciclos de amplificación, se completó la extensión de las cadenas incompletas durante 7 min a 72°C. El programa básico utilizado fue el siguiente:

Programa de PCR	
95°C	5 min
95°C Desnaturalización	1 min
T _m Hibridación	1 min
72°C Extensión	te
72°C	7 min

} × 30 ciclos

El termociclador empleado fue un *Mastercycler personal* (Eppendorf). Para evitar contaminaciones, las mezclas de reacción se realizaron en una cabina de flujo vertical

(FLV60 Euro Aire) tras irradiar al menos 15 min todo el material con luz UV. Los productos resultantes de las reacciones de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa. El DNA amplificado se purificó mediante el *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (Amersham), siguiendo las indicaciones del fabricante. Cuando fue necesario, uno de los oligonucleótidos utilizados en la PCR se marcó con DIG o con Cy5 en su extremo 5' (Roche). Los productos de PCR purificados se digirieron directamente con las enzimas de restricción adecuadas, siempre que los oligonucleótidos fueran diseñados con tal fin, añadiendo de 1 a 5 nucleótidos extras en sus extremos 5' adyacentes al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, también incluida en el oligonucleótido.

3.3.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis es una técnica utilizada para la separación e identificación de fragmentos de DNA que también permite aislarlos a partir de una mezcla heterogénea. Esta técnica se basa en la carga negativa que presenta el DNA a pH neutro proporcionada por sus grupos fosfato, por lo que al ser sometido a un campo eléctrico migra hacia el polo positivo. Dependiendo de la concentración de agarosa del gel se pueden identificar fragmentos de DNA de diferente peso molecular. La visualización del DNA se realiza por la irradiación con luz ultravioleta de los geles con el agente intercalante bromuro de etidio, que al ser irradiado emite luz fluorescente. Las moléculas de DNA lineal migran a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, de manera que puede determinarse el tamaño de un fragmento determinado de DNA utilizando marcadores de peso molecular (Fig. 17).

La agarosa en polvo (LWO EEO; Pronadisa) se disolvió en un volumen final de 50 ó 200 ml de tampón de electroforesis TAE (1×), en función del tamaño de los soportes utilizados.

TAE (50×)	
Trizma Base (Sigma)	242 g
EDTA 0,5 M pH8	100 ml
Ácido acético glacial (Panreac)	57 ml
Agua MQ	Hasta 1 L

Se pesó la cantidad necesaria de agarosa en función del tamaño de los fragmentos de DNA a visualizar o recuperar:

Tamaño DNA (pb)	% agarosa
>10.000	0,4
3.000-10.000	0,7
500-3.000	1
<500	2

Cuando el gel de agarosa se utilizó para recuperar bandas de DNA se mezclaron 3/4 de agarosa de bajo punto de fusión (agarosa LM sieve; Pronadisa) con 1/4 de agarosa LWO EEO. A continuación, la solución se calentó hasta su ebullición en un horno microondas y una vez templada, se añadió bromuro de etidio (Amresco) a una concentración final de 0,5 µg/ml a partir de una solución concentrada de 10 mg/ml. Tras su homogenización, se vertió en los soportes adecuadamente sellados en los que se colocaron los peines para la formación de los pocillos. Usualmente las muestras cargadas fueron de un volumen de 10 hasta 25 µl por pocillo. Cuando se requirió cargar volúmenes mayores, se unieron varias púas del peine con cinta adhesiva (1 por cada 25 µl de muestra a cargar).

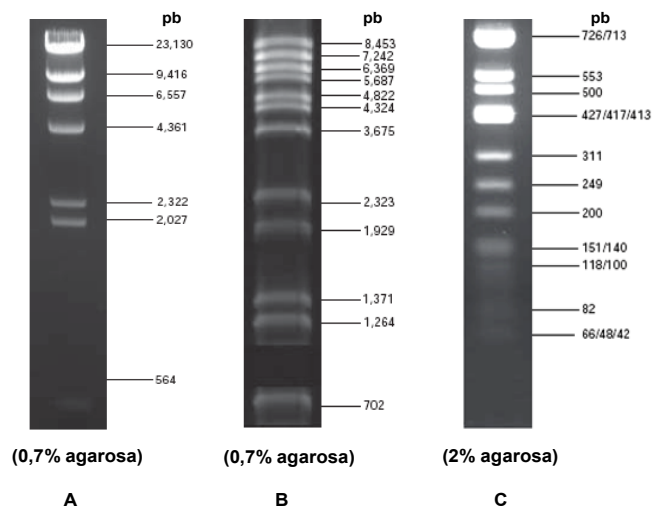


Fig. 17. DNA cromosómico del bacteriófago λ (Promega) digerido con las enzimas de restricción *Hind* III (Roche) (A) o *Bst*E II (Roche) (B) y del bacteriófago ØX174 digerido con *Hinf* I (Promega) (C), utilizados como marcadores de peso molecular en este trabajo. El tamaño de los fragmentos de DNA lineal se muestran en pares de bases (pb). También se muestra el porcentaje de agarosa del gel en el que se realizó la electroforesis.

El gel solidificado se introdujo en una cubeta de electroforesis (Biorad) con TAE (1×) y se cargaron las muestras de DNA. Para preparar las muestras se utilizó solución transportadora 6×. La solución transportadora contiene glicerol, que aporta densidad a la muestra evitando que difunda rápidamente al ser cargada; azul de bromofenol, que permite seguir con facilidad la marcha del gel sin necesidad de irradiarlo; y, al igual que el tampón de electroforesis, contiene EDTA (*EthyleneDiammine Tetraacetic Acid*; Sigma), un potente quelante que actúa secuestrando los cationes necesarios para las nucleasas, impidiendo de esta manera la degradación de los ácidos nucleicos.

Solución transportadora 6×	
Glicerol (Panreac)	30 g
Xilencianol (Clontech)	0,25 g
Azul de bromofenol (Panreac)	0,25 g
EDTA 0,5 M pH 8*	2 ml
Agua MQ	Hasta 100 ml

Autoclavar

*Añadir una vez disueltos el resto de componentes

Durante la electroforesis se aplicó un voltaje constante de entre 50 y 100 voltios (aproximadamente 5 V/cm) con un alimentador de electroforesis 200/2.0 (Biorad), el tiempo de la electroforesis dependió del tamaño de los fragmentos que se querían identificar o separar. Los geles se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta (TS-36; UVP) a 302 nm y se fotografiaron mediante el sistema de captación de imágenes Gel Doc XR (Biorad).

3.3.5. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para la cuantificación y determinación de la pureza de los ácidos nucleicos (DNA y RNA) se realizaron medidas espectrofotométricas mediante el cuantificador de ácidos nucleicos GeneQuant (Amerham Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se realizó una dilución 1/100 en agua MQ y se determinó la absorbancia a 230, 260 y 280 nm en una cubeta de cuarzo. La longitud de onda a 260 nm se utiliza para la cuantificación y, junto con las de 230 nm y 280 nm, para la comprobación de la pureza (mediante las razones 260/230 y 260/280). Los preparados puros de DNA y

RNA presentan razones de $\geq 1,8$ y ≥ 2 , respectivamente. Una absorbancia elevada a 280 nm puede indicar contaminación por proteínas. Asimismo, una absorbancia elevada a 230 nm puede indicar la presencia de impurezas: péptidos y sales, debido a que el Tris, el EDTA y los enlaces peptídicos absorben en esta longitud de onda.

3.3.6. Clonación de fragmentos de DNA en vectores plasmídicos

i) Restricción

La digestión del DNA utilizando enzimas de restricción es uno de los métodos más comunes en biología molecular. Los vectores y los insertos que se utilizan se digieren previamente con una o más enzimas de restricción. Esta técnica se basa en que las endonucleasas de restricción reconocen secuencias específicas de DNA de unos pocos pares de bases, cortando el DNA de doble cadena en un sitio específico situado dentro o cerca de esta secuencia diana. Algunos de los factores importantes que han de tenerse en cuenta para obtener buenos resultados son: la pureza del DNA, la temperatura, el tiempo de digestión y los tampones específicos para cada enzima. En este trabajo se han utilizado las enzimas y sus respectivos tampones, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche).

Restricción	
Tampón 10×	2 μ l
Enzima (10 unidades/ μ l)	0,2 μ l
DNA (1 μ g/ μ l)	2 μ l
Agua MQ	Hasta 20 μ l

Las digestiones con más de una enzima se realizaron con el tampón de mayor compatibilidad para las dos enzimas. Cuando fue necesario, se aumentó el volumen de restricción hasta 100 μ l manteniendo las proporciones de los diferentes componentes. Después de realizar una restricción, siempre se cargó una alícuota para comprobar que el DNA estuviera bien digerido. Si el DNA a digerir fue un plásmido, éste, tras su defosforilación, se cargó en un gel de agarosa y tras cortar la banda de interés, se procedió a su purificación mediante el *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit*. Este procedimiento es importante, para eliminar las sales si se pretende realizar una

ligación, y también para la eliminación del plásmido no digerido, ya que la incorporación de éste tras la transformación sería más eficiente que la propia ligación.

ii) Rellenado de extremos

Según la compatibilidad de las dianas entre el vector y el inserto, puede ser necesario rellenar los extremos cohesivos. La aplicación de esta técnica permite obtener fragmentos de DNA con extremos romos. Así, la DNA polimerasa del bacteriófago T4 (Roche) permite añadir dNTPs en los extremos protuberantes 5' (gracias a su actividad polimerasa 5'→3') y eliminar los extremos protuberantes 3' (gracias a su actividad exonucleasa 3'→5').

Rellenado de extremos	
DNA	5 µg
Tampón (5×)	20 µl
dNTPs (5×)	20 µl
DNA pol T4 (1U/ µl)	5 µl
Agua MQ	Hasta 100 µl

Después de incubar la mezcla durante 15 min a 37°C, se inactivó a 70°C durante 10 min. Para la eliminación de sales se procedió a su purificación mediante el *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit*.

iii) Defosforilación

Para evitar posibles recircularizaciones del vector, antes de realizar la ligación con el inserto, se pueden eliminar los grupos fosfato del extremo 5' del vector mediante el tratamiento con la fosfatasa alcalina (Fig. 18). Para ello, tras la restricción del vector en un volumen final de 100 µl, se añadió 1 µl de fosfatasa alcalina (1 unidad/ µl; Roche), incubándolo a 37°C durante 20 min y repitiendo el proceso 2 veces más. Obsérvese que no se añadió el tampón específico de la fosfatasa alcalina ya que al tratarse del producto de restricción de una enzima, las sales del tampón de éste son útiles para la fosfatasa alcalina. Para detener la reacción se procedió a calentar la mezcla a 70°C durante 10

min. Para la eliminación de las sales se procedió a su purificación mediante el *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit*.

iv) Ligación

La reacción de ligación permite unir fragmentos con extremos compatibles (cohesivos o romos) mediante la ligasa del bacteriófago T4, capaz de catalizar la formación de uniones fosfodiéster entre los extremos terminales 5'-fosfato y 3'-hidroxil del DNA de doble cadena (Fig. 18). Esta reacción depende de la concentración de los extremos del vector y del inserto. Cuando se trató de una reacción entre fragmentos con extremos cohesivos, la relación de los extremos vector-inserto fue 1:2, mientras que para los extremos romos la proporción fue de 1:1. Para calcular las cantidades de vector y de inserto necesarios se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng de vector} \times \text{kb de inserto}}{\text{kb de vector}} \times \text{relación inserto/vector}$$

Las diferentes reacciones de ligación se realizaron utilizando la DNA ligasa del fago T4 (Promega), incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente o bien a 4°C durante toda la noche, tiempo tras el cual se procedió a su inactivación calentando la mezcla durante 10 min a 70°C.

Ligación	
Tampón 2×	2,5 µl
Ligasa T4	0,5 µl
Vector	Según fórmula
Inserto	Según fórmula
Agua MQ	Hasta 5 µl

Cuando por el volumen de los vectores e insertos no fue posible realizar la reacción de ligación en un volumen final de 5 µl, se utilizó 1 µl de tampón 10× en un volumen final de 10 µl y 1 µl de ligasa. En este caso para inactivar la ligación se recurrió a la diálisis, utilizando filtros de 0,05 µm de diámetro de poro (Millipore) para eliminar el exceso de sales que podrían interferir en la electrotransformación.

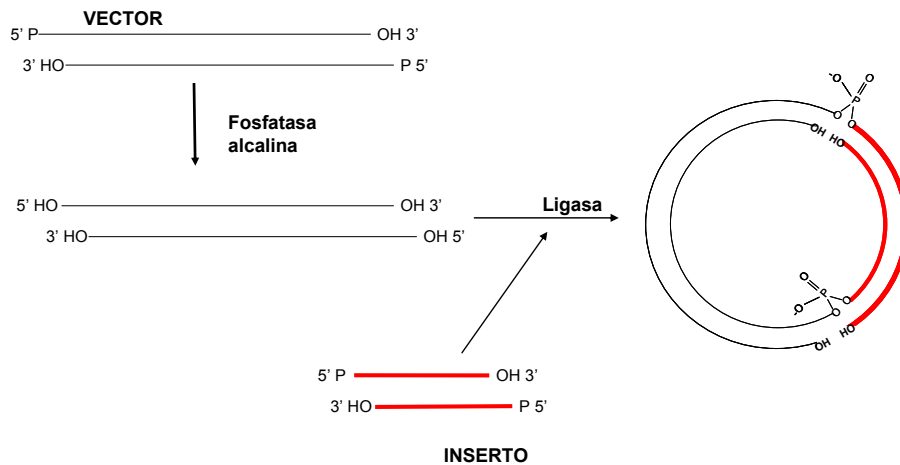


Fig. 18. Representación de la ligación de dos fragmentos de DNA (un inserto y un plásmido con los extremos compatibles entre ellos) tras la defosforilación de los extremos 5' de éste último. Nótese que el producto final permanece con dos *nicks* que serán reparados por la maquinaria celular tras la transformación.

Cabe destacar que el vector de clonación pGEM-T (Promega), utilizado en este trabajo, presenta extremos compatibles con la mayoría de los productos de PCR ya que contiene una timidina en ambos extremos terminales 3'. Este hecho mejora la eficiencia de la ligación de un producto de PCR en este plásmido, evitando la recircularización del vector, siendo además compatible con los productos de PCR amplificados con la Taq polimerasa (Expand), que añade una adenosina a sus extremos 3'. Además, este vector contiene un gen de resistencia a la Ap y los promotores del fago T7 y de la RNA polimerasa del fago SP6 flanqueando el MCS (*Multiple Cloning Site*) dentro de la región codificante α -peptídica de la enzima β -galactosidasa. Así, al insertar un fragmento, la región α -peptídica se inactiva de manera que los clones recombinantes pueden identificarse directamente por el color utilizando placas selectivas que contengan Ap y X-gal. La enzima β -galactosidasa degrada la X-gal formando un precipitado azul. Si la la región codificante α -peptídica de la enzima β -galactosidasa queda interrumpida por DNA foráneo, no se metaboliza la X-gal por lo que el color de las colonias es blanco. Otra ventaja de este vector es que el MCS tiene varias dianas de restricción que permiten liberar los insertos por digestión con diferentes enzimas que cortan el vector una sola vez. Contiene también las secuencias diana de los oligonucleótidos M13F- pUC (-40) y M13R-pUC (-40) (Tabla 2) que fueron utilizados

para amplificar los fragmentos, los cuales pueden ser posteriormente secuenciados (*Macrogen Sequencing Service*).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados con el vector pGEM-T

Oligonucleótido	Secuencia	Aplicación
M13F- pUC(-40)	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC	Oligonucleótido directo para la secuenciación de los fragmentos clonados en el vector pGEM-T. Para la obtención de DNA para ensayos EMSA se marcó su extremo 5' con DIG y para <i>footprinting</i> con Cy5
M13R-pUC(-40)	5'- CAGGAAACAGCTATGAC	Oligonucleótido reverso para la secuenciación de los fragmentos clonados en el vector vector pGEM-T. Para la obtención de DNA para ensayos EMSA se marcó su extremo 5' con DIG y para <i>footprinting</i> con Cy5

v) Transformación

La transformación consiste en la incorporación de DNA exógeno por parte de la célula bacteriana, pudiéndose obtener posteriormente múltiples copias de éste. En este trabajo se han utilizado dos metodologías diferentes para introducir DNA plasmídico en diferentes cepas bacterianas: electrotransformación para *E. coli* DH5 α (Clontech) y *S. suis*; y transformación por choque térmico para *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene), *E. coli* TOP10 (Invitrogen) y *E. coli* ABLE (Stratagene).

La electrotransformación se basa en la aplicación de un pulso eléctrico de alto voltaje que despolariza la membrana celular, formándose poros transitorios a través de los cuales pueden penetrar moléculas de DNA al interior celular (Shigekawa y Dower, 1988). Se utilizó el *Gene Pulser II* y el *Pulse Controller Electroporation System* (Biorad) y los protocolos recomendados por el fabricante. Básicamente, se añadieron 5 μ l de la ligación inactivada o 200 ng de plásmido a 50 μ l de células competentes en hielo y tras 5 min se transfirió la mezcla a una cubeta de electrotransformación estéril (2 mm *electrode gap*, Biolabs) que se colocó en la cámara del *Gene Pulser*. Las condiciones de la electroporación utilizadas para las células electrocompetentes de *E. coli* fueron 25 μ FD de capacitancia y 200 Ω de resistencia en paralelo, aplicando un pulso eléctrico de 2 kV/cm² de potencial. Inmediatamente se añadió 1 ml de BHI a 4°C a la cubeta de electrotransformación y se recuperó la mezcla que fue transferida a un tubo estéril de vidrio, incubándolo a 37°C en agitación durante 45 min para la expresión fenotípica. Finalmente los cultivos se sembraron en las placas selectivas adecuadas.

Para la transformación por choque térmico se añadieron a un vial de células competentes de *E. coli* entre 10 y 100 ng de DNA en un volumen de 1 a 5 μ l, incubándolo durante 30 min en hielo, favoreciendo así la unión del DNA a la pared de las células competentes. A continuación, se procedió a la realización del choque térmico (90 s a 42°C), y se mantuvo el vial en hielo durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se añadió 800 μ l de LB para permitir la expresión fenotípica, que se realizó a 37°C durante 1 h. Finalmente se sembraron en las placas selectivas adecuadas.

3.3.7. Obtención de mutantes de *S. suis*

La obtención de mutantes de *S. suis* se realizó mediante delección. La estrategia utilizada se detalla en el Apartado 4.2.3 de Resultados y Discusión.

En primer lugar, el producto de la PCR con la delección fue clonado en el vector pCR4-TOPO, (Invitrogen), mediante la transformación por choque térmico de las células competentes *One Shot TOP10* (Invitrogen). Dicho vector fue purificado, procediéndose posteriormente a la amplificación de sus insertos mediante PCR utilizando los oligonucleótidos M13F- pUC(-40) y M13R-pUC(-40). El producto de PCR obtenido fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI* y, una vez purificado, se clonó en el vector pSET4s mediante la transformación de las células competentes para clonajes dificultosos *ABLE* (Stratagene) obteniéndose los vectores pSET4 Δ adcR y pSET4 Δ fur, que presentan delecionados los genes *adcR* y *fur*, respectivamente.

El vector utilizado para la obtención de los mutantes fue el pSET4s, un plásmido suicida termosensible que contiene el gen de resistencia a la espectinomicina (Takamatsu *et al.*, 2001a). Además, presenta un MCS dentro de la región codificante α -peptídica de la enzima β -galactosidasa. Este vector presenta el origen de replicación ColE1 del vector pUC19, que permite su propagación a 37°C en *E. coli*. Sin embargo, no ocurre lo mismo en *S. suis* debido a la termosensibilidad del producto del gen *repA*, implicado en el inicio de la replicación del vector, que permite su propagación a 28°C pero no a 37°C. Los oligonucleótidos utilizados en la construcción de mutantes se muestran en la Tabla 3.

i) Preparación de células electrocompetentes de *S. suis*

Un cultivo de 20 ml de la cepa de *S. suis* en THY líquido con 40 mM DL-Treonina y 10 mM glicina de una DO_{600} de 0,5, se centrifugó y el sedimento se lavó 2 veces con 10 ml de CTB (*Chemical Transformation Buffer*). Tras el segundo lavado, los tubos con el sedimento resuspendido en CTB, se mantuvieron en hielo durante 30 min. A continuación, se realizaron 4 lavados con 10 ml de *Washing Buffer*. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 500 μ l de *Storage Buffer* (solución anterior con el 15% de glicerol) y se realizaron alícuotas de 100 μ l que se conservaron a -80°C hasta su uso.

THY (40 mM DL-Treonina + 10 mM glicina)	
TH (Difco)	6 g
Extracto de levadura (Difco)	4 g
DL-Treonina 0,5 M	16 ml
Glicina 1 M	2 ml
Agua MQ	Hasta 200 ml

Autoclavar

CTB (<i>Chemical Transformation Buffer</i>)	
MnCl ₂ 1M (Sigma)	11 ml
CaCl ₂ 1M (Merck)	3 ml
KCl 1M (Panreac)	50 ml
Pipes[piperazina-N,N'-bis(ácido2-etanosulfónico)] 100 mM (Sigma)*	20 ml
Agua MQ	Hasta 200 ml

*Homogeneizar con NaOH

Esterilizar por filtración y conservar a 4°C

<i>Washing Buffer</i>	
Sacarosa (Merck)	20,52 g
Fosfato potásico (Panreac) 200 mM	2 ml
Agua MQ	Hasta 200 ml

Autoclavar y conservar a 4°C

ii) Electrotransformación de *S. suis*

Una alícuota de 100 µl de células competentes se mezcló con 1 µg de DNA plasmídico, siendo la mezcla transferida a una cubeta de electroporación (2 mm *electrode gap*) y pulsada inmediatamente mediante el *Biorad Gene Pulser* (2,5 kV, 200 Ω y 25 µF). La mezcla fue entonces diluida en 1 ml de THY e incubada durante 2 h a 28°C, tiempo tras el que se procedió a sembrar los cultivos en placas THY suplementadas con espectinomicina (el antibiótico para el que el vector presenta resistencia), incubándose a 28°C durante 48 h.

iii) Reemplazamiento génico

Se seleccionaron varios clones de cada cepa transformada que se resembraron mediante estría en placas de THY suplementadas con espectinomicina para seleccionar las células que habían incorporado el plásmido.

Varias colonias aisladas fueron seleccionadas y purificadas mediante siembra en estría en placas de THY suplementadas con espectinomicina incubándose a 37°C. Mediante PCR se verificó que las colonias que aparecieron en estas placas correspondían a las células que habían incorporado la construcción en sus cromosomas como resultado de una recombinación homóloga simple, ya que a 37°C no puede tener lugar la replicación del vector termosensible en *S. suis* y mediante la espectinomicina sólo se seleccionan aquellas células que lo han integrado en su cromosoma (Fig. 19). A partir de este punto comenzaron las sucesivas réplicas en placas de THY sin antibiótico, incubándose durante 48h a 28°C para permitir el segundo *crossover* (Fig. 19).

Además, se realizaron réplicas de estas colonias resemebrándose en el mismo tipo de placas que incluían el antibiótico para el que el vector proporcionaba resistencia, incubándose éstas a 37°C. Esto fue útil para el cribaje de las células que habían perdido el vector, por lo que consecuentemente habrían perdido también la resistencia que éste proporcionaba. Así, las colonias cuyas réplicas no crecían en estas placas eran candidatos a ser mutantes ya que las células podían haber reemplazado su gen salvaje por el segmento génico modificado mediante delección como consecuencia de una doble recombinación (Fig. 19). Finalmente, los mutantes se confirmaron mediante PCR y secuenciación.

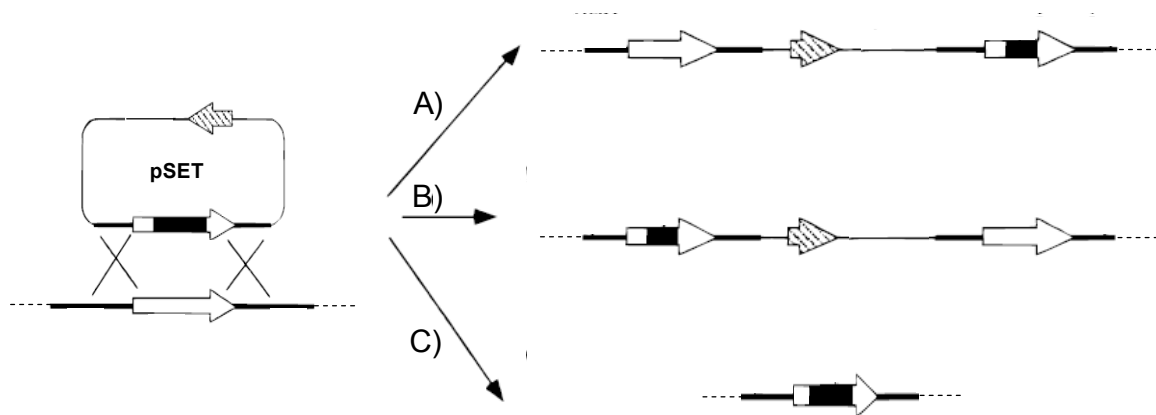


Fig. 19. Representación esquemática de las estructuras cromosómicas antes (izquierda) y después (derecha) de la recombinación simple (A y B) y de la doble recombinación (C). La flecha rayada representa al gen que proporciona resistencia a la espectinomicina proporcionada por el vector pSET4s. La flecha grande blanca representa el gen que se pretende mutar y su versión mutada se representa mediante un rectángulo negro en su interior. Las regiones adyacentes al gen que se pretende mutar se representan mediante líneas continuas (las más cercanas) o discontinuas (las más alejadas). Figura modificada de Takamatsu *et al.* (2001b).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de mutantes

Oligonucleótido	Secuencia	Aplicación
adcR-ID1	5'- TGTTATAAAAGCGTGCCTAGC	Oligonucleótido directo para la mutación del gen <i>adcR</i> de <i>S. suis</i>
adcR-ID2	5'- GCAGCCTTTTCAATAAGCATC	Oligonucleótido reverso para la mutación del gen <i>adcR</i> de <i>S. suis</i>
adcR-ID3	5'- TTTAGTTTGACTGAGGCTGC	Oligonucleótido directo para la mutación del gen <i>adcR</i> de <i>S. suis</i>
adcR-ID4	5'- AGACTGCTGATCACGAACC	Oligonucleótido reverso para la mutación del gen <i>adcR</i> de <i>S. suis</i>
adcR-ID5	5'- ATTCTGGCTCATAACTTACGC	Oligonucleótido directo para la mutación del gen <i>adcR</i> de <i>S. suis</i>
adcR-ID6	5'-GGTATGCGCGTGATGAGGATCCTTTGA CAAGAACCAACC	Oligonucleótido reverso para la mutación del gen <i>adcR</i> de <i>S. suis</i> , complementario a adcR-ID7
adcR-ID7	5'-GGTTGGTTCTTGTCAAAGGATCCTCATC ACGCGCATACC	Oligonucleótido directo para la mutación del gen <i>adcR</i> de <i>S. suis</i> , complementario a adcR-ID6
adcR-ID8	5'- AATTCGTAAACCGTGCTCG	Oligonucleótido reverso para la mutación del gen <i>adcR</i> de <i>S. suis</i>
fur-ID1	5'-ATGGATTGCGGACTGATGAGGG	Oligonucleótido reverso para la mutación del gen <i>fur</i> de <i>S. suis</i>
fur-ID2	5'- CGTGACCAAATTGAAACGGACC	Oligonucleótido directo para la mutación del gen <i>fur</i> de <i>S. suis</i>
fur-ID3	5'- TTTCAGCACTAGGGTGGTC	Oligonucleótido reverso para la mutación del gen <i>fur</i> de <i>S. suis</i>
fur-ID4	5'- CTTGCTACTGTAATGGTCCG	Oligonucleótido directo para la mutación del gen <i>fur</i> de <i>S. suis</i>
fur-ID5	5'- GGCTGAAATGAAGAGGATAGG	Oligonucleótido reverso para la mutación del gen <i>fur</i> de <i>S. suis</i>
fur-ID6	5'-CAGTCGTTGCCAAGCTTATCGTGGATGT AGAAATCCCAGC	Oligonucleótido directo para la mutación del gen <i>fur</i> de <i>S. suis</i> , complementario a fur-ID7
fur-ID7	5'-GCTCGGGATTCTACATCCACGATAAG CTTGGCAACGACTG	Oligonucleótido reverso para la mutación del gen <i>fur</i> de <i>S. suis</i> , complementario a fur-ID6
fur-ID8	5'- TACGACCTGCACCATGAAC	Oligonucleótido directo para la mutación del gen <i>fur</i> de <i>S. suis</i>

3.4. Técnicas de RNA

Para evitar la degradación del RNA, todo el material utilizado fue libre de RNasas. Las soluciones preparadas se trataron con DEPC (DiEtil PiroCarbonato; Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. El material de vidrio se trató a 150°C durante un mínimo de 3 h y todo el material fungible utilizado estaba libre de RNasas.

3.4.1. Extracción de RNA

Las extracciones de RNA se realizaron a partir de los sedimentos de 10 ml de un cultivo en la fase de crecimiento exponencial (DO_{600} de 0,6) del microorganismo a estudiar en las condiciones adecuadas. Los sedimentos se resuspendieron en una solución de TE con lisozima (10 mg/ml; Sigma) y se incubaron 10 min a 37°C. Para la extracción de RNA se utilizó el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La eliminación de los restos de DNA se llevó a cabo durante el tratamiento mediante la *RNase-free DNase* (Qiagen) y posteriormente mediante la *DNase Turbo* (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la eliminación de los restos de proteínas y de sales tras el tratamiento con la DNasa, los RNAs se purificaron con una *RNeasy mini column (clean up)*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). La concentración y la integridad del RNA se determinaron mediante la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y la electroforesis en geles de agarosa al 1%, respectivamente. En todos los casos, la ausencia de DNA en las muestras de RNA se determinó por PCR.

3.4.2. RT-PCR

Los análisis de RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) se realizaron mediante el *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche). Esta técnica permite un análisis rápido, sensible y reproducible del RNA, realizando la transcripción inversa del RNA generando cDNA (DNA complementario) y la posterior amplificación del cDNA mediante PCR. Las enzimas *Expand High Fidelity PCR System* y *AMV Reverse Transcriptase* (Roche) permiten la realización de ambas reacciones en un solo paso. Para la realización de las RT-PCRs se siguieron las instrucciones del fabricante

utilizando oligonucleótidos internos de la región codificante de los genes de estudio (Tabla 4).

Mezcla I	
dNTPs (10 mM c.u.)	5 μ l
Oligonucleótido directo (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Oligonucleótido reverso(10 pmol/ μ l)	2 μ l
DTT (100 mM)	2,5 μ l
Agua MQ tratada con DEPC	Hasta 25 μ l

Mezcla II	
Tampón (5 \times)	10 μ l
Enzimas	1 μ l
Agua MQ tratada con DEPC	Hasta 25 μ l

Tras unir las dos mezclas se añadieron 100 ng del RNA de estudio. Para la realización de la retrotranscripción, el programa utilizado del termociclador incluyó un paso previo de 30 min a 50°C. Posteriormente se utilizó un programa normal de PCR.

3.4.3. RT-PCR a tiempo real

La RT-PCR a tiempo real se utiliza para cuantificar la expresión génica mediante el análisis del RNA. En este estudio se ha utilizado el *LightCycler RNA Master SYBR Green I* (Roche) usando el *LightCycler Instrument* (Roche).

El *LightCycler-RNA Master SYBR Green I* realiza una amplificación a alta temperatura, utilizando la Tth DNA polimerasa combinada con aptámeros. Estas moléculas son oligonucleótidos que se unen al centro activo de la polimerasa impidiendo la unión de otros ácidos nucleicos a temperaturas inferiores a la óptima para la Tth polimerasa. Cuando se aumenta la temperatura, los aptámeros son liberados por la enzima y se puede iniciar la transcripción inversa y la subsiguiente amplificación. Esta polimerasa es termoestable, tiene actividad transcriptasa inversa dependiente de RNA y actividad DNA polimerasa dependiente de DNA, por lo que permite la realización de la RT y de la PCR en una sola reacción.

El *SYBR Green I* es un fluoróforo específico para el DNA de doble cadena. Está incluido en la mezcla de reacción del kit y actúa uniéndose a los productos de PCR en cada uno de los pasos de amplificación.

El equipo *LightCycler* permite cuantificar los productos de PCR durante cada ciclo de amplificación, monitorizando la fluorescencia a una longitud de onda de 521 nm. Es un termociclador rápido, combinado con un fluorímetro de microvolumen, que permite cambios de temperatura rápidos entre los diferentes ciclos.

Con los datos que se obtienen se puede realizar un análisis paso a paso de la amplificación permitiendo cuantificar el RNA de interés. Además, es posible determinar el punto de fusión de los fragmentos amplificados y descartar amplificaciones inespecíficas. Los datos obtenidos se analizaron en un ordenador mediante el *LightCycler Software* (Roche).

Mezcla de RT-PCR a tiempo real	
Mn(OAc) ₂	1,3 µl
LightCycler-RNA Master SYBR Green I	7,5 µl
Oligonucleótido directo (10 pmol/µl)	0,6 µl
Oligonucleótido reverso(10 pmol/µl)	0,6 µl
Muestra de RNA	2 µl
Agua MQ tratada con DEPC	Hasta 18 µl

Esta mezcla se transfirió a un capilar frío y se selló colocándose en el rotor del aparato. El programa que se utilizó comprende diferentes fases que se describen a continuación:

Programa	Temperatura (C°)	Tiempo (s)	Pendiente (C°/s)	N° de ciclos
Transcripción inversa	61	1200	20	1
Desnaturalización	95	30	20	1
Amplificación	95	1	20	45
	58	10	20	
	72	15	20	
	76	5	20	
Curva de fusión	95	5	20	1
	68	18	20	
	95	0	0,1	
Enfriamiento	40	30	20	1

Todos los oligonucleótidos utilizados tanto en RT-PCR como en RT-PCR a tiempo real (Tabla 4) fueron diseñados con el programa *Primer Select* (DNA Star, Inc.) con la

misma temperatura de hibridación (58°C) y se comprobaron sus respectivas amplificaciones a esta temperatura mediante PCR con DNA cromosómico antes de su utilización en los ensayos de RNA.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en las RT-PCR y/o RT-PCR a tiempo real

Oligonucleótido	Secuencia	Aplicación
103.up	5'- GCTTCGACAAATTTACCGCTGAC	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
103.dw	5'- TAAGAGAAGGCTGTATGTTGAGTGAC	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real
173.up	5'- TCACAACCTGCCAACCAAAGAA	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
173.dw	5'- GCCATCGCAATCCAAACAC	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real
174.up	5'- CAATTGACAACGGCAGATACAGAAGC	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
174.dw	5'- GCAAAAACCGAGAGCGCGATAGATTA	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
175.up	5'- TATCATCATCGGCCTCATCCTT	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
175.dw	5'- GAACGGCAAACCAAATCTACCC	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
176.up	5'- TTTCGAGCATGCTGTCTGGTAT	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real
176.dw	5'- GGTAATCCGCCTTTCACG	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
1237.up	5'- CATAGTGGGGAGAGGCATAG	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real
1237.dw	5'- ATCTTCATCCGCAGCAACAC	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
1238.up	5'- TTGACGAGGATACGGCATTGT	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
1238.dw	5'- GCACTCGCTGGGGTTTCTG	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
1239.up	5'- AAGGTTGGTTTCGTCGTTTGA	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
1239.dw	5'- GTCCTGCATCCATCCCTGTTGTC	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
1240.up	5'- GATTTTGGTTGGTTCTTGTC	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real y RT-PCR
1240.dw	5'- GTATGCGCGTGATGATGAG	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real
feoA.up	5'- ACACTTAGCGCACTTGGGTTTA	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real
feoA.dw	5'- GCCTAGGGGAGCGACTTTTT	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real
feoB.up	5'- CTGGCTGGCTACAATCTCTGGT	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real

feoB.dw	5'- TTTTCGGTCCTGTTTCATTTCA	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real
309.up	5'- CAATTCCTCGGTTTCCTCA	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real
309.dw	5'- ACTCTGGTAATCCGCATCAAG	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real
1390.up	5'- GCGTAAAACCAATCCCTAACAC	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real
1390.dw	5'- AAAACCAATCGAAGACCCTCAC	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real
1352.up	5'- ATCAAAAATGGCACGCTATCAG	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real
1352.dw	5'- GAAGGTAATCCGACTCACAC	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real
1103.up	5'- GAACATCGCCTATCCGCAGAC	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real
1103.dw	5'- GACCATTGGCTATCGCACTAT	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real
cys.up	5'- GGTAACACTGGTATCGGTCTTG	Oligonucleótido directo usado en RT-PCR a tiempo real
cys.dw	5'- CCTGTCCTGTGTATCTTCGTG	Oligonucleótido reverso usado en RT-PCR a tiempo real

3.5. Técnicas de proteínas

3.5.1. Sobreexpresión de proteínas con el sistema pET

El plásmido utilizado para la clonación y la sobreexpresión de proteínas recombinantes fue el pET15b (Novagene). Este vector permite la clonación en fase de los genes que codifican las proteínas que se desean sobreexpresar, quedando bajo el control de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 y de un RBS (*Ribosome Binding Site*) muy eficiente de la proteína mayoritaria de la cápside del fago T7. El hospedador utilizado para la sobreexpresión de proteínas fue *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene), lisogénica para el bacteriófago λ DE3. Este bacteriófago contiene un fragmento de DNA con el gen *lacI* y el gen que codifica la RNA polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. En una cepa lisogénica para DE3, el único promotor capaz de producir la transcripción de la RNA polimerasa del fago T7 es el *lacUV5*, inducible por IPTG. De esta manera, al añadir IPTG al cultivo, se induce la RNA polimerasa que transcribe el DNA clonado en el vector pET15b siendo su traducción masiva gracias a la gran eficiencia de su RBS. Además, esta cepa se caracteriza por ser deficiente en las proteasas Lon y OmpT, evitándose de esta manera la degradación de las proteínas heterólogas expresadas en esta cepa. Por otra parte, el vector pET15b también permite la inserción de una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína sobreexpresada, hecho que facilita la purificación de ésta. Asimismo, presenta codones de final de lectura en los tres posibles marcos de lectura a continuación de la región de clonación y, además, un terminador de la transcripción del bacteriófago T7.

El plásmido pET15b contiene el operón *lac downstream* del promotor T7. También presenta el gen *lacI* (represor *lac*). Cuando este vector es usado en lisógenos DE3, el represor LacI actúa en el promotor *lacUV5*, en el cromosoma del huésped, para reprimir la transcripción del gen de la RNA polimerasa T7 y en el promotor *T7lac* del vector, bloqueando la transcripción del gen clonado en ausencia de IPTG.

La cepa *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL presenta copias extras de los genes *argU*, *ileY* y *lewW*, que codifican tRNAs de baja frecuencia de uso en *E. coli* (y reconocen los

codones AGA, AGG y CUA, respectivamente). Estos genes se encuentran en un plásmido que presenta resistencia al cloranfenicol.

3.5.2. Clonación en pET15b e inducción con IPTG

Para llevar a cabo la clonación de los genes que codifican las proteínas de interés se procedió a la amplificación mediante PCR de sus regiones codificantes, a partir del DNA cromosómico de la cepa 89/1591 de *S. suis*. Los oligonucleótidos utilizados en la PCR (Tabla 5) se diseñaron para poder digerir directamente los productos de PCR purificados, incluyendo de 1 a 5 nucleótidos extra en sus extremos 5', adyacentes a los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. Las dianas utilizadas fueron las únicas presentes en el vector, en el MCS, para orientar el producto de PCR digerido en la dirección deseada. Para la elección de las enzimas de restricción utilizadas se tuvo en cuenta que éstas no digirieran el producto de PCR y que sus dianas se encontraran en el MCS del plásmido pET15b. En los oligonucleótidos directos siempre se incluyó la diana *NdeI*, que permite que la clonación empiece en el codón de inicio AUG en el extremo 5' del inserto. Los oligonucleótidos reversos incluyeron las dianas *BamHI* o *XhoI*, dependiendo del inserto a clonar, además del codón de final de lectura.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la clonación en pET15b

Oligonucleótido	Secuencia ^a	Aplicación
adcR.up. <i>NdeI</i>	5'-ACTGACATATGCCTATGAATCGTATTGTATTAG	Oligonucleótido directo para la clonación del gen <i>ssuiDRAFT 1240 (adcR)</i> de <i>S. suis</i>
adcR.rv. <i>BamHI</i>	5'-AGGGATCCATCTCATCTATTTTCTAATC	Oligonucleótido reverso para la clonación del gen <i>ssuiDRAFT 1240 (adcR)</i> de <i>S. suis</i>
fur.up. <i>NdeI</i>	5'-ACTGACATATGGAACCTCCATTCTCACTTCAATGC	Oligonucleótido directo para la clonación del gen <i>ssuiDRAFT 1172 (fur)</i> de <i>S. suis</i>
fur.rv. <i>BamHI</i>	5'-AGGGATCCATTCGTCTTTTAGCCCTGAC	Oligonucleótido reverso para la clonación del gen <i>ssuiDRAFT 1172 (fur)</i> de <i>S. suis</i>
103.up. <i>NdeI</i>	5'-ACTGACATATGTAAAGAAAAGTGATAAGAGGC	Oligonucleótido directo para la clonación del gen <i>ssuiDRAFT 103</i> de <i>S. suis</i>
103.rv. <i>XhoI</i>	5'-ACTGCTCGAGATTTTATTTTAACTCTTGAGC	Oligonucleótido reverso para la clonación del gen <i>ssuiDRAFT 103</i> de <i>S. suis</i>
174.up. <i>NdeI</i>	5'-ACTGACATATGAAAAAGTTTTAGCTATTTTATTTAGTTTATTG	Oligonucleótido directo para la clonación del gen <i>ssuiDRAFT 174</i> de <i>S. suis</i>

174.dw.BamHI	5'- <u>AGGGATCC</u> GCCTTTTACTGAAGTTTTGAATTCTG	Oligonucleótido reverso para la clonación del gen <i>ssuiDRAFT 174</i> de <i>S. suis</i>
1237.up.NdeI	5'- <u>ACTGACATATG</u> AAAAAAGTTGGTTTATTATTCTTG	Oligonucleótido directo para la clonación del gen <i>ssuiDRAFT 1237</i> de <i>S. suis</i>
1237.dw.XhoI	5'- <u>ACTGCTCGAGCC</u> AGTCTTACTCTCTTAGTGAGCC	Oligonucleótido reverso para la clonación del gen <i>ssuiDRAFT 1237</i> de <i>S. suis</i>

^aLas dianas de restricción se muestran subrayadas. Los oligonucleótidos extra presentes en el extremo 5' para permitir la digestión directa de los productos de PCR se muestran en negrita.

Tras la digestión de los productos de PCR purificados con las enzimas de restricción adecuadas y su purificación, se realizó la ligación en el vector pET15b purificado, previamente cortado con las enzimas de restricción correspondientes. La ligación se transformó por electroporación en la cepa de *E. coli* DH5 α y se procedió a la extracción plasmídica. La clonación en los plásmidos recombinantes se confirmó mediante digestión y secuenciación con los oligonucleótidos T7 Promoter y T7 Terminator (Tabla 6). Los plásmidos recombinantes comprobados se usaron para transformar la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RIL mediante choque térmico.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados con el vector pET15b

Oligonucleótido	Secuencia	Aplicación
T7 Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG	Oligonucleótido directo para la secuenciación de los fragmentos clonados en el vector pET15b
T7 Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Oligonucleótido reverso para la secuenciación de los fragmentos clonados en el vector pET15b

Para cada una de las proteínas que se pretendían sobreexpresar, tras la transformación, se seleccionaron 8 clones. Se realizó una resiembra 1/20 de un cultivo de noche de cada uno de ellos en LB con los antibióticos correspondientes (ampicilina y cloranfenicol) hasta una DO₆₀₀ de 0,6. La inducción de las proteínas se realizó añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM. Transcurridas 3 h en agitación a 37°C, se procedió a la sedimentación de los cultivos. Se seleccionó, mediante la visualización de los extractos crudos en SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli, 1970), el clon que mayor sobreexpresión presentaba.

3.5.3. Preparación de extractos crudos

Tras las 3 h de inducción con IPTG, se centrifugó, durante 1 min, 1 ml del cultivo inducido y, como control, se centrifugó 1 ml del mismo cultivo al que no se le añadió IPTG. Los sedimentos se resuspendieron en 90 μ l de agua MQ y se añadieron 30 μ l de tampón de carga de proteínas 4 \times , conservándolos a -80°C hasta su uso. Para la preparación del tampón de carga de proteínas 4 \times se realizaron alícuotas de 1 ml de la mezcla indicada a continuación, que se conservó a -20°C y a la que en el momento de su uso se añadieron 100 μ l de DTT 100 mM (1,4 DiTioTreitol; Roche) y 40 μ l de 2-mercaptoetanol (Merck) por alícuota.

Tampón de carga de proteínas 4 \times	
*Tampón compresor 4 \times	25 ml
Glicerol (Panreac)	20 ml
SDS (<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate; Merck)	4 g
Azul de bromofenol (Panreac)	0,2 g
Agua MQ	Hasta 50 ml

*Ver Apartado 3.5.6.

Tras calentar los extractos crudos durante 5 min a 95°C para lisar las células, se cargaron 10 μ l por muestra que se analizaron mediante SDS-PAGE.

3.5.4. Purificación de proteínas

Un volumen de 10 ml de los cultivos inducidos se centrifugó durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 1 ml de *Equilibration Wash/Buffer* (Clontech) al que previamente se añadió un comprimido de *Complete Mini protease inhibitor cocktail* (Roche) por cada 10 ml. Las suspensiones celulares fueron lisadas por sonicación en hielo durante 5 min a 50 W en ciclos de 0,7 s, utilizando un homogenizador ultrasónico Braun Labsonic U (B. Biotech) con una sonda mediana de Titanio (12T). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 7.000 \times g durante 10 min. Una muestra del sobrenadante de cada suspensión celular sonicada fue analizada mediante SDS-PAGE para comprobar que todas las proteínas eran solubles y, una vez confirmado, se procedió

a la purificación de las proteínas mediante el *TALON Purification Kit* (Clontech). Este método se basa en la interacción reversible entre la cola de histidinas de la proteína recombinante sobreexpresada y los iones de cobalto inmovilizados en la resina TALON. Por cada 1 ml de sonificado se utilizaron 700 μ l de resina. Antes de añadir la muestra sonicada fue necesario equilibrar la resina. Para ello, se resuspendió en 5 volúmenes de *Equilibration Wash/Buffer* (Clontech) y se eliminó el sobrenadante mediante su centrifugación durante 2 min. A continuación, se añadió 1 ml de la muestra sonicada a los 700 μ l de resina. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 20 min. Se eliminó el sobrenadante centrifugando durante 5 min y la resina se lavó dos veces con 10 volúmenes de *Equilibration Wash/Buffer* (Clontech), agitando a temperatura ambiente durante 10 min y eliminando el sobrenadante centrifugando durante 5 min cada vez. Las proteínas purificadas se eluyeron con 1 ml de *Elution Buffer* (Clontech), una solución con imidazol que presenta gran afinidad por el cobalto y que actúa desplazando la unión entre las colas de histidina de las proteínas recombinantes y el cobalto de la resina, permitiendo de esta manera la solubilización de las proteínas. Finalmente, las proteínas purificadas se dializaron (mediante membranas de celulosa *Dialysis tubing*; Sigma) en fosfato sódico (pH 7) para eliminar el imidazol y se visualizaron mediante SDS-PAGE. En los casos en los que fue necesario, se aumentó la concentración de las proteínas mediante las columnas Microcon YM-50 (Millipore) por centrifugación, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.5. Extracción de proteínas asociadas a la pared de *S. suis*

La extracción de proteínas asociadas a la pared de *S. suis* se llevó a cabo por el método descrito por Tavares y Sellstedt (2000), con algunas modificaciones. Cultivos de 200 ml de *S. suis* crecidos durante toda la noche fueron sedimentados mediante la centrífuga Eppendorf 5810R a $8.000 \times g$ durante 10 min y las células lavadas con Tris-HCl (62,5 mM, pH 6,8) para eliminar los restos de trazas de proteínas extracelulares. El sedimento fue pipeteado continuamente durante 5 min con el mismo tampón suplementado con el 0,1% (v/v) de Triton X-100 (Roche), un detergente no iónico que permite la solubilización de las proteínas asociadas a la pared celular. La suspensión se centrifugó durante 10 min a $8.000 \times g$ y a 4°C. A continuación, el sobrenadante se centrifugó con una ultracentrífuga Beckman (modelo L80) utilizando el rotor Ti80 durante 2h a 51.030

× g (4°C) para concentrar el extracto de proteínas asociadas a la pared celular. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 100 µl de Tris-HCl (62,5 mM, pH 6,8) y se visualizó mediante SDS-PAGE, conservándose a 4°C.

3.5.6. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

En este trabajo se realizaron electroforesis de una dimension en minigeles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida al 10% (para extractos de proteínas asociadas a la pared), al 12% (para proteínas mayores de 20 kDa) o al 15% (para proteínas menores de 20 kDa). La electroforesis se realizó utilizando el *Hoefler MINIVE Complete (Vertical electroforesis system)*, la fuente de electroforesis APELEX ST304 (*electrophoresis power supply*); los vidrios, los espaciadores (1 × 105 mm) y los peines de Amersham. Mediante este método desnaturalizante, las cadenas individuales de polipéptidos forman complejos con las moléculas de SDS (cargadas negativamente), migrando como complejos proteína-SDS con carga global negativa a través de los poros del gel de poliacrilamida hacia el polo positivo. La velocidad de migración bajo estas condiciones es mayor para los polipéptidos más pequeños y menor para los más grandes. Los geles de poliacrilamida se forman tras la polimerización de monómeros de acrilamida en cadenas de poliacrilamida. El TEMED (*N,N,N',N'-TetraMethylEthyleneDiamine*; Amresco) cataliza la formación de radicales libres que dirigen la reacción a partir del ión persulfato que se añade en forma de APS (*Ammonium PerSulfate*; Amresco) y que actúa como iniciador. Se utilizó acrilamida 30% p/v, bisacrilamida 0,8% p/v (Pronadisa). Para su preparación se realizaron dos mezclas por separado justo en el momento de su utilización. En primer lugar, se realizó la mezcla del separador con la que se llenó el soporte de vidrio (aproximadamente las 3/4 partes), se cubrió con 200 µL SDS al 1% para evitar la entrada de aire y facilitar la polimerización (durante 10 min).

Separador (para geles al 10%)	
Agua MQ	3,125 ml
Tampón separador 4×	1,875 ml
Acrilamida 30%	2,5 ml
APS 10%	80 µl
Temed	20 µl

Separador (para geles al 12%)	
Agua MQ	2,625 ml
Tampón separador 4×	1,875 ml
Acrilamida 30%	3 ml
APS 10%	80 µl
Temed	20 µl

Separador (para geles al 15%)	
Agua MQ	1,875 ml
Tampón separador 4×	1,875 ml
Acrilamida 30%	3,75 ml
APS 10%	80 µl
Temed	20 µl

A continuación se preparó la mezcla del compresor (siempre con las mismas proporciones de componentes, independientemente del porcentaje del separador) y se añadió hasta cubrir el soporte de vidrio en su totalidad, colocando el peine en su parte superior y dejándolo polimerizar durante 30 min.

Compresor	
Agua MQ	1,83 ml
Tampón compresor 4×	0,75 ml
Acrilamida 30%	0,3 ml
APS 10%	40 µl
Temed	10 µl

Para preparar las muestras se utilizó el tampón de carga de proteínas 4×, generalmente se cargaron de 10 a 40 µl, desnaturalizando las proteínas previamente a 95°C durante 5 min. Las electroforesis se realizaron durante 90 min a 150 V en tampón TGS (Tris-Glicina-SDS; Biorad). El marcador de peso molecular utilizado fue el Rainbow (Amersham) (Fig. 20). Los geles se tiñeron con *Brilliant Blue G-colloidal* (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tampón separador 4×		Tampón compresor 4×	
Tris base (Sigma)	45,4 g	Tris base (Sigma)	15,1 g
SDS*	1 g	SDS*	1 g
Agua MQ	Hasta 250 ml	Agua MQ	Hasta 250 ml
Conservar a 4°C		Conservar a 4°C	
*Añadir después de ajustar el pH a 8,8 con HCl		*Añadir después de ajustar el pH a 6,8 con HCl	

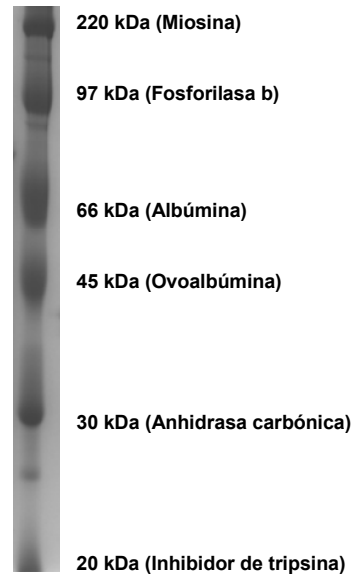


Fig. 20. Marcador Rainbow, utilizado en los SDS-PAGE. Se muestra las proteínas que lo componen y su masa molecular en kilodaltons (kDa).

3.5.7. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas en este trabajo se ha realizado mediante el método de Lowry. Este método se basa en la formación de un complejo azulado entre el Cu^{2+} y los nitrógenos de los enlaces peptídicos (Lowry *et al.*, 1951). Además, se provoca el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, quedando expuestos los residuos fenólicos que van a participar en la segunda etapa de la reacción de manera que se resalta el color formado. Mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu, cuyo principal componente es el ácido fosfomolibdotúngstico, se aumenta la sensibilidad ya que al ser reducido por los grupos fenólicos de los residuos peptídicos da lugar a un complejo de color azul intenso, siendo la intensidad del color proporcional a la concentración de proteínas.

Para llevarlo a cabo se realizó un banco de diluciones a partir de una solución de 20 mg/ml de BSA (*Bovine Serum Albumin*; Sigma): 0 - 0,75 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 - 20 - 30 - 40 - 60 - 80 (μg totales en 0,5 ml de agua MQ). Además, se diluyeron 10 μl de la muestra problema en 490 μl de agua MQ. A todas las diluciones se les añadió 0,5 ml de NaOH 1M (Panreac) y se incubaron 5 min a 100°C. Tras enfriarlas durante 5 min en un baño con agua fría, se añadió 2,5 ml de solución A a todas las diluciones.

Solución A	
Na ₂ CO ₃ (Panreac)	15,1 g
Tartrato Na-K (10%) + Cu ₂ SO ₄ .5 H ₂ O (5%)	400 μl
Agua MQ	Hasta 100 ml

Tartrato Na-K (10%) + Cu ₂ SO ₄ .5 H ₂ O (5%)	
Tartrato Na-K (Panreac)	100 mg
Cu ₂ SO ₄ .5 H ₂ O (Panreac)	50 mg
Agua MQ	Hasta 10 ml

Conservar a -20°C

Tras 10 min a temperatura ambiente se añadió 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac) a todas las diluciones y se dejaron un mínimo de 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a la lectura de la densidad óptica a 750 nm y finalmente, mediante una recta de regresión obtenida a partir de las densidades ópticas proporcionadas por el banco de diluciones del BSA, se calculó la concentración de proteínas de las muestras problema.

3.5.8. Western Blot

Esta técnica permite la transferencia de las proteínas fraccionadas en un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF (*PolyVinylidene Fluoride*) para la detección de proteínas específicas mediante el uso de anticuerpos.

Tras la realización de un SDS-PAGE con las proteínas a estudiar, se realizó la transferencia electroforética mediante un *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* siguiendo las instrucciones del fabricante (Biorad) a dos membranas de Immobilon-P

0,45 µm de PVDF (Millipore). Antes de la electrotransferencia, el gel de poliacrilamida se trató 10 min con agua destilada y 20 min con solución de transferencia. Las membranas se trataron durante 10 min con metanol, se lavaron con agua destilada y tras otro tratamiento de 10 min con una solución de metanol al 25%, se dejaron en solución de transferencia durante 20 min. Estas membranas son hidrofóbicas y presentan una estructura porosa uniforme con la capacidad de unir proteínas con mayor afinidad que la nitrocelulosa. La electrotransferencia se realizó a 350 mA durante 1,5 h a 4°C en solución de transferencia con una fuente de electroforesis ST304 (Apelex).

Solución de transferencia	
Tris (Biorad)	6,05 g
Glicina (B. Mannheim)	28,82 g
SDS (Sigma)	1 g
Metanol (Panreac)	200 ml
Agua MQ	Hasta 1 L

Una vez finalizada la electrotransferencia, la membrana de PVDF en contacto directo con el gel se bloqueó durante 1 hora con solución de bloqueo a temperatura ambiente para impedir uniones inespecíficas. La segunda membrana se tiñó durante 5 min con la solución de tinción para visualizar las proteínas transferidas, el exceso de colorante se eliminó con la solución de desteñido mediante dos lavados de 5 min cada uno.

Solución de tinción	
Metanol (Panreac)	200 ml
Ácido acético (Panreac)	25 ml
Coomassie brillant blue (Biorad)	100 mg
Agua MQ	Hasta 500 ml

Solución de desteñido	
Metanol (Panreac)	225 ml
Ácido acético (Panreac)	35 ml
Agua MQ	Hasta 500 ml

Tras el bloqueo de la membrana se procedió a sumergirla en una dilución 1/100 del suero (ver Apartado 3.7.1), en el que se encuentran los anticuerpos primarios específicos que se unirán a la proteína a detectar, con la solución de bloqueo, durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación lenta.

Solución de bloqueo	
Blocking reagent (Roche)	1 g
Tween 20 (Panreac)	100 µl
PBS 1×	Hasta 100 ml

Posteriormente la membrana se lavó tres veces con PBS 1× durante 10 min cada vez para eliminar los anticuerpos no unidos de forma específica y se incubó en solución de bloqueo con el anticuerpo secundario (dilución 1/30.000) *Anti-Mouse IgG (Fc specific)*, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente y agitación lenta. La membrana fue lavada nuevamente con PBS 1× para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y los polipéptidos reactivos se visualizaron con 20 ml de una solución alcalina (Tampón 3) conteniendo 90 µl de NBT (*4-Nitro Blue Tetrazolium chloride*; 75 mg en 700 µl de N,N-dimetilformamida y 300 µl de agua MQ) y 70 µl de BCIP (*X-phosphate-5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate*; 50 mg en 1 ml de N,N-dimetilformamida) llevándose a cabo el revelado en oscuridad como recomienda el fabricante (Roche). Así, los anticuerpos unidos pueden visualizarse gracias a que la fosfatasa alcalina cataliza la liberación del fosfato del BCIP dando lugar a la reducción del NBT que provoca la formación de un precipitado oscuro e insoluble.

PBS 10×	
NaCl (Panreac)	80 g
KCl (Panreac)	2 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (Panreac)	26,8 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	2,4 g
Agua MQ	Hasta 1 L

Ajustar el pH a 7,4 con HCl
Autoclavar

Tampón 3	
NaCl (Panreac)	11,68 g
MgCl ₂ ·6 H ₂ O (Merck)	20 g
Tris-HCl (Sigma)	1,6 g
Tris base (Sigma)	23,16 g
Agua MQ	Hasta 2 L

Ajustar el pH a 9,5 con NaOH

3.5.9. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)

Este es un método rápido, simple y extremadamente sensible para la detección de la unión de proteínas a secuencias específicas de DNA. Permite detectar la afinidad, cantidad y especificidad de la unión entre la proteína y el DNA. La proteína unida a su

secuencia de reconocimiento presenta mayor peso molecular que el fragmento de DNA al que no se une la proteína, desplazándose a través de un gel de poliacrilamida más lentamente, el unido, y visualizándose como una banda de retraso con respecto al no unido. Incluye diversas fases; preparación de los fragmentos de DNA marcados, preparación del gel de poliacrilamida (PAGE), preparación de la mezcla de la proteína con el DNA marcado, electroforesis y, finalmente, la transferencia y el revelado.

i) Marcaje de los fragmentos de DNA

Mediante PCR con los oligonucleótidos adecuados (Tabla 7) se procedió a la amplificación de las regiones promotoras (aproximadamente de la posición -200 a la +50 con respecto al inicio de la traducción de los genes a estudiar), utilizando uno de los oligonucleótidos marcados en su extremo 5' con digoxigenina. El DNA se amplificó por PCR y se clonó en el vector pGEM-T. La presencia del promotor deseado se confirmó mediante la secuenciación del fragmento clonado en el plásmido, utilizando sus oligonucleótidos (Tabla 2), procediéndose posteriormente a su amplificación por PCR con los oligonucleótidos del vector, uno de ellos marcado con digoxigenina en su extremo 5'. En los casos en los que se pretendía estudiar el efecto de la sustitución de nucleótidos en las secuencias reguladoras, se diseñaron oligonucleótidos que incluyeron los nucleótidos deseados.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la clonación de promotores

Oligonucleótido	Secuencia	Aplicación
AdeR50.2rv	5'- GTTCTACCTTATTTGTTTCGTC	Oligonucleótido directo para la clonación del promotor del gen <i>ssuiDRAFT 1240 (adcR)</i> de <i>S. suis</i> y de su fragmento B1
1240.50	5'- ATCTCGTGCAGGTACTTC	Oligonucleótido reverso para la clonación del promotor del gen <i>ssuiDRAFT 1240 (adcR)</i> de <i>S. suis</i> y de su fragmento B2
AdeR50.1	5'- TTAACCTGTAAAGTATACCAC	Oligonucleótido reverso para la clonación del fragmento B1 del promotor del gen <i>ssuiDRAFT 1240 (adcR)</i> de <i>S. suis</i>
AdeR50.1rv	5'- TTAAAAGGTTAAGGGGATGC	Oligonucleótido directo para la clonación del fragmento B2 del promotor del gen <i>ssuiDRAFT 1240 (adcR)</i> de <i>S. suis</i>
AdeRBOXmut	5'- TTCTATGTGGTATACCCGACAAG	Oligonucleótido reverso para la clonación del fragmento B1 mutado del promotor del gen <i>ssuiDRAFT 1240 (adcR)</i> de <i>S. suis</i>
AdeRmutWT ^a	5'- TTCTATGTGGTATACTTAACAAGTTAA	Oligonucleótido directo para la clonación del fragmento B2 del promotor del gen <i>ssuiDRAFT 1240 (adcR)</i> de <i>S. suis</i>
103.up	5'- TCACTAATCACCTTTGCG	Oligonucleótido directo para la clonación del promotor del gen <i>ssuiDRAFT 0103</i> de <i>S. suis</i>

103.50	5'- CGAGCAAGCTGCTAAAAC	Oligonucleótido reverso para la clonación del promotor del gen <i>ssu1DRAFT 0103</i> de <i>S. suis</i>
174.pr	5'- TTTGGATTGCGATGGCAC	Oligonucleótido directo para la clonación del promotor del gen <i>ssu1DRAFT 0174</i> de <i>S. suis</i>
174.50	5'- TAAGAAAACCAGCCCAAC	Oligonucleótido reverso para la clonación del promotor del gen <i>ssu1DRAFT 0174</i> de <i>S. suis</i>
1352.pr	5'- ACTGACAAACAGACTGGC	Oligonucleótido directo para la clonación del promotor del gen <i>ssu1352</i> de <i>S. suis</i>
1352.50	5'- TAGCGCTCGATTAECTCC	Oligonucleótido reverso para la clonación del promotor del gen <i>ssu1352</i> de <i>S. suis</i>
1390.pr	5'- GCGTTTGTCGTGGAATGG	Oligonucleótido directo para la clonación del promotor del gen <i>ssu1390</i> de <i>S. suis</i>
1390.50	5'- CAAGATAGGATAATGCCT	Oligonucleótido reverso para la clonación del promotor del gen <i>ssu1390</i> de <i>S. suis</i>
fur.pr	5'- GAACGGTACTGGCTGAC	Oligonucleótido directo para la clonación del promotor del gen <i>fur</i> de <i>S. suis</i>
fur.50	5'- GATAATGTAGGCAACGAC	Oligonucleótido reverso para la clonación del promotor del gen <i>fur</i> de <i>S. suis</i>
173.pr	5'- CATACGGTCCTTGTTAC	Oligonucleótido directo para la clonación del promotor del gen <i>ssu1DRAFT 0173</i> de <i>S. suis</i>
173.50	5'- GTCCATCTAGATAGATAG	Oligonucleótido reverso para la clonación del promotor del gen <i>ssu1DRAFT 0173</i> de <i>S. suis</i>
1637.pr	5'- TCCTCTCTAGGTGTTAGC	Oligonucleótido directo para la clonación del promotor del gen <i>feoA</i> de <i>S. suis</i>
1637.50	5'- TATCATCTTGCGTTAGGC	Oligonucleótido reverso para la clonación del promotor del gen <i>feoA</i> de <i>S. suis</i>
1195.pr	5'- CCAAGTCCTAGACAGTTG	Oligonucleótido directo para la clonación del promotor del gen <i>ssu0309</i> de <i>S. suis</i>
1195.50	5'- TCATCCCTAAAACAAGGG	Oligonucleótido reverso para la clonación del promotor del gen <i>ssu0309</i> de <i>S. suis</i> y RT-PCR
1606.pr	5'- AAGTAGCTCACTACTTGC	Oligonucleótido directo para la clonación del promotor del gen <i>ssu1103</i> de <i>S. suis</i>
1606.50	5'- TAACCAATGCTACAGCAC	Oligonucleótido reverso para la clonación del promotor del gen <i>ssu1103</i> de <i>S. suis</i>

^aOligonucleótidos AdcRmut1-AdcRmut14 (no mostrados) derivan del AdcRmutWT pero con el cambio de nucleótido deseado (ver Figura 29).

ii) Reacción de unión DNA-proteína

Las mezclas de reacción de unión de la proteína o el extracto crudo al fragmento de DNA se realizaron a temperatura ambiente durante 10 min con los tampones utilizados por Bsat y Helmann (1999), con algunas modificaciones.

Tampón de unión 5×	
Tris-HCl	1,6 g
KCl (Panreac)	1,85 g
Glicerol	25 ml
Agua MQ	Hasta 100 ml

Ajustar el pH a 7,5 con NaOH
Conservar a 4°C

En el momento de su uso, a 399,5 µl de tampón de unión 5×, se añadieron 100 µl de BSA (10 mg resuspendidos en 1 ml de tampón de unión 5×; Sigma) y 0,5 µl de DTT (0,5 M; Roche). Cuando fue necesario, el tampón de unión 5× se suplementó con EDTA (concentración final 1 mM; Sigma) en presencia o ausencia de Zn₂SO₄ o Fe₂SO₄ (Merck y Panreac, respectivamente; ambos a una concentración final de 1 mM).

Mezcla de la reacción de unión	
Tampón de unión 5×	4 µl
DNA marcado con DIG (50 ng/ µl)	0,5 µl
DNA inespecífico*	2 µl
Proteína (1 µg/ µl) o extracto crudo	0/10 µl
Agua MQ	Hasta 20 µl

*Herring Testes Carrier DNA (10 mg/ml) (Sigma)

iii) Electroforesis (PAGE)

Para los ensayos EMSA, se realizaron electroforesis de una dimension en minigeles no desnaturizantes de poliacrilamida al 5%. La electroforesis se realizó utilizando el Hoefer MINIVE Complete (*Vertical electroforesis system*), la fuente de electroforesis

G-201 (GAOC); y los vidrios, los espaciadores (de 1,5 × 105 mm) y los peines de Amersham.

PAGE 5%	
Agua MQ	7,5 ml
Tampón de electroforesis	2,5 ml
Acrilamida 30%	2,5 ml
APS 10%	80 µl
Temed	20 µl

La mezcla se añadió hasta cubrir el soporte de vidrio en su totalidad, colocando el peine en su parte superior y dejándolo polimerizar durante 30 min. Se realizó un *prerun* de 30 min a 90V antes de cargar las muestras. La electroforesis se llevó a cabo con tampón de electroforesis (40 mM Tris-acetato) durante 90 min a 150 V.

Tampón de electroforesis (40 mM Tris-acetato) 5×	
Tris base (Sigma)	48,4 g
Ácido acético glacial	11,4 ml
Agua MQ	Hasta 2 L

Conservar a 4°C

iv) Transferencia y revelado

Para poder llevar a cabo la detección de los fragmentos de DNA marcadas con digoxigenina, el gel de electroforesis se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (Biodyne[®]B Membrana, 0,45 µm; PALL Gelman). Para ello, tras la electroforesis, se retiró uno de los vidrios del gel de electroforesis poniéndose en contacto el gel con la membrana de nylon. A continuación se colocaron encima 3 filtros 3 MM y el vidrio, con peso encima, durante 30 min. Seguidamente, el DNA se fijó a la membrana mediante el equipo UV Stratalinker 2400 (Stratagene) ya que la radiación ultravioleta consigue que se entrecrucen las moléculas de ácido nucleico con las fibras de nylon de la membrana y de esta forma queden fijadas a la misma. Tras 30 min en agitación lenta con solución de bloqueo, la membrana se sumergió durante 30 min más en 20 ml de la misma solución, a la que se añadieron 4 µl de *Antidigoxigenina-AP Fab Fragment* (Roche). Este anticuerpo, conjugado con fosfatasa alcalina, se une específicamente a la digoxigenina del DNA marcado. Gracias a la fosfatasa alcalina se

visualizaron las bandas de DNA mediante NBT y BCIP tras 3 lavados de 10 min con PBS 1×, tal y como se realizó en los revelados de Western.

3.5.10. Ensayo de protección con DNasaI (*footprinting*)

Esta técnica permite detectar la región del DNA a la que se une una determinada proteína, basándose en la protección que esta interacción confiere al fragmento de DNA. De esta manera se impide la acción de la DNasaI, enzima que corta inespecíficamente el DNA, en la región del DNA a la que se une la proteína (Galas *et al.*, 1978).

El fragmento de DNA que se estudia se marca por uno de sus extremos con un fluorocromo (Cy5), de manera que la digestión con la DNasaI resulta en diferentes cortes a lo largo de todo el fragmento. Asimismo, si hay una región protegida, no habrá fragmentos de un tamaño determinado, correspondiente a la zona protegida. En un gel vertical, este hecho se visualiza como una región sin bandas. Los ensayos de protección ante la acción de la DNasaI se llevaron a cabo utilizando el *ALFexpressTM DNA Sequencer* (Amersham Pharmacia Biotech).

Mediante PCR se amplificó el fragmento de 100 a 400 pb y se clonó en el vector pGEM-T. La presencia de la secuencia deseada se confirmó mediante secuenciación. Posteriormente se procedió a su amplificación por PCR con los oligonucleótidos del vector (Tabla 2), uno de ellos marcado con Cy5 en su extremo 5'. El estudio se llevó a cabo sobre las dos cadenas del DNA, la codificante y la no codificante, por tanto, se amplificaron dos fragmentos, cada uno de ellos con un extremo marcado con el fluorocromo Cy5. La reacción de unión se realizó en un volumen final de 20 µl con 100 ng de DNA marcado con Cy5.

Tampón de unión 5× para <i>footprinting</i>	
Tris 1 M	250 µl
MgCl ₂ 0,5 M	500 µl
CaCl ₂ 0,1 M	250 µl
Glicerol	1,25 ml
KCl 2,5 M	1 ml
Agua MQ	Hasta 5 ml

En el momento de su uso, al tampón de unión 5× para *footprinting* se le añadió BSA y DTT a concentraciones finales de 0,4 mg/ml y 2 mM, respectivamente. La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 2 µl de una dilución 1/1.000 de DNAsI (10.000 unidades/ µl; Roche) que se incubó a 30°C durante 3 min. A continuación, se añadieron 380 µl de agua MQ e inmediatamente se trató con 450 µl de una solución de fenol-cloroformo-isoamílico, se centrifugó durante 3 min y al sobrenadante se le añadió 450 µl de cloroformo isoamílico. Después de centrifugar 3 min, al sobrenadante se le añadió 1 ml de etanol absoluto y 40 µl de acetato sódico 3 M a pH 8 para precipitar el DNA durante toda la noche a -20°C. Finalmente el DNA se resuspendió en 2 µl de agua MQ y se le añadió 4 µl de solución STOP (que evita la formación de estructuras secundarias entre los fragmentos de DNA), cargándose todo en el gel de poliacrilamida.

Solución STOP	
Azul dextrano 2000 (Pharmacia Biotech)	50 mg
Formamida (Roche)	Hasta 10 ml

Conservar a -20°C

Las reacciones de *footprinting*, con y sin proteína, y las 4 reacciones para la secuenciación del fragmento de DNA de estudio, clonado en el vector pGEM-T, se cargaron en un gel de poliacrilamida vertical en el secuenciador *ALFexpress™ DNA Sequencer* siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de los fragmentos de diferente tamaño de DNA se realizó gracias al láser del secuenciador que excita las bandas fluorescentes, y las señales son recogidas mediante los fotodetectores, digitalizadas y procesadas por el programa ALFwin proporcionado por el fabricante. Comparando los fluorogramas obtenidos de las muestras con proteína y sin proteína, se puede detectar la ausencia de fragmentos de restricción en la región del DNA protegida por la unión proteica. Para conocer la secuencia protegida es necesario identificarla mediante la secuenciación del fragmento clonado en el pGEM-T (Fig. 21).

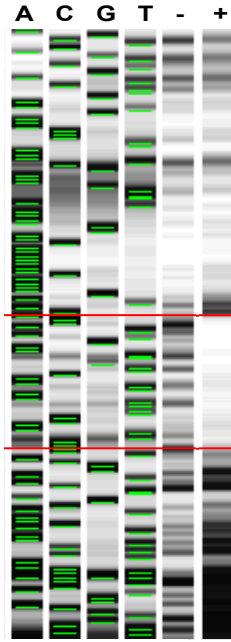


Fig. 21. Gel de poliacrilamida vertical para la secuenciación/*footprinting*. Los cuatro primeros carriles representan la secuencia del fragmento. El carril (-) presenta el fragmento digerido con DNase I sin proteína. El carril (+) presenta el fragmento digerido con DNase I, obsérvese la zona (delimitada por dos líneas paralelas) en la que no hay fragmentos de DNA debido a la protección conferida por la proteína. Para establecer la secuencia de unión de la proteína es necesario recurrir a los cuatro primeros carriles.

El método de secuenciación empleado en este trabajo ha sido el método didesoxi o de Sanger utilizando un oligonucleótido marcado con el fluorocromo Cy5 y con secuencia complementaria al vector empleado para clonar los insertos de DNA (pGEM-T; Tabla 2). Se emplearon los desoxinucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y los didesoxinucleósidos trifosfato (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Para la secuenciación de cada una de las muestras, se realizaron cuatro reacciones que incluyeron los cuatro dNTPs y un ddNTPS diferente en cada una de las 4 reacciones. Los didesoxinucleótidos están modificados ya que se elimina el grupo hidroxilo en la posición 3' de la desoxiribosa. Estos nucleótidos pueden incorporarse a la cadena de DNA naciente, pero no es posible que se una a ellos ningún otro nucleótido por el extremo 3'. Por tanto, una vez incorporado un didesoxinucleótido se termina la síntesis de la cadena de DNA. De esta manera se consiguen moléculas de DNA de distinto tamaño para cada reacción, obteniendo así una representación de todos los nucleótidos de la secuencia. Cargando

las reacciones en un gel de poliacrilamida se detectan los fragmentos marcados con Cy5 mediante láser, obteniéndose así la secuencia completa.

Los vectores con el fragmento de DNA se secuenciaron usando el *fmol DNA cycle sequencing system kit* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se añadieron 2 μ l de d/ddNTPs en el tubo correspondiente para cada nucleótido. Se realizó la mezcla con 5 μ l de tampón, 1,5 μ l de oligonucleótido marcado con Cy5, de 500 ng a 1 μ g de DNA plasmídico con el inserto a secuenciar, 1 μ l de Taq y hasta 16 μ l de agua MQ. A continuación se repartieron 4 μ l de la mezcla en cada tubo con los d/ddNTPs y se colocaron en el termociclador. Las reacciones de amplificación se realizaron en las siguientes condiciones: 95°C, 30 segundos; 42°C, 30 segundos y 72°C, 1 minuto. Este ciclo se repitió 30 veces y posteriormente se procedió a la detención de las reacciones añadiendo 3 μ l de solución de STOP. Las muestras se procesaron en el equipo *ALFexpress™ DNA Sequencer*.

3.5.11. Identificación de proteínas

La identificación de las proteínas se llevó a cabo recortando las bandas de interés del gel de poliacrilamida y realizando una digestión triptica que fue analizada mediante espectrometría de masas Maldi-tof obteniéndose de esta manera la secuencia aminoacídica de varios péptidos. Las secuencias de los péptidos se analizaron mediante el programa informático *MASCOT search engine* (Versión 2.1). Los análisis fueron llevados a cabo por el *Servei de Proteòmica i Bioinformàtica* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

3.6. Bases de datos y análisis de secuencias

Las secuencias utilizadas para la selección de los genes de estudio y para el diseño de los oligonucleótidos se obtuvieron de la base de datos del *Genbank* (AAFA00000000) donde se muestran anotados los genes de la cepa 89/1591 de *S. suis*, cuyo genoma se encuentra totalmente secuenciado y en las últimas fases de ensamblaje. El genoma completamente secuenciado y anotado de la cepa de *S. suis* P1/7 se obtuvo de http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_suis/.

Mediante el programa *GENOMIC BLAST* se llevaron a cabo búsquedas específicas de genes y proteínas de las cepas secuenciadas, presentes en la base de datos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi).

El alineamiento de las secuencias obtenidas por MacroGen para la comprobación de las secuencias clonadas en los vectores, así como las secuencias obtenidas para el estudio de *footprinting*, se realizaron utilizando el programa SeqmanII (DNASTAR Inc.).

Para la comparación de las secuencias del DNA y de las proteínas con las presentes en la base de datos del *GenBank*, se utilizaron los programas BLASTN (compara las secuencias nucleotídicas introducidas con las de la base de datos), BLASTX (compara las secuencias introducidas, traduciéndolas en las 6 pautas de lectura posibles [ORFs o *Open Reading Frames*], con las proteínas de la base de datos) y BLASTP (utilizado para conocer la homología entre proteínas) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

La edición de secuencias y la selección de oligonucleótidos se llevaron a cabo mediante los programas *Editseq* y *Primer Select* (DNA Star, Inc.), respectivamente.

3.7. Experimentación animal

Los animales utilizados en este trabajo han sido ratones hembra BALB/cAnNHsd de 3 u 8 semanas de edad, obtenidos de Harlan Iberica (Barcelona). El origen de esta cepa de ratones albinos se remonta a 1913, adquirida por H. Bagg y llamada “Bagg albino” o BALB. La cepa BALB/cAnNHsd deriva de un núcleo de cría obtenido por el *National Institute of Health* (Bethesda, EEUU). Estos ratones son susceptibles a gran variedad de microorganismos, incluyendo *S. suis* (Kataoka *et al.*, 1991).

Todos los animales pasaron una semana de cuarentena y se estabularon un máximo de 4 animales por jaula bajo condiciones específicas libres de patógenos a una temperatura de 19 a 21°C, con ciclos artificiales de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y una humedad relativa del 50-60%. Para la alimentación de los ratones se utilizó una dieta de ingredientes naturales peletizada libre de antibióticos. El régimen alimenticio fue *ad libitum*. En cuanto al agua utilizada, siempre fue autoclavada y los animales tuvieron acceso libre a ella en todo momento. Su morbilidad y mortalidad se monitorizó diariamente. El criterio de punto final se llevó a cabo según el protocolo de supervisión utilizado (Tabla 8), sacrificando a los animales mediante dislocación cervical. Los ratones que sobrevivieron hasta el último día del experimento fueron sacrificados de la misma forma. Todos los experimentos realizados con animales fueron aprobados por la CEEAH (*Comissió d'Ètica en l'Experimentació Animal i Humana*) de la UAB y se llevaron a cabo en el *Servei d'Estabulari* de la UAB.

Tabla 8. Protocolo de supervisión utilizado en los experimentos con animales

Peso	Normal (no hay pérdida de peso o el animal crece con normalidad): 0 puntos Pérdida de peso inferior al 10%: 1 punto Pérdida de peso de entre el 10 i el 20%: 2 puntos Pérdida de peso superior al 20%: 3 puntos
Aspecto	Normal: 0 puntos Pelaje en mal estado: 1 punto Pelaje en mal estado + secreciones oculares y/o nasales: 2 puntos Postura anormal, automutilaciones o vocalizaciones indicativas de dolor: 3 puntos
Respiración	Ausencia de disnea: 0 puntos Disnea leve: 1 punto Disnea moderada: 2 puntos Disnea severa: 3 puntos
Conducta	Normal: 0 puntos Agresivo y/o comatoso: 3 puntos
Cuando un animal obtuvo una puntuación de 3 en dos o más parámetros, los 3 se contabilizaron como 4. Se estableció como criterio de punto final aquellos animales que obtuvieron una puntuación igual o superior a 8 (50% de los 16 puntos que se podían obtener como máximo).	

3.7.1. Dosis letal 50 (DL₅₀)

Para los ensayos de patogenicidad, 4 grupos de 3 ratones de 8 semanas de edad fueron utilizados para cada cepa bacteriana. Cada grupo fue inoculado con una concentración concreta de la cepa de *S. suis* a estudiar. La suspensión a inocular se realizó diluyendo un cultivo de *S. suis* en fase exponencial en THY líquido suplementado con suero bovino inactivado al 10% (Invitrogen). Para ajustar la concentración inoculada, se midió la densidad óptica del cultivo inicial y se realizó un banco de diluciones para conseguir el número deseado de bacterias por inóculo, que fue de un volumen de 0,1 ml por animal. El número de bacterias final inyectado por animal se determinó mediante el recuento de células viables en placa (THY) de cada una de las diluciones inoculadas. Una vez inoculados, los animales se observaron periódicamente durante 21 días aplicando los criterios de punto final pertinentes (Tabla 8). Durante las 3 semanas posteriores a la inoculación se realizó el recuento de morbilidad y mortalidad. Se estableció como dosis de referencia aquella que produjo una mortalidad del 50% de los animales (DL₅₀) según la fórmula de Reed y Muench (1938).

Para la obtención del suero usado en los ensayos de Western blot, tres grupos de seis ratones de 4 semanas de edad fueron inoculados con 0,1 ml de THY conteniendo la DL₅₀ de las cepas de *S. suis* 89/1591, P1/7 o con 0,1 ml de THY como control negativo. Los animales que sobrevivieron más de 30 días después de la inoculación fueron anestesiados con un cóctel de ketamina (90 mg/kg; Imalgène 1000) y xilacina (10 mg/kg; Rompun 2%). La sangre se recogió mediante punción cardíaca, se incubó a 37°C durante 2 horas para facilitar su coagulación y se centrifugó a 300 × g durante 10 min. El suero se recuperó conservándolo a -20°C hasta su uso.

3.7.2. Preparación de vacunas y ensayos de protección

Para la preparación de vacunas, 10 µg de cada una de las proteínas purificadas y dializadas o 50 µg de proteínas asociadas a la pared celular se resuspendieron con el adyuvante Imject Alum (hidróxido de aluminio; Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de la inoculación de células vivas para analizar su capacidad protectora se inocularon 10⁷ cfu/dosis.

Para los ensayos de protección, se realizaron grupos de 8 ratones de 3 semanas de edad que fueron inoculados intraperitonealmente con 0,1 ml de vacuna. Se utilizaron 2 grupos control de 8 ratones cada uno, uno de ellos inoculados con el tampón de las vacunas (fosfato sódico pH 7) y el otro con el mismo tampón al que se le añadió el adyuvante utilizado en las vacunas. Después de 2 semanas, se llevó a cabo una segunda inmunización y 3 semanas después se realizó el enfrentamiento con una inyección intraperitoneal de una suspensión de THY suplementada con suero bovino inactivado al 10% (Invitrogen) y conteniendo 10^8 cfu/dosis de la cepa 89/1591 de *S. suis*. La supervivencia de los ratones fue monitorizada durante un mínimo de 7 días.

El análisis estadístico de los resultados del enfrentamiento se realizaron mediante el test exacto de Fisher (*Servei d'Estadística* de la UAB). Los valores $P < 0,05$ fueron considerados como significativos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación y organización transcripcional de genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de zinc y de hierro en *S. suis*

El primer objetivo de este trabajo fue la identificación mediante estudios *in silico* de genes de *S. suis* relacionados con el transporte de zinc y de hierro, gracias a que el genoma de la cepa 89/1591 del serotipo 2 de este patógeno ha sido totalmente secuenciado y se encuentra en la fase final de su ensamblaje (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Para ello, se recurrió a la anotación del genoma de esta cepa, en la que se predicen las funciones de sus genes a partir de las homologías que presentan con los genes de otros microorganismos (Tabla 9).

De esta manera, se seleccionaron los genes que codifican los componentes de dos transportadores ABC, uno relacionado con la captación de zinc (*ssuiDRAFT 1239-1238-1237*) y otro con la de hierro (*ssuiDRAFT 0173-0174-0175-0176*), los genes que codifican el transportador de hierro FeoAB (*ssuiDRAFT 1637-1638*), el gen que codifica una proteína periplásmica de unión al zinc que aparentemente formaría parte de un transportador ABC (*ssuiDRAFT 0103*) y, finalmente, los genes que codifican los reguladores del transporte de zinc y de hierro (AdcR y Fur, respectivamente).

Tabla 9. Genes de *S. suis* cuyos productos están relacionados con la captación de cationes divalentes según la anotación provisional del genoma de este microorganismo.

ORF (89/1591) ^a	ORF (P1/7) ^b	Tamaño producto (aa) ^c	Posible función
<i>ssuiDRAFT 1237</i>	<i>ssu0115</i>	503	Lipoproteína de unión al zinc (ABC)
<i>ssuiDRAFT 1238</i>	<i>ssu0114</i>	270	Permeasa (Transportador ABC)
<i>ssuiDRAFT 1239</i>	<i>ssu0113</i>	234	ATPasa (Transportador ABC)
<i>ssuiDRAFT 1240</i>	<i>ssu0112</i>	149	Proteína reguladora (AdcR)
<i>ssuiDRAFT 0173</i>	<i>ssu0607</i>	217	ATPasa (Transportador ABC)
<i>ssuiDRAFT 0174</i>	<i>ssu0606</i>	309	Lipoproteína de unión al hierro (ABC)
<i>ssuiDRAFT 0175</i>	<i>ssu0605</i>	341	Permeasa (Transportador ABC)
<i>ssuiDRAFT 0176</i>	<i>ssu0604</i>	333	Permeasa (Transportador ABC)
<i>ssuiDRAFT 1637</i>	<i>ssu1236</i>	156	Transportador de hierro (FeoA)
<i>ssuiDRAFT 1638</i>	<i>ssu1237</i>	714	Transportador de hierro (FeoB)
<i>ssuiDRAFT 0103</i>	<i>ssu0308</i>	306	Lipoproteína de unión al zinc (ABC)
<i>ssuiDRAFT 1172</i>	<i>ssu0289</i>	151	Proteína reguladora (Fur)

^aORF según la anotación del genoma de la cepa 89/1591 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

^bORF según la anotación del genoma de la cepa P1/7 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_suis/)

^cTamaño en aminoácidos.

Además, a partir de las secuencias adyacentes a estos genes y mediante análisis TBLASTN, se estableció la posible organización génica de estas regiones (Fig. 22).

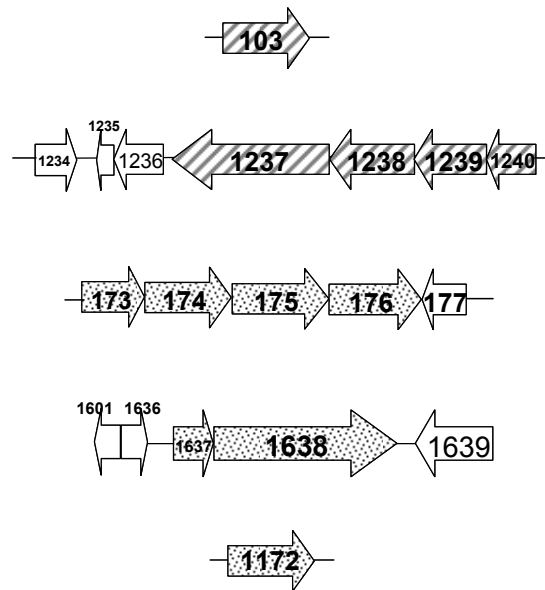


Fig. 22. Representación esquemática de varios fragmentos del genoma de la cepa 89/1591 de *S. suis* cuyos productos se han relacionado con la captación de zinc (flechas rayadas) y de hierro (flechas punteadas). También se muestran los genes adyacentes a éstos. Representación realizada según la anotación provisional del genoma de este microorganismo (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y los análisis TBLASTN.

Mediante estudios de RT-PCR se confirmó la organización genética establecida determinando, además, que los grupos de los genes estudiados relacionados con el transporte de cationes que se encuentran contiguos en el genoma de la cepa 89/1591 de *S. suis*, forman parte de una misma unidad transcripcional (mRNA) (Fig. 23).

En el primer operón estudiado se encuentran los genes *ssuiDRAFT 0173*, *ssuiDRAFT 0174*, *ssuiDRAFT 0175* y *ssuiDRAFT 0176*, que presentan homología con los genes que codifican los distintos componentes de transportadores ABC relacionados con el transporte de hierro.

La segunda unidad transcripcional analizada contiene los genes *ssuiDRAFT 1240* (*adcR*), *ssuiDRAFT 1239*, *ssuiDRAFT 1238* y *ssuiDRAFT 1237*, que presentan homología con el regulador *adcR* y con los genes que codifican los distintos componentes de un transportador ABC implicado en el transporte de zinc. Además, los productos de estos genes, también presentes en el genoma de *S. gordonii*, se relacionan

con el transporte de zinc y/o de manganeso, con la transformación genética y con la formación de biofilm (Dintilhac y Claverys, 1997; Dintilhac *et al.*, 1997; Loo *et al.*, 2003).

Por último, se analizó el operón que contiene los genes *ssuiDRAFT 1637* y *ssuiDRAFT 1638*, que presentan homología con los genes que codifican las proteínas FeoA y FeoB, implicadas en el transporte de hierro, como se ha descrito en las bacterias anaeróbicas facultativas *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium (Kammler *et al.*, 1993; Tsolis *et al.*, 1996).

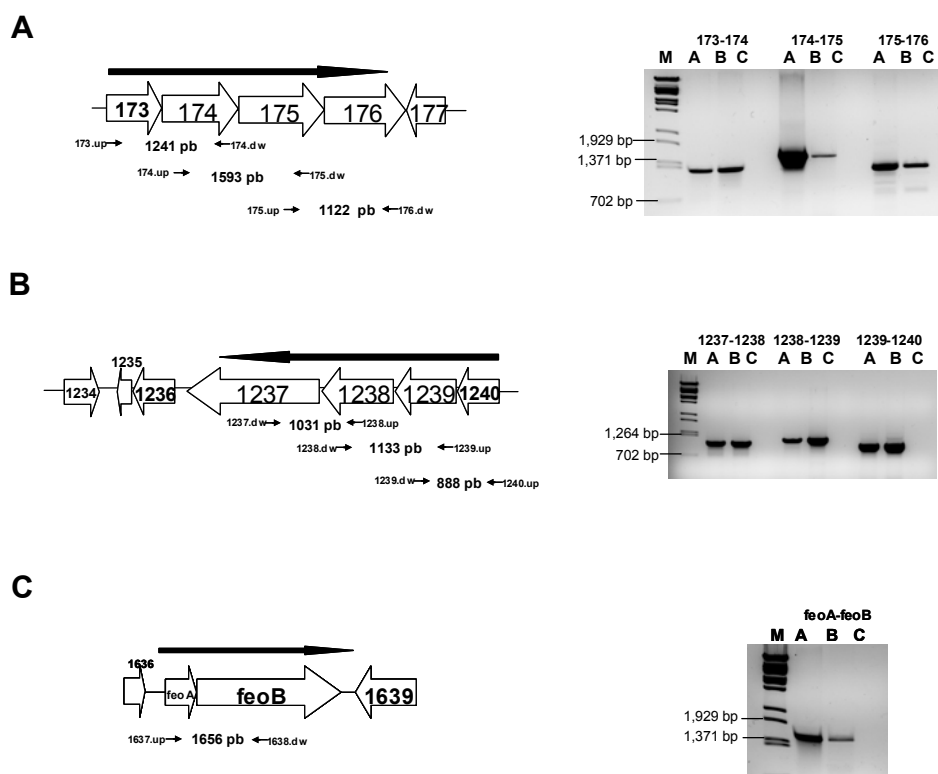


Fig. 23. Representación esquemática de la organización genética determinada mediante análisis de RT-PCR de las regiones del genoma de la cepa 89/1591 de *S. suis* de dos transportadores ABC posiblemente implicados en el transporte de hierro (A) y de zinc (B) y del transportador de hierro FeoAB (C). La flecha negra indica la unidad transcripcional. Las parejas de oligonucleótidos utilizadas para los análisis de RT-PCR se indican mediante flechas pequeñas. El tamaño de sus productos de PCR se indica en pares de bases (pb). Las RT-PCRs se realizaron en presencia de RNA (Carriles A), en presencia de DNA (Carriles B) o, como control negativo, en ausencia de ambos (Carriles C). Como marcador se utilizó el DNA cromosómico del bacteriófago λ digerido con la enzima de restricción *BstE* II (Carril M).

Asimismo, se realizaron análisis BLASTP que determinaron que todos los genes seleccionados se encuentran en el genoma de otras especies de estreptococos. De hecho, los productos de los genes *ssuiDRAFT 1240 (adcR)*, *ssuiDRAFT 1239*, *ssuiDRAFT 1238* y *ssuiDRAFT 1237* presentan un alto grado de identidad con los productos de los genes de *S. pneumoniae* *adcR* (52%), *adcC* (77%), *adcB* (82%) y *adcA* (70%), respectivamente. En *S. gordonii*, el operón homólogo denominado *adc*, también consta de estos cuatro genes (*adcR*, *adcC*, *adcB* y *adcA*), habiéndose confirmado que dichos genes también forman parte de la misma unidad transcripcional (Loo *et al.*, 2003). Además, sus productos génicos han sido descritos como un represor que contiene un posible sitio de unión a metales (AdcR), un transportador que contiene un lugar de unión al ATP (AdcC), una proteína con 7 dominios hidrofóbicos (AdcB) y una lipoproteína de unión al zinc (AdcA) (Loo *et al.*, 2003). Por todo ello, se puede deducir que se trata en los tres casos (*S. suis*, *S. pneumoniae* y *S. gordonii*) de transportadores de tipo ABC con los 3 componentes típicos (ATPasa, permeasa y proteína de unión al sustrato) implicados, probablemente, en el transporte de cationes divalentes. Además, estos tres operones contienen el gen que codifica el represor AdcR, una proteína que podría actuar de forma homóloga a la proteína Zur en este grupo de bacterias grampositivas (Dintilhac y Claverys, 1997).

Una vez determinados los genes y las unidades transcripcionales de los posibles genes seleccionados en este estudio, que podían estar implicados en la captación de cationes divalentes, se procedió a analizar su expresión en diferentes condiciones de cultivo. Se sabe que el tratamiento de los cultivos bacterianos con 2,2'-dipiridil (DPD) induce la expresión de genes regulados por cationes divalentes, ya que este compuesto actúa secuestrándolos, tal y como se ha observado en cultivos de *Pasteurella multocida* (Garrido *et al.*, 2003a), *E. coli* (Chao *et al.*, 2005) y *B. anthracis* (Passalacqua *et al.*, 2007), entre otros.

Así, para comprobar si los cationes divalentes participan en la regulación de los genes seleccionados, se trataron cultivos de la cepa 89/1591 de *S. suis* con DPD. Tras la extracción de RNA tanto de los cultivos tratados con DPD como de los no tratados, y mediante análisis RT-PCR a tiempo real, se observó que la expresión de todos los genes estudiados se inducía en presencia de DPD (Fig. 24). Por tanto, estos resultados son la confirmación experimental de que la expresión de los genes seleccionados *in silico*,

efectivamente están regulados por cationes divalentes, ya que en condiciones de carencia de estos cationes aumenta la expresión de dichos genes con lo cual la célula consigue ser más eficiente en su captación.

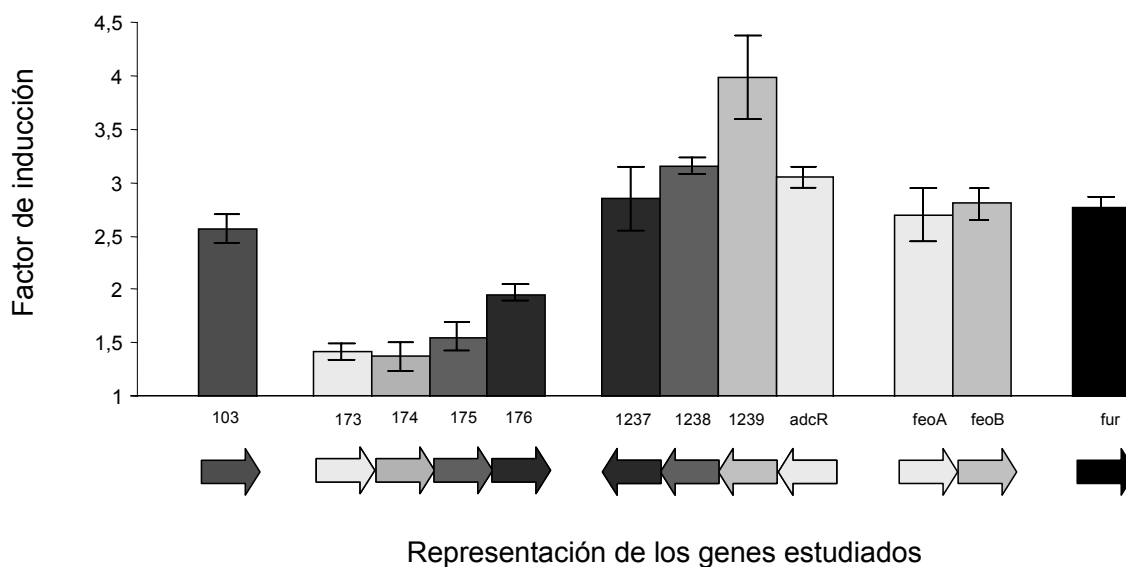


Fig. 24. Inducción de la expresión de los genes de la cepa 89/1591 de *S. suis* posiblemente implicados en la captación de cationes divalentes determinada mediante RT-PCR a tiempo real. El factor de inducción es la relación entre la concentración de mRNA de cada gen de las células crecidas en presencia de DPD con respecto a la concentración de mRNA de las células crecidas en ausencia de este quelante. Los resultados que se muestran son la media de dos experimentos independientes (cada uno de ellos llevado a cabo por duplicado). La desviación típica se indica mediante barras de error.

Cabe destacar en este punto que la adición de DPD al medio de cultivo provoca una disminución en la tasa de crecimiento de *S. suis* debido a una reducción en la disponibilidad de estos cationes. Es por este motivo por el que en el momento de realizar las extracciones de RNA, se tuvo en cuenta la densidad óptica del cultivo y no el tiempo del tratamiento con DPD, puesto que el cultivo sin tratar con este compuesto, como era de esperar, alcanzaba la mitad de la fase exponencial (fase óptima para la realización de la extracción del RNA) mucho antes que el cultivo tratado.

En *P. multocida*, así como en otras especies bacterianas, el tratamiento de los cultivos con agentes quelantes induce la expresión de los genes regulados negativamente por la proteína Fur (Garrido *et al.*, 2003a, Briggs *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en *S. suis* ocurre lo mismo, si bien, además de los genes posiblemente controlados por el regulador Fur, también se induce la expresión de los genes que podrían estar bajo el control de otros reguladores como por ejemplo la proteína AdcR.

4.2. El regulador AdcR en *S. suis*

4.2.1. Identificación de la región de unión de la proteína AdcR al DNA

En *S. suis*, el gen *ssuiDRAFT1240* es homólogo al gen *adcR* de otros estreptococos, el producto del cual se ha propuesto como regulador de la captación de Zn^{2+} y/o de Mn^{2+} en varias especies de bacterias grampositivas (Dintilhac y Claverys, 1997; Dintilhac *et al.*, 1997). Estudios *in silico*, mediante comparación de secuencias permitieron proponer un posible motivo de unión (denominado caja AdcR) de la proteína AdcR al DNA (Panina *et al.*, 2003). Con el fin de confirmar dicha predicción, se llevó a cabo la purificación de la proteína AdcR de *S. suis* (Fig. 25A) y mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA), se estudió su capacidad de unión a la región promotora del gen que la codifica. Así, se llevaron a cabo varios EMSAs, usando la región comprendida entre la posición -156 y +50 (con respecto al inicio de la traducción) de la región promotora del gen *adcR* (Fig. 25B). Los resultados obtenidos revelaron que la proteína AdcR se une específicamente a su promotor (Fig. 25C).

Además, la abolición de la unión de la proteína AdcR a su región promotora en presencia del quelante EDTA, da soporte a la hipótesis de que la interacción entre esta proteína y su promotor depende de determinados cationes divalentes (Fig. 25D). De hecho, al añadir tanto Zn^{2+} como Mn^{2+} en exceso y en presencia de EDTA, se consigue reestablecer dicha unión (Fig. 25D). Sin embargo, la adición de Fe^{2+} no permite reestablecer esta unión (Fig. 25D). Así pues, en este estudio se ha demostrado experimentalmente por vez primera que, efectivamente, la proteína AdcR se autorregula, uniéndose a una región determinada de su propio promotor y, también, que esta regulación depende de Zn^{2+} y de Mn^{2+} , mientras que el Fe^{2+} no ejerce ningún efecto.

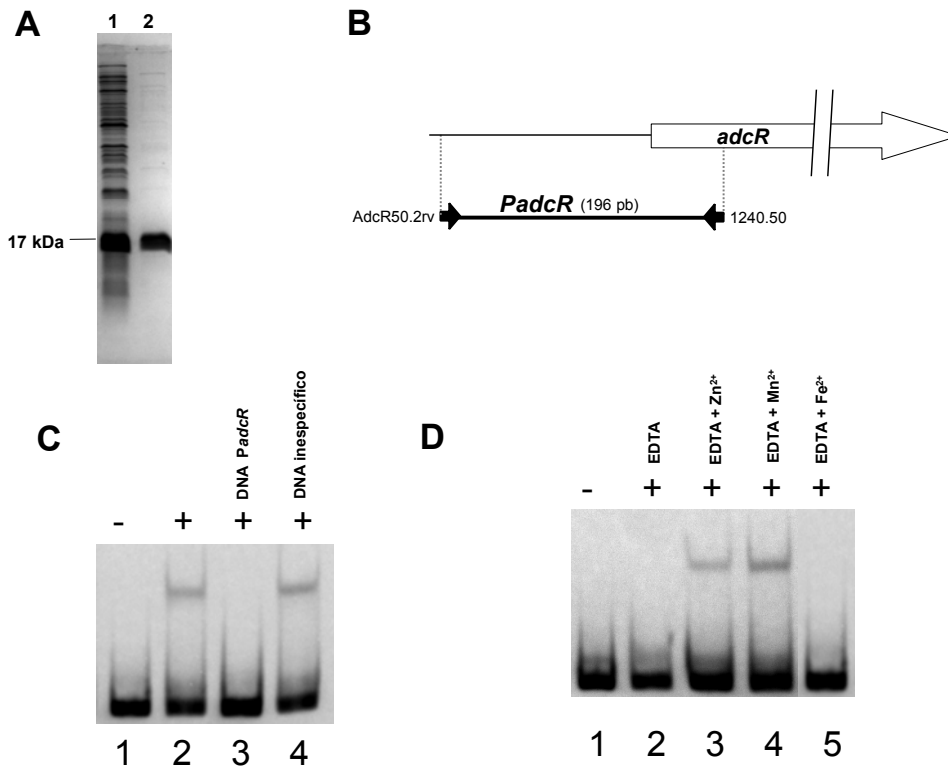


Fig. 25. (A) SDS-PAGE mostrando el extracto crudo de un cultivo de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL que contiene el vector pET15-b sobreexpresando la proteína AdcR de *S. suis* (Carril 1). La proteína AdcR purificada se muestra en el Carril 2. (B) Representación esquemática del gen *adcR* con su región promotora (*PadcR*). Las flechas pequeñas indican el par de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del promotor usado en los ensayos EMSA. (C) Movilidad electroforética de fragmentos de DNA que contienen el promotor *adcR* de *S. suis* en ausencia (Carril 1) o en presencia (Carril 2) de la proteína AdcR purificada. También se muestra el efecto de un exceso del promotor *adcR* sin marcar (Carril 3) y del plásmido pGEM-T (Carril 4) en la migración del promotor *adcR* de *S. suis* en presencia de la proteína AdcR purificada. (D) Efecto de la adición de EDTA (1 mM) sobre la capacidad de unión de la proteína AdcR en ausencia de cationes divalentes (Carril 2) o en presencia de Zn²⁺ (Carril 3), Mn²⁺ (Carril 4) o Fe²⁺ (Carril 5), todos ellos a una concentración de 1 mM. Como control, se muestra la movilidad del mismo promotor sin la adición de la proteína AdcR (Carril 1).

Por otra parte, los resultados obtenidos indican que el transportador ABC SsuiDRAFT 1239-1237, relacionado con la captación de zinc, que se encuentra en la misma unidad transcripcional que el gen *adcR* (*ssuiDRAFT 1240*), debe estar también regulado por la proteína AdcR ya que su expresión depende, al igual que el gen *adcR*, del promotor que

se encuentra al inicio de este operón. De hecho, en *S. pyogenes* se ha demostrado que en el regulón *adcR* también se incluyen los genes *adcR*, *adcC*, *adcB* y *adcA*, homólogos a *ssuiDRAFT 1240*, *1239*, *1238* y *1237*, respectivamente, formando una unidad transcripcional, a excepción de *adcA* (Brenot *et al.*, 2007). En esta especie, se han localizado posibles motivos de unión de la proteína AdcR tanto en el promotor del gen *adcR*, como en el promotor del gen *adcA* y al construirse un mutante *adcR* defectivo y estudiar la expresión de los genes *adcC*, *adcB* y *adcA*, se ha observado que todos ellos se encuentran desreprimidos respecto a su expresión en la cepa salvaje (Brenot *et al.*, 2007). Según esto, tanto la ordenación como la regulación de los genes *adcR*, *adcC*, *adcB* y *adcA* en *S. pyogenes* son similares a las de *S. suis*.

Seguidamente, se estudió si el resto de genes seleccionados en este trabajo podrían pertenecer al regulón AdcR. Por ello, se realizaron ensayos EMSAs con los promotores de dichos genes. Los resultados obtenidos indicaron que el gen *ssuiDRAFT 0103*, que codifica una proteína periplásmica de unión al zinc de un transportador ABC, también se encuentra bajo el control del regulador AdcR (Fig. 26).

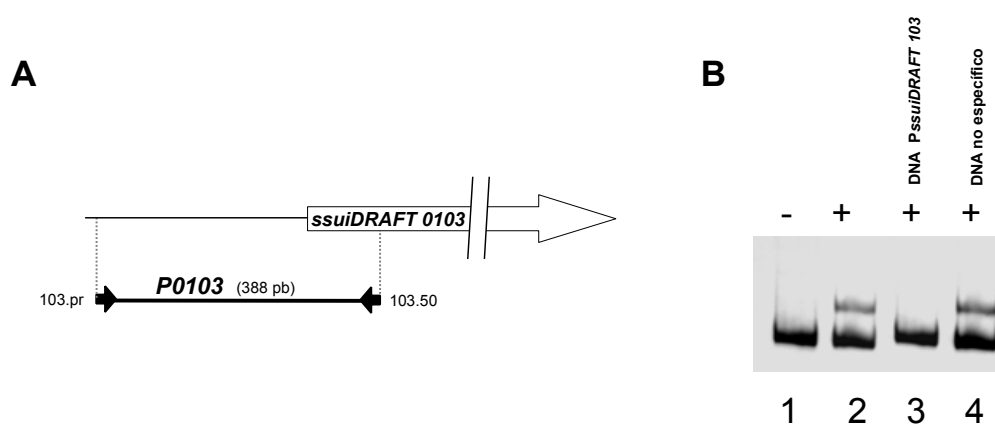


Fig. 26. (A) Representación esquemática del gen *ssuiDRAFT 0103* y su región promotora (*P0103*). Las flechas pequeñas indican el par de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del promotor. (B) Movilidad electroforética del fragmento de DNA que contiene el promotor del gen *ssuiDRAFT 0103* de *S. suis* en ausencia (Carril 1) o en presencia (Carril 2) de la proteína AdcR purificada de *S. suis*. También se muestra el efecto de un exceso del promotor *ssuiDRAFT 0103* sin marcar (Carril 3) y del plásmido pGEM-T (Carril 4) en la migración del promotor *ssuiDRAFT 0103* de *S. suis* en presencia de la proteína AdcR purificada.

Para determinar la funcionalidad de cada uno de los motivos hallados en las posiciones -28 y -16 (denominados *Box1* y *Box2*, respectivamente) se llevaron a cabo diversos EMSAs con los fragmentos de DNA que contenían sólo una de las dos cajas por separado (Fig. 28A). De esta manera se determinó que el primer motivo (*Box1*) es absolutamente imprescindible, mientras que el segundo (*Box2*) no es necesario para que tenga lugar la unión de la proteína AdcR a su promotor (Fig. 28B).

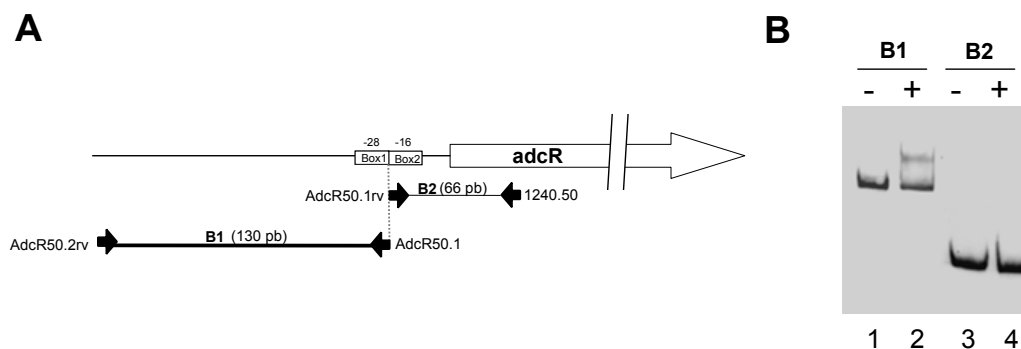


Fig. 28. (A) Análisis del papel de las dos posibles cajas AdcR (*Box1* y *Box2*), presentes en el promotor del gen *adcR* de *S. suis*, en la unión de la proteína AdcR. Cada una de las cajas fue amplificada por PCR por separado, como se muestra en la representación esquemática del promotor *adcR*. Las cajas se representan mediante rectángulos, mostrando sus posiciones con respecto al inicio de la traducción. Las flechas pequeñas representan la posición de los oligonucleótidos utilizados. También se muestran los tamaños de los fragmentos empleados. (B) Movilidad electroforética de los fragmentos de DNA de 130 pb (*Box1*) y de 66 pb (*Box2*) (B1 y B2, respectivamente) de la región promotora del gen *adcR* de *S. suis* en ausencia (Carriles 1 y 3) o en presencia (Carriles 2 y 4) de la proteína AdcR.

Por otra parte, sustituciones puntuales de cada uno de los nucleótidos del primer motivo (*Box1*) permitieron definir de manera más precisa que la secuencia de unión de la proteína AdcR corresponde al motivo TTAACNRGTTAA (Fig. 29). Cabe señalar también que la inserción de un solo nucleótido entre las dos adeninas centrales del motivo denominado *Box1* (TTAACAAGTTAA) es suficiente para abolir la unión de la proteína AdcR, demostrándose de esta manera la importancia de la distancia que separa las dos mitades de la secuencia palindrómica para poder ser reconocida por dicha proteína (Fig. 29). Además, y en concordancia con que un sólo motivo es suficiente para la unión de la proteína AdcR, cabe remarcar que el promotor del gen *ssuiDRAFT*

0103 se encuentra regulado por la proteína AdcR y presenta una única copia de esta secuencia (TTAACTGGTTAA) en la posición -26 con respecto al inicio de la traducción. Sin embargo, como era de esperar, la proteína AdcR es incapaz de unirse al resto de los promotores de los genes estudiados (Tabla 9), puesto que ninguno de ellos contiene la secuencia de reconocimiento indicada (datos no mostrados).

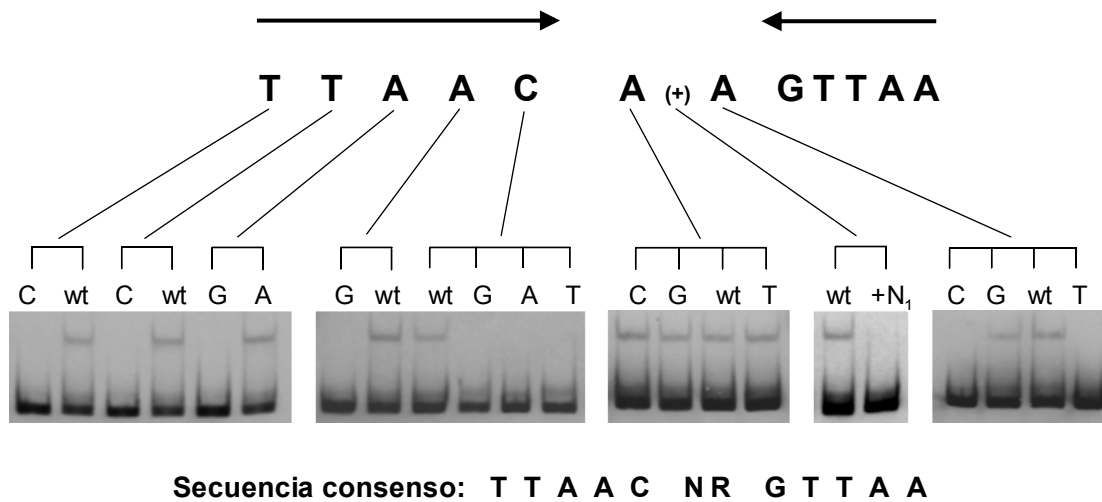


Fig. 29. Análisis del efecto de sustituciones puntuales en el motivo *Box1* en la movilidad electroforética del promotor *adcR* de *S. suis*. Como control positivo se utilizó el promotor sin modificar o salvaje (wt: *wild type*). El símbolo (+) representa la posición en la que se añadió un nucleótido adicional (+N₁). Las flechas invertidas indican las regiones palindrómicas. También se muestra la secuencia consenso deducida.

Hasta la fecha, en diferentes especies bacterianas se han descrito diversos factores transcripcionales relacionados con la captación de zinc. El primer regulador de la captación de zinc fue descrito en *E. coli* y se conoce como proteína Zur (*Zinc-uptake regulator*). Dicho regulador se une a los motivos de DNA GAAATGTTATANTATAACATTTC y GTAATGTAATAACATTAC, presentes en las γ -proteobacterias y en las α -proteobacterias, respectivamente (Panina *et al.*, 2003). Un segundo regulador de la captación de zinc se ha identificado en *Bacillus* spp. y también se conoce como Zur. Sin embargo, el regulador Zur del grupo de *Bacillus* spp. parece estar más relacionado con la proteína Fur (*Ferric-uptake regulator*) de *E. coli* (29% de identidad) que con el propio represor Zur (< 25% de identidad) (Gaballa y Helmann, 1998). El motivo de unión de la proteína Zur de *B. subtilis* es

TAAATCGTAATNATTACGATTTA, sustancialmente diferente a la secuencia de unión de la proteína Fur de *E. coli* (GATAATGATAATCATTATC) (de Lorenzo *et al.*, 1988). El tercer y más reciente regulador de zinc descrito es la proteína AdcR, presente en el género *Streptococcus* (Panina *et al.*, 2003). Los datos obtenidos en este trabajo confirman experimentalmente, a través de ensayos *footprinting* y EMSAs la validez de la caja AdcR determinada mediante análisis *in silico* (TTAACYRGTTAA; Panina *et al.*, 2003), definiéndola de una manera más precisa (TTAACNRGTTAA). Además, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la unión de la proteína AdcR es dependiente, al menos *in vitro*, de Zn²⁺ o Mn²⁺, pero no de Fe²⁺.

A pesar de la estrecha relación existente entre las especies de bacterias grampositivas, los reguladores involucrados en la captación de zinc presentan una gran diferencia en sus respectivos motivos de reconocimiento al DNA. Este hecho sugiere la existencia de dos orígenes diferentes de proteínas reguladoras involucradas en la homeostasis de zinc en el grupo de las bacterias grampositivas. Además, debido a que varios de los genes estudiados se inducen en presencia de DPD y no parecen estar regulados por la proteína AdcR, es de esperar que en *S. suis* existan otros sistemas reguladores de los genes involucrados en la captación de los cationes divalentes, tal y como ocurre en numerosas especies bacterianas, como por ejemplo los reguladores Zur y Fur de *S. enterica* serovar Typhimurium (Campoy *et al.*, 2002).

4.2.2. Determinación del regulón AdcR

Una vez conocida la secuencia consenso de la caja AdcR (TTAACNRGTTAA) y aprovechando que el genoma de la cepa P1/7 del serotipo 2 de *S. suis* se encuentra completamente secuenciado y ensamblado, se llevó a cabo una búsqueda de todas las cajas AdcR presentes en el genoma de este microorganismo a través del programa informático *Editseq* (DNASTAR Inc.). De esta manera se hallaron 4 copias de esta caja repartidas a lo largo de todo el genoma de *S. suis* (Tabla 10), dos de las cuales corresponden a las cajas ya mencionadas, presentes en los promotores de los genes *ssuiDRAFT 1240 (adcR)* y *ssuiDRAFT 0103*.

Tabla 10. Genes de *S. suis* cuyos promotores contienen la caja AdcR.

ORF (89/1591) ^a	ORF (P1/7) ^b	Tamaño producto (aa) ^c	Posible función
<i>ssuiDRAFT 1240</i>	<i>ssu0112</i>	149	Proteína reguladora (AdcR)
<i>ssuiDRAFT 0103</i>	<i>ssu0308</i>	306	Lipoproteína de unión al zinc (ABC)
<i>ssuiDRAFT 0240</i>	<i>ssu1352</i>	89	Proteína ribosomal S14
<i>ssuiDRAFT 0326</i>	<i>ssu1390</i>	858	Precursor Internalina A

^aORF según la anotación del genoma de la cepa 89/159 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

^bORF según la anotación del genoma de la cepa P1/7 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_suis/)

^cTamaño en aminoácidos.

Las otras dos cajas se encuentran en las posiciones -36 y -31 con respecto al inicio de la traducción de los genes *ssu1352* y *ssu1390* de la cepa P1/7 de *S. suis*, respectivamente. Mediante análisis BLASTX se determinó la posible función de estos genes gracias a que se establecieron homologías de los genes *ssu1352* y *ssu1390* con genes que codifican la proteína ribosomal S14 y una proteína denominada Internalina A, respectivamente. Los promotores de estos genes fueron amplificados y se realizaron ensayos de movilidad electroforética con la proteína AdcR, observándose que ambas cajas son funcionales ya que se encuentran bajo el control de esta proteína (Fig. 30).

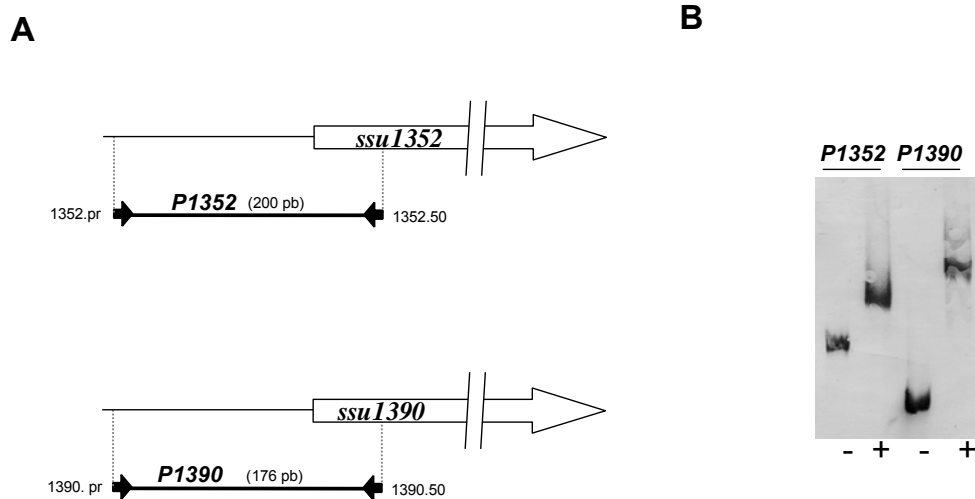


Fig. 30. (A) Representación esquemática de los genes *ssu1352* y *ssu1390* y de sus respectivas regiones promotoras. Las flechas pequeñas indican la posición del par de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de sus promotores. (B) Movilidad electroforética de los fragmentos de DNA que contienen el promotor de los genes *ssu1352* (*P1352*) o *ssu1390* (*P1390*) de *S. suis* P1/7 en ausencia (-) o en presencia (+) de la proteína AdcR purificada de *S. suis*.

Como se expondrá más adelante, la proteína AdcR, además de regular genes cuyos productos están involucrados en la captación de cationes, también parece regular genes cuyos productos son proteínas ribosomales parálogas que podrían tener una función importante en ambientes con carencia de zinc, así como otros genes cuyos productos podrían intervenir en los procesos invasivos durante la interacción patógeno-hospedador (Panina *et al.*, 2003; Brenot *et al.*, 2007). Todo ello está en concordancia con los resultados obtenidos en la búsqueda de genes en cuyos promotores se encuentran motivos de unión funcionales de la proteína AdcR, en este caso los genes que codifican la proteína ribosomal S14 y la internalina A (*ssu1352* y *ssu1390*, respectivamente).

4.2.3. Construcción de un mutante defectivo en la proteína AdcR y estudio de su papel regulador

Con el objetivo de estudiar el papel del regulador AdcR en relación con la expresión de los genes que controla, se procedió a la construcción de un mutante de *S. suis* deficiente en el gen *adcR* mediante *overlap extension* PCR, de manera que se consiguió amplificar el gen *adcR* incorporando en él una delección. Para ello, en primer lugar se realizaron dos PCRs (una con los oligonucleótidos ID1-ID2; y la otra con los oligonucleótidos ID3-ID4), utilizando como molde el DNA cromosómico de la cepa P1/7 de *S. suis* (Fig. 31). Los productos de ambas PCRs se utilizaron como moldes para las siguientes PCRs, en las que se utilizaron los oligonucleótidos ID5-ID6 (internos al fragmento amplificado con los oligonucleótidos ID1-ID2) y los oligonucleótidos ID7-ID8 (internos al fragmento amplificado con los oligonucleótidos ID3-ID4) (Fig. 31). Los oligonucleótidos ID6 e ID7 se diseñaron de forma que fueran complementarios entre ellos, para que al utilizar una mezcla de las PCRs amplificadas con los oligonucleótidos ID5-ID6 y ID7-ID8 como molde y los oligonucleótidos ID5 y ID8 como cebadores, se obtuviera el gen con la delección deseada (Fig. 31).

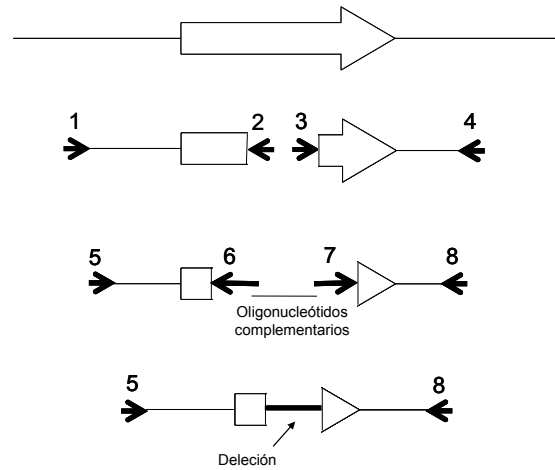


Fig. 31. Representación esquemática de las 3 PCRs sucesivas que se realizaron para la obtención de los plásmidos pSET4 Δ adcR y pSET4 Δ fur.

El fragmento deleciónado se clonó en el vector termosensible pSET4s, obteniéndose el vector pSET4 Δ adcR, utilizado para llevar a cabo la electrotransformación de la cepa virulenta de *S. suis* P1/7, de manera que se obtuvo la cepa UA5000, con una deleción en el gen *adcR*. La comprobación del mutante se realizó mediante PCR y secuenciación. La PCR de comprobación se llevó a cabo con una pareja de oligonucleótidos externa a la construcción (*adcR*-ID1 + *adcR*-ID4, Tabla 3), obteniéndose un producto de 1.512 pb en la cepa mutante frente a los 1.741 pb de la cepa salvaje (Fig. 32)

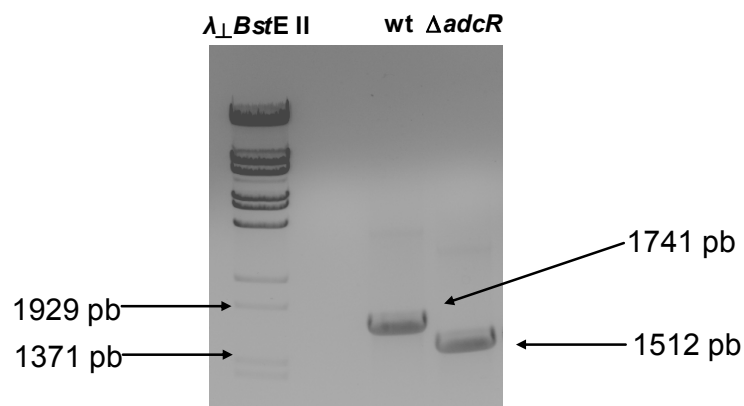


Fig. 32. Comprobación mediante PCR de la deleción (Δ) de 229 pb en el gen *adcR* de la cepa UA5000 de *S. suis*. Como control se utilizó el DNA cromosómico de la cepa salvaje *S. suis* P1/7 (wt). Los productos de PCR se comprobaron mediante secuenciación. El marcador de peso molecular utilizado fue el DNA cromosómico del bacteriófago λ , digerido con la enzima de restricción *BstE* II, del que se indica el tamaño de alguna de sus bandas.

Seguidamente, se estudió el perfil electroforético de las proteínas asociadas a la pared celular de las cepas P1/7 y UA5000, para lo cual se realizaron extracciones de las paredes de dichas cepas y se analizaron mediante SDS-PAGE. En el perfil electroforético del extracto de la pared del mutante *adcR* se observó la sobreexpresión de dos proteínas de unas 100 y 120 kDa que no se visualizaban en el perfil electroforético del extracto de pared de la cepa salvaje (Fig. 33).

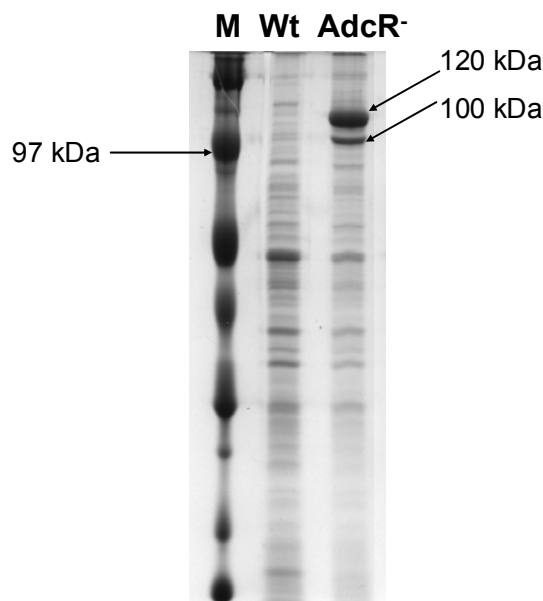


Fig. 33. SDS-PAGE mostrando el perfil electroforético de los extractos de la pared de las cepas P1/7 (wt) y UA5000 (*AdcR*⁻) de *S. suis*. Se indica la masa molecular aproximada de las dos proteínas sobreexpresadas en el mutante *adcR*. También se muestra el marcador Rainbow (M).

Las bandas correspondientes a las proteínas sobreexpresadas en el mutante *adcR* fueron digeridas con tripsina, obteniéndose las secuencias aminoacídicas de varios péptidos de cada una de ellas mediante espectrometría de masas Maldi-tof. La secuencia de los péptidos reveló, mediante el programa informático *MASCOT search engine*, que se trataba de las proteínas Ssu0309 y Ssu1103, de 116 y 95 kDa, respectivamente, homólogas a las proteínas denominadas Pht (*Pneumococcal histidine triad*) (Tabla 11). Como se verá más adelante, esta familia de proteínas se caracteriza por presentar conservado y repetido el dominio HxxHxH (*histidine triad motif*) y se relacionan con el proceso invasivo (Adamou *et al.*, 2001; Brenot *et al.*, 2007).

Tabla 11. Genes que codifican las proteínas identificadas en el extracto de pared de la cepa mutante UA5000 de *S. suis*.

ORF (89/1591) ^a	ORF (P1/7) ^b	Tamaño producto (aa) ^c	Proteínas homólogas (BLAST)
<i>ssuiDRAFT 1195</i>	<i>ssu0309</i>	1051	Pht
<i>ssuiDRAFT 1606</i>	<i>ssu1103</i>	834	Pht

^aORF según la anotación del genoma de la cepa 89/159 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

^bORF según la anotación del genoma de la cepa P1/7 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_suis/)

^cTamaño en aminoácidos.

Debido a que las proteínas sobreexpresadas en el mutante *adcR* deben estar bajo el control de la proteína AdcR (ya sea directa o indirectamente), se procedió a la búsqueda de cajas AdcR en las regiones promotoras de los genes que las codifican. A pesar de que no se encontró ninguna copia exacta de la caja AdcR, se procedió a la amplificación de sus promotores para analizarlos mediante ensayos de movilidad electroforética (Fig. 34). Como era de esperar, los EMSAs llevados a cabo con el promotor del gen *ssu0309* resultaron ser negativos. Sin embargo, al realizar el ensayo de movilidad electroforética con el promotor del gen *ssu1103*, se observó que la proteína AdcR se une específicamente (Fig. 34). Por ello, se analizó minuciosamente la secuencia de su promotor y, aunque no se encontró una copia exacta de la caja AdcR (TTAACNRGTAA), sí se halló una muy parecida (TTAACTAGTAAA) en la posición -230 con respecto al inicio de la traducción, que es suficiente para permitir la unión de la proteína AdcR.

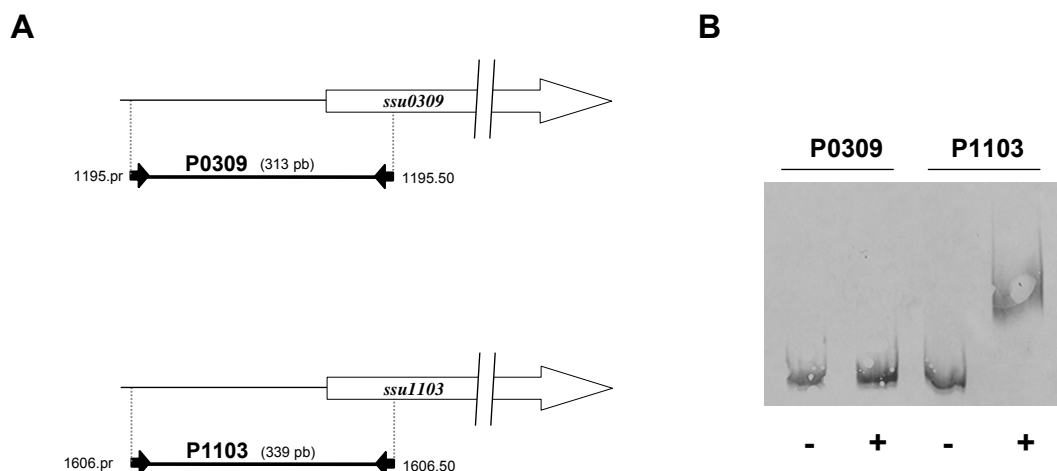


Fig. 34. (A) Representación esquemática de los genes *ssu0309* y *ssu1103* de *S. suis* P1/7 y sus respectivas regiones promotoras. Las flechas pequeñas indican la posición del par de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los promotores. (B) Movilidad electroforética de los fragmentos de DNA que contienen el promotor de los genes *ssu0309* (P0309) y *ssu1103* (P1103) en ausencia (-) o en presencia (+) de la proteína AdcR.

Como no se encontró ninguna caja AdcR en el promotor del gen *ssu0309*, se procedió al análisis del gen que le precede (*ssu0308*), encontrándose una copia exacta de la caja AdcR (TTAACTGGTTAA) en la posición -26 con respecto al inicio de la traducción. Al realizar análisis BLASTX con este gen se obtuvo como resultado una homología con el gen *ssuiDRAFT 0103* de la cepa 89/1591 de *S. suis*, gen estudiado anteriormente y que sí se encuentra bajo el control del regulador AdcR. Para comprobar si el gen *ssu0309* se encuentra en la misma unidad transcripcional que el gen *ssu0308* (*ssuiDRAFT 0103* en la cepa 89/1591) y, por tanto, bajo el control de la proteína AdcR, se realizó una RT-PCR con los oligonucleótidos 103.up y 1195.50 (Fig. 35). Los resultados obtenidos indicaron que efectivamente se encuentran en la misma unidad transcripcional por lo que ambos genes están sometidos al control del regulador AdcR. Este gen (*ssu0309*) corresponde al gen *ssuiDRAFT 1195* en la cepa 89/1591, que no fue detectado con anterioridad en esta cepa debido a que su secuencia aparece incompleta en la base de datos. Sin embargo, análisis posteriores mediante PCR han determinado que, efectivamente, se haya contiguo al gen *ssuiDRAFT 0103* (Fig. 35).

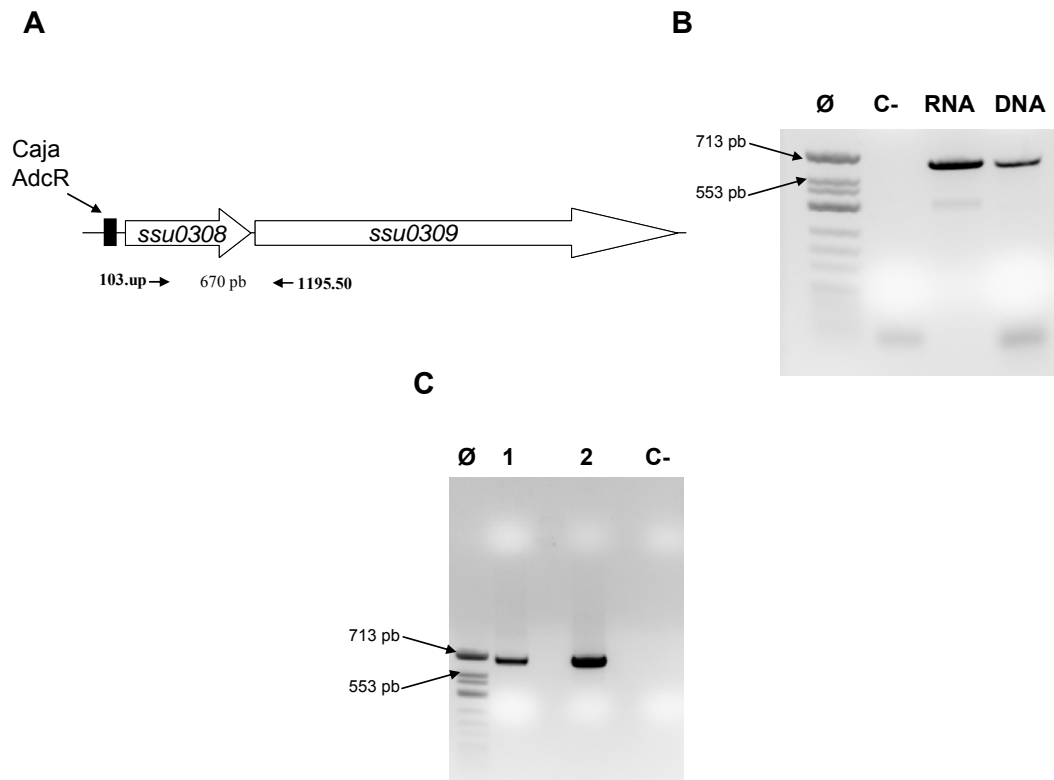


Fig. 35. (A) Representación esquemática de la organización genética determinada mediante análisis de RT-PCR de la región que contiene los genes *ssu0308-0309* de *S. suis* P1/7. La posición del par de oligonucleótidos utilizado para los análisis de RT-PCR se representa mediante flechas pequeñas y el tamaño del producto se indica en pares de bases (pb). (B) RT-PCR realizada en presencia de RNA, DNA o en ausencia de ambos (C-) como control negativo. (C) PCR realizada con DNA cromosómico de las cepas P1/7 (1), 89/1591 (2) de *S. suis* o sin DNA como control negativo (C-). Como marcador se utilizó DNA cromosómico del bacteriófago ØX174 digerido con *Hinf* I.

Las proteínas asociadas a la pared celular que aparecen sobreexpresadas en el perfil electroforético del mutante *adcR* corresponden a proteínas localizadas en la superficie celular de diversos estreptococos, conocidas como Pht. Estas proteínas sólo se han hallado entre especies de estreptococos patógenos (Panina *et al.*, 2003), y presentan conservado y repetido el dominio HxxHxH (*histidine triad motif*), que parece estar implicado en la unión al zinc o al DNA (Adamou *et al.*, 2001) y que se encuentran en las dos proteínas identificadas (*Ssu0309* y *Ssu1103*). Además, las proteínas Pht están relacionadas con la interacción célula hospedadora-patógeno y se ha sugerido que están bajo el control de la proteína *AdcR*, utilizando el zinc como mecanismo regulador

(Brenot *et al.*, 2007). Cabe recordar que las proteínas Pht proporcionan protección frente a diversos tipos capsulares de pneumococos en el modelo animal de ratón (Adamou *et al.*, 2001), por lo que su uso podría ser útil para el desarrollo de vacunas eficaces contra las infecciones de *S. suis*.

Seguidamente y con el objetivo de estudiar la expresión de los genes regulados por la proteína AdcR, se procedió a la extracción de mRNA de la cepa deficiente en el gen *adcR* (UA5000) y de la cepa salvaje (P1/7), analizándolos mediante PCR a tiempo real (Fig. 36). Los resultados obtenidos mostraron que los genes que presentan la caja AdcR en la región promotora de su operón, se encuentran desreprimidos en la cepa UA5000. Estos resultados demuestran que la proteína AdcR ejerce un papel como regulador negativo de la transcripción sobre: (i) los genes implicados en la captación de zinc (*ssuiDRAFT 0103* y *ssuiDRAFT 1239-1237*), (ii) los genes que codifican las proteínas Pht (*ssu0309* y *ssu1103*) y (iii) los genes que codifican el precursor de la Internalina A y la proteína ribosomal S14 (*ssu1390* y *ssu1352*, respectivamente).

Los componentes de los transportadores ABC implicados en la captación de zinc y/o de manganeso en *S. suis* se expresan desde 3 hasta 90 veces más en la cepa deficiente en el gen *adcR* que en la cepa salvaje. De hecho, estos resultados se corresponden con los resultados obtenidos en la expresión de los transportadores homólogos en un mutante *adcR* de *S. pyogenes* (Brenot *et al.*, 2007).

Por otra parte, los genes que codifican las proteínas Pht (*ssu0309* y *ssu1103*) se expresan de 10 a 30 veces más en la cepa mutante UA5000 que en la cepa salvaje. Como se ha comentado anteriormente, estas proteínas parecen estar implicadas en los procesos invasivos y en la homeostasis de metales (Panina *et al.*, 2003). Aunque ni el papel de estas proteínas en la interacción con las células hospedadoras ni con la homeostasis de metales se ha demostrado aún, sí que se ha descrito que mutantes de *S. pyogenes* deficientes en genes que codifican las proteínas Pht son menos virulentos que la cepa salvaje en el modelo animal de ratón (Reid *et al.*, 2003).

En relación con los procesos invasivos, cabe destacar también al factor de expresión del gen homólogo al precursor de la Internalina A (*ssu1390*), que en la cepa deficiente en el gen *adcR* se expresa unas 200 veces más que en la cepa salvaje. Esta proteína se ha

estudiado en el patógeno *Listeria monocytogenes* y parece estar implicada en el proceso invasivo mediante la interacción con las células hospedadoras (Wollert *et al.*, 2007).

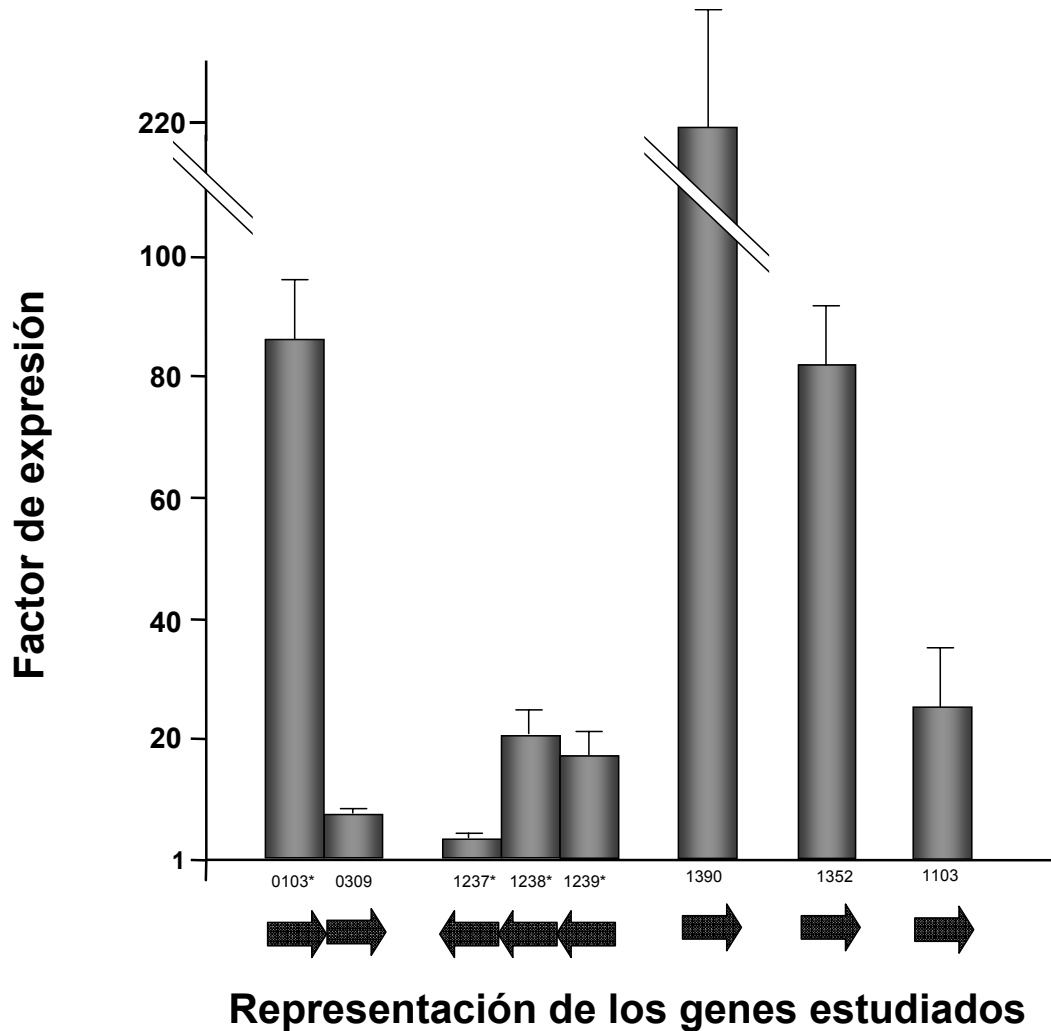


Fig. 36. Factor de expresión de algunos de los genes pertenecientes al regulón AdcR en el mutante *adcR* de *S. suis*. El factor de expresión se ha determinado mediante RT-PCR a tiempo real y es la relación entre la concentración de mRNA de cada gen de la cepa mutante con respecto a la cepa salvaje (P1/7). Los resultados que se muestran son la media de dos experimentos independientes (cada uno de ellos llevado a cabo por duplicado). La desviación típica se indica mediante barras de error. El símbolo (*) indica que la nomenclatura génica corresponde a la de la cepa de *S. suis* 89/1591 (ver tabla 9), el resto corresponde a la de la cepa P1/7.

Por otra parte y en relación a determinadas proteínas ribosomales, se ha propuesto que su expresión podría estar regulada por el zinc (Panina *et al.*, 2003). Esta hipótesis se basa en que las copias originales de estas proteínas contienen motivos de unión al zinc (C-X₂-C-X_n-C-X₂-C), mientras que estos motivos no se encuentran en sus parálogos (copias de los genes originales que surgieron durante la evolución a partir de duplicaciones). Se piensa que el motivo de unión al zinc juega un importante papel en la estabilidad de los ribosomas sometidos a altas temperaturas en las bacterias termofílicas y en las *Archaea*, mientras que es prescindible bajo condiciones normales (Makarova *et al.*, 2001). Por todo lo anterior, se ha sugerido que en condiciones de carencia de zinc, la inducción de los genes ribosomales parálogos permitiría la incorporación de sus productos en los ribosomas en lugar de las proteínas originales. Así, éstas últimas serían degradadas con la consiguiente liberación de zinc al citoplasma. El metal liberado durante este proceso sería utilizado por las enzimas esenciales que lo necesitan, como por ejemplo las DNA polimerasas (Panina *et al.*, 2003). Por el contrario, en un ambiente rico en zinc, los genes parálogos estarían reprimidos por sus respectivos reguladores, mientras que los productos de los genes originales se expresarían formando parte de los ribosomas utilizando todo el zinc disponible para impedir su acumulación, ya que como se ha visto anteriormente, un exceso de este metal resulta tóxico para la célula. Esta hipótesis cobra mayor fuerza en vista de los resultados obtenidos en el mutante UA5000 (AdcR⁻) ya que el gen *ssu1352*, que codifica la proteína ribosomal S14, presenta una caja AdcR funcional en su promotor (Fig. 30). Además, este gen se expresa más de 80 veces en la cepa cuyo gen *adcR* se encuentra deletado que en la cepa salvaje (Fig. 36), por lo que en la cepa salvaje se encuentra reprimido por el regulador AdcR. En concordancia con la hipótesis expuesta anteriormente, al analizar la secuencia aminoacídica de esta proteína se observó que no contiene ningún motivo de unión al zinc (C-X₂-C-X_n-C-X₂-C). La búsqueda de otros genes que codifican proteínas ribosomales S14 en el genoma de la cepa P1/7 de *S. suis*, mostró que el gen *ssu1352* podría ser un gen parálogo, copia del gen original (*ssu0083*), que sí que conserva el dominio de unión al zinc (Fig. 37).

Ssu0083 MAKKSMIAKNKRPAKFSTQAYTRCEKCGRPHSVYRKFKLCRVCFRDLAYLGQIPGVTKASW

Ssu1352 MAKKSMMARYQRQLELIERYADLRKSLKEKGDYQALRKLPRDSNPRLKYRDKTDGRPHAYMRKFGVSRITFRELAHLGQLPGVKKASW

Fig. 37. Secuencias aminoacídicas de las dos proteínas ribosomales S14 Ssu0083 y Ssu1352 de la cepa P1/7 de *S. suis*. El motivo de unión al zinc se encuentra subrayado en la primera de ellas (C-X₂-C-X_n-C-X₂-C), mientras que la segunda carece de él.

Como se comentó en la introducción de este trabajo, el zinc es un importante componente de muchas proteínas, incluyendo DNA polimerasas, proteasas y proteínas ribosomales y, los estreptococos, como el resto de bacterias, requieren mecanismos efectivos para la adquisición de zinc. En *B. subtilis* el transportador de zinc ZosA se encuentra regulado por la proteína PerR (Gaballa y Helmann, 2002). En *E. coli* y en *B. subtilis*, la transcripción de algunos transportadores de zinc se encuentra regulada por Zur (Patzner y Hantke, 2000). Sin embargo, el grupo de los estreptococos no presenta el regulador Zur, en su lugar se ha propuesto a la proteína AdcR, un represor de la familia MarR (Loo *et al.*, 2003). Así, en este grupo de microorganismos, la proteína AdcR actuaría de forma similar a la proteína Zur, actuando como un regulador global de la respuesta de zinc. Los datos obtenidos en este trabajo confirman esta hipótesis y también dan validez a los estudios realizados mediante métodos bioinformáticos, que predecían que la proteína AdcR controla la expresión de sistemas implicados en el transporte de zinc, de proteínas relacionadas con los procesos invasivos y de proteínas ribosomales parálogas (Panina *et al.*, 2003).

4.3. El regulador Fur en *S. suis*

4.3.1. Determinación de genes regulados por la proteína Fur

La proteína Fur de *E. coli* es relativamente pequeña (17 kDa) con 148 aminoácidos y es la responsable de llevar a cabo la regulación de los sistemas implicados en la captación de hierro, así como de un diverso número de mecanismos celulares (Hantke, 1981; Hantke, 1982; Touati, 1988; Stojiljkovic *et al.*, 1994; Escolar *et al.*, 1999). Con el objetivo de estudiar el gen *fur* de *S. suis* se realizó la búsqueda de dicho gen en la base de datos del genoma de este patógeno observándose que su producto presenta características similares a la proteína Fur de *E. coli* (17 kDa y 151 aminoácidos), aunque la identidad entre ambas proteínas es sólo de un 31%.

Los sitios a los que se une el complejo Fur-Fe²⁺, denominados cajas Fur, se encuentran presentes en los promotores de los genes regulados por esta proteína y, aunque son similares en muchas especies bacterianas, pueden presentar una cierta variabilidad (Fuangthong y Helmann, 2003). Las cajas Fur se hallan normalmente entre las posiciones -35 y -10 presentando unas 20 pb, más o menos conservadas, que constituyen un palíndromo degenerado rico en A-T. Por estas razones, y al contrario de lo que ocurre con la proteína AdcR, es muy difícil identificar cajas Fur en *S. suis* mediante análisis bioinformáticos.

Como se comentó anteriormente, los genes *fur*, *feoA* y *feoB*, todos ellos relacionados con el transporte de hierro, se inducen en presencia de DPD (Fig. 24), por lo que deben estar regulados por cationes divalentes. Así, el propio gen *fur* junto con el operón *feoAB*, implicado en la captación de hierro, son susceptibles de encontrarse bajo el control de la proteína Fur. Además, la región promotora de sus genes, si bien no posee ninguna caja definida como en el caso del gen *adcR*, presentan regiones ricas en A-T (Fig. 38) como ocurre con los promotores de los genes regulados por esta proteína.

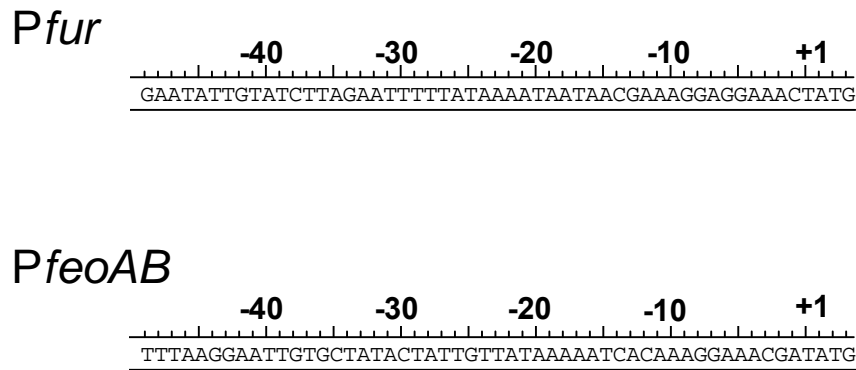


Fig. 38. Regiones promotoras del gen *fur* (*P_{fur}*) y del operón *feoAB* (*P_{feoAB}*). Se indican las posiciones de los nucleótidos con respecto al inicio de la traducción (+1).

Para comprobar la implicación de la proteína Fur en la regulación de genes relacionados con el transporte de hierro en *S. suis*, se procedió a la sobreexpresión de la proteína Fur de *S. suis* en la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL llevándose a cabo ensayos EMSA con el extracto crudo de la cepa de *E. coli* que sobreexpresaba la proteína Fur de *S. suis*, usando las regiones promotoras de los genes *fur* y *ssuiDRAFT 1637 (feoA)* de *S. suis* 89/1591 (Fig. 39). Los EMSAs realizados se llevaron a cabo con extracto crudo de la cepa que sobreexpresaba la proteína Fur y no con la proteína purificada debido a que ésta, una vez purificada, no se encontraba en su forma activa debido, probablemente, a la interacción con la resina utilizada para su purificación.

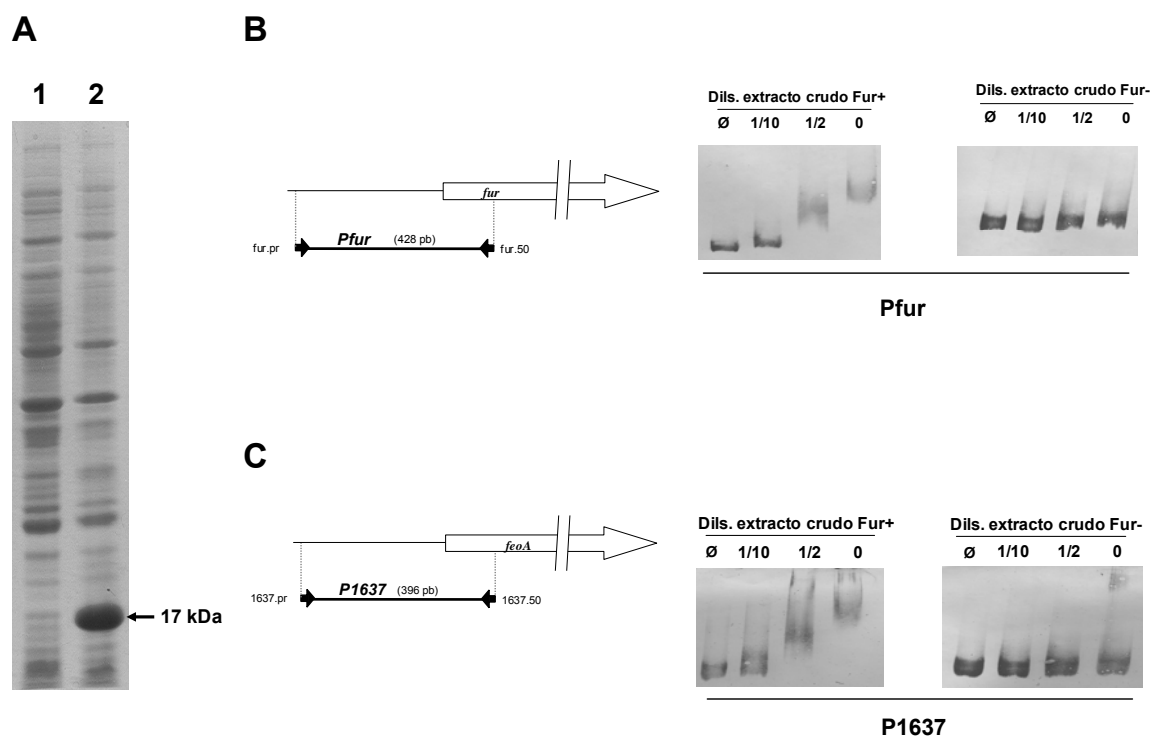


Fig. 39. (A) SDS-PAGE mostrando el extracto crudo de un cultivo de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL que contiene el vector pET15-b sin sobreexpresar (1) y sobreexpresando (2) la proteína Fur de 17 kDa de *S. suis*. (B y C) Representación esquemática y movilidad electroforética de las regiones promotoras de los genes *fur* (Pfur) y *feoA* (P1637) de *S. suis* 89/1591. Se indican las diluciones (1/10, 1/2 ó 0) utilizadas de extracto crudo de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL sobreexpresando la proteína Fur de *S. suis* (Fur+) o, como control negativo, una concentración equivalente de extracto crudo de la misma cepa de *E. coli* sin sobreexpresar la proteína Fur (Fur-). La ausencia de extracto crudo se indica mediante el símbolo “Ø”. Las flechas pequeñas indican la posición del par de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los promotores.

Los resultados obtenidos revelaron que tanto los genes que constituyen el operón *feoAB*, así como el propio gen *fur*, se encuentran bajo el control de la proteína Fur en *S. suis*. De hecho, al igual que ocurre en *S. suis*, la autorregulación de la proteína Fur ha sido descrita en diversos microorganismos (De Lorenzo *et al.*, 1988; Delany *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003b). Además, estudios recientes ponen de manifiesto que la proteína Fur también regula los genes *feoAB* en *Desulfovibrio vulgaris* (Bender *et al.*, 2007).

4.3.2. Construcción de un mutante defectivo en la proteína Fur y estudio de su papel regulador

Con el objetivo de estudiar el papel del regulador Fur con respecto a la expresión de los genes que controla, se procedió a la construcción de un mutante de *S. suis* deficiente en el gen *fur*. Para ello, se realizó una deleción de 222 pb en el gen *fur* siguiendo el mismo procedimiento que el indicado anteriormente para la construcción del mutante *adcR* (Fig. 31). El fragmento deleciónado se clonó en el vector termosensible pSET4s, obteniéndose el vector pSET4 Δ *fur*, utilizado para llevar a cabo la electrotransformación de la cepa virulenta de *S. suis* P1/7. De esta manera se obtuvo la cepa UA5001, con una deleción en el gen *fur*. La comprobación del mutante se realizó mediante PCR y secuenciación. La PCR de comprobación se llevó a cabo con una pareja de oligonucleótidos externa a la construcción (*fur*-ID1 + *fur*-ID4, Tabla 3), obteniéndose un producto de 1.586 pb en la cepa mutante frente a los 1.808 pb de la cepa salvaje (Fig. 40).

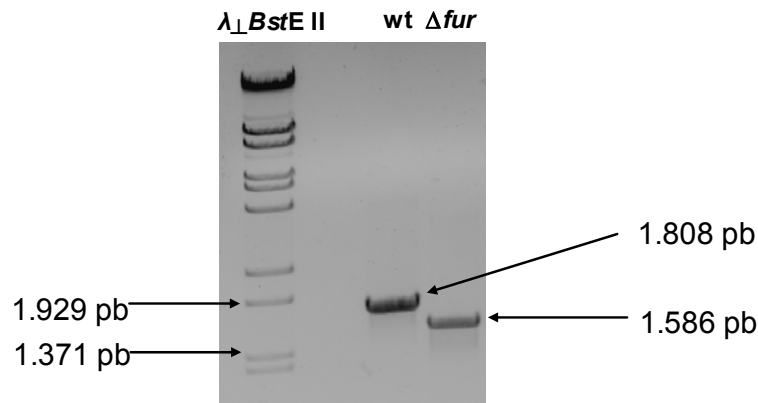


Fig. 40. Comprobación mediante PCR de la deleción (Δ) de 222 pb en el gen *fur* de la cepa UA5001 de *S. suis*. Como control se utilizó el DNA cromosómico de la cepa salvaje *S. suis* P1/7 (wt). Los productos de PCR se comprobaron mediante secuenciación. El marcador de peso molecular utilizado fue el DNA cromosómico del bacteriófago λ , digerido con la enzima de restricción *BstE* II, del que se indica el tamaño de alguna de sus bandas.

Como se describió anteriormente, el gen *ssuiDRAFT 1637* (*feoA*) es el primero de una unidad transcripcional que incluye 2 genes (*ssuiDRAFT 1637-1638*), que presentan homología con los genes que codifican las proteínas FeoA y FeoB, implicadas en el

transporte de hierro en *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium y *D. vulgaris* (Kammler *et al.*, 1993; Tsois *et al.*, 1996; Bender *et al.*, 2007).

Así, con el objetivo de estudiar la expresión de los genes regulados por la proteína Fur, se procedió a la extracción de mRNA de la cepa *fur* deficiente (UA5001) y de la cepa salvaje (P1/7) para analizarlos mediante RT-PCR a tiempo real (Fig. 41). Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de los genes *feoA* y *feoB* aumenta en la cepa mutante con respecto a la salvaje, por lo que la proteína Fur ejerce un control negativo sobre ellos.

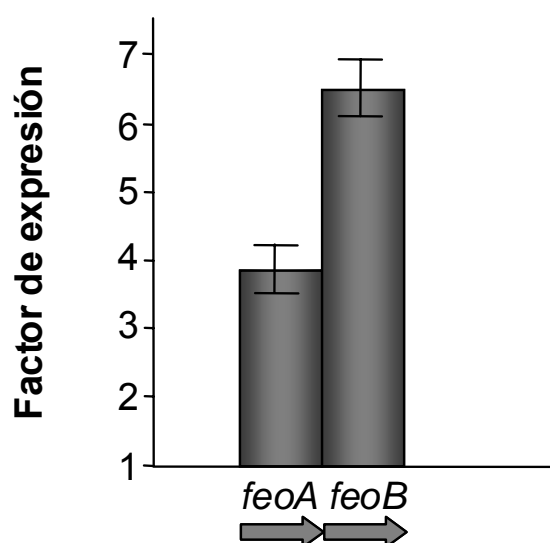


Fig. 41. Factor de expresión de algunos de los genes pertenecientes al regulón Fur en el mutante *fur* de *S. suis*. El factor de expresión se ha determinado mediante RT-PCR a tiempo real y es la relación entre la concentración de mRNA de cada gen de la cepa mutante con respecto a la cepa salvaje (P1/7). Los resultados que se muestran son la media de dos experimentos independientes (cada uno de ellos llevado a cabo por duplicado). La desviación típica se indica mediante barras de error.

Este conjunto de resultados muestra que en *S. suis*, de la misma forma que ocurre en todos los microorganismos estudiados, la proteína Fur es responsable de la regulación de sistemas implicados en la captación de hierro como un represor transcripcional de manera que bajo condiciones de exceso de hierro, la proteína Fur se une al Fe^{2+} adquiriendo una conformación que le permite reconocer a sus secuencias de DNA diana

(Hantke, 1981; Klebba *et al.*, 1982; Griggs *et al.*, 1987; Saito, 1991; Stojiljkovic y Hantke, 1995; Escolar *et al.*, 1999; Ratledge y Dover, 2000; Garrido *et al.*, 2003a).

4.4. Efecto de las mutaciones en los genes *adcR* y *fur* en la virulencia de *S. suis*

Como se mencionó anteriormente, durante los últimos años se han construido numerosos mutantes deficientes en los genes implicados en la homeostasis del hierro y del zinc (*Fur* y *Zur*, respectivamente) en diversos microorganismos patógenos con el objetivo de determinar sus respectivos papeles en la virulencia. La mayoría de los mutantes *fur* y *zur* estudiados presentan una disminución de la virulencia (Campoy *et al.*, 2002a; Mey *et al.*, 2005; Jacobsen *et al.*, 2005; Harvie *et al.*, 2005; Kitphati *et al.*, 2007; Cha *et al.*, 2008). No obstante, no se puede generalizar sobre la implicación de estos genes en la virulencia bacteriana, ya que patógenos como *Pasteurella multocida* deficientes en el gen *fur* no presentan una disminución de la virulencia al compararla con la cepa salvaje (Bosch *et al.*, 2001).

Para determinar el efecto de las mutaciones de los genes *adcR* y *fur* en la virulencia de *S. suis*, se propuso estudiar la dosis letal 50 (DL₅₀) de los mutantes *adcR*, *fur* y del doble mutante *adcR fur*.

En los trabajos realizados anteriormente se habían obtenido ya los mutantes *adcR* y *fur*, pero no se disponía de un doble mutante en ambos genes. Así, para la construcción de este último, se prepararon células electrocompetentes a partir de la cepa UA5000 (deficiente en el gen *adcR*) y se transformó con el vector pSET4Δ*fur* para conseguir el reemplazamiento del gen *fur* salvaje por el gen *fur* deleciónado de la construcción, obteniéndose de esta manera la cepa doble mutante UA5002. La comprobación del doble mutante se realizó mediante PCR (Fig. 42) y secuenciación, de la misma forma que en el caso de los mutantes simples.

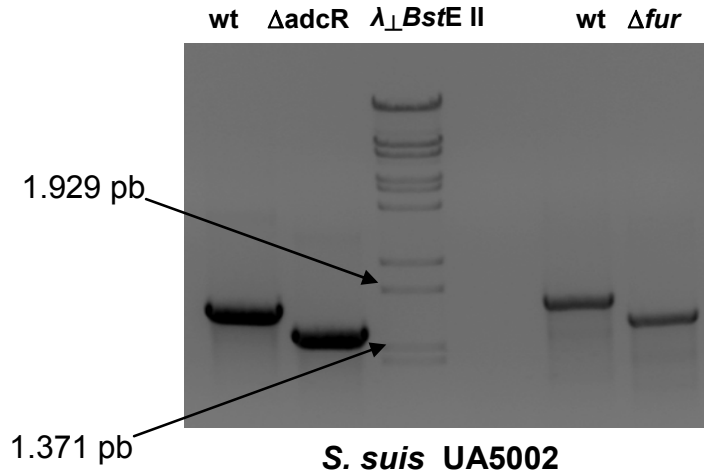


Fig. 42. Comprobación mediante PCR de la deleciones (Δ) de 229 y 222 pb en los genes *adcR* y *fur* (respectivamente) de la cepa UA5002 de *S. suis*. Como control se utilizó el DNA cromosómico de la cepa salvaje *S. suis* P1/7 (wt). Los productos de PCR se comprobaron mediante secuenciación. El marcador de peso molecular utilizado fue el DNA cromosómico del bacteriófago λ , digerido con la enzima de restricción *BstE* II, del que se indica el tamaño de alguna de sus bandas.

Los estudios de virulencia de este patógeno se realizaron en el modelo animal de ratón, tal y como se detallan en el Apartado 3.7 de material y métodos de este trabajo. Los resultados obtenidos indican que todos los mutantes estudiados presentan una significativa disminución de su virulencia, siendo sus DL_{50} s un mínimo de 45 veces mayor que la DL_{50} de la cepa salvaje (Tabla 12).

Tabla 12. Dosis letal 50 (DL_{50}) de las cepas de *S. suis* P1/7, UA5000, UA5001 y UA5002 en el modelo animal de ratón (cfu/animal).

P1/7 (wt)	UA5000 ($\Delta adcR$)	UA5001 (Δfur)	UA5002 ($\Delta adcR \Delta fur$)
$4,4 \times 10^6$	$>2 \times 10^8$	$>2,5 \times 10^8$	$>3 \times 10^8$

De hecho, el 26% de los animales inoculados con una dosis de 10^5 - 10^6 cfu/animal de la cepa salvaje de *S. suis* (P1/7), desarrolló signos de enfermedad entre las primeras 24-36 horas tras la infección (disnea, disminución de la movilidad, fiebre y pelaje erizado), llegando a morir el 13% de ellos. Por otra parte, los animales inoculados con una dosis similar de los mutantes UA5000, UA5001 o UA5002 permanecieron en buen estado durante las 3 semanas que duró el experimento.

Además, todos los animales inoculados con una dosis de 10^7 - 10^8 cfu/animal de la cepa salvaje de *S. suis* (P1/7) murieron durante los 4 primeros días tras la infección, mientras que todos los animales inoculados con los mutantes *fur* y todos los inoculados con el doble mutante *adcR fur* permanecieron en buen estado durante todo el experimento y sólo murió el 17% de los ratones inoculados con el mutante *adcR* (Fig. 43).

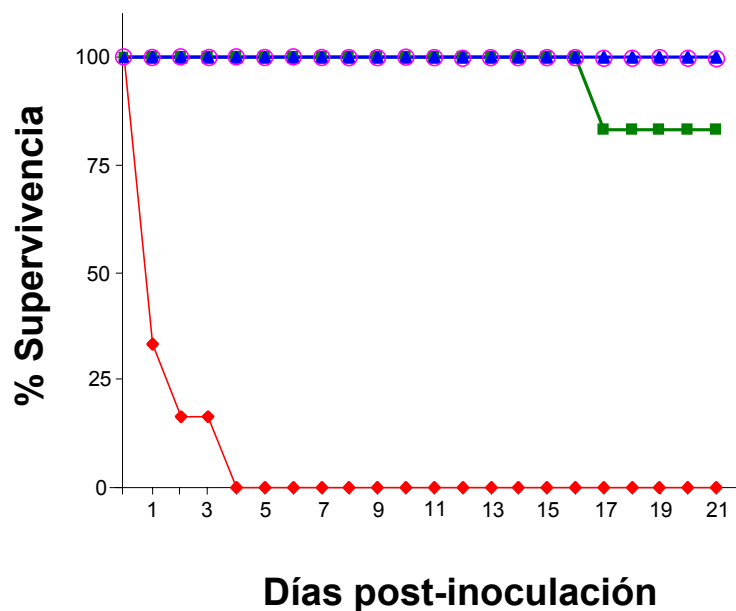


Fig 43. Representación gráfica de la supervivencia a lo largo del tiempo de los ratones inoculados con la cepa salvaje P1/7 (◆), con el mutante *adcR* (■), con el mutante *fur* (▲) o con el doble mutante *adcR fur* (○). Los ratones fueron inoculados con 10^7 - 10^8 cfu/animal de la cepa indicada de *S. suis* ($n = 6$ ratones por grupo).

Es de señalar que a pesar de que en el mutante *adcR* se encuentran sobreexpresados algunos factores de virulencia, al menos su DL_{50} aumenta considerablemente con respecto a la cepa salvaje. Estos resultados sugieren que en este mutante otros factores de virulencia deben encontrarse afectados negativamente. Además, aunque la patogénesis de las infecciones causadas por *S. suis* no ha sido completamente definida, se sabe que este patógeno es capaz de sobrevivir en el interior de las células del hospedador (Vanier *et al.*, 2004) y uno de los mecanismos de defensa de las células hospedadoras contra los microorganismos que los invaden es la producción de superóxidos (Janssen *et al.*, 2003). De hecho, el metabolismo aeróbico genera especies reactivas de oxígeno que pueden causar daños en diversas estructuras celulares (Dubrac y Touati, 2000). Como se comentó anteriormente, los microorganismos expuestos a

estos compuestos han desarrollado mecanismos efectivos que los protegen contra el daño oxidativo, incluyendo reguladores del transporte de metales como la proteína Fur (Dubrac y Touati, 2000). Como el resto de estreptococos, *S. suis* ha perdido los citocromos y la catalasa, es aerotolerante y, por tanto, ha de poseer mecanismos que le permitan combatir el estrés oxidativo (Niven *et al.*, 1999). Así pues, una de las posibles hipótesis que explicaría la disminución de la virulencia que presentan los mutantes deficientes en los reguladores de metales AdcR y Fur de *S. suis* podría ser una mayor susceptibilidad frente al estrés oxidativo generado por el organismo hospedador.

Otra posible explicación de la atenuación de la virulencia podría ser una disminución en la tasa de crecimiento de las cepas mutantes debida a la pérdida del control de la homeostasis de metales. Así, para comprobar el efecto de las mutaciones en relación al crecimiento, se procedió a la medición de la densidad óptica de los cultivos de las diferentes cepas a lo largo de 12 horas (Fig. 44).

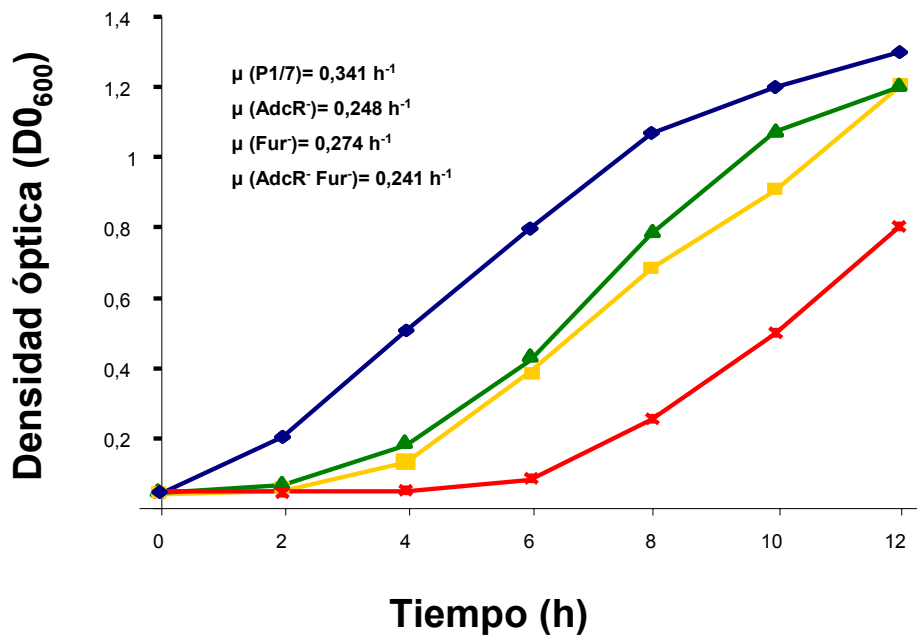


Fig. 44. Representación gráfica a lo largo del tiempo del crecimiento de las cepas de *S. suis* salvaje P1/7 (♦), *adcR* deficiente UA5000 (■), *fur* deficiente UA5001 (▲) y *adcR fur* deficiente UA5002 (×). Los resultados que se muestran son la media de tres experimentos independientes. También se indican las tasas de crecimiento (μ) de cada cepa.

De esta manera se observó que la tasa de crecimiento se ve reducida de forma significativa durante la fase de crecimiento exponencial en todos los mutantes respecto la cepa salvaje (Fig. 44) y, además, la fase de latencia se alarga considerablemente en el tiempo en las tres cepas mutantes, especialmente en el doble mutante *adcR fur* (UA5002).

Posiblemente, la disminución de la virulencia de las cepas que presentan mutados los reguladores *adcR* y *fur* sea debida a una combinación de factores, entre los que pueden encontrarse la mayor sensibilidad al estrés oxidativo, así como los efectos negativos en el crecimiento que representa la desregulación de los genes implicados en el transporte de metales. Asimismo, cabe recordar que este tipo de reguladores son en realidad reguladores pleiotrópicos que, además de controlar los genes implicados en la captación de metales y de proteínas que participan en la respuesta al estrés oxidativo, también regulan, ya sea de manera directa o indirecta, otros genes importantes para la célula (Touati, 1988, Stojiljkovic *et al.*, 1994; Escolar *et al.*, 1999).

4.5. Capacidad inmunogénica y protectora de las proteínas de *S. suis* reguladas por AdcR y Fur

4.5.1. Capacidad inmunogénica y protectora de transportadores ABC implicados en la captación de zinc y de hierro

Como ya se ha mencionado anteriormente, los transportadores ABC involucrados en la captación de solutos en los procariotas emplean una proteína periplásmica de unión al ligando. Estas proteínas actúan recogiendo el sustrato liberado por el receptor de la membrana externa en las bacterias gramnegativas y transfiriéndoselo al componente transmembranal correspondiente de la membrana interna, mientras que en las bacterias grampositivas y en las *Archaea*, las proteínas periplásmicas de unión al sustrato son en realidad lipoproteínas con un característico lípido N-terminal anclado en la superficie exterior de la membrana citoplasmática (Gilson *et al.*, 1988; Sutcliffe y Russell, 1995; Albers *et al.*, 1999). Son precisamente estos componentes de los transportadores ABC bacterianos los que se encuentran más expuestos en la superficie celular. De hecho, algunos de ellos presentan propiedades inmunogénicas contra las especies bacterianas de las que derivan (Garmory y Titball, 2004; Tanabe *et al.*, 2006), como ocurre en el caso de las proteínas de unión al sustrato implicadas en la captación de cationes divalentes PiaA y PiuA de *S. pneumoniae* que, además de ser inmunogénicas, confieren protección ante este patógeno en el modelo animal de ratón (Jomaa *et al.*, 2005).

Por todas estas razones, se procedió a la clonación en *E. coli* de los genes de *S. suis* que codifican lipoproteínas periplásmicas de transportadores ABC de unión al Zn^{2+} (*ssuiDRAFT 0103* y *ssuiDRAFT 1237*) y al Fe^{2+} (*ssuiDRAFT 0174*), para la posterior sobreexpresión y purificación de sus productos (Fig. 45A). A continuación, los productos sobreexpresados de los genes *ssuiDRAFT 0103*, *ssuiDRAFT 0174* y *ssuiDRAFT 1237* fueron analizados mediante Western Blot, utilizando el suero obtenido de los ratones supervivientes tras la infección con la cepa 89/1591 de *S. suis*. Los resultados mostraron que las tres proteínas son inmunogénicas ya que el suero de los ratones infectados con este patógeno contiene anticuerpos específicos contra estas proteínas (Fig. 45B). Por el contrario, se obtuvieron resultados negativos cuando estas proteínas fueron analizadas con suero de ratones no infectados (datos no mostrados).

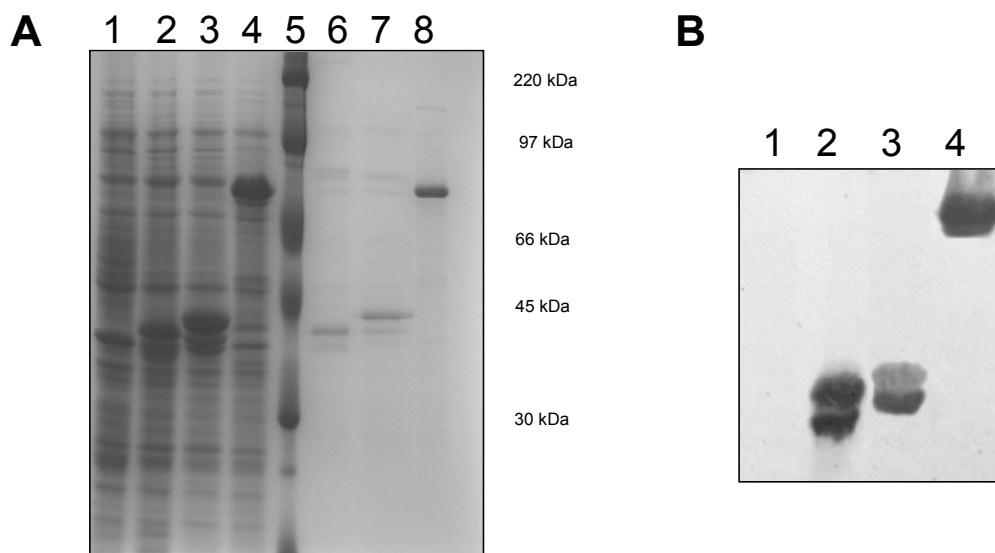


Fig. 45. (A) SDS-PAGE mostrando los extractos crudos de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL con el vector pET15-b solo (Carril 1) o sobreexpresando las proteínas SsuiDRAFT 0103 (Carril 2), SsuiDRAFT 0174 (Carril 3) y SsuiDRAFT 1237 (Carril 4). Las proteínas purificadas SsuiDRAFT 0103, SsuiDRAFT 0174 y SsuiDRAFT 1237 se muestran en los Carriles 6, 7 y 8, respectivamente. El marcador de peso molecular (Rainbow, Amersham) se muestra en el Carril 5, con sus valores situados a lo largo del margen derecho. (B) Western blot realizado con el suero de los ratones infectados con la cepa 89/1591 de *S. suis*. Los análisis se llevaron a cabo con extractos crudos de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL conteniendo el vector pET15-b solo como control negativo (Carril 1) o sobreexpresando las proteínas SsuiDRAFT 0103 (Carril 2), SsuiDRAFT 0174 (Carril 3) y SsuiDRAFT 1237 (Carril 4).

Además, con el objetivo de determinar si la inducción de esta respuesta inmunológica es suficiente para proteger a los ratones contra la infección de *S. suis*, tres grupos de ocho ratones fueron inmunizados dos veces con 10 µg de cada una de las tres proteínas. Así, cuando los animales fueron inoculados con 10^8 cfu/animal de la cepa de *S. suis* 89/1591, prácticamente todos los ratones murieron al cabo de 21 días de la infección en los grupos control y en los vacunados con la proteína SsuiDRAFT 0174 (Fig. 46). Sin embargo, la viabilidad del grupo de ratones inoculados con la proteína SsuiDRAFT 1237 fue del 50% ($P > 0,05$), mientras que la de los vacunados con la proteína SsuiDRAFT 0103, fue significativamente mayor (87,5%; $P < 0,01$) (Fig. 46).

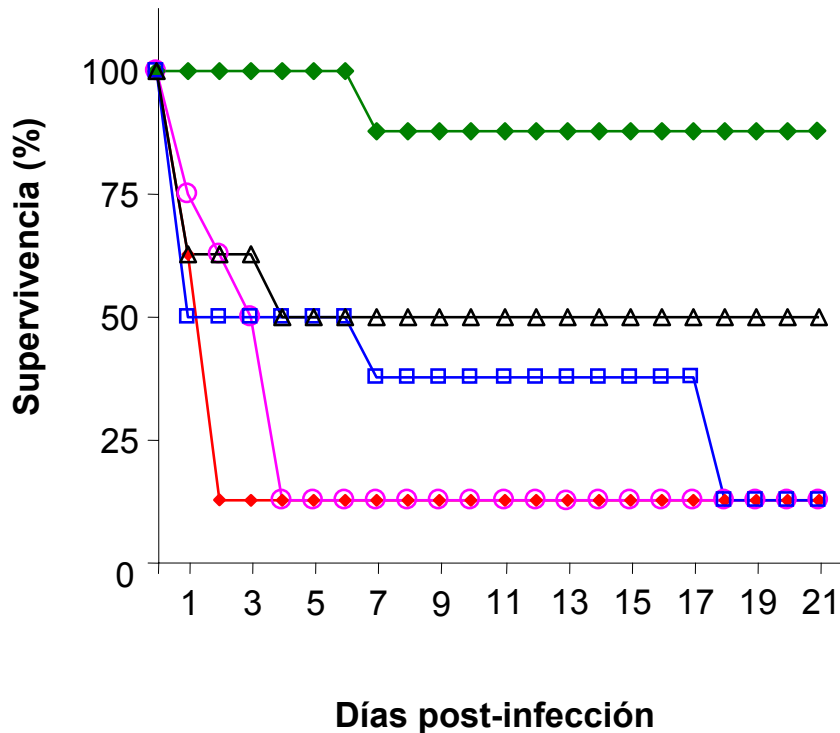


Fig. 46. Representación gráfica a lo largo del tiempo de la supervivencia de los ratones inoculados con solvente (◆) o solvente con adyuvante (○); y las de los vacunados con las proteínas purificadas SsuiDRAFT 0103 (◇), SsuiDRAFT 0174 (□) o SsuiDRAFT 1237 (△). Después de la última inmunización, se realizó la infección con 10^8 cfu/animal de la cepa 89/1591 de *S. suis*, ($n = 8$ ratones por grupo).

Estos resultados ponen de manifiesto que el producto del gen *ssuiDRAFT 0103*, perteneciente al regulón *adcR* de *S. suis*, además de ser inmunogénico, confiere un alto grado de protección contra este patógeno, al menos en el modelo de infección de ratón. Asimismo, las proteínas SsuiDRAFT 0174 y SsuiDRAFT 1237, presentes en la pared celular de *S. suis* y codificadas en dos unidades transcripcionales policistrónicas independientes, también poseen capacidad antigénica, aunque su poder protector es menor que el de la proteína SsuiDRAFT 0103. Es posible que la capacidad de protección de estas dos proteínas sea baja, por ejemplo, porque participan en el transporte de cationes divalentes de una forma menos relevante o simplemente porque su exposición al sistema inmune del hospedador no es tan importante como la de la proteína SsuiDRAFT 0103. Sin embargo, las tres proteínas inducen una respuesta inmunológica en el modelo animal de ratón y una combinación de ellas podría ser considerada como base para un simple test serológico que permitiera detectar

infecciones provocadas por *S. suis* en granjas. Además, cabe destacar también el hecho de que los análisis PBLASTN del gen *ssuiDRAFT 0103* determinaron que este gen se encuentra prácticamente en todos los estreptococos de los que se dispone de su secuencia. Esto sugiere que su producto podría utilizarse como herramienta para alcanzar una amplia protección frente a un significativo grupo de patógenos grampositivos.

Se han descrito componentes de transportadores ABC inmunogénicos en una gran variedad de géneros bacterianos entre los que se encuentran *Campylobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Brucella*, *Treponema*, *Chlamydia*, *Yersinia* e incluso *Streptococcus* (Garmory y Titball, 2004; Tanabe *et al.*, 2006). En concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo, varios tipos de estos transportadores, entre los que se encuentran transportadores ABC implicados en el transporte de cationes, además de ser inmunogénicos, tienen capacidad protectora pudiendo llegar a ser útiles en el desarrollo de vacunas (Rosinha, 2002; Garmory y Titball, 2004; Jomaa *et al.*, 2005; Tanabe *et al.*, 2006).

4.5.2. Capacidad inmunogénica y protectora de los mutantes *adcR*, *fur* y *adcR fur*

Como se comentó anteriormente, una de las estrategias desarrolladas para producir vacunas contra las bacterias patógenas implica la sobreexpresión en la superficie celular bacteriana de transportadores de cationes inducidos mediante la construcción de cepas deficientes en los represores de la transcripción de estos transportadores (Garrido *et al.*, 2008). Puesto que se han descritos transportadores implicados en la captación de cationes divalentes que resultan ser inmunogénicos y además confieren protección (West *et al.*, 2001; Jomaa *et al.*, 2005; Stranger-Jones *et al.*, 2006), se procedió a analizar, mediante Western Blot, los extractos de pared de los mutantes de *S. suis* deficientes en los genes *adcR*, *fur* y en ambos a la vez, utilizando el suero obtenido de los ratones supervivientes tras la infección con la cepa 89/1591 de *S. suis* (Fig 47). Los resultados mostraron que en todos los extractos de pared de los mutantes aparece un mayor número de bandas inmunogénicas que en el extracto de pared de la cepa salvaje. No obstante, en el mutante *adcR* (UA5000) aparecen más bandas inmunogénicas que en

el mutante *fur* (UA5001). Sin embargo, es en el doble mutante (UA5002) en el que se observa un mayor número de proteínas inmunogénicas (Fig. 47).

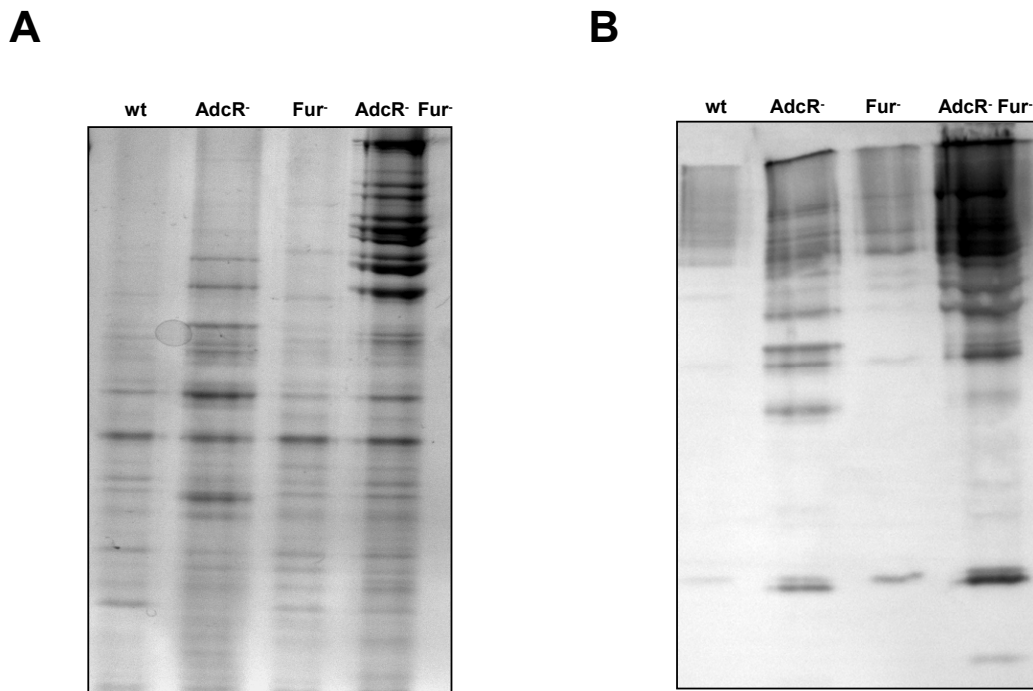


Fig. 47. (A) SDS-PAGE mostrando el perfil electroforético de los extractos de la pared de las cepas P1/7 (wt), UA5000 (AdcR⁻), UA5001 (Fur⁻) y UA5002 (AdcR⁻ y Fur⁻) de *S. suis*. (B) Western blot realizado con el suero de los ratones infectados con la cepa 89/1591 de *S. suis*. Los análisis se llevaron a cabo con los extractos de pared de las cepas P1/7 (wt), UA5000, UA5001 y UA5002 de *S. suis*.

Debido a que los tres mutantes analizados presentan un mayor número de proteínas inmunogénicas expuestas en la superficie celular que la cepa salvaje, se procedió a comprobar la capacidad de protección de los mutantes UA5000, UA5001 y UA5002. Además, ya que en las tres cepas se observó una importante atenuación de la virulencia (ver Apartado 4.4), se optó inicialmente por usar las células vivas como vacunas en el modelo animal de ratón. No obstante, cuando se realizó el enfrentamiento con 10^8 cfu/animal de la cepa virulenta 89/1591 de *S. suis*, prácticamente todos los ratones murieron, sin llegar a observarse diferencias significativas en ninguno de los grupos vacunados con las distintas cepas mutantes respecto al grupo control. Quizás, la ausencia de protección sea debida a una rápida eliminación de las bacterias mutantes debido a su menor virulencia. De hecho, en *S. suis* se ha descrito que los mutantes defectivos en la producción de polisacáridos capsulares son avirulentos, siendo

rápidamente eliminados de la circulación, mientras que la cepa salvaje persiste en sangre tras más de 48 h de infección (Charland *et al.*, 1998). Así pues, la rápida eliminación de las cepas mutantes impediría la producción de anticuerpos específicos contra la bacteria, hecho que podría explicar la ausencia de protección de los animales inoculados con las cepas mutantes atenuadas como vacuna al enfrentarlos con la cepa virulenta 89/1591.

4.5.3. Capacidad protectora de las proteínas asociadas a la pared celular del doble mutante *adcR fur*

Debido a que ni las células mutantes vivas ni los extractos de pared de los mutantes simples proporcionan un efecto protector significativo (datos no mostrados), junto con el hecho de que el extracto de la pared del doble mutante *adcR fur* (UA5002) es el que más proteínas inmunogénicas presenta, se procedió a estudiar su capacidad protectora en el modelo animal de ratón (Fig. 48).

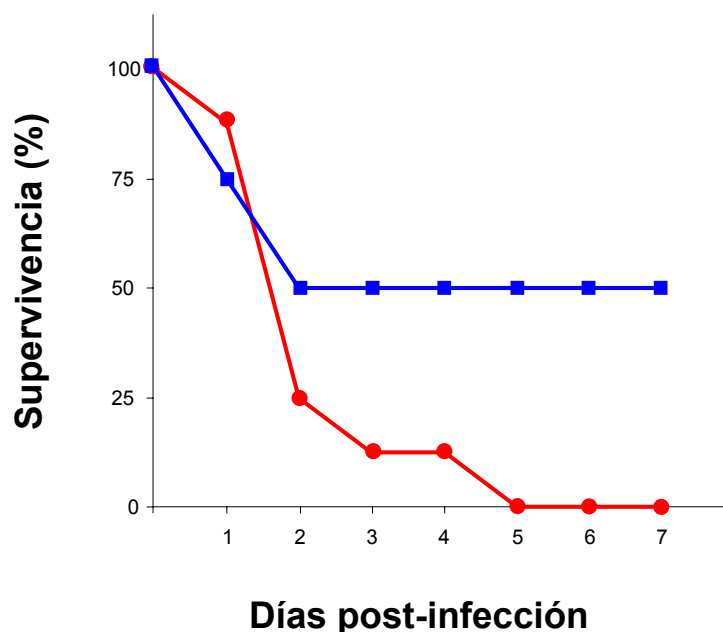


Fig. 48. Representación gráfica a lo largo del tiempo de la supervivencia de los ratones inoculados con extracto de pared de la cepa salvaje más adyuvante (●) o con extracto de pared de la cepa UA5002 más adyuvante (■). Después de la última inmunización, se realizó la infección con 10^8 cfu/animal de la cepa 89/1591 de *S. suis*, ($n = 8$ ratones por grupo).

Los resultados obtenidos mostraron que existe una protección parcial de los animales vacunados con el extracto de pared de la cepa UA5002 al enfrentarlos a 10^8 cfu/animal de la cepa virulenta 89/1591 de *S. suis*. De hecho, el 50% de los animales vacunados con el extracto de pared del doble mutante UA5002 sobrevivieron a la infección mientras que ninguno de los animales del grupo control (vacunados con el extracto de pared de la cepa salvaje P1/7) sobrevivió al enfrentamiento con la misma dosis de la cepa 89/1591 de *S. suis* ($P < 0,05$).

Como muestran los resultados obtenidos en este trabajo, los productos de los genes que se encuentran bajo el control de los reguladores de metales AdcR y Fur se encuentran sobreexpresados en los mutantes de *S. suis* deficientes en estos reguladores. Asimismo, se han descrito numerosos sistemas implicados en la captación de cationes divalentes que, además de ser inmunogénicos, confieren también capacidad protectora, tal y como se describe en este trabajo y en publicaciones anteriores (West *et al.*, 2001; Jomaa *et al.*, 2005; Stranger-Jones *et al.*, 2006). Como se comentó anteriormente, una de las aproximaciones utilizadas para el desarrollo de vacunas consiste en la utilización de células que expresan de forma constitutiva proteínas receptoras de cationes divalentes como el zinc y el hierro. Estudios recientes ponen de manifiesto que extractos de pared de mutantes defectivos en el gen *fur* de *P. multocida* confieren protección en el modelo animal de ratón (Garrido *et al.*, 2008). Paralelamente, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los extractos de los mutantes deficientes en los reguladores *adcR* y *fur* de *S. suis* también confieren protección en este modelo animal.

Cabe mencionar finalmente que no sólo los transportadores de cationes pueden ser los responsables de la protección proporcionada por el extracto de pared del doble mutante UA5002 (*AdcR⁻ Fur⁻*) de *S. suis*, ya que entre los genes regulados por el represor AdcR en *S. suis*, se encuentran los genes que codifican las proteínas Pht, que como se mencionó anteriormente, proporcionan protección frente a diversos tipos capsulares de pneumococos en el modelo animal de ratón (Adamou *et al.*, 2001). En concordancia con estos datos, y debido a su presencia en los extractos de pared de los mutantes *adcR* de *S. suis*, tal y como se ha demostrado en este trabajo, es más que probable que parte de la protección conferida por los extractos de pared del doble mutante sea debida a la presencia de estas proteínas.

En definitiva, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los extractos de pared de los mutantes defectivos en los genes *adcR* y *fur*, junto con determinados transportadores de cationes divalentes entre los que destaca la proteína periplásmica de unión al sustrato que forma parte de un transportador ABC implicado en el transporte de zinc y/o del manganeso (SsuiDRAFT 0103), pueden ser útiles para el desarrollo de vacunas eficaces contra un patógeno como *S. suis*, que causa grandes pérdidas económicas en la industria porcina.

5. CONCLUSIONES

A partir de los datos obtenidos en el presente trabajo, puede concluirse que en *Streptococcus suis*:

1. Los genes que forman parte de los transportadores ABC implicados en la captación de zinc y/o manganeso (*ssuiDRAFT 1240-1237* y *ssuiDRAFT 0103*) y de hierro (*ssuiDRAFT 0173-0176*), así como la expresión del transportador de hierro *feoAB* y los genes que codifican los reguladores AdcR y Fur, se inducen en presencia de 2,2'-dipiridil (DPD).
2. La secuencia de DNA reconocida por la proteína AdcR es TTAACNRGTTAA y la unión de dicha proteína a esta secuencia de DNA requiere cationes divalentes como el Zn^{2+} o el Mn^{2+} .
3. La proteína AdcR controla negativamente la expresión de sistemas implicados en el transporte de zinc y/o manganeso (*SsuiDRAFT 1240-1237* y *SsuiDRAFT 0103*), de proteínas relacionadas con los procesos invasivos (*Ssu0309*, *Ssu1103* y *Ssu1390*) y de una proteína ribosomal paróloga (*Ssu1352*).
4. Los genes que constituyen el operón *feoAB*, así como el propio gen *fur*, se encuentran bajo el control de la proteína Fur.
5. Mutaciones en los genes *adcR*, *fur* o en ambos al mismo tiempo, comportan una importante atenuación de la virulencia y, además, conllevan la sobreexpresión de proteínas inmunogénicas asociadas a la pared celular.
6. Ni las cepas mutantes vivas ni los extractos de pared de los mutantes simples (*adcR* y *fur*) confieren una protección significativa ante una infección de *S. suis* en el modelo animal de ratón.

7. Las proteínas periplásmicas relacionadas con el transporte de cationes divalentes SsuiDRAFT 0103, 0174 y 1237, así como varias proteínas asociadas a la pared celular de los mutantes en los genes *adcR* y *fur* son inmunogénicas.

8. La proteína SsuiDRAFT 0103, así como el extracto de pared del doble mutante *adcR fur*, confieren protección ante una infección con la cepa virulenta de *S. suis* 89/1591 en el modelo animal de ratón.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adamou, J. E., J. H. Heinrichs, A. L. Erwin, W. Walsh, T. Gayle, M. Dormitzer, R. Dagan, Y. A. Brewah, P. Barren, R. Lathigra, S. Langermann, S. Koenig, and S. Johnson. 2001. Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis. *Infection and immunity* **69**:949-958.

Agranoff, D., L. Collins, D. Kehres, T. Harrison, M. Maguire, and S. Krishna. 2005. The Nramp orthologue of *Cryptococcus neoformans* is a pH-dependent transporter of manganese, iron, cobalt and nickel. *The Biochemical journal* **385**:225-232.

Aisen, P. 1976. Iron metabolism. *Ciba Found. Symp.* **51**:1-17.

Albers, S. V., M. G. Elferink, R. L. Charlebois, C. W. Sensen, A. J. Driessen, and W. N. Konings. 1999. Glucose transport in the extremely thermoacidophilic *Sulfolobus solfataricus* involves a high-affinity membrane-integrated binding protein. *Journal of bacteriology* **181**:4285-4291.

Alonso, A., P. Sanchez, and J. L. Martinez. 2000. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**:1778-1782.

Althaus, E. W., C. E. Outten, K. E. Olson, H. Cao, and T. V. O'Halloran. 1999. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **38**:6559-6569.

Ames, G. F. 1986. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Annu Rev Biochem* **55**:397-425.

Anderson, J. E., P. F. Sparling, and C. N. Cornelissen. 1994. Gonococcal transferrin-binding protein 2 facilitates but is not essential for transferrin utilization. *Journal of bacteriology* **176**:3162-3170.

Anderson, O. S. 1978. Permeability properties of unmodified lipid bilayer membranes. In *membrane transport in Biology* (G. Giesbisch, D.C. Tosteson, H. H. Ussing, eds.). New York: Springer-Verlag **1**:346-446.

Andrews, S. C. 1998. Iron storage in bacteria. *Advances in microbial physiology* **40**:281-351.

Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews* **27**:215-237.

Anton, A., C. Grosse, J. Reissmann, T. Pribyl, and D. H. Nies. 1999. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *Journal of bacteriology* **181**:6876-6881.

Arceneaux, J. E., and B. R. Byers. 1980. Ferrisiderophore reductase activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of bacteriology* **141**:715-721.

Arends, J. P., and H. C. Zanen. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Reviews of infectious diseases* **10**:131-137.

Bates, C. S., C. Toukoki, M. N. Neely, and Z. Eichenbaum. 2005. Characterization of MtsR, a new metal regulator in group A streptococcus, involved in iron acquisition and virulence. *Infection and immunity* **73**:5743-5753.

Beachey, E. H. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *The Journal of infectious diseases* **143**:325-345.

Beard, S. J., R. Hashim, J. Membrillo-Hernandez, M. N. Hughes, and R. K. Poole. 1997. Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Molecular microbiology* **25**:883-891.

Beard, S. J., R. Hashim, G. Wu, M. R. Binet, M. N. Hughes, and R. K. Poole. 2000. Evidence for the transport of zinc(II) ions via the pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* **184**:231-235.

Beard, S. J., M. N. Hughes, and R. K. Poole. 1995. Inhibition of the cytochrome bd-terminated NADH oxidase system in *Escherichia coli* K-12 by divalent metal cations. *FEMS microbiology letters* **131**:205-210.

Bearden, S. W., and R. D. Perry. 1999. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Molecular microbiology* **32**:403-414.

Bender, K. S., H. C. Yen, C. L. Hemme, Z. Yang, Z. He, Q. He, J. Zhou, K. H. Huang, E. J. Alm, T. C. Hazen, A. P. Arkin, and J. D. Wall. 2007. Analysis of a ferric uptake regulator (Fur) mutant of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Appl Environ Microbiol* **73**:5389-5400.

Benkirane, R., M. G. Gottschalk, and J. D. Dubreuil. 1997. Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using western blotting. *FEMS microbiology letters* **153**:379-385.

Berish, S. A., S. Subbarao, C. Y. Chen, D. L. Trees, and S. A. Morse. 1993. Identification and cloning of a fur homolog from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and immunity* **61**:4599-4606.

Berry, A. M., and J. C. Paton. 1996. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* **64**:5255-5262.

Beveridge, T. J. 1999. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology* **181**:4725-4733.

- Beveridge, T. J., V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferreti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood.** 2000. Ultrastructure of Gram-positive cell walls. In *Gram-Positive Bacteria*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press: 3–10.
- Beveridge, T. J., and L. L. Graham.** 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **55**:684–705.
- Bigas, A., M. A. Garrido, I. Badiola, J. Barbe, and M. Llagostera.** 2006. Non-viability of *Haemophilus parasuis fur*-defective mutants. *Veterinary microbiology* **118**:107-116.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y)* **277**:1453-1474.
- Borgnia, M. J., and P. Agre.** 2001. Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:2888-2893.
- Bosch, M., R. Tarrago, M. E. Garrido, S. Campoy, A. R. Fernandez de Henestrosa, A. M. Perez de Rozas, I. Badiola, and J. Barbe.** 2001. Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS microbiology letters* **203**:35-40.
- Braun, V.** 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS microbiology reviews* **16**:295-307.
- Braun, V., K. Hantke, and W. Koster.** 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Metal ions in biological systems* **35**:67-145.
- Braun, V., and H. Killmann.** 1999. Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in biochemical sciences* **24**:104-109.
- Brenot, A., K. Y. King, and M. G. Caparon.** 2005. The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Molecular microbiology* **55**:221-234.
- Brenot, A., B. F. Weston, and M. G. Caparon.** 2007. A PerR-regulated metal transporter (PmtA) is an interface between oxidative stress and metal homeostasis in *Streptococcus pyogenes*. *Molecular microbiology* **63**:1185-1196.
- Briggs, H. L., N. Pul, R. Seshadri, M. J. Wilson, C. Tersteeg, K. E. Russell-Lodrigue, M. Andoh, A. J. Baumler, and J. E. Samuel.** 2008. Limited role for iron regulation in *Coxiella burnetii* pathogenesis. *Infection and immunity* **76**:2189-2201.

Brocklehurst, K. R., J. L. Hobman, B. Lawley, L. Blank, S. J. Marshall, N. L. Brown, and A. P. Morby. 1999. ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **31**:893-902.

Bsat, N., and J. D. Helmann. 1999. Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator in vitro and in vivo. *Journal of bacteriology* **181**:4299-4307.

Burnie, J., T. Carter, G. Rigg, S. Hodgetts, M. Donohoe, and R. Matthews. 2002. Identification of ABC transporters in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* as potential targets for antibody therapy. *FEMS immunology and medical microbiology* **33**:179-189.

Busenlehner, L. S., M. A. Pennella, and D. P. Giedroc. 2003. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS microbiology reviews* **27**:131-143.

Cain, D., F. Malouin, M. Dargis, J. Harel, and M. Gottschalk. 1995. Alterations in penicillin-binding proteins in strains of *Streptococcus suis* possessing moderate and high levels of resistance to penicillin. *FEMS microbiology letters* **130**:121-127.

Campoy, S., M. Jara, N. Busquets, A. M. de Rozas, I. Badiola, and J. Barbe. 2002a. Intracellular cyclic AMP concentration is decreased in *Salmonella typhimurium* fur mutants. *Microbiology (Reading, England)* **148**:1039-1048.

Campoy, S., M. Jara, N. Busquets, A. M. Perez De Rozas, I. Badiola, and J. Barbe. 2002b. Role of the high-affinity zinc uptake *znuABC* system in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence. *Infection and immunity* **70**:4721-4725.

Cantin, M., J. Harel, R. Higgins, and M. Gottschalk. 1992. Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Streptococcus suis* isolates. *J Vet Diagn Invest* **4**:170-174.

Cellier, M. F., I. Bergevin, E. Boyer, and E. Richer. 2001. Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. *Trends Genet* **17**:365-370.

Cervantes, C., A. E. Espino-Saldaña, F. Acevedo-Aguilar, I. L. León-Rodríguez, M. E. Rivera-Cano, M. Avila-Rodríguez, K. Wróbel-Kaczmarczyk, K. Wróbel-Zasada, J. K. Gutiérrez-Corona, J. S. Rodríguez-Zavala, and R. Moreno-Sánchez. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista latinoamericana de microbiología* **48**:203-210.

Cha, J. Y., J. S. Lee, J. I. Oh, J. W. Choi, and H. S. Baik. 2008. Functional analysis of the role of Fur in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528: Fur controls expression of genes involved in quorum-sensing. *Biochemical and biophysical research communications* **366**:281-287.

Chanter, N., P. W. Jones, and T. J. Alexander. 1993. Meningitis in pigs caused by *Streptococcus suis*--a speculative review. *Veterinary microbiology* **36**:39-55.

- Chao, T. C., J. Buhrmester, N. Hansmeier, A. Puhler, and S. Weidner.** 2005. Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. *Appl Environ Microbiol* **71**:5969-5982.
- Charland, N., J. Harel, M. Kobisch, S. Lacasse, and M. Gottschalk.** 1998. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiology (Reading, England)* **144 (Pt 2)**:325-332.
- Charland, N., M. Jacques, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 1997. Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 and 1/2. *Microbiology (Reading, England)* **143 (Pt 11)**:3607-3614.
- Charland, N., M. Kobisch, B. Martineau-Doize, M. Jacques, and M. Gottschalk.** 1996. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *FEMS immunology and medical microbiology* **14**:195-203.
- Chatellier, S., M. Gottschalk, R. Higgins, R. Brousseau, and J. Harel.** 1999. Relatedness of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from different geographic origins as evaluated by molecular fingerprinting and phenotyping. *Journal of clinical microbiology* **37**:362-366.
- Chatellier, S., J. Harel, Y. Zhang, M. Gottschalk, R. Higgins, L. A. Devriese, and R. Brousseau.** 1998. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by *16S rRNA* gene sequence comparison. **48**:581-589.
- Chen, C., J. Tang, W. Dong, C. Wang, Y. Feng, J. Wang, F. Zheng, X. Pan, D. Liu, M. Li, Y. Song, X. Zhu, H. Sun, T. Feng, Z. Guo, A. Ju, J. Ge, Y. Dong, W. Sun, Y. Jiang, J. Wang, J. Yan, H. Yang, X. Wang, G. F. Gao, R. Yang, J. Wang, and J. Yu.** 2007. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates. *PLoS ONE* **2**:e315.
- Chen, C. Y., S. A. Berish, S. A. Morse, and T. A. Mietzner.** 1993. The ferric iron-binding protein of pathogenic *Neisseria* spp. functions as a periplasmic transport protein in iron acquisition from human transferrin. *Molecular microbiology* **10**:311-318.
- Chen, C. Y., and S. A. Morse.** 2001. Identification and characterization of a high-affinity zinc uptake system in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS microbiology letters* **202**:67-71.
- Clancy, A., J. W. Loar, C. D. Speziali, M. Oberg, D. E. Heinrichs, and C. E. Rubens.** 2006. Evidence for siderophore-dependent iron acquisition in group B streptococcus. *Molecular microbiology* **59**:707-721.
- Claverys, J. P.** 2001. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Research in microbiology* **152**:231-243.

- Cornelissen, C. N., J. E. Anderson, I. C. Boulton, and P. F. Sparling.** 2000. Antigenic and sequence diversity in gonococcal transferrin-binding protein A. *Infection and immunity* **68**:4725-4735.
- Cornelissen, C. N., J. E. Anderson, and P. F. Sparling.** 1997a. Characterization of the diversity and the transferrin-binding domain of gonococcal transferrin-binding protein 2. *Infection and immunity* **65**:822-828.
- Cornelissen, C. N., J. E. Anderson, and P. F. Sparling.** 1997b. Energy-dependent changes in the gonococcal transferrin receptor. *Molecular microbiology* **26**:25-35.
- Cornelissen, C. N., and P. F. Sparling.** 1994. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Molecular microbiology* **14**:843-850.
- Coulter, S. N., W. R. Schwan, E. Y. Ng, M. H. Langhorne, H. D. Ritchie, S. Westbrook-Wadman, W. O. Hufnagle, K. R. Folger, A. S. Bayer, and C. K. Stover.** 1998. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Molecular microbiology* **30**:393-404.
- Courville, P., R. Chaloupka, F. Veyrier, and M. F. Cellier.** 2004. Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog. *The Journal of biological chemistry* **279**:3318-3326.
- Cox, C. D.** 1980. Iron reductases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **141**:199-204.
- Crosa, J. H.** 1997. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:319-336.
- Crosa, J. H., and C. T. Walsh.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:223-249.
- Culotta, V. C., M. Yang, and T. V. O'Halloran.** 2006. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et biophysica acta* **1763**:747-758.
- Cywes, C., and M. R. Wessels.** 2001. Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature* **414**:648-652.
- Dalet, K., E. Gouin, Y. Cenatiempo, P. Cossart, and Y. Hechard.** 1999. Characterisation of a new operon encoding a Zur-like protein and an associated ABC zinc permease in *Listeria monocytogenes*. *FEMS microbiology letters* **174**:111-116.
- Darwin, A. J., and V. L. Miller.** 1999. Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular microbiology* **32**:51-62.
- de Greeff, A., H. Buys, R. Verhaar, J. Dijkstra, L. van Alphen, and H. E. Smith.** 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and immunity* **70**:1319-1325.

- de Lorenzo, V., M. Herrero, F. Giovannini, and J. B. Neilands.** 1988. Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of fur gene in *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry / FEBS* **173**:537-546.
- de Moor, D. E.** 1963. Septicaemic infection in pigs caused by haemolytic streptococci of new Lancefield groups designated R,S, and T. *Antonie van Leeuwenhoek* **29**:272.
- del Campo Sepulveda, E. M., E. Altman, M. Kobisch, S. D'Allaire, and M. Gottschalk.** 1996. Detection of antibodies against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a purified capsular polysaccharide antigen-based indirect ELISA. *Veterinary microbiology* **52**:113-125.
- Delany, I., R. Rappuoli, and V. Scarlato.** 2004. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Molecular microbiology* **52**:1081-1090.
- Delany, I., G. Spohn, A. B. Pacheco, R. Ieva, C. Alaimo, R. Rappuoli, and V. Scarlato.** 2002. Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Molecular microbiology* **46**:1107-1122.
- Delhaize, E., T. Kataoka, D. M. Hebb, R. G. White, and P. R. Ryan.** 2003. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *The Plant cell* **15**:1131-1142.
- Ding, X., H. Zeng, N. Schiering, D. Ringe, and J. R. Murphy.** 1996. Identification of the primary metal ion-activation sites of the diphtheria *tox* repressor by X-ray crystallography and site-directed mutational analysis. *Nature structural biology* **3**:382-387.
- Dintilhac, A., G. Alloing, C. Granadel, and J. P. Claverys.** 1997. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Molecular microbiology* **25**:727-739.
- Dintilhac, A., and J. P. Claverys.** 1997. The *adc* locus, which affects competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, encodes an ABC transporter with a putative lipoprotein homologous to a family of streptococcal adhesins. *Research in microbiology* **148**:119-131.
- Dressler, C., U. Kues, D. H. Nies, and B. Friedrich.** 1991. Determinants Encoding Resistance to Several Heavy Metals in Newly Isolated Copper-Resistant Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **57**:3079-3085.
- Dubrac, S., and D. Touati.** 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *Journal of bacteriology* **182**:3802-3808.
- Eide, D., M. Broderius, J. Fett, and M. L. Guerinot.** 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:5624-5628.

Elkins, M. F., and C. F. Earhart. 1989. Nucleotide sequence and regulation of the *Escherichia coli* gene for ferrienterobactin transport protein FepB. *Journal of bacteriology* **171**:5443-5451.

Elliott, S. D. 1966. Streptococcal infection in young pigs. I. An immunochemical study of the causative agent (PM streptococcus). *The Journal of hygiene* **64**:205-212.

Elliott, S. D., and J. Y. Tai. 1978. The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*. *The Journal of experimental medicine* **148**:1699-1704.

Emsley, J. 1998. *The Elements*. Clarendon Press. Oxford **3rd ed.**

Endo, G., and S. Silver. 1995. CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Journal of bacteriology* **177**:4437-4441.

Ernst, J. F., and G. Winkelmann. 1977. Enzymatic release of iron from sideramines in fungi. NADH:sideramine oxidoreductase in *Neurospora crassa*. *Biochimica et biophysica acta* **500**:27-41.

Escobar, L., J. Perez-Martin, and V. de Lorenzo. 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of bacteriology* **181**:6223-6229.

Esgleas, M., Y. Li, M. A. Hancock, J. Harel, J. D. Dubreuil, and M. Gottschalk. 2008. Isolation and characterization of α -enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. *Microbiology (Reading, England)* **154**:2668-2679.

Facklam, R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical microbiology reviews* **15**:613-630.

Fath, M. J., and R. Kolter. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiological reviews* **57**:995-1017.

Fetherston, J. D., V. J. Bertolino, and R. D. Perry. 1999. YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. *Molecular microbiology* **32**:289-299.

Field, H. I., D. Buntan, and J. T. Done. 1954. Studies on piglet mortality. I. Streptococcal meningitis and arthritis. *Veterinary Record* **66**:454-455.

Finkelstein, A. 1984. Water movement through membrane channels. *Curr Top Membr Transp* **21**:295-308.

Fischer, E., B. Strehlow, D. Hartz, and V. Braun. 1990. Soluble and membrane-bound ferrisiderophore reductases of *Escherichia coli* K-12. *Arch Microbiol* **153**:329-336.

- Fischetti, V. A., V. Pancholi, and O. Schneewind.** 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Molecular microbiology* **4**:1603-1605.
- Fittipaldi, N., J. Harel, B. D'Amours, S. Lacouture, M. Kobisch, and M. Gottschalk.** 2007. Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic *Streptococcus suis* mutant as a live attenuated vaccine in swine. *Vaccine* **25**:3524-3535.
- Forman, S., M. J. Nagiec, J. Abney, R. D. Perry, and J. D. Fetherston.** 2007. Analysis of the aerobactin and ferric hydroxamate uptake systems of *Yersinia pestis*. *Microbiology (Reading, England)* **153**:2332-2341.
- Fuangthong, M., and J. D. Helmann.** 2003. Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **185**:6348-6357.
- Gaballa, A., and J. D. Helmann.** 1998. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **180**:5815-5821.
- Gaballa, A., and J. D. Helmann.** 2002. A peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **45**(4):997-1005.
- Gaines, C. G., J. S. Lodge, J. E. Arceneaux, and B. R. Byers.** 1981. Ferrisiderophore reductase activity associated with an aromatic biosynthetic enzyme complex in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **148**:527-533.
- Gaither, L. A., and D. J. Eide.** 2001. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals* **14**:251-270.
- Gaither, L. A., and D. J. Eide.** 2000. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *The Journal of biological chemistry* **275**:5560-5564.
- Galas, D. J., and A. Schmitz.** 1978. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic acids research* **5**:3157-3170.
- Garduno, R. A., E. Garduno, and P. S. Hoffman.** 1998. Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infection and immunity* **66**:4602-4610.
- Garmory, H. S., and R. W. Titball.** 2004. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infection and immunity* **72**:6757-6763.
- Garrido, M. A., M. Bosch, A. Bigas, I. Badiola, J. Barbe, and M. Llagostera.** 2008. Heterologous protective immunization elicited in mice by *Pasteurella multocida fur ompH*. *Int. Microbiol.* **11**:17-24.

Garrido, M. E., M. Bosch, R. Medina, A. Bigas, M. Llagostera, A. M. Perez De Rozas, I. Badiola, and J. Barbe. 2003a. fur-independent regulation of the *Pasteurella multocida hbpA* gene encoding a haemin-binding protein. *Microbiology (Reading, England)* **149**:2273-2281.

Garrido, M. E., M. Bosch, R. Medina, M. Llagostera, A. M. Perez de Rozas, I. Badiola, and J. Barbe. 2003b. The high-affinity zinc-uptake system znuACB is under control of the iron-uptake regulator (*fur*) gene in the animal pathogen *Pasteurella multocida*. *FEMS microbiology letters* **221**:31-37.

Genco, C. A., and D. W. Dixon. 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Molecular microbiology* **39**:1-11.

Gilbert, H. F. 1990. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **63**:69-172.

Gilmour, N. J., W. Donachie, A. D. Sutherland, J. S. Gilmour, G. E. Jones, and M. Quirie. 1991. Vaccine containing iron-regulated proteins of *Pasteurella haemolytica* A2 enhances protection against experimental pasteurellosis in lambs. *Vaccine* **9**:137-140.

Gilson, E., G. Alloing, T. Schmidt, J. P. Claverys, R. Dudler, and M. Hofnung. 1988. Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *The EMBO journal* **7**:3971-3974.

Gottschalk, M., R. Higgins, and S. Quessy. 1999. Dilemma of the virulence of *Streptococcus suis* strains. *Journal of clinical microbiology* **37**:4202-4203.

Gottschalk, M., A. Lebrun, M. Jacques, and R. Higgins. 1990. Hemagglutination properties of *Streptococcus suis*. *Journal of clinical microbiology* **28**:2156-2158.

Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, J. D. Dubreuil, H. Smith, and U. Vecht. 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* **62**:75-79.

Gottschalk, M., and M. Segura. 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Veterinary microbiology* **76**:259-272.

Gottschalk, M. G., S. Lacouture, and J. D. Dubreuil. 1995. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiology (Reading, England)* **141 (Pt 1)**:189-195.

Govoni, G., S. Vidal, M. Cellier, P. Lepage, D. Malo, and P. Gros. 1995. Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse Nramp1 gene in macrophages. *Genomics* **27**:9-19.

Grass, G. 2006. Iron transport in *Escherichia coli*: all has not been said and done. *Biometals* **19**:159-172.

Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, S. Franke, D. H. Nies, and C. Rensing. 2001. ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **183**:4664-4667.

Grass, G., S. Franke, N. Taudte, D. H. Nies, L. M. Kucharski, M. E. Maguire, and C. Rensing. 2005a. The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *Journal of bacteriology* **187**:1604-1611.

Grass, G., M. Otto, B. Fricke, C. J. Haney, C. Rensing, D. H. Nies, and D. Munkelt. 2005b. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* **183**:9-18.

Grass, G., M. D. Wong, B. P. Rosen, R. L. Smith, and C. Rensing. 2002. ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **184**:864-866.

Griffiths, E., and P. Williams. 1999. The iron-uptake systems of pathogenic bacteria, fungi and protozoa. In: Bullen JJ, Griffiths E, eds. *Iron and Infection. Molecular, Physiological and Clinical Aspects*, 2nd ed. Chichester, England: John Wiley and Sons:87-212.

Griggs, D. W., B. B. Tharp, and J. Konisky. 1987. Cloning and promoter identification of the iron-regulated *cir* gene of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **169**:5343-5352.

Groeger, W., and W. Köster. 1998. Transmembrane topology of the two FhuB domains representing the hydrophobic components of bacterial ABC transporters involved in the uptake of siderophores, haem and vitamin B12. *Microbiology (Reading, England)* **144 (Pt 10)**:2759-2769.

Grosse, C., A. Anton, T. Hoffmann, S. Franke, G. Schleuder, and D. H. Nies. 2004. Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*. *Archives of Microbiology* **182**:109-118.

Grosse, C., G. Grass, A. Anton, S. Franke, A. N. Santos, B. Lawley, N. L. Brown, and D. H. Nies. 1999. Transcriptional organization of the *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of bacteriology* **181**:2385-2393.

Grünberg, K., C. Wawer, B. M. Tebo, and D. Schuler. 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **67**:4573-4582.

Guffanti, A. A., Y. Wei, S. V. Rood, and T. A. Krulwich. 2002. An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K⁺ and H⁺. *Molecular microbiology* **45**:145-153.

Guyton. 1996. *Tratado de fisiología médica*. Interamericana McGraw Hill.

Hamza, I., R. Hassett, and M. R. O'Brian. 1999. Identification of a functional *fur* gene in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of bacteriology* **181**:5843-5846.

- Hantke, K.** 2001. Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals* **14**:239-249.
- Hantke, K.** 1982. Negative control of iron uptake systems in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* **15**:83–86.
- Hantke, K.** 1981. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* **182**:288-292.
- Harvie, D. R., S. Vilchez, J. R. Steggles, and D. J. Ellar.** 2005. *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology (Reading, England)* **151**:569-577.
- Hennequin, C., F. Porcheray, A. Waligora-Dupriet, A. Collignon, M. Barc, P. Bourlioux, and T. Karjalainen.** 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology (Reading, England)* **147**:87-96.
- Higgins, C. F.** 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology* **8**:67-113.
- Higgins, C. F.** 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **446**:749-757.
- Higgins, R., and M. Gottschalk.** 1999. Streptococcal diseases. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds), *Diseases of Swine*, Iowa State University Press. Ames.563-570.
- Higgins, R., M. Gottschalk, M. Boudreau, A. Lebrun, and J. Henrichsen.** 1995. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest* **7**:405-406.
- Hill, J. E., M. Gottschalk, R. Brousseau, J. Harel, S. M. Hemmingsen, and S. H. Goh.** 2005. Biochemical analysis, *cpn60* and *16S rDNA* sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Veterinary microbiology* **107**:63-69.
- Holm, L., C. Sander, H. Ruterjans, M. Schnarr, R. Fogh, R. Boelens, and R. Kaptein.** 1994. LexA repressor and iron uptake regulator from *Escherichia coli*: new members of the CAP-like DNA binding domain superfamily. *Protein engineering* **7**:1449-1453.
- Hommeze, J., L. A. Devriese, J. Henrichsen, and F. Castryck.** 1986. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Veterinary microbiology* **11**:349-355.
- Horsburgh, M. J., S. J. Wharton, M. Karavolos, and S. J. Foster.** 2002. Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends in microbiology* **10**:496-501.
- Huang, D. L., D. J. Tang, Q. Liao, H. C. Li, Q. Chen, Y. Q. He, J. X. Feng, B. L. Jiang, G. T. Lu, B. Chen, and J. L. Tang.** 2008. The Zur of *Xanthomonas campestris* functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters. *Nucleic acids research*.

- Janssen, R., T. van der Straaten, A. van Diepen, and J. T. van Dissel.** 2003. Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Microbes Infect* **5**:527-534.
- Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray.** 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews* **59**:171-200.
- Jacobs, A. A., P. L. Loeffen, A. J. van den Berg, and P. K. Storm.** 1994. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infection and immunity* **62**:1742-1748.
- Jacobs, A. A., A. J. van den Berg, and P. L. Loeffen.** 1996. Protection of experimentally infected pigs by suilysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *The Veterinary record* **139**:225-228.
- Jacobsen, I., J. Gerstenberger, A. D. Gruber, J. T. Bosse, P. R. Langford, I. Hennig-Pauka, J. Meens, and G. F. Gerlach.** 2005. Deletion of the ferric uptake regulator Fur impairs the in vitro growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and immunity* **73**:3740-3744.
- Jacques, M., M. Gottschalk, B. Foiry, and R. Higgins.** 1990. Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *Journal of bacteriology* **172**:2833-2838.
- Janulczyk, R., S. Ricci, and L. Bjorck.** 2003. MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity* **71**:2656-2664.
- Jensen, J., and C. A. van Dorssen.** 1951. Meningo-encephalitis bij vafkens door streptococcen. *Tijdschrift voor Diergeneeskund* **76**:815-832.
- Jobin, M. C., and D. Grenier.** 2003. Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS microbiology letters* **220**:113-119.
- Johnston, J. W., L. E. Myers, M. M. Ochs, W. H. Benjamin, Jr., D. E. Briles, and S. K. Hollingshead.** 2004. Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. *Infection and immunity* **72**:5858-5867.
- Jomaa, M., J. Yuste, J. C. Paton, C. Jones, G. Dougan, and J. S. Brown.** 2005. Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* **73**:6852-6859.
- Jones, R. N.** 2001. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest* **119**:397S-404S.
- Kadner, R. J.** 1990. Vitamin B12 transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes. *Molecular microbiology* **4**:2027-2033.

Kammler, M., C. Schon, and K. Hantke. 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **175**:6212-6219.

Karlyshev, A. V., P. C. Oyston, K. Williams, G. C. Clark, R. W. Titball, E. A. Winzeler, and B. W. Wren. 2001. Application of high-density array-based signature-tagged mutagenesis to discover novel *Yersinia* virulence-associated genes. *Infection and immunity* **69**:7810-7819.

Kataoka, Y., M. Haritani, M. Mori, M. Kishima, C. Sugimoto, M. Nakazawa, and K. Yamamoto. 1991. Experimental infections of mice and pigs with *Streptococcus suis* type 2. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* **53**:1043-1049.

Kauko, A., A. T. Pulliainen, S. Haataja, W. Meyer-Klaucke, J. Finne, and A. C. Papageorgiou. 2006. Iron incorporation in *Streptococcus suis* Dps-like peroxide resistance protein Dpr requires mobility in the ferroxidase center and leads to the formation of a ferrihydrite-like core. *Journal of molecular biology* **364**:97-109.

Kehres, D. G., M. L. Zaharik, B. B. Finlay, and M. E. Maguire. 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Molecular microbiology* **36**:1085-1100.

Kilpper-Balz, R., and K. Schleifer. 1987. *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* **37**:160-162.

King, S. J., A. G. Allen, D. J. Maskell, C. G. Dowson, and A. M. Whatmore. 2004. Distribution, genetic diversity, and variable expression of the gene encoding hyaluronate lyase within the *Streptococcus suis* population. *Journal of bacteriology* **186**:4740-4747.

Kitphati, W., P. Ngok-Ngam, S. Suwanmaneerat, R. Sukchawalit, and S. Mongkolsuk. 2007. *Agrobacterium tumefaciens fur* has important physiological roles in iron and manganese homeostasis, the oxidative stress response, and full virulence. *Appl Environ Microbiol* **73**:4760-4768.

Klebba, P. E., M. A. McIntosh, and J. B. Neilands. 1982. Kinetics of biosynthesis of iron-regulated membrane proteins in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **149**:880-888.

Kobayashi, N., K. Nishino, and A. Yamaguchi. 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **183**:5639-5644.

Korshunova, Y. O., D. Eide, W. G. Clark, M. L. Guerinot, and H. B. Pakrasi. 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant molecular biology* **40**:37-44.

Köster, W. 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in microbiology* **152**:291-301.

- Köster, W., and V. Braun.** 1990. Iron (III) hydroxamate transport into *Escherichia coli*. Substrate binding to the periplasmic FhuD protein. The Journal of biological chemistry **265**:21407-21410.
- Kurl, D. N., S. Haataja, and J. Finne.** 1989. Hemagglutination activities of group B, C, D, and G streptococci: demonstration of novel sugar-specific cell-binding activities in *Streptococcus suis*. Infection and immunity **57**:384-389.
- Laemmli, U. K.** 1970. Claveage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.
- Lancefield, R. C.** 1933. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. The Journal of experimental medicine **59**:441-158.
- Langford, P., A. E. Williams, and J. S. Kroll.** 1991. Superoxide dismutases of pathogenic and non-pathogenic *Streptococcus suis* type 2 isolates. FEMS microbiology letters **61**:347-350.
- Larsen, R. A., D. Foster-Hartnett, M. A. McIntosh, and K. Postle.** 1997. Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for in vivo physical interactions. Journal of bacteriology **179**:3213-3221.
- Laurent, T. C., and J. R. Fraser.** 1992. Hyaluronan. Faseb J **6**:2397-2404.
- Le Cam, E., D. Frechon, M. Barray, A. Fourcade, and E. Delain.** 1994. Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**:11816-11820.
- Lee, E. W., M. N. Huda, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya.** 2003a. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial agents and chemotherapy **47**:3733-3738.
- Lee, H. J., S. H. Bang, K. H. Lee, and S. J. Park.** 2007. Positive regulation of *fur* gene expression via direct interaction of fur in a pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*. Journal of bacteriology **189**:2629-2636.
- Lee, H. J., K. J. Park, A. Y. Lee, S. G. Park, B. C. Park, K. H. Lee, and S. J. Park.** 2003b. Regulation of *fur* expression by RpoS and fur in *Vibrio vulnificus*. Journal of bacteriology **185**:5891-5896.
- Lee, L. J., J. A. Barrett, and R. K. Poole.** 2005. Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. Journal of bacteriology **187**:1124-1134.
- Lee, Y. H., R. K. Deka, M. V. Norgard, J. D. Radolf, and C. A. Hasemann.** 1999. *Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone. Nature structural biology **6**:628-633.

Legatzki, A., S. Franke, S. Lucke, T. Hoffmann, A. Anton, D. Neumann, and D. H. Nies. 2003a. First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metal resistance in *Ralstonia metallidurans*. *Biodegradation* **14**:153-168.

Legatzki, A., G. Grass, A. Anton, C. Rensing, and D. H. Nies. 2003b. Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *Journal of bacteriology* **185**:4354-4361.

Létoffé, S., J. M. Ghigo, and C. Wandersman. 1994. Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:9876-9880.

Létoffé, S., F. Nato, M. E. Goldberg, and C. Wandersman. 1999. Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor HasR. *Molecular microbiology* **33**:546-555.

Lindsay, J. A., and S. J. Foster. 2001. Zur: a Zn(2+)-responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading, England)* **147**:1259-1266.

Linton, K. J., and C. F. Higgins. 1998. The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Molecular microbiology* **28**:5-13.

Liu, M., W. N. Tanaka, H. Zhu, G. Xie, D. M. Dooley, and B. Lei. 2008. Direct Hemin Transfer from IsdA to IsdC in the Iron-regulated Surface Determinant (Isd) Heme Acquisition System of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of biological chemistry* **283**:6668-6676.

Loo, C. Y., K. Mittrakul, I. B. Voss, C. V. Hughes, and N. Ganeshkumar. 2003. Involvement of the *adc* operon and manganese homeostasis in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *Journal of bacteriology* **185**:2887-2900.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**:265-275.

Lu, D., B. Boyd, and C. A. Lingwood. 1997. Identification of the key protein for zinc uptake in *Hemophilus influenzae*. *The Journal of biological chemistry* **272**:29033-29038.

Lun, Z. R., Q. P. Wang, X. G. Chen, A. X. Li, and X. Q. Zhu. 2007. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *The Lancet infectious diseases* **7**:201-209.

MacDiarmid, C. W., L. A. Gaither, and D. Eide. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **19**:2845-2855.

Maciag, A., E. Dainese, G. M. Rodriguez, A. Milano, R. Provvedi, M. R. Pasca, I. Smith, G. Palu, G. Riccardi, and R. Manganeli. 2007. Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *Journal of bacteriology* **189**:730-740.

- Makarova, K. S., V. A. Ponomarev, and E. V. Koonin.** 2001. Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins. *Genome biology* **2**:RESEARCH 0033.
- Makui, H., E. Roig, S. T. Cole, J. D. Helmann, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Molecular microbiology* **35**:1065-1078.
- Maresso, A. W., T. J. Chapa, and O. Schneewind.** 2006. Surface protein IsdC and Sortase B are required for heme-iron scavenging of *Bacillus anthracis*. *Journal of bacteriology* **188**:8145-8152.
- Masse, E., and S. Gottesman.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:4620-4625.
- Matthysse, A. G., H. A. Yarnall, and N. Young.** 1996. Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology* **178**:5302-5308.
- Mazmanian, S. K., G. Liu, E. R. Jensen, E. Lenoy, and O. Schneewind.** 2000. *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:5510-5515.
- Mazmanian, S. K., E. P. Skaar, A. H. Gaspar, M. Humayun, P. Gornicki, J. Jelenska, A. Joachmiak, D. M. Missiakas, and O. Schneewind.** 2003. Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science (New York, N.Y)* **299**:906-909.
- Mélançon, D., and D. Grenier.** 2003. Production and Properties of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances from the Swine Pathogen *Streptococcus suis* Serotype 2. *App Env Microb*:4482–4488.
- Mercer, J. F., N. Barnes, J. Stevenson, D. Strausak, and R. M. Llanos.** 2003. Copper-induced trafficking of the cU-ATPases: a key mechanism for copper homeostasis. *Biometals* **16**:175-184.
- Mergeay, M., D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles, and F. Van Gijsegem.** 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of bacteriology* **162**:328-334.
- Mey, A. R., E. E. Wyckoff, V. Kanukurthy, C. R. Fisher, and S. M. Payne.** 2005. Iron and *fur* regulation in *Vibrio cholerae* and the role of *fur* in virulence. *Infection and immunity* **73**:8167-8178.
- Miller, J. H.** 1991. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Modun, B., D. Kendall, and P. Williams.** 1994. Staphylococci express a receptor for human transferrin: identification of a 42-kilodalton cell wall transferrin-binding protein. *Infection and immunity* **62**:3850-3858.
- Moeck, G. S., and J. W. Coulton.** 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Molecular microbiology* **28**:675-681.
- Moeck, G. S., J. W. Coulton, and K. Postle.** 1997. Cell envelope signaling in *Escherichia coli*. Ligand binding to the ferrichrome-iron receptor fhua promotes interaction with the energy-transducing protein TonB. *The Journal of biological chemistry* **272**:28391-28397.
- Mongkolsuk, S., and J. D. Helmann.** 2002. Regulation of inducible peroxide stress responses. *Molecular microbiology* **45**:9-15.
- Moxon, E. R., and J. S. Kroll.** 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. **150**:65-85.
- Munkelt, D., G. Grass, and D. H. Nies.** 2004. The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins DmeF and FieF from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *Journal of bacteriology* **186**:8036-8043.
- Nachin, L., M. El Hassouni, L. Loiseau, D. Expert, and F. Barras.** 2001. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Molecular microbiology* **39**:960-972.
- Nies, D. H.** 1995. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **177**:2707-2712.
- Nies, D. H.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS microbiology reviews* **27**:313-339.
- Nies, D. H., and N. Brown.** 1998. Two-component systems in the regulation of heavy metal resistance. In: Silver S, Walden W (eds) *Metal ions in gene regulation*. Chapman Hall, London:77-103.
- Nies, D. H., and S. Silver.** 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of industrial microbiology* **14**:186-199.
- Niven, D. F., A. Ekins, and A. A. al-Samaurai.** 1999. Effects of iron and manganese availability on growth and production of superoxide dismutase by *Streptococcus suis*. *Can J Microbiol* **45**:1027-1032.
- Noll, M., and S. Lutsenko.** 2000. Expression of ZntA, a zinc-transporting P1-type ATPase, is specifically regulated by zinc and cadmium. *IUBMB life* **49**:297-302.

- Norton, P. M., C. Rolph, P. N. Ward, R. W. Bentley, and J. A. Leigh.** 1999. Epithelial invasion and cell lysis by virulent strains of *Streptococcus suis* is enhanced by the presence of suilysin. *FEMS immunology and medical microbiology* **26**:25-35.
- Nucifora, G., L. Chu, T. K. Misra, and S. Silver.** 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**:3544-3548.
- Nygaard, T. K., M. Liu, M. J. McClure, and B. Lei.** 2006. Identification and characterization of the heme-binding proteins SeShp and SeHtsA of *Streptococcus equi* subspecies equi. *BMC microbiology* **6**:82.
- Ochsner, U. A., Z. Johnson, and M. L. Vasil.** 2000. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)* **146 (Pt 1)**:185-198.
- Ohana, E., D. Segal, R. Palty, D. Ton-That, A. Moran, S. L. Sensi, J. H. Weiss, M. Hershinkel, and I. Sekler.** 2004. A sodium zinc exchange mechanism is mediating extrusion of zinc in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **279**:4278-4284.
- Okwumabua, O., O. Abdelmagid, and M. M. Chengappa.** 1999. Hybridization analysis of the gene encoding a hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis* type 2: evidence for the absence of the gene in some isolates. *FEMS microbiology letters* **181**:113-121.
- Osaki, M., D. Takamatsu, Y. Shimoji, and T. Sekizaki.** 2002. Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to sortase of gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* **184**:971-982.
- Outten, C. E., F. W. Outten, and T. V. O'Halloran.** 1999. DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **274**:37517-37524.
- Palmiter, R. D., and S. D. Findley.** 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *The EMBO journal* **14**:639-649.
- Palyada, K., D. Threadgill, and A. Stintzi.** 2004. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *Journal of bacteriology* **186**:4714-4729.
- Panina, E. M., A. A. Mironov, and M. S. Gelfand.** 2003. Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:9912-9917.
- Passalacqua, K. D., N. H. Bergman, J. Y. Lee, D. H. Sherman, and P. C. Hanna.** 2007. The global transcriptional responses of *Bacillus anthracis* Sterne (34F2) and a

Delta *sodAI* mutant to paraquat reveal metal ion homeostasis imbalances during endogenous superoxide stress. *Journal of bacteriology* **189**:3996-4013.

Patzer, S. I., and K. Hantke. 2000. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **275**:24321-24332.

Patzer, S. I., and K. Hantke. 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **28**:1199-1210.

Paulsen, I. T. 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Current opinion in microbiology* **6**:446-451.

Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological reviews* **60**:575-608.

Pecqueur, L., B. D'Autreaux, J. Dupuy, Y. Nicolet, L. Jacquamet, B. Brutscher, I. Michaud-Soret, and B. Bersch. 2006. Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *The Journal of biological chemistry* **281**:21286-21295.

Perch, B., K. B. Pedersen, and J. Henrichsen. 1983. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *Journal of clinical microbiology* **17**:993-996.

Piddock, L. J. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews* **19**:382-402.

Poch, M. T., and W. Johnson. 1993. Ferric reductases of *Legionella pneumophila*. *Biomaterials* **6**:107-114.

Pohl, E., R. K. Holmes, and W. G. Hol. 1999. Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *Journal of molecular biology* **285**:1145-1156.

Polissi, A., A. Pontiggia, G. Feger, M. Altieri, H. Mottl, L. Ferrari, and D. Simon. 1998. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity* **66**:5620-5629.

Portnoy, M. E., X. F. Liu, and V. C. Culotta. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Molecular and cellular biology* **20**:7893-7902.

Postle, K. 1999. Active transport by customized beta-barrels. *Nature structural biology* **6**:3-6.

Postle, K., and J. T. Skare. 1988. *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *J. Biol. Chem.* **263**:11000-11007.

- Poyart, C., G. Quesne, S. Coulon, P. Berche, and P. Trieu-Cuot.** 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *Journal of clinical microbiology* **36**:41-47.
- Pradel, E., N. Guiso, F. D. Menozzi, and C. Locht.** 2000. *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infection and immunity* **68**:1919-1927.
- Putman, M., H. W. van Veen, and W. N. Konings.** 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:672-693.
- Que, Q., and J. D. Helmann.** 2000. Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Molecular microbiology* **35**:1454-1468.
- Ratledge, C., and L. G. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual review of microbiology* **54**:881-941.
- Reams, R. Y., D. D. Harrington, L. T. Glickman, H. L. Thacker, and T. L. Bowersock.** 1996. Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *J Vet Diagn Invest* **8**:119-121.
- Reed, L. J., and H. Muench.** 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**:493-497.
- Reid, S. D., A. G. Montgomery, J. M. Voyich, F. R. DeLeo, B. Lei, R. M. Ireland, N. M. Green, M. Liu, S. Lukomski, and J. M. Musser.** 2003. Characterization of an extracellular virulence factor made by group A *Streptococcus* with homology to the *Listeria monocytogenes* internalin family of proteins. *Infection and immunity* **71**:7043-7052.
- Rensing, C., B. Mitra, and B. P. Rosen.** 1997a. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:14326-14331.
- Rensing, C., T. Pribyl, and D. H. Nies.** 1997b. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *Journal of bacteriology* **179**:6871-6879.
- Reynolds, P. R., G. P. Mottur, and C. Bradbeer.** 1980. Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*. Some observations on the roles of the gene products of BtuC and TonB. *The Journal of biological chemistry* **255**:4313-4319.
- Rogers, E. E., D. J. Eide, and M. L. Guerinot.** 2000. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:12356-12360.
- Rogers, H. J.** 1970. Bacterial growth and the cell envelope. *Bacteriological reviews* **34**:194-214.
- Rosenberg, H., R. G. Gerdes, and K. Chegwiddden.** 1977. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **131**:505-511.

- Rosinha, G. M., D. A. Freitas, A. Miyoshi, V. Azevedo, E. Campos, S. L. Cravero, O. Rossetti, G. Splitter, and S. C. Oliveira.** 2002. Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. *Infection and immunity* **70**:5036-5044.
- Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer, and J. Reizer.** 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Molecular microbiology* **11**:841-847.
- Saito, T., M. R. Wormald, and R. J. Williams.** 1991. Some structural features of the iron-uptake regulation protein. *European journal of biochemistry / FEBS* **197**:29-38.
- Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning; a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sandford, S. E., and R. Higgins.** 1992. Streptococcal diseases. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ, eds. *Diseases of Swine*. Ames: Iowa State University Press:588-560.
- Schneewind, O., P. Model, and V. A. Fischetti.** 1992. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell* **70**:267-281.
- Schneider, R., and K. Hantke.** 1993. Iron-hydroxamate uptake systems in *Bacillus subtilis*: identification of a lipoprotein as part of a binding protein-dependent transport system. *Molecular microbiology* **8**:111-121.
- Schottmüller, H.** 1903. Die Artunterscheidung der für Menschen pathogenen Streptokokken auf Blutagar. *Münch Med Wchnschr* **50**:848–853 909-812.
- Segers, R. P., T. Kenter, L. A. de Haan, and A. A. Jacobs.** 1998. Characterisation of the gene encoding suilysin from *Streptococcus suis* and expression in field strains. *FEMS microbiology letters* **167**:255-261.
- Segura, M., and M. Gottschalk.** 2004. Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. *Front Biosci* **9**:1157-1188.
- Serhir, B., D. Dubreuil, R. Higgins, and M. Jacques.** 1995. Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from *Streptococcus suis* capsular type 2. *Journal of bacteriology* **177**:3830-3836.
- Shigekawa, K., and W. J. Dower.** 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* **6**:742-751.
- Shin, J. H., S. Y. Oh, S. J. Kim, and J. H. Roe.** 2007. The zinc-responsive regulator Zur controls a zinc uptake system and some ribosomal proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of bacteriology* **189**:4070-4077.

- Silver, S., T. K. Misra, and R. A. Laddaga.** 1989. Bacterial resistance to toxic heavy metals. In T. J. Beveridge and R. J. Doyle (ed.), *Metal ions and bacteria*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.: 121–139.
- Simpson, R. J., and T. J. Peters.** 1990. Forms of soluble iron in mouse stomach and duodenal lumen: significance for mucosal uptake. *The British journal of nutrition* **63**:79-89.
- Skaar, E. P., M. Humayun, T. Bae, K. L. DeBord, and O. Schneewind.** 2004. Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science (New York, N.Y)* **305**:1626-1628.
- Smith, H. E., U. Vecht, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, Y. Biermann, and M. A. Smits.** 1996. Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infection and immunity* **64**:4409-4412.
- Solioz, M., A. Odermatt, and R. Krapf.** 1994. Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man. *FEBS letters* **346**:44-47.
- St Geme, J. W., and D. Cutter.** 1996. Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. *Molecular microbiology* **21**:21-31.
- Staats, J. J., I. Feder, O. Okwumabua, and M. M. Chengappa.** 1997. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun* **21**:381-407.
- Staudenmaier, H., B. Van Hove, Z. Yaraghi, and V. Braun.** 1989. Nucleotide sequences of the *fecBCDE* genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(III) dicitrate in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **171**:2626-2633.
- Stevens, J. B., R. A. Carter, H. Hussain, K. C. Carson, M. J. Dilworth, and A. W. Johnston.** 1999. The *fhu* genes of *Rhizobium leguminosarum*, specifying siderophore uptake proteins: *fhuDCB* are adjacent to a pseudogene version of *fhuA*. *Microbiology (Reading, England)* **145 (Pt 3)**:593-601.
- Stoebner, J. A., and S. M. Payne.** 1988. Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity* **56**:2891-2895.
- Stojiljkovic, I., A. J. Baumler, and K. Hantke.** 1994. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a fur titration assay. *Journal of molecular biology* **236**:531-545.
- Stojiljkovic, I., and K. Hantke.** 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet* **247**:199-205.
- Stranger-Jones, Y. K., T. Bae, and O. Schneewind.** 2006. Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:16942-16947.

Sun, Y., M. D. Wong, and B. P. Rosen. 2001. Role of cysteinyl residues in sensing Pb(II), Cd(II), and Zn(II) by the plasmid pI258 CadC repressor. *The Journal of biological chemistry* **276**:14955-14960.

Sutcliffe, I. C., and R. R. Russell. 1995. Lipoproteins of gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* **177**:1123-1128.

Tai, S. S., C. Yu, and J. K. Lee. 2003. A solute binding protein of *Streptococcus pneumoniae* iron transport. *FEMS microbiology letters* **220**:303-308.

Takamatsu, D., M. Osaki, and T. Sekizaki. 2001a. Evidence for lateral transfer of the SuiIysin gene region of *Streptococcus suis*. *Journal of bacteriology* **184**:2050-2057.

Takamatsu, D., M. Osaki, and T. Sekizaki. 2001b. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* **46**:140-148.

Tamura, G. S., A. Nittayajarn, and D. L. Schoentag. 2002. A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. *Infection and immunity* **70**:2877-2885.

Tanabe, M., H. S. Atkins, D. N. Harland, S. J. Elvin, A. J. Stagg, O. Mirza, R. W. Titball, B. Byrne, and K. A. Brown. 2006. The ABC transporter protein OppA provides protection against experimental *Yersinia pestis* infection. *Infection and immunity* **74**:3687-3691.

Tang, D. J., X. J. Li, Y. Q. He, J. X. Feng, B. Chen, and J. L. Tang. 2005. The zinc uptake regulator Zur is essential for the full virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**:652-658.

Tartoff, K. D., and C. A. Hobbs. 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res Lab Focus* **9**:12.

Tavares, F., and A. Sellstedt. 2000. A simple, rapid and non-destructive procedure to extract cell wall-associated proteins from *Frankia*. *J Microbiol Methods* **39**:171-178.

Taylor, J. M., and D. E. Heinrichs. 2002. Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Molecular microbiology* **43**:1603-1614.

Tikkanen, K., S. Haataja, and J. Finne. 1996. The galactosyl-(alpha 1-4)-galactose-binding adhesin of *Streptococcus suis*: occurrence in strains of different hemagglutination activities and induction of opsonic antibodies. *Infection and immunity* **64**:3659-3665.

Timmerman, M. M., and J. P. Woods. 1999. Ferric reduction is a potential iron acquisition mechanism for *Histoplasma capsulatum*. *Infection and immunity* **67**:6403-6408.

Touati, D. 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**:1-6.

- Touati, D.** 1988. Transcriptional and posttranscriptional regulation of manganese superoxide dismutase biosynthesis in *Escherichia coli*, studied with operon and protein fusions. *Journal of bacteriology* **170**:2511-2520.
- Tsai, K. J., K. P. Yoon, and A. R. Lynn.** 1992. ATP-dependent cadmium transport by the *cadA* cadmium resistance determinant in everted membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **174**:116-121.
- Tsolis, R. M., A. J. Baumler, F. Heffron, and I. Stojiljkovic.** 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infection and immunity* **64**:4549-4556.
- Tsuge, K., Y. Ohata, and M. Shoda.** 2001. Gene *yerP*, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**:3566-3573.
- Valério, R. F., and T. J. Beveridge.** 2005. Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Molecular microbiology*.
- Vallee, B. L., and K. H. Falchuk.** 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews* **73**:79-118.
- van der Lelie, D., T. Schwuchow, U. Schwidetzky, S. Wuertz, W. Baeyens, M. Mergeay, and D. H. Nies.** 1997. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. *Molecular microbiology* **23**:493-503.
- Vanechoutte, M., P. Kampfer, T. De Baere, E. Falsen, and G. Verschraegen.** 2004. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.* 1990) comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **54**:317-327.
- Vanier, G., M. Segura, P. Friedl, S. Lacouture, and M. Gottschalk.** 2004. Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and immunity* **72**:1441-1449.
- Vasil, M. L., and U. A. Ochsner.** 1999. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Molecular microbiology* **34**:399-413.
- Vecht, U., H. J. Wisselink, M. L. Jellema, and H. E. Smith.** 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infection and immunity* **59**:3156-3162.
- Venturi, V., P. Weisbeek, and M. Koster.** 1995. Gene regulation of siderophore-mediated iron acquisition in *Pseudomonas*: not only the Fur repressor. *Molecular microbiology* **17**:603-610.
- Walter, A., and J. Gutknecht.** 1986. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *Membr Biol* **90**:207-217.

- Weber, M., E. Harada, C. Vess, E. Roepenack-Lahaye, and S. Clemens.** 2004. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J* **37**:269-281.
- Weinberg, E. D.** 2000. Microbial pathogens with impaired ability to acquire host iron. *Biometals* **13**:85-89.
- West, D., K. Reddin, M. Matheson, R. Heath, S. Funnell, M. Hudson, A. Robinson, and A. Gorringe.** 2001. Recombinant *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein A protects against experimental meningococcal infection. *Infection and immunity* **69**:1561-1567.
- Williams, A. E., and W. F. Blakemore.** 1990. Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *The Journal of infectious diseases* **162**:474-481.
- Windsor, R. S., and S. D. Elliott.** 1975. Streptococcal infection in young pigs. IV. An outbreak of streptococcal meningitis in weaned pigs. *The Journal of hygiene* **75**:69-78.
- Wisselink, H. J., U. Vecht, N. Stockhofe-Zurwieden, and H. E. Smith.** 2001. Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *The Veterinary record* **148**:473-477.
- Wollert, T., D. W. Heinz, and W. D. Schubert.** 2007. Thermodynamically reengineering the listerial invasion complex InlA/E-cadherin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:13960-13965.
- Wyckoff, E. E., A. M. Valle, S. L. Smith, and S. M. Payne.** 1999. A multifunctional ATP-binding cassette transporter system from *Vibrio cholerae* transports vibriobactin and enterobactin. *Journal of bacteriology* **181**:7588-7596.
- Xiong, A., and R. K. Jayaswal.** 1998. Molecular characterization of a chromosomal determinant conferring resistance to zinc and cobalt ions in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* **180**:4024-4029.
- Xu, C., and B. P. Rosen.** 1999. Metalloregulation of soft metal resistance pumps. In B. Sarkar (ed.), *Metals and genetics*. Plenum Press, New York, N.Y.:5-19.
- Yang, W., Y. Liu, L. Chen, T. Gao, B. Hu, D. Zhang, and F. Liu.** 2007. Zinc uptake regulator (*zur*) gene involved in zinc homeostasis and virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Current microbiology* **54**:307-314.
- Young, J., and I. B. Holland.** 1999. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochimica et biophysica acta* **1461**:177-200.
- Yu, H., H. Jing, Z. Chen, H. Zheng, X. Zhu, H. Wang, S. Wang, L. Liu, R. Zu, L. Luo, N. Xiang, H. Liu, X. Liu, Y. Shu, S. S. Lee, S. K. Chuang, Y. Wang, J. Xu, and W. Yang.** 2006. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerging infectious diseases* **12**:914-920.

Zgurskaya, H. I. 2002. Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* **292**:95-105.

Zhao, H., and D. Eide. 1996. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:2454-2458.

Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider, and G. Storz. 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *Journal of bacteriology* **181**:4639-4643.

7. AGRADECIMIENTOS

En la realización de este trabajo han participado, de una manera u otra, muchas personas a las que, a pesar de que voy a ser breve, les estoy profundamente agradecido.

Para comenzar, dar las gracias a todos los integrantes del *Departament de Genètica i Microbiologia* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, especialmente a los profesores Jordi Barbé y Montserrat Llagostera por haber dirigido este trabajo y, sobretodo, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, donde he trabajado durante los últimos años con grandes compañeros.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo del Prof. Marcelo Gottschalk, al que agradezco haberme permitido trabajar en su laboratorio. También me gustaría agradecer la inestimable ayuda de Nahuel Fittipaldi, así como la asistencia brindada por toda la gente del GREMIP de la *Université de Montréal*, especialmente a Verena y a Maricruz.

Sin duda, lo mejor de estos años ha sido toda la gente que he conocido. No puedo olvidarme de ninguno de los que son o han sido compañeros del laboratorio y con los que tanto tiempo he compartido. Así pues, quiero dar las gracias, en primer lugar a M^a Elena, por haberme iniciado en este trabajo y por todo el tiempo que le ha dedicado. En segundo lugar, a la plantilla actual: Anna B. y Laura T., por sus broncas diarias para conmigo; Susana E., por estar siempre dispuesta a ~~fumar~~ ayudar; Carlota, por ser una pequeña gran persona; Pilar, por todas las RTs; Susana C., por iniciarme en el mundo de los fagos; Laura M., porque cuando va a Elche nadie duerme; Luisa, Fernanda, Julieth y Natalia, por sorprenderme con la gastronomía colombiana; Andrea, por ser una gran anfitriona; Joan, por perderse en un 24 h; Gerard A., por ser el nuevo α tras mi corta ausencia; Spricigo, por estar siempre pesquisando y Marc P., por ser un gran bioinformático. Finalmente, a todos los que ya se fueron (del laboratorio): Vanessa, Marc A., Neus, Jordi C., Núria, Isabel, Mirle, Noelia, Gerard M., Sonia, Anna H. y Mónica, con una mención especial a mi amigo José (de Trujillo), una gran persona; y recordar también a los que estuvieron de paso: Eliane, Andrés, Raúl, Sara, Ornella, Fadi, David, Cris, Òscar y Montse. Muchas gracias a todos.

Agradecimientos

Tampoco quiero olvidarme de los laboratorios 3 y 4, ni de las secretarias, y agradecer la ayuda del DARP (Montserrat Saco) y la colaboración de los servicios de Proteómica (Sílvia Bronsoms), Genómica (Anna Barceló) y de toda la gente del Estabulario.

Por último, aunque no por ello menos importante, agradecer todo el apoyo recibido de mis amigos (por interrumpirme constantemente durante la redacción de este trabajo) y, sobretodo, de toda mi familia, especialmente a mis padres, al jefe Martín, al Dr. Santiago Aranda, a la mamá Montse y a mi sobrinita Lucía.

8. ANEXO

Artículos:

- 1) Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions.**

- 2) Immunogenic and protective capacities of cell-wall associated proteins of *Streptococcus suis* mutants deficient in divalent-cation-uptake regulators.**

Analysis of the Protective Capacity of Three *Streptococcus suis* Proteins Induced under Divalent-Cation-Limited Conditions[∇]

Jesús Aranda,¹ Maria Elena Garrido,^{1,2} Pilar Cortés,^{1,3} Montserrat Llagostera,^{1,2} and Jordi Barbé^{1,2*}

Department de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain¹; Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain²; and Servei d'Anàlisi i d'Aplicacions Microbiològiques, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain³

Received 19 July 2007/Returned for modification 3 October 2007/Accepted 2 January 2008

Streptococcus suis is a gram-positive pathogen that causes serious diseases in pigs and, in some cases, humans. Three genes of the virulent *S. suis* 89/1591 strain, encoding putative divalent-cation-binding lipoproteins, were isolated based on information obtained from the draft annotation files of this organism's genome. The products of these genes, which are inducible by divalent-cation deprivation, were subsequently purified, and their immunogenic and protective abilities were analyzed. All three proteins (SsuiDRAFT 0103, SsuiDRAFT 0174, and SsuiDRAFT 1237) were found to be immunogenic, but only one of them (SsuiDRAFT 0103) induced a significant protective response (87.5%, $P = 0.01$) against the same *S. suis* strain. Furthermore, the *S. suis* ssuiDRAFT 1240 gene (*adCR*), which encodes a predicted regulator of Zn^{2+} and/or Mn^{2+} uptake in streptococci, was cloned, and its protein product was purified. Electrophoretic mobility shift assays with purified *S. suis* AdcR protein showed experimentally, for the first time, that the AdcR DNA-binding sequence corresponds to the TTAACNRGTAA motif. In addition, a requirement for either Zn^{2+} or Mn^{2+} , but not Fe^{2+} , to establish in vitro binding of AdcR to its target sequence and the ability of AdcR to bind the ssuiDRAFT 0103 and ssuiDRAFT 1237 gene promoters but not the promoter of the ssuiDRAFT 0174 gene were demonstrated. Taken together, these data suggest that SsuiDRAFT 0103 is a good candidate for vaccines against *S. suis* and support preliminary results indicating that bacterial envelope proteins involved in the uptake of divalent cations other than iron may be useful for protective purposes.

Streptococcus suis is a significant gram-positive bacterium that causes important pathogenic entities, such as meningitis, septicemia, sudden death, and pneumonia, mainly in swine (30). Humans may also be infected by *S. suis*, usually after they have direct and extended contact with either infected or healthy carrier animals (1). To date, 35 different serotypes of *S. suis* have been described based on this bacterium's polysaccharide capsular antigen (21). Of these, serotype 2 has been shown to be the serotype most frequently involved in infectious diseases caused by *S. suis* (30). While several approaches to develop either live or recombinant vaccines to prevent *S. suis*-mediated disease have been tested (14, 30), putative protective strategies must still involve a wide range of weapons against this bacterium.

ATP-binding cassette (ABC) transporters are widespread in living organisms and comprise one of the largest protein families. In bacterial cells, these transporters import a variety of allocrites, including metal ions (9, 17). ABC transporters are multicomponent systems consisting of two membrane-inserted subunits, two components inside the cytoplasm that carry the ATP-binding site, and the substrate-specific binding protein located outside the cytoplasm (3, 11). In gram-negative bacteria, the binding protein is a soluble periplasmic protein. In gram-positive bacteria and archaea, it is a lipoprotein with a

characteristic N-terminal lipid anchored to the cytoplasmic membrane. This lipoprotein is the ABC transporter component that is most exposed outside the cell surface (20, 31).

ABC transporters related to divalent-cation uptake have been shown to be involved in the virulence of many gram-negative and gram-positive bacteria (19, 22). Furthermore, several components of these ABC systems present in the cell wall, especially molecules such as lipoproteins, have immunogenic properties against the bacterial species from which they are derived (10, 23). For this reason, it has been suggested that these molecules have putative protective abilities (17), and this has been confirmed in some bacterial species, such as *Yersinia pestis* (34).

The entire genome of the *S. suis* 89/1591 virulent strain belonging to serotype 2 has been sequenced, and annotation of the sequence is near completion. Taking advantage of this fact, we searched the *S. suis* draft annotation database for genes encoding putative components of predicted divalent-cation-binding ABC transporters to analyze the immunogenicity and protective properties of these proteins, as well as the regulatory mechanism behind their expression.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains DH5 α and BL21-CodonPlus(DE3)-RIL were grown in Luria-Bertani medium (26). When necessary, ampicillin (50 μ g/ml), chloramphenicol (34 μ g/ml), and 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Roche) were added to the growth media. *S. suis* strain 89/1591 was grown in Todd-Hewitt (TH) (Difco) medium supplemented with 2% yeast extract (Difco). All cultures were incubated at 37°C, and agitation was used for *E. coli* but not for *S. suis*. The divalent-cation chelator

* Corresponding author. Mailing address: Department de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain. Phone: 34-93-581 1837. Fax: 34-93-581 2387. E-mail: jordi.barbe@uab.cat.

[∇] Published ahead of print on 22 January 2008.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant features	Source
<i>Streptococcus suis</i> 89/1591	Virulent and capsulated serotype 2 strain	GREMIP ^a
<i>Escherichia coli</i> strains		
DH5 α	<i>supE4</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Clontech
BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	B ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (r _B m _B ⁻) <i>dam</i> ⁺ Tc ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> The [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Cam ^r]	Stratagene
Plasmids		
pGEM-T	PCR cloning vector; Ap ^r	Promega
pET15b	His ₆ tag expression vector; Ap ^r	Novagen

^a GREMIP, Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Université de Montréal (Canada).

2,2'-dipyridyl (DPD) (Sigma) was added at a final concentration of 150 μ M to TH broth 30 min before inoculation of *S. suis* cells. DNA extraction, cloning, transformation, and other molecular techniques used in this work were carried out as previously described (29).

Cloning, protein purification, and Western blot analysis. The *S. suis* proteins used in this work were selected based on their predicted functions in the draft annotation database for this organism (<http://genome.ornl.gov/microbial/ssui/>) and were expressed and purified as follows. DNA fragments containing genes encoding the desired proteins were amplified from purified chromosomal DNA of *S. suis* strain 89/1591 by PCR using the primers listed in Table 2. To facilitate restriction enzyme digestion of the PCR products, PCR primers were designed with one to five extra nucleotides at their 5' ends adjacent to the recognition site for the corresponding enzymes. Purified PCR products were then enzymatically digested with the corresponding restriction enzymes, cloned into the appropriate restriction sites in the polylinker of the pET15b expression vector, and transformed into *E. coli* DH5 α cells. Recombinant plasmids were predicted to express an N-terminal His₆-tagged fusion protein, and correct in-frame fusions of the protein genes in pET15b were confirmed by sequencing plasmid DNA with the T7 Promoter and T7 Terminator primers (Macrogen Sequencing Service). Recombinant plasmids were then used to transform strain BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.

An overnight culture of each resulting BL21-CodonPlus(DE3)-RIL strain was diluted (1/20) in 10 ml of Luria-Bertani medium and incubated at 37°C until the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was 0.6. Expression of the fusion proteins was induced at this time by addition of IPTG to a final concentration of 1 mM. After incubation for an additional 3 h at 37°C, the cells were collected by centrifugation at 8,000 \times g for 10 min and resuspended in 1 ml of equilibration/wash buffer (50 mM sodium phosphate, 300 mM sodium chloride; pH 7) containing Complete Mini protease inhibitor cocktail (Roche). The cell suspensions were then lysed by sonication on ice for 5 min at 50 W by using a Braun LabsonicU (Braun Biotech International). Unbroken cells and debris were removed by centrifugation at 7,000 \times g for 10 min. Each supernatant was subsequently mixed with 700 μ l of BD TALON resin (Clontech) that had been previously equilibrated with 5 resin volumes of equilibration/wash buffer. Mixing was carried out by agitating the preparation for 20 min at room temperature, after which the resin was washed twice with 10 volumes of equilibration/wash buffer. Proteins were eluted with 1 ml of elution buffer (50 mM sodium phosphate, 300 mM sodium chloride, 10 mM imidazole). Finally, the purified proteins were dialyzed against 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) to remove the imidazole and then visualized by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (24).

Both the crude extracts of *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL cells overexpressing the proteins of interest and the purified proteins were visualized by Coomassie blue staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. The antigenicity of the proteins was analyzed by Western blotting as described previously (18).

Mobility shift assays and DNase I footprinting. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed as previously described (6), with slight modifications. Briefly, DNA promoters were PCR amplified from *S. suis* genomic DNA using suitable oligonucleotide primers (Table 2), and the purified PCR fragments

were cloned into the pGEM-T vector. The presence of the desired promoter was confirmed by sequencing the plasmid DNA using the M13F-pUC(-40) and M13R-pUC(-40) primers of the pGEM-T vector. DNA probes were prepared by PCR amplification with one of the primers labeled with digoxigenin (DIG) at its 5' end and were purified. DNA-protein reaction mixtures (20 μ l) containing 25 ng of a DIG-labeled DNA probe and either 0 or 10 μ g of purified *S. suis* AdcR protein were incubated in EMSA buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8], 50 mM KCl, 5% [vol/vol] glycerol, 1 μ g bulk carrier sperm salmon DNA, 0.5 mM 1,4-dithiothreitol, 0.1 mg bovine serum albumin per ml) for 10 min at room temperature.

To determine whether AdcR binding was divalent cation dependent, 5 \times EMSA buffer was supplemented with EDTA at a final concentration of 1 mM in the presence or absence of either Zn₂SO₄, Mn₂SO₄, or Fe₂SO₄ (each at a final concentration of 1 mM). DNA-protein complexes were visualized by separation on a 5% nondenaturing polyacrylamide gel (40 mM Tris-acetate) at 150 V for 1.5 h and then transferred to a Biodine B nylon membrane (Pall Gelman Laboratory). DIG-labeled DNA-protein complexes were detected using the manufacturer's protocol (Roche). DNase I footprinting assays were carried out using an ALF sequencer (Amersham Biosciences) as described previously (7).

RNA techniques. RNA was isolated as described previously (15), with slight modifications. Briefly, 10-ml *S. suis* cultures in the mid-exponential growth phase (OD₆₀₀, 0.6) were collected by centrifugation at 8,000 \times g for 10 min. The cells were then resuspended by vigorous vortexing at 37°C for 10 min in 300 μ l of prelysis buffer containing 10 mg of lysozyme per ml. Total RNA was extracted by using an RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. DNA contamination was removed from the RNA during purification by treatment with RNase-free DNase (Qiagen), followed by digestion with DNase Turbo (Ambion). The concentration and integrity of the RNA were determined by measuring the OD₂₆₀ and by 1% agarose gel electrophoresis, respectively. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) assays were performed using a Titan One Tube RT-PCR system (Roche) by following the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR analysis of gene expression either in the presence or in the absence of the divalent-cation-chelating agent DPD was performed for all genes as reported previously (8); specific internal oligonucleotide primers were used for each gene (Table 2). In all cases, the absence of DNA in RNA samples was tested by performing PCR without RT.

Serum preparation and protection assays. Female BALB/cAnNHsd mice (3 weeks old) obtained from Harlan Iberica (Barcelona, Spain) were used for serum preparation and protection assays. All animals were quarantined for 1 week. A maximum of four animals per cage were housed under specific-pathogen-free conditions at 19 to 21°C with an artificial cycle consisting of 12 h of light and 12 h of darkness; the relative humidity was 50 to 60%. Antibiotic-free pelleted food and autoclaved water were provided ad libitum during the experiments. The animals were monitored daily for morbidity and mortality. All animal experiments were approved by the Universitat Autònoma de Barcelona Animal Ethics Committee.

Purified and dialyzed SsuiDRAFT 0103, SsuiDRAFT 0174, and SsuiDRAFT 1237 proteins were resuspended in 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) and quantified by the Lowry method using bovine serum albumin as a protein standard. To prepare the vaccines, 10 μ g of each protein per dose was adsorbed with Imject alum adjuvant (aluminum hydroxide; Pierce) according to the manufacturer's protocol.

To obtain serum for Western blot assays, six 4-week-old female BALB/cAnNHsd mice were inoculated with 0.1 ml of a TH broth suspension containing the 50% lethal dose (LD₅₀) (2.9 \times 10⁶ CFU/animal) of strain *S. suis* 89/1591 (2) or 0.1 ml of TH broth alone as a negative control. Animals that survived until 30 days postinoculation were anesthetized with ketamine/xylazine. Blood was collected by cardiac puncture, incubated at 37°C for 2 h to facilitate clot formation, and then centrifuged at 300 \times g for 10 min. Serum was recovered and stored at -20°C for Western blot assays.

For protection assays, three groups of eight female 4-week-old BALB/cAnNHsd mice were inoculated intraperitoneally with 0.1 ml of SsuiDRAFT 0103, SsuiDRAFT 0174, or SsuiDRAFT 1237 protein. Two additional groups of eight mice each inoculated with 0.1 ml of either 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) or the same solution with Imject alum adjuvant as negative controls. After 2 weeks, a second immunization was carried out, followed 3 weeks later by a challenge consisting of intraperitoneal injection of 0.1 ml of a suspension containing 20 LD₅₀s of the *S. suis* 89/1591 strain in TH broth supplemented with 10% inactivated bovine serum. The survival of the mice was subsequently monitored for 21 days.

Statistical analysis. Fisher's exact test was used to analyze the statistical significance of the lethal challenge data.

TABLE 2. Primers used in this study

Primer	Sequence ^a	Position	Application
adcR.up.NdeI	5'- <u>ACTGACATATG</u> CCATGAATCGTATTGTATTAG	1 ^b	Upper primer for cloning <i>S. suis</i> ssuiDRAFT 1240 (<i>adcR</i>) gene
adcR.rv.BamHI	5'- <u>AGGGATCC</u> ATCTCATCTATTTTCTAATC	464 ^b	Lower primer for cloning <i>S. suis</i> ssuiDRAFT 1240 (<i>adcR</i>) gene
103.up.NdeI	5'- <u>ACTGACATATG</u> TAAAGAAAAGTGATAAGAGGC	1 ^b	Upper primer for cloning <i>S. suis</i> ssuiDRAFT 103 gene
103.rv.XhoI	5'- <u>ACTGCTCGAG</u> ATTTTATTTAACTCTTGAGC	934 ^b	Lower primer for cloning <i>S. suis</i> ssuiDRAFT 103 gene
174.up.NdeI	5'- <u>ACTGACATATG</u> AAAAAGTTTTAGCTATTTTAA GTTTATTG	1 ^b	Upper primer for cloning <i>S. suis</i> ssuiDRAFT 174 gene
174.dw.BamHI	5'- <u>AGGGATCCG</u> TCCCTTTTACTGAAGTTTTTGAATT TCTG	945 ^b	Lower primer for cloning <i>S. suis</i> ssuiDRAFT 174 gene
1237.up.NdeI	5'- <u>ACTGACATATG</u> AAAAAGTTGGTTTATTATT CTTG	1 ^b	Upper primer for cloning <i>S. suis</i> ssuiDRAFT 1237 gene
1237.dw.XhoI	5'- <u>ACTGCTCGAG</u> CCAGTCTTACTCTCTTAGTG AGCC	1540 ^b	Lower primer for cloning <i>S. suis</i> ssuiDRAFT 1237 gene
AdcR50.2rv	5'-GTTCTACCTTATTGTTTCGTC	-146 ^b	Upper primer to obtain EMSA probes
Ret1240.50	5'-ATCTCGTCAGGTACTTC	50 ^b	Lower primer to obtain EMSA probes
AdcR50.1	5'-TTAACTTGTAAAGTATACCAC	-17 ^b	Lower primer to obtain EMSA probes
AdcR50.1rv	5'-TTAAAAGGTTAAGGGATGC	-16 ^b	Upper primer to obtain EMSA probes
AdcRmutWT ^c	5'-TTCTATGGGTAACTTAAACAAGTTAA	-43 ^b	Upper primer to obtain EMSA probes
P103.up	5'-TCACTAATCACCTTTGCG	-322 ^b	Upper primer to obtain EMSA probes
P103.dw	5'-CGAGCAAGCTGCTAAAAC	66 ^b	Lower primer to obtain EMSA probes
103.up	5'-GCTTCGACAAATTTACCGTGAC	359 ^b	Upper primer for real-time quantitative RT-PCR assay
103.dw	5'-TAAGAGAAGGCTGTATGTTGAGTGAC	610 ^b	Lower primer for real-time quantitative RT-PCR assay
173.up	5'-TCACAACCTGCCAACCAAGAA	70 ^b	Upper primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
173.dw	5'-GCCATCGCAATCCAAAAC	326 ^b	Lower primer for real-time quantitative RT-PCR assay
174.up	5'-CAATTGACAAACGGCAGATACAGAAGC	280 ^b	Upper primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
174.dw	5'-GCAAAACCGAGAGCGGATAGATTA	644 ^b	Lower primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
175.up	5'-TATCATCATCGGCTCATCCTT	630 ^b	Upper primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
175.dw	5'-GAACGGCAAACCAATCTACCC	929 ^b	Lower primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
176.up	5'-TTTCGAGCATGCTGTCTGGTAT	476 ^b	Upper primer for real-time quantitative RT-PCR assay
176.dw	5'-GGTAATCCGCTTTCACG	729 ^b	Lower primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
1237.up	5'-CATAGTGGGGAGAGGCATAG	385 ^b	Upper primer for real-time quantitative RT-PCR assay
1237.dw	5'-ATCTTCATCCGACGCAACAC	690 ^b	Lower primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
1238.up	5'-TTGACGAGGATACGGCATTGTT	482 ^b	Upper primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
1238.dw	5'-GCACTCGCTGGGGTTTCTG	746 ^b	Lower primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
1239.up	5'-AAGGTTGGTTTCGCTGTTTGA	311 ^b	Upper primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
1239.dw	5'-GTCCCTGCATCCATCCCTGTTGTC	515 ^b	Lower primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
1240.up	5'-GATTTGGTTGGTCTTGTGTC	78 ^b	Upper primer for real-time quantitative RT-PCR and RT-PCR assays
1240.dw	5'-GTATGCGCGTGATGATGAG	350 ^b	Lower primer for real-time quantitative RT-PCR assay
cys.up	5'-GGTAACACTGGTATCGGTTCTG	217 ^b	Upper primer for real-time quantitative RT-PCR assay
cys.dw	5'-CCTGTCTGTTGTATCTTCGTC	478 ^b	Lower primer for real-time quantitative RT-PCR assay
M13F-Puc(-40)	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC	-111 ^c	Upper primer for sequencing pGEM-T vector; labeled at 5' end with DIG to obtain EMSA probes
M13R-pUC(-40)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC	126 ^c	Lower primer for sequencing pGEM-T vector; labeled at 5' end with DIG to obtain EMSA probes
T7 Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG	-153 ^d	Upper primer for sequencing the pET15b vector
T7 Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG	74 ^d	Lower primer for sequencing the pET15b vector

^a Restriction endonuclease recognition sites are underlined. Extra nucleotides added at the 5' end to allow digestion of PCR products directly are indicated by bold type.

^b Position of the 5' end of the oligonucleotide with respect to the translational start point of the corresponding gene.

^c Position of the 5' end of the oligonucleotide with respect to the multiple-cloning site in the cloning vector.

^d Position of the 5' end of the oligonucleotide with respect to the NdeI restriction site in the expression vector.

^e Primers AdcRmut1 to AdcRmut14 (not shown) are derivatives of AdcRmutWT but have the desired nucleotide changes shown in Fig. 4B.

RESULTS

Organization and transcriptional analysis of genes encoding predicted divalent-cation-related ABC transporter components in *S. suis*. Three open reading frames (ORFs), whose products have been annotated as putative divalent-cation-binding lipoproteins (SsuiDRAFT 0103, SsuiDRAFT 0174, and SsuiDRAFT 1237) (Fig. 1A), are listed in the draft genome annotation database for the *S. suis* 89-1591 strain (<http://genome.ornl.gov/microbial/ssui/>). BLASTP analysis corroborated that the predicted products of these ORFs exhibit between 43 and 70% identity to zinc-binding (SsuiDRAFT 0103 and SsuiDRAFT 1237) or iron-binding (SsuiDRAFT 0174) streptococcal lipoproteins. Further study of the DNA surrounding sequences of these three ORFs by TBLASTN analysis established the putative genetic organization of the DNA regions (Fig. 1B and 1C). The hypothetical arrangements were confirmed by RT-PCR, which showed that a single transcriptional unit consisted of ORFs ssuiDRAFT 1240 to ssuiDRAFT

1237 (Fig. 1B) and that transcription of ORFs ssuiDRAFT 0173 to ssuiDRAFT 0176 yielded a single mRNA (Fig. 1C). In contrast, ORF ssuiDRAFT 0103 seems to be physically isolated since no ORF was detected immediately upstream or downstream of it in the contig. It should also be noted that TBLASTN analyses showed that the structures of the *S. suis* DNA regions containing either ORF ssuiDRAFT 0174 or ORF ssuiDRAFT 1237, as well as the transcriptional organization of ssuiDRAFT 0103 as a monocistronic unit, are preserved in other streptococcal species, such as *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* (data not shown). In fact, the protein products of ORFs ssuiDRAFT 1240, ssuiDRAFT 1239, ssuiDRAFT 1238, and ssuiDRAFT 1237 have high degrees of identity (52, 77, 82, and 70%, respectively) with the protein products encoded by *Streptococcus pneumoniae* *adcR*, *adcC*, *adcB*, and *adcA*, all of which are involved in Zn²⁺ and/or Mn²⁺ uptake in that organism and in *Streptococcus gordonii* (12, 25). Furthermore, these genes have been shown to be

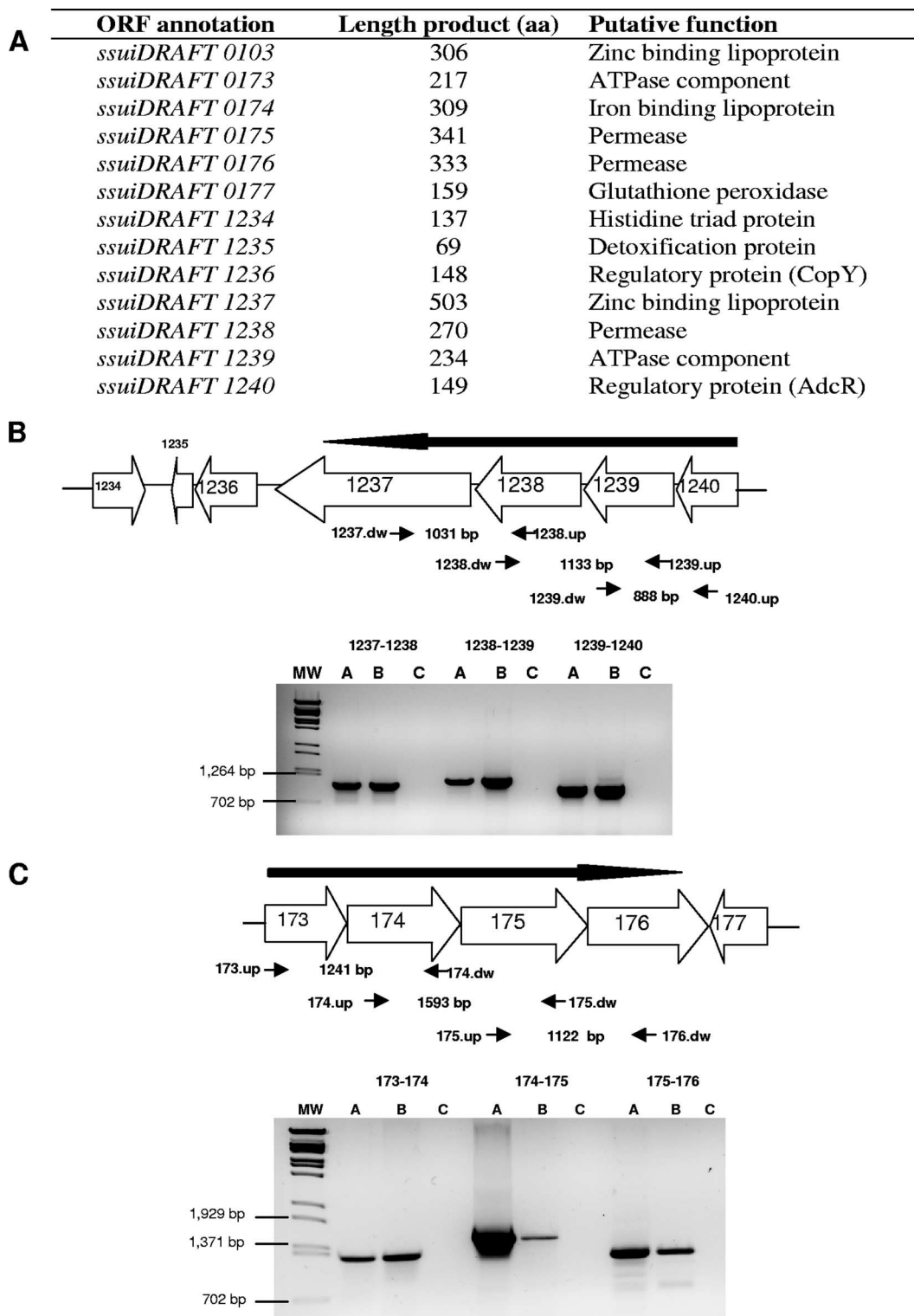


FIG. 1. (A) ORFs of the *S. suis* 89/1591 genome whose products have been predicted to be involved in divalent-cation uptake according to the provisional annotation of the genome of this organism. The lengths of the gene products (in amino acids [aa]) and the putative functions of the genes are also indicated. (B and C) Genetic organization, as determined by RT-PCR analysis of RNA, of *S. suis* 89/1591 chromosomal regions containing *ssuiDRAFT 1237* (B) and *ssuiDRAFT 0174* ORFs (C). The large filled arrows indicate the putative transcriptional units that have been tested. The primer sets used for the RT-PCR analyses are indicated by small arrows. RT-PCRs were carried out in the presence of total RNA (lanes A), in the presence of DNA (lanes B), or in the absence of both RNA and DNA (lanes C). *BstEII*-digested λ DNA was used as molecular size marker (lane MW).

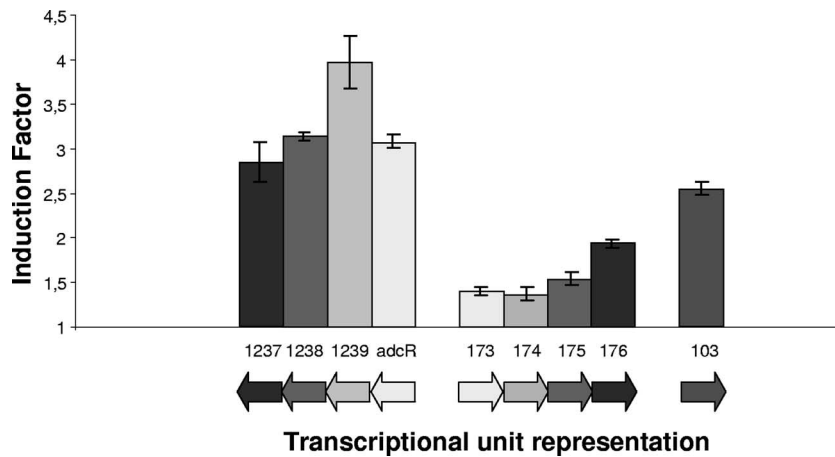


FIG. 2. DPD-mediated induction of several *S. suis* 89/1591 ORFs in the transcriptional units that include the ssuiDRAFT 0103, ssuiDRAFT 0174, and ssuiDRAFT 1237 ORFs. The induction factor is the ratio of the mRNA concentration of a gene from cells treated with DPD (150 μ M) to the mRNA concentration of the gene from cells not treated with DPD. RNA was extracted from DPD-treated and nontreated cultures at an OD₆₀₀ of 0.6. The amount of mRNA of each gene was determined by using a standard curve generated by amplification of an internal fragment of the *S. suis* ssuiDRAFT 0855 ORF encoding the cysteine synthase enzyme, whose expression is not sensitive to divalent-cation deprivation. The results are the means of two independent experiments (each carried out in duplicate); the standard deviations are indicated by error bars.

required for transformation competence of *S. pneumoniae* and biofilm formation by *S. gordonii* (12, 25). It is also noteworthy that transcriptional units containing ORFs ssuiDRAFT 0103, ssuiDRAFT 0174, and ssuiDRAFT 1237 are inducible in the presence of DPD, as would be expected if all three ORFs belong to the divalent-cation uptake systems of *S. suis* (Fig. 2).

AdcR protein controls ssuiDRAFT 0103 and ssuiDRAFT 1237 transcriptional units. As shown in Fig. 1B, ssuiDRAFT 1240 (homologous to the *adcR* gene of the streptococci) is the first gene in the transcriptional unit containing ORF ssuiDRAFT 1237. The product of the *adcR* gene is a repressor that controls the uptake of Zn²⁺ and/or Mn²⁺ in several gram-positive bacteria (9, 13, 25). Although an in silico comparison of sequences predicted a putative AdcR-binding motif (28), to our knowledge there is no experimental evidence effectively demonstrating the DNA recognition sequence of AdcR. For this reason, the *S. suis* AdcR protein was purified, and its ability to bind the promoter region of its own encoding transcriptional unit was analyzed by EMSA using a DNA fragment extending from position 50 to position -146 (with respect to the predicted translational starting point) as a probe (Fig. 3A). The EMSA results showed that the AdcR protein specifically binds to the promoter of its gene (Fig. 3B) and that the presence of either Zn²⁺ or Mn²⁺ is required for the specific binding of AdcR in vitro (Fig. 3C), whereas addition of Fe²⁺ did not promote DNA-protein complex formation (data not shown).

A footprinting experiment with the same DNA fragment that was used for the EMSA revealed that a core region consisting of 24 nucleotides was protected by AdcR binding (Fig. 4A). It is also worth noting that inside the AdcR-protected core region, one exact copy (TTAACAAGTTAA) and another very similar copy (TTAAAAGGTTAA) of the in silico-predicted AdcR-binding sequence (TTAACYRGTTAA) were found at positions -28 and -16, respectively. Analysis of the role of each of these two motifs in AdcR binding showed that the presence of the first motif (at position -28) is absolutely necessary for AdcR binding, whereas the second motif (at

position -16) is dispensable (data not shown). Single substitutions of each of the nucleotides of the first motif (AdcR box) provided a more precise identification of the AdcR-binding sequence as TTAACNRGTTAA. In addition, insertion of a

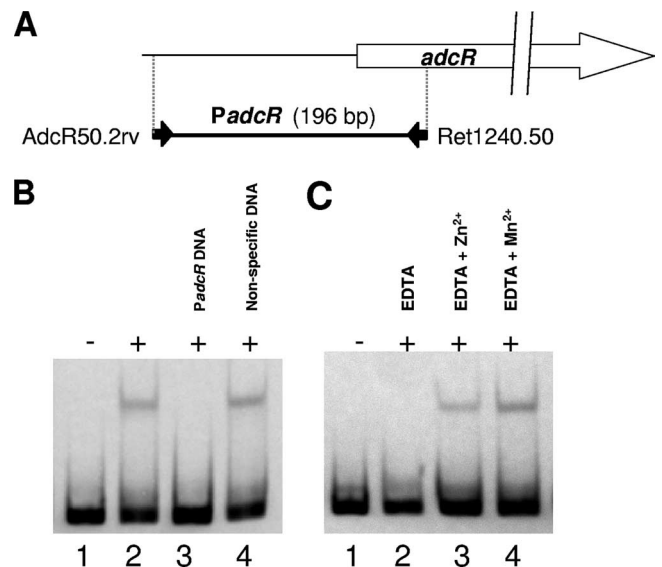


FIG. 3. (A) Schematic diagram of the *adcR* gene with its promoter region (*PadcR*). The small arrows indicate the primer pair used to amplify the promoter in EMSA experiments. (B) Electrophoretic mobility of the DNA fragments containing the *S. suis* *adcR* promoter in the absence (lane 1) or in the presence (lane 2) of purified *S. suis* AdcR. The effects of a 300-fold molar excess of unlabeled *S. suis* *adcR* promoter (lane 3) or pGEM-T plasmid DNA (lane 4) on the migration of the *S. suis* *adcR* promoter in the presence of purified AdcR are also shown. (C) Effects of EDTA addition (1 mM) on the AdcR-binding capacity in the absence of exogenous divalent cation (lane 2) or in the presence of either 1 mM Zn²⁺ (lane 3) or 1 mM Mn²⁺ (lane 4). As a control, the mobility of the same promoter without AdcR is also shown (lane 1).

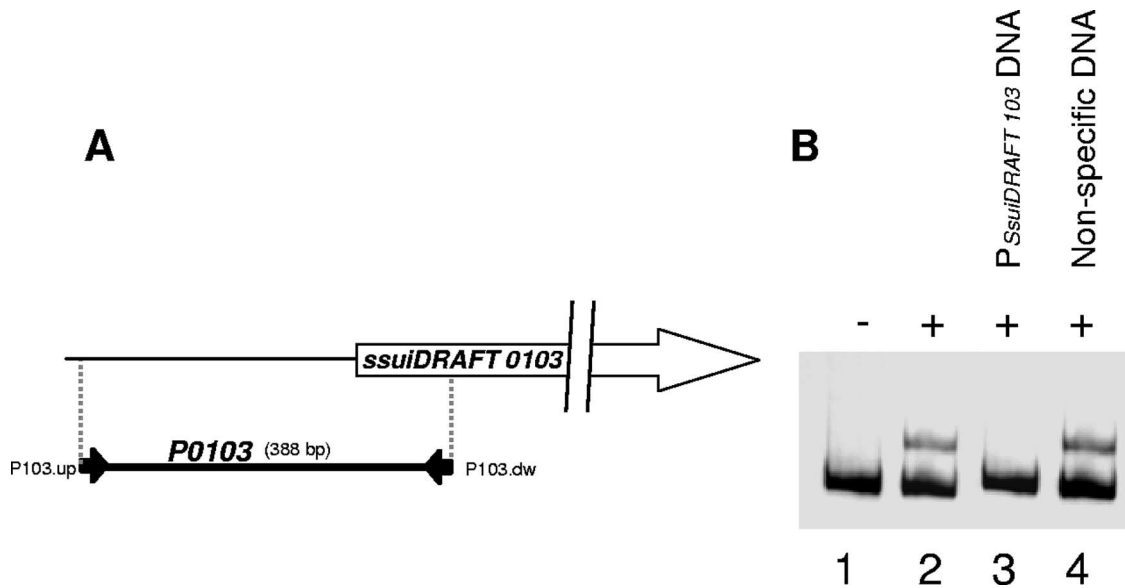


FIG. 5. (A) Schematic diagram of the *ssuiDRAFT 0103* gene with its promoter region (*P0103*). The small arrows indicate the primer pair used to amplify the promoter in EMSA experiments. (B) Electrophoretic mobility of the DNA fragment containing the *S. suis* *ssuiDRAFT 0103* promoter in the absence (lane 1) or in the presence (lane 2) of purified *S. suis* AdcR. The effects of a 300-fold molar excess of unlabeled *S. suis* *ssuiDRAFT 0103* promoter (lane 3) and pGEM-T plasmid DNA (lane 4) on the migration of the *S. suis* *ssuiDRAFT 0103* promoter in the presence of purified AdcR are also shown.

of bacterial species. The first of these regulators to be described was the *E. coli* Zur protein (zinc uptake regulator), which is widespread in gammaproteobacteria and alphaproteobacteria (28). A second Zn^{2+} uptake regulator is that of the *Bacillus* group and is also called Zur (16). The third and most recently recognized Zn^{2+} regulator to be described is AdcR, which is present in *Streptococcus* (28).

In this work, after searching the draft annotation database of the *S. suis* 89/1591 strain genome, we identified three genes (*ssuiDRAFT 0103*, *ssuiDRAFT 0174*, and *ssuiDRAFT 1237*) encoding putative components of divalent-cation uptake-related ABC transporters. The ORF belonging to the transcrip-

tional unit containing one of these three genes and encoding AdcR was identified. This protein had been demonstrated previously to be an in vivo repressor controlling the genes involved in Zn^{2+} and/or Mn^{2+} incorporation in streptococci (9, 13, 25), and a putative recognition motif was proposed following in silico analysis (28). Data reported here effectively demonstrated, for the first time, not only that the in silico-predicted motif (TTAACYRGTTAA) is very similar to the in vitro func-

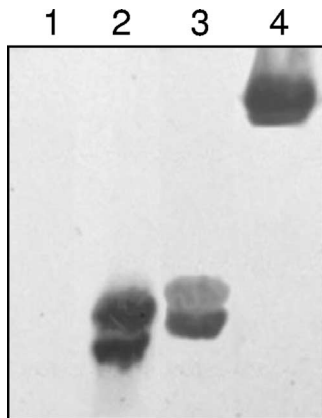


FIG. 6. Western blot analysis with serum recovered from mice infected with the *S. suis* 89/1591 strain. The analysis was carried out with crude extracts from *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL cells containing the pET15b vector either alone as a negative control (lane 1) or overexpressing the *SsuiDRAFT 0103* (lane 2), *SsuiDRAFT 0174* (lane 3), and *SsuiDRAFT 1237* (lane 4) proteins.

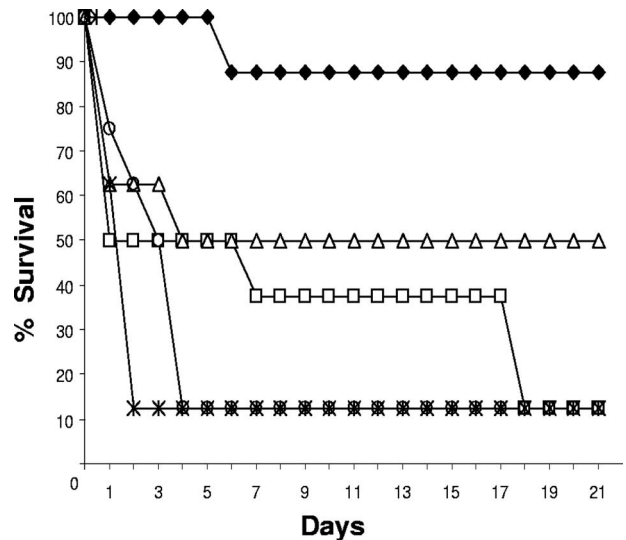


FIG. 7. Survival curves for mice inoculated with solvent (*) or solvent with adjuvant (○) and vaccinated with purified *SsuiDRAFT 103* (◆), *SsuiDRAFT 174* (□), or *SsuiDRAFT 1237* (△) protein (eight mice per group). After the last immunization, the mice were challenged intraperitoneally with an amount of wild-type *S. suis* 89/1591 cells equivalent to 20 LD₅₀s of this bacterial strain.

tional binding sequence (TTAACNRGTTAA) but also that AdcR binding to its target sequence is dependent, at least in vitro, on the presence of either Zn^{2+} or Mn^{2+} but not on the presence of Fe^{2+} . Likewise, our results indicated that the distance between the two palindromic halves of the AdcR-binding sequence must be strictly preserved. Nonetheless, as described above, despite the close relationship among all gram-positive bacteria, the regulation of Zn^{2+} uptake differs dramatically with respect to DNA recognition motifs. This finding suggests two different origins for Zn^{2+} uptake regulatory proteins in this bacterial phylum.

The results presented in this work also demonstrated that the product of the ssuiDRAFT 0103 gene belonging to the *S. suis* *adcR* regulon, which constitutes a single transcriptional unit, not only is immunogenic but also confers a statistically significant level of protection against *S. suis* challenge to mice vaccinated with this protein. Two other *S. suis* envelope proteins (SsuiDRAFT 0174 and SsuiDRAFT 1237), encoded in two independent polycistronic transcriptional units, with antigenic capacity but less protective power than the SsuiDRAFT 0103 protein were also identified. The reduced protective ability of these two proteins might be due, for example, to a less important role in divalent-cation uptake, or their exposure to the external medium may not be as extensive as that of the ssuiDRAFT 0103 ORF. However, since animals inoculated with *S. suis* produced antibodies against the three proteins, a combination or even only one of them might form the basis of a simple serological test for detecting *S. suis* infections on animal farms. Furthermore, it must be noted that although the expression of the ssuiDRAFT 0103, ssuiDRAFT 0174, and ssuiDRAFT 1237 ORFs was induced in the presence of the chelating agent DPD, only the ssuiDRAFT 0103 and ssuiDRAFT 1237 ORFs were under AdcR control. These data suggest that there is a second regulator of divalent-cation uptake, which controls at least ssuiDRAFT 0174 expression.

It is well known that many bacterial envelope proteins involved in iron uptake are immunogenic and that some of them are protective (4, 5). Similar results have been reported for some divalent-cation uptake systems other than the iron uptake systems (27, 32, 33). Nevertheless, data presented in this work are the first data to demonstrate that proteins belonging to the *adcR* regulon may be useful as vaccines. Finally, the fact that TBLASTN analysis confirmed that genes homologous to the ssuiDRAFT 0103 ORF are present in practically all streptococci for which sequence data are available (data not shown) suggests that the encoded product can be used as a tool to achieve broad protection against this significant pathogenic group of gram-positive bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grant AGL2005-03574 from the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) de España and by grant 2005SGR-533 from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació (DURSI) de la Generalitat de Catalunya. J. Aranda was a recipient of a predoctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona.

We thank Joan Ruiz for his excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Arends, J. P., and H. C. Zanen. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev. Infect. Dis.* **10**:131-137.
2. Beaudoin, M., R. Higgins, J. Harel, and M. Gottschalk. 1992. Studies on a murine model for evaluation of virulence of *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**:111-116.
3. Boos, W., and J. M. Lucht. 1996. Periplasmic binding protein-dependent ABC transporters, p. 1175-1209. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
4. Bosch, M., M. E. Garrido, A. M. Pérez de Rozas, I. Badiola, J. Barbé, and M. Llagostera. 2004. *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. *Vet. Microbiol.* **99**:103-112.
5. Brown, J. S., A. D. Ogunniyi, M. C. Woodrow, D. W. Holden, and J. C. Paton. 2001. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* **69**:6702-6706.
6. Bsai, N., and J. D. Helmann. 1999. Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator in vitro and in vivo. *J. Bacteriol.* **181**:4299-4307.
7. Campoy, S., M. E. Fontes, S. Padmanabhan, P. Cortés, M. Llagostera, and J. Barbé. 2003. LexA-independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **49**:769-781.
8. Campoy, S., G. Mazón, A. R. Fernández de Henestrosa, M. Llagostera, P. B. Monteiro, and J. Barbé. 2002. A new regulatory DNA motif of the gamma subclass *Proteobacteria*: identification of the LexA protein binding site of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiology* **148**:3583-3597.
9. Claverys, J. P. 2001. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res. Microbiol.* **152**:231-243.
10. Cockayne, A., P. J. Hill, N. B. L. Powell, K. Bishop, C. Sims, and P. Williams. 1998. Molecular cloning of a 32-kilodalton lipoprotein component of a novel iron-regulated *Staphylococcus epidermidis* ABC transporter. *Infect. Immun.* **66**:3767-3774.
11. Dean, M., and R. Allikmets. 1995. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**:779-785.
12. Dintilhac, A., G. Alloing, C. Granadel, and J.-P. Claverys. 1997. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* **25**:727-739.
13. Dintilhac, A., and J.-P. Claverys. 1997. The *adc* locus, which affects competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, encodes an ABC transporter with a putative lipoprotein homologous to a family of streptococcal adhesins. *Res. Microbiol.* **148**:119-131.
14. Fittipaldi, N., J. Harel, B. D'Amours, S. Lacouture, M. Kobisch, and M. Gottschalk. 2007. Potential use of an unencapsulated and aromatic amino acid-auxotrophic *Streptococcus suis* mutant as a live attenuated vaccine in swine. *Vaccine* **25**:3524-3535.
15. Fontaine, M. C., J. Pérez-Casal, and P. J. Willson. 2004. Investigation of a novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect. Immun.* **72**:774-781.
16. Gaballa, A., and J. D. Helmann. 1998. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**:5815-5821.
17. Garmory, H. S., and R. W. Titball. 2004. ATP-binding cassette transporters are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infect. Immun.* **72**:6757-6763.
18. Garrido, M. E., M. Bosch, R. Medina, A. Bigas, M. Llagostera, A. M. Pérez de Rozas, I. Badiola, and J. Barbé. 2003. *fur*-independent regulation of the *Pasteurella multocida hbpA* gene encoding a haemin-binding protein. *Microbiology* **149**:2273-2281.
19. Garrido, M. E., M. Bosch, R. Medina, M. Llagostera, A. M. Pérez de Rozas, I. Badiola, and J. Barbé. 2003. The high-affinity zinc-uptake system *znuABC* is under control of the iron-uptake regulator (*fur*) gene in the animal pathogen *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**:31-37.
20. Hantke, K. 2001. Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals* **14**:239-249.
21. Higgins, R., M. Gottschalk, M. Jacques, M. Beaudain, and J. Henrichsen. 1995. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J. Vet. Diagn. Investig.* **7**:405-406.
22. Janulczyk, R., S. Ricci, and L. Björck. 2003. MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **71**:2656-2664.
23. Jomaa, M., J. Yuste, J. C. Paton, C. Jones, G. Dougan, and J. S. Brown. 2005. Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **73**:6852-6859.
24. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
25. Loo, C. Y., K. Mitrakul, I. B. Voss, C. V. Hughes, and N. Ganeshkumar. 2003. Involvement of the *adc* operon and manganese homeostasis in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *J. Bacteriol.* **185**:2887-2900.
26. Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
27. Ogunniyi, A. D., R. L. Folland, D. E. Briles, S. K. Hollingshead, and J. C.

- Paton.** 2000. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**:3028–3033.
28. **Panina, E. M., A. A. Mironov, and M. S. Gelfand.** 2003. Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangements of ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:9912–9917.
29. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning; a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
30. **Staats, J. J., I. Feder, O. Okwumabua, and M. M. Chengappa.** 1997. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet. Res. Commun.* **21**:381–407.
31. **Sutcliffe, I. C., and R. R. Russell.** 1995. Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **177**:1123–1128.
32. **Tai, S. S.** 2006. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. *Crit. Rev. Microbiol.* **32**:139–153.
33. **Talkington, D. F., B. G. Brown, J. A. Tharpe, A. Koenig, and H. Russell.** 1996. Protection of mice against fatal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesin A (PsaA). *Microb. Pathog.* **21**:17–22.
34. **Tanabe, M., H. S. Atkins, D. N. Harland, S. J. Elvin, A. J. Stagg, O. Mirza, R. W. Titball, B. Byrne, and K. A. Brown.** 2006. The ABC transporter protein OppA provides protection against experimental *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* **74**:3687–3691.

Editor: V. J. DiRita

1 An article for Infection and Immunity

2

3 Immunogenic and protective capacities of cell-wall associated proteins of *Streptococcus*
4 *suis* mutants deficient in divalent-cation-uptake regulators

5

6 Running title: Protective capacities of *adcR* for *S. suis* mutants

7

8 Authors: Jesús Aranda¹, Maria Elena Garrido^{1,2}, Nahuel Fittipaldi⁴, Pilar Cortés^{1,3},
9 Montserrat Llagostera^{1,2}, Marcelo Gottschalk⁴ and Jordi Barbé^{1,2,5}

10

11 ¹Department de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).
12 Bellaterra, 08193 - Barcelona, Spain.

13 ²Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Bellaterra, 08193 - Barcelona, Spain.

14 ³Servei d'Anàlisis i d'Aplicacions Microbiològiques, UAB. Bellaterra, 08193 -
15 Barcelona, Spain.

16 ⁴Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc and Centre de Recherche
17 en Infectiologie Porcine. Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-
18 Hyacinthe, Quebec J2S 7C6, Canada.

19 ⁵To whom reprint requests should be addressed.

20

21 E-mail: jordi.barbe@uab.cat

22 Phone: 34 - 93 - 581 1837

23 Fax: 34 - 93 - 581 2387

24

25

26 ABSTRACT

27

28 Many cell wall-associated, divalent-cation-regulated proteins are immunogenic and
29 some of them confer protection against the bacterial species from which they are
30 derived. In this work, two *Streptococcus suis* divalent-cation-uptake-regulator genes
31 controlling zinc/manganese- and iron-uptake (*adcR* and *fur*, respectively) were
32 inactivated in order to study the immunogenic and protective capacities of their cell
33 wall-associated proteins. Results obtained showed an overexpression of a set of
34 immunogenic proteins (including members of the Pneumococcal histidine triad family
35 previously reported to confer protection against streptococcal pathogens) in the *S. suis*
36 *adcR* mutant cell wall extracts. Likewise, genes encoding zinc transporters, putative
37 virulence factors, and a paralog ribosomal protein related to zinc starvation, appeared
38 derepressed in this mutant strain. Moreover, protection assays in mice showed that
39 although *adcR*-regulated cell wall-associated proteins were not sufficient to confer
40 protection in mice, the combination of *adcR*- and *fur*-regulated cell wall-associated
41 proteins is able to confer a significant protection (50%, $P = 0.038$) against a challenge to
42 mice vaccinated with them.

43

44 INTRODUCTION

45

46 *Streptococcus suis* is an important pathogen that causes significant economical losses in
47 the swine industry worldwide (17). Infection caused by *S. suis* may be as varied as
48 asymptomatic bacteremia to fulminant systemic disease, with meningitis as the most
49 outstanding feature (17). It is also an important zoonotic agent for humans, who may
50 acquire the infection through skin wounds upon contact with pigs and/or their by-

51 products. Recently, during an outbreak in China, 215 human cases of *S. suis* infection
52 were documented, and 39 of those patients died (36). More than thirty serotypes of *S.*
53 *suis* based on its capsular antigens are currently known (17). The serotype 2 is the most
54 frequently isolated from diseased animals (28). Efforts to control the infection are
55 hampered by the lack of effective vaccines against *S. suis*. Furthermore, mechanisms
56 involved in pathogenesis of this microorganism are not yet completely understood (14).

57

58 Iron and zinc are essential components of many bacterial proteins either as structural or
59 catalytic cofactors (3, 5). The concentration of both elements in free state in the body
60 fluids of mammals is extremely low in order to prevent bacterial proliferation. On the
61 other hand, metals at high concentrations are toxic to microorganisms. Toxicity occurs
62 through the displacement of essential metals from their native binding sites or through
63 ligand interactions (5, 9). In addition, iron can be particularly toxic under aerobic
64 conditions interacting with either oxygen or oxygen reduced species (34).
65 Consequently, microorganisms require homeostatic mechanisms to control intracellular
66 metal levels.

67

68 Fur (Ferric uptake regulator) is a transcriptional regulator of genes involved in iron
69 uptake and storage in many bacterial species (3). In *E. coli* and *B. subtilis*, as well as
70 other close relative species, transcription of the zinc transporter genes is regulated by
71 Zur (Zinc uptake regulator) which belongs to the Fur proteins family (24). However, in
72 *Streptococcus* species zinc transporter genes are controlled by AdcR, a transcriptional
73 regulator factor from the MarR proteins family (20).

74

75 Several cell wall-associated transporters involved in divalent-cation uptake, including
76 ABC transporters, have been shown to have immunogenic properties against the
77 bacterial species from which they are derived (12, 32). It has been shown that in *S. suis*,
78 AdcR controls at least two operons related with Zn⁺²/Mn⁺² uptake, encoding a complete
79 ABC transporter (SsuiDRAFT 1237 to 1240) and a divalent-cation-binding lipoprotein
80 (SsuiDRAFT 0103) (4). Interestingly, both cation-binding lipoproteins encoded for
81 these operons (SsuiDRAFT 1237 and SsuiDRAFT 0103) were immunogenic when
82 analyzed on Western blots by using immunological reactive serum obtained from
83 surviving mice after inoculation with wild-type *S. suis* 89/1591 strain (4). Furthermore,
84 a high level of protection against *S. suis* challenge was obtained in mice when
85 vaccinated with the product of the ssuiDRAFT 0103 ORF (4).

86

87 Different strategies have been developed to produce vaccines against pathogenic
88 bacteria, including the overexpression on the bacterial cell surface of divalent-cation-
89 uptake transporters which are induced in the presence of chelating agents or by the
90 construction of deficient strains in cation-uptake repressors (13). In this context, the aim
91 of this work has been to obtain knockout *S. suis* mutants on the regulator genes of either
92 zinc/manganese- or iron-uptake systems to study their putative use as a protective tool
93 against this pathogen.

94

95 **MATERIALS AND METHODS**

96

97 **Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** Bacterial strains and plasmids
98 used in this work are listed in Table 1. *Escherichia coli* cells were grown in Luria-
99 Bertani (LB) medium (22). When necessary, ampicillin (50 µg/ml), kanamycin (50

100 $\mu\text{g/ml}$), or spectinomycin ($50 \mu\text{g/ml}$) were added to LB medium. *S. suis* was grown in
101 Todd-Hewitt (TH, Difco). When required, spectinomycin ($100 \mu\text{g/ml}$) was added to TH
102 medium. Unless otherwise indicated, all cultures were incubated at 37°C , with shaking
103 for *E. coli*. DNA extractions, cloning, and other molecular techniques used were
104 performed as described elsewhere (27). All oligonucleotides (Roche) used in this work
105 are listed in Table 2.

106

107 **Construction of *S. suis* mutants.** The *adcR* and *fur* genes were inactivated by precise,
108 in frame deletion. Briefly, upstream and downstream regions of both *adcR* and *fur* genes
109 (including partially coding regions) were amplified by overlap-extension PCR using
110 genomic DNA from *S. suis* P1/7 strain as a template. A PCR product of 892 bp
111 comprising a deletion of 229 bp was obtained for the *adcR* gene, whereas a PCR
112 product of 848 bp presenting a deletion of 222 bp was obtained for the *fur* gene. Both
113 PCR fragments were cloned into the pCR4-TOPO vector following the manufacturer
114 instructions and propagated in *E. coli* TOP 10 cells. Inserts were amplified afterwards
115 by PCR using primers M13F and M13R (Table 2), amplicons digested with *EcoRI* and
116 cloned into the *EcoRI*-digested thermosensitive suicide vector pSET4s, which carries
117 the *spc* and *repA*s genes conferring spectinomycin resistance and thermosensitivity,
118 respectively (31), giving rise to plasmids pSET4 Δ adcR and pSET4 Δ fur. Recombinant
119 plasmids were propagated in *E. coli* ABLE-C cells, purified, and used to electroporate
120 *S. suis* electrocompetent P1/7 and UA5000 strains as previously described (30). Cells
121 were then plated on TH agar containing spectinomycin and incubated for 48h at 28°C to
122 select for clones that had incorporated the plasmid. Several clones were then selected
123 and purified by single-colony isolation on TH agar containing spectinomycin and
124 incubated at 37°C . Integration of the construction into the chromosome as a result of

125 homologous recombination via a single crossover was verified by PCR in temperature-
126 and spectinomycin-resistant colonies. Those colonies were then passaged several times
127 onto non selective media at 28°C and screened for loss of vector-mediated
128 spectinomycin resistance. Candidate spectinomycin-sensitive, temperature-resistant
129 clones were analyzed by PCR, which showed the exchange of the wild-type allele for
130 the genetic segment containing the desired deletion as a consequence of a homologous
131 recombination through a double crossover event were. Allelic replacement in candidate
132 clones was further confirmed by sequencing of the region in the resulting mutants.

133

134 **Preparation of *S. suis* cell wall fractions.** Extraction of cell wall-associated proteins
135 was performed as described elsewhere (33), with some modifications. Briefly, cells
136 from 200 ml of an overnight culture were pelleted at 4°C by centrifugation at $8.000 \times g$
137 for 10 min. The cells were washed with 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8) and the pellet was
138 pipetted up-and-down for 5 min in 4 ml of the same buffer supplemented with 0.1%
139 (v/v) Triton X-100 (Roche). The suspension was centrifuged at $8.000 \times g$ for 10 min at
140 4°C. The supernatant was collected and centrifuged 2h at $51.030 \times g$ at 4°C in order to
141 concentrate the cell wall protein extract. Finally, the protein pellet was resuspended in
142 100 μ l of 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), visualized by sodium dodecyl sulfate-
143 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (19), and stored at 4°C. The SDS-
144 PAGE was stained with Brilliant Blue G Colloidal (Sigma) in order to avoid any stain
145 interference with the subsequent procedures. The identification of overexpressed
146 proteins was done in the *Servei de Proteòmica i Bioinformàtica* (SepBio) of the
147 *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB). Thus, electrophoretic bands were in-gel
148 digested with trypsin and analyzed using MALDI-TOF mass spectrometry as previously
149 reported (1).

150

151 **RNA techniques.** RNA was isolated as described before (11) with slight modifications.

152 Ten ml of a *S. suis* culture in the middle-exponential growth phase (OD₆₀₀ of 0.6) were

153 collected by centrifugation at 8,000 × *g* for 10 min. Cells were then resuspended by

154 vigorous vortexing at 37°C for 10 min in 300 µl of prelysis buffer containing 10 mg of

155 lysozyme per ml. Total RNA was extracted by using the RNeasy Mini Kit (Qiagen)

156 according to the manufacturer's instructions. DNA contamination was removed from

157 the RNA during purification by treatment with RNase-free DNase (Qiagen) followed by

158 digestion with DNase Turbo (Ambion). The concentration and integrity of RNA were

159 determined by absorbance at 260 nm (A₂₆₀) measurements and 1% agarose gel

160 electrophoresis, respectively. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) assays were done

161 using a Titan One Tube RT-PCR system (Roche) following the manufacturer's

162 instructions. Real-time RT-PCR analysis of gene expression was performed for all

163 genes as reported previously (8), with specific internal oligonucleotides used for each

164 gene (Table 2). In all cases, the absence of DNA in RNA samples was tested by PCR

165 without the addition of reverse transcriptase.

166

167 **Mobility shift assays.** Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were done as

168 previously described (7) with slight modifications. DNA promoters were PCR-

169 amplified from P1/7 *S. suis* genomic DNA using suitable oligonucleotides (Table 2) and

170 the purified PCR fragments were cloned in *E. coli* DH5α cells through the pGEM-T

171 vector. The presence of the desired promoter was confirmed by sequencing the plasmid

172 DNA using the primers M13F and M13R. DNA probes were prepared by PCR

173 amplification, being one of the oligonucleotides labeled with digoxigenin (DIG) at its 5'

174 end (Table 2). DNA-protein reaction mixtures (20 µl) containing 25 ng of a DIG-DNA-

175 labeled probe and either 0 or 10 μg of purified *S. suis* AdcR protein were incubated in
176 EMSA buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8], 50 mM KCl, 5% [vol/vol] glycerol, 1 μg bulk
177 carrier sperm salmon DNA, 0.5 mM 1,4-dithiothreitol [DTT], and 0.1 mg bovine serum
178 albumin [BSA] per ml) for 10 min at room temperature. AdcR protein was purified as
179 previously described (4).

180

181 **Protection assays.** Female BALB/cAnNHsd mice (3 weeks old) obtained from Harlan
182 Iberica (Barcelona, Spain) were used for these studies. All animals underwent a
183 quarantine period of 1 week. A maximum of four animals per cage were housed under
184 specific-pathogen-free conditions at 19–21°C with an artificial 12-h light/12-h dark
185 cycle; the relative humidity was 50–60%. Antibiotic-free pelleted food and autoclaved
186 water were provided ad libitum during the experiments. Animals were monitored daily
187 for morbidity and mortality. All animal experiments were approved by the UAB Animal
188 Ethics Committee. For protection assays, groups of eight female 4-week-old
189 BALB/cAnNHsd mice were injected intraperitoneally with 0.1 ml of 50 μg of cell wall-
190 associated proteins adsorbed with Imject Alum adjuvant (aluminum hydroxide; Pierce)
191 according to the manufacturer's protocol. After 2 weeks, a second immunization was
192 carried out, 3 weeks later followed by a challenge with an intraperitoneal injection of a
193 0.1 ml suspension of TH broth supplemented with 10% inactivated bovine serum
194 containing 10^8 cfu of *S. suis* 89/1591. The survival of the mice was subsequently
195 monitored for 7 days. Serum for Western blot assays was obtained as previously
196 reported (4).

197

198 **Statistical analysis.** Fisher's exact test was used to analyze the statistical significance
199 of the lethal challenge data. A statistical test with a *P* value less than 0.05 was
200 considered as significant.

201

202 **RESULTS AND DISCUSSION**

203

204 **Analysis of the *S. suis* *adcR* regulon composition.** It has been predicted in silico and
205 demonstrated in vitro that the TTAACNRGTAA motif is the AdcR DNA-binding
206 sequence (4, 23). A search in the complete sequenced genome of *S. suis* P1/7 strain
207 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_suis/), with the EditSeq program (DNASTAR,
208 Inc.), revealed four open reading frames (ORFs) presenting an identical motif to the
209 AdcR binding sequence in their promoter regions.

210

211 Two of them are the *ssu1390* and *ssu1352* ORFs, whose predicted products are
212 homologous to the internalin A (InIA) of *Listeria monocytogenes* (which allows this
213 bacterium to invade cells (35)) and to the 30S ribosomal protein S14 lacking the typical
214 zinc-ribbon motif present in the most of ribosomal proteins, respectively. Furthermore,
215 several EMSAs carried out confirmed that the purified AdcR protein binds specifically
216 to the promoter of both genes (Fig. 1).

217

218 The other two ORFs of P1/7 strain presenting an AdcR-binding sequence correspond
219 to the *S. suis* 89/1591 homologues previously identified as *ssuiDRAFT 1240* ORF
220 (*adcR*) and *ssuiDRAFT 0103* ORF (encoding a putative zinc-binding streptococcal
221 lipoprotein) (4). These ORFs were annotated as *ssu0112* and *ssu0308*, respectively, in *S.*
222 *suis* P1/7 strain (Table 3). Similar to strain 89/1591, in strain P1/7 *adcR* is the first gene

223 of a transcriptional unit which contains three components of an ABC transporter
224 (Ssu0113 to 0115) involved in zinc/manganese uptake (Table 3). Further, it is worth
225 noting that both *adcR*-regulated ssuiDRAFT 0103 and 1237 lipoproteins (Ssu0308 and
226 Ssu0115 P1/7 homologous) have been reported to be immunogenic and able to confer
227 protection against *S. suis* in mice (4). In this regard, it is known that lipoproteins are the
228 ABC transporter components most exposed outside of the Gram-positive cell surface
229 (15, 29). Taken together, these data suggest that *adcR*-mutant cell wall-associated
230 proteins could be candidates to be effective vaccines against *S. suis* infection.

231

232 In order to evaluate the role of the AdcR protein in the regulation of genes whose
233 products could present immunogenic and/or protective abilities, the construction and
234 characterization of an *adcR* in-frame deletion mutant was carried out as described in
235 Material and Methods. After electrotransformation with plasmid pSET4 Δ adcR (Fig. 2A)
236 to replace the wild-type *adcR* gene of *S. suis* P1/7 strain for an *adcR*-deleted gene, the *S.*
237 *suis* UA5000 strain (AdcR⁻) was obtained, being the deletion confirmed by both PCR
238 (Fig. 2B) and sequencing (data not shown). The repressor function of the AdcR protein
239 upon these genes was confirmed by the fact that the null-*adcR* strain showed
240 derepression of all AdcR-regulated ORFs (Fig. 3).

241

242 **The AdcR protein regulates an *S. suis* gene encoding a paralog ribosomal protein.**

243 It has been proposed that genes encoding paralog ribosomal proteins may be regulated
244 by AdcR and thus contribute to survival during zinc starvation (23). This hypothesis is
245 based on the fact that original copies of ribosome proteins present zinc-ribbon motifs
246 (C-X₂-C-X_n-C-X₂-C) and are thus likely to bind zinc, while paralog copies lack these
247 motifs. However, presence of zinc in the ribosomes seems to be required to stabilize

248 them at high temperature only in thermophilic bacteria and Archaea (21). Therefore, it
249 has been suggested that under conditions of zinc starvation, the induction of paralog
250 genes could lead to the incorporation of these paralog proteins into the ribosomes in
251 place of the original ribosomal proteins. After degradation of original, zinc-containing
252 ribosomal proteins, the metal becomes available to be used by other zinc-dependent
253 proteins. Scenarios in concordance with this hypothesis have been reported during zinc
254 starvation for ribosomal proteins of *B. subtilis* and *S. pyogenes* (6, 21). Accordingly, our
255 results showed that expression of ssu1352 ORF in the *adcR*-knockout strain, encoding
256 the ribosomal protein S14, is approximately 100-fold higher in comparison than in the
257 wild-type strain (Fig. 3). In this respect, an ORF (ssu0083) encoding the putative
258 original 30S ribosomal protein S14 ORF is also present in the complete genome of *S.*
259 *suis* P1/7 strain. As expected, the predicted encoding product of ssu0083 ORF presents
260 a zinc-ribbon motif (CEKCGRPHSVYRKFKLCRVC) which is absent in the AdcR-
261 regulated ssu1352 ORF (data not shown). Although further experiments are needed to
262 fully evaluate its validity, our data support the hypothesis that genes encoding paralog
263 ribosomal proteins regulated by AdcR contribute to zinc homeostasis in streptococci.

264

265 **Two Pht proteins are under AdcR regulation in *S. suis*.** SDS-PAGE analysis of cell
266 wall-associated proteins of both the *adcR* mutant and wild-type strains revealed the
267 overexpression of two proteins of approximately 120 and 100 kDa in the *adcR*-
268 knockout strain (Fig. 4). To identify them, both protein gel bands were in-gel digested
269 with trypsin and the peptides obtained identified using MALDI-TOF mass spectrometry
270 (data not shown). Results indicated that these two proteins corresponded to ssu0309 and
271 ssu1103 ORF products, which have been both annotated as Pht (Pneumococcal histidine
272 triad) proteins, showing a score of 165 and 73 (using the MASCOT search engine,

273 Version 2.1), respectively. Predicted products of those two genes are proteins of 116.5
274 and 95.4 kDa molecular weight, respectively, in agreement with the apparent molecular
275 mass seen on SDS-PAGE (Fig. 4). Pht proteins have only been found in pathogenic
276 streptococcal species and are both involved in the invasion process (2, 23). This family
277 of proteins shows a conserved and repeated motif HxxHxH (histidine triad motif) which
278 is implicated in the zinc binding (2, 23, 26).

279

280 Overexpression of Ssu1103 and Ssu0309 proteins in the *adcR* mutant strain suggested
281 that they are under the control of AdcR. At this respect, it must be noted that an AdcR-
282 like motif (TTAACTAGTAAA) is found at position -230 with respect to the ssu1103
283 predicted translational starting point. For this reason, the ability of *S. suis* AdcR protein
284 to bind the promoter region of ssu1103 ORF promoter was analyzed by EMSA. Data
285 showed that the AdcR protein specifically binds to the promoter of this gene (Fig. 5).

286

287 Moreover, and since ssu0308 and ssu0309 ORFs were demonstrated to be co-
288 transcribed by RT-PCR analysis (data not shown), a search of any putative AdcR box
289 upstream of this transcriptional unit was carried out. As expected, one motif of these
290 characteristics (TTAACTGGTTAA) was found at position -26 with respect to the
291 predicted translational starting point of the ssu0308 ORF, whose product is homologous
292 (99% identity) to the protein codified by the AdcR-regulated ssu1DRAFT 0103 ORF of
293 the 89/1591 *S. suis* strain (Table 3). Furthermore, EMSA experiments demonstrated that
294 the *S. suis* AdcR protein is able to bind this AdcR-like sequence present upstream the
295 ssu0308-ssu0309 ORFs transcriptional unit (data not shown). Accordingly with all these
296 data, derepression of both ssu1103 and ssu0309 ORFs was observed in the *adcR* mutant
297 strain (Fig. 6).

298

299 Further, Pht proteins are involved in host cell-pathogen interaction and it has been
300 hypothesized that they have evolved to become sensitive to AdcR regulation in order to
301 exploit zinc as a compartment-specific regulatory cue (6). It is also noteworthy that Pht
302 proteins present hydrophobic leader sequences which presumably target these proteins
303 to the bacterial cell surface and induce specific antibodies against pneumococcal sepsis,
304 suggesting that Pht proteins might serve as effective vaccines against streptococci
305 infections (2, 18). Our data effectively demonstrate the presence of Pht proteins in the *S.*
306 *suis* cell wall and that AdcR protein is not only involved in cation homeostasis but also
307 controls putative virulence factors.

308

309 **Protective capacities of cell wall-associated proteins of *adcR* and *adcR* for *S. suis***
310 **mutants.** As cited above, *adcR*-mutant strain overexpresses genes encoding predicted
311 immunogenic proteins. For that reason, the cell-wall associated proteins of both wild-
312 type and *adcR*-null strains were analyzed on Western-blot by using immunological
313 reactive serum obtained from surviving mice after inoculation with *S. suis* 89/1591
314 wild-type strain. Results showed that the *adcR* mutant strain extracts present more
315 immunological proteins than the wild-type strain (data not shown). However, no
316 protective effect was obtained when the cell-wall associated proteins of the *adcR*-
317 mutant strain were inoculated to mice previous to a challenge with wild-type *S. suis*
318 89/1591 strain (data not shown). This result suggested that *adcR*-regulated proteins
319 associated to the cell wall are not sufficient to prevent the infective process in mice.
320 This is could be due to that the amount of immunogenic proteins is not enough or their
321 exposure to the external medium may not be as extensive as necessary to confer a good
322 protection. In fact, previous data have demonstrated that a recombinant *adcR*-regulated

323 protein (SsuiDRAFT 0103) is enough to confer a significant protection against this
324 pathogen in mice (4).

325

326 The ferric-uptake regulator (*fur*)-homologous ssu0289 ORF was found in *S. suis* P1/7
327 strain through bioinformatics analysis. As cited above, the Fur protein binds iron in the
328 cytoplasm of many bacterial cells and blocks the transcription of iron-regulated genes,
329 being many of their products powerful antigens (10, 16, 25). Then, and to increase the
330 putative immunogenic capacity of the *S. suis adcR* mutant, we constructed strain
331 UA5002 strain (*AdcR⁻ Fur⁻*). The presence of the *fur* gene deletion was confirmed by
332 both PCR (Fig. 7) and sequencing (data not shown).

333

334 Analysis of the SDS-PAGE profile of *S. suis* UA5002 cell wall-associated proteins
335 revealed that the double mutant strain presented a higher number of immunogenic
336 proteins than the *S. suis adcR* single mutant (data not shown). In order to determine
337 whether the induction of this immunogenic response was enough to protect mice against
338 *S. suis* infection, two groups of eight mice were immunized twice with 50 µg cell wall-
339 associated proteins of either double mutant strain or wild-type strain (as a control).
340 When the animals were challenged with 10⁸ cfu of the *S. suis* 89/1591 strain, all the
341 mice died within 4 days after the infection in the control group (Fig. 8). In contrast, 50%
342 of mice inoculated with an identical dose of the virulent strain remained alive during all
343 the experiment (Fig. 8). These results point out that the combination of cell wall-
344 associated proteins under the control of either zinc/manganese- and iron- uptake
345 regulators (*AdcR* and *Fur*, respectively) not only are immunogenic but also confer a
346 statistically significant level of protection ($P = 0.038$) against *S. suis* challenge to mice
347 immunized with these proteins.

348

349 To sum up, data reported in this work demonstrate that the use of cell wall extracts of *S.*
350 *suis* double mutants defective in genes regulating either Zn^{2+}/Mn^{2+} or Fe^{2+} cations are
351 able to protect mice against challenge with this bacterial species. This double mutant
352 based strategy had not been used so far and can be exported to other virulent bacterial
353 species. Thus, mutagenesis of this kind of regulators allows to obtain similar effects in
354 the overexpression of divalent-cation-uptake transporters on the bacterial cell surface
355 that those induced by chelating agents, overcoming problems associated with this
356 chemical components use such as the poor yield of bacterial cell growth and simplifying
357 the massive production of this antigen source.

358

359 **ACKNOWLEDGEMENTS**

360

361 We are very grateful to Dr. Sekizaki for providing pSET4s plasmid used in this work.
362 We thank Joan Ruiz and Sonia Lacouture for their excellent technical assistance. This
363 work was funded by grants AGL2005-03574 from the Ministerio de Educación y
364 Ciencia (MEC) de España and 2005SGR-533 from the Departament d'Universitats,
365 Recerca i Societat de la Informació (DURSI) de la Generalitat de Catalunya. J. Aranda
366 is recipient of a pre-doctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona.
367 N. Fittipaldi is the recipient of a Natural Sciences and Engineering Research Council of
368 Canada postgraduate scholarship.

369

370

371

372

373 REFERENCES

374

- 375 1. **Abella, M., S. Rodriguez, S. Paytubi, S. Campoy, M. F. White, and J. Barbe.**
376 2007. The *Sulfolobus solfataricus radA* paralogue sso0777 is DNA damage
377 inducible and positively regulated by the Sta1 protein. *Nucleic Acids Res*
378 **35:6788-6797.**
- 379 2. **Adamou, J. E., J. H. Heinrichs, A. L. Erwin, W. Walsh, T. Gayle, M.**
380 **Dormitzer, R. Dagan, Y. A. Brewah, P. Barren, R. Lathigra, S.**
381 **Langermann, S. Koenig, and S. Johnson.** 2001. Identification and
382 characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective
383 against sepsis. *Infection and immunity* **69:949-958.**
- 384 3. **Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial
385 iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27:215-237.**
- 386 4. **Aranda, J., M. E. Garrido, P. Cortes, M. Llagostera, and J. Barbe.** 2008.
387 Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced
388 under divalent-cation-limited conditions. *Infection and immunity* **76:1590-1598.**
- 389 5. **Babich, H., and G. Stotzky.** 1978. Toxicity of zinc to fungi, bacteria, and
390 coliphages: influence of chloride ions. *Applied and environmental microbiology*
391 **36:906-914.**
- 392 6. **Brenot, A., B. F. Weston, and M. G. Caparon.** 2007. A PerR-regulated metal
393 transporter (PmtA) is an interface between oxidative stress and metal
394 homeostasis in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **63:1185-1196.**
- 395 7. **Bsat, N., and J. D. Helmann.** 1999. Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric
396 uptake repressor) with the *dhb* operator in vitro and in vivo. *Journal of*
397 *bacteriology* **181:4299-4307.**

- 398 **8. Campoy, S., G. Mazon, A. R. Fernandez de Henestrosa, M. Llagostera, P. B.**
399 **Monteiro, and J. Barbe.** 2002. A new regulatory DNA motif of the gamma
400 subclass Proteobacteria: identification of the LexA protein binding site of the
401 plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiology* **148**:3583-3597.
- 402 **9. Chamnongpol, S., W. Dodson, M. J. Cromie, Z. L. Harris, and E. A.**
403 **Groisman.** 2002. Fe(III)-mediated cellular toxicity. *Mol Microbiol* **45**:711-719.
- 404 **10. Escolar, L., J. Perez-Martin, and V. de Lorenzo.** 1999. Opening the iron box:
405 transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of bacteriology*
406 **181**:6223-6229.
- 407 **11. Fontaine, M. C., J. Perez-Casal, and P. J. Willson.** 2004. Investigation of a
408 novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infection and immunity* **72**:774-
409 781.
- 410 **12. Garmory, H. S., and R. W. Titball.** 2004. ATP-binding cassette transporters
411 are targets for the development of antibacterial vaccines and therapies. *Infection*
412 and immunity **72**:6757-6763.
- 413 **13. Garrido, M. E., M. Bosch, A. Bigas, I. Badiola, J. Barbe, and M. Llagostera.**
414 2008. Heterologous protective immunization elicited in mice by *Pasteurella*
415 *multocida fur ompH*. *Int Microbiol* **11**:17-24.
- 416 **14. Gottschalk, M., and M. Segura.** 2000. The pathogenesis of the meningitis
417 caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* **76**:259-
418 272.
- 419 **15. Hantke, K.** 2001. Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals* **14**:239-
420 249.
- 421 **16. Hantke, K.** 1981. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12:
422 isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* **182**:288-292.

- 423 17. **Higgins, R., M. Gottschalk, M. Boudreau, A. Lebrun, and J. Henrichsen.**
424 1995. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. J Vet
425 Diagn Invest 7:405-406.
- 426 18. **Kunitomo, E., Y. Terao, S. Okamoto, T. Rikimaru, S. Hamada, and S.**
427 **Kawabata.** 2008. Molecular and biological characterization of histidine triad
428 protein in group A streptococci. Microbes and infection / Institut Pasteur **10**:414-
429 423.
- 430 19. **Laemmli, U. K.** 1970. Claveage of structural proteins during the assembly of the
431 head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.
- 432 20. **Loo, C. Y., K. Mitrakul, I. B. Voss, C. V. Hughes, and N. Ganeshkumar.**
433 2003. Involvement of the *adc* operon and manganese homeostasis in
434 *Streptococcus gordonii* biofilm formation. Journal of bacteriology **185**:2887-
435 2900.
- 436 21. **Makarova, K. S., V. A. Ponomarev, and E. V. Koonin.** 2001. Two C or not
437 two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific
438 gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal
439 proteins. Genome Biol **2**:RESEARCH 0033.
- 440 22. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor
441 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. .
- 442 23. **Panina, E. M., A. A. Mironov, and M. S. Gelfand.** 2003. Comparative
443 genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and
444 rearrangement of ribosomal proteins. Proc Natl Acad Sci U S A **100**:9912-9917.
- 445 24. **Patzer, S. I., and K. Hantke.** 2000. The zinc-responsive regulator Zur and its
446 control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in
447 *Escherichia coli*. J Biol Chem **275**:24321-24332.

- 448 **25. Ratledge, C., and L. G. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria.
449 Annual review of microbiology **54**:881-941.
- 450 **26. Riboldi-Tunnicliffe, A., N. W. Isaacs, and T. J. Mitchell.** 2005. 1.2
451 Angstroms crystal structure of the *S. pneumoniae* PhtA histidine triad domain a
452 novel zinc binding fold. FEBS letters **579**:5353-5360.
- 453 **27. Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory
454 manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 3rd
455 ed.
- 456 **28. Staats, J. J., I. Feder, O. Okwumabua, and M. M. Chengappa.** 1997.
457 *Streptococcus suis*: past and present. Vet Res Commun **21**:381-407.
- 458 **29. Sutcliffe, I. C., and R. R. Russell.** 1995. Lipoproteins of gram-positive bacteria.
459 Journal of bacteriology **177**:1123-1128.
- 460 **30. Takamatsu, D., M. Osaki, and T. Sekizaki.** 2001. Construction and
461 characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors.
462 Plasmid **45**:101-113.
- 463 **31. Takamatsu, D., M. Osaki, and T. Sekizaki.** 2001. Thermosensitive suicide
464 vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. Plasmid **46**:140-148.
- 465 **32. Tanabe, M., H. S. Atkins, D. N. Harland, S. J. Elvin, A. J. Stagg, O. Mirza,**
466 **R. W. Titball, B. Byrne, and K. A. Brown.** 2006. The ABC transporter protein
467 OppA provides protection against experimental *Yersinia pestis* infection.
468 Infection and immunity **74**:3687-3691.
- 469 **33. Tavares, F., and A. Sellstedt.** 2000. A simple, rapid and non-destructive
470 procedure to extract cell wall-associated proteins from *Frankia*. J Microbiol
471 Methods **39**:171-178.

- 472 **34. Touati, D.** 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. Arch Biochem Biophys
473 **373**:1-6.
- 474 **35. Wollert, T., D. W. Heinz, and W. D. Schubert.** 2007. Thermodynamically
475 reengineering the listerial invasion complex InlA/E-cadherin. Proc Natl Acad Sci
476 U S A **104**:13960-13965.
- 477 **36. Yu, H., H. Jing, Z. Chen, H. Zheng, X. Zhu, H. Wang, S. Wang, L. Liu, R.**
478 **Zu, L. Luo, N. Xiang, H. Liu, X. Liu, Y. Shu, S. S. Lee, S. K. Chuang, Y.**
479 **Wang, J. Xu, and W. Yang.** 2006. Human *Streptococcus suis* outbreak,
480 Sichuan, China. Emerging infectious diseases **12**:914-920.
- 481
- 482
- 483
- 484
- 485
- 486
- 487
- 488
- 489
- 490
- 491
- 492
- 493
- 494
- 495
- 496

497 **FIGURE LEGENDS**

498

499 FIG. 1. (A) Schematic representation of both *ssu1352* and *ssu1390* ORFs with their
500 promoter regions (P1352 and P1390, respectively). Small arrows indicate the primer
501 pairs used to amplify the promoters for EMSA experiments. (B) Electrophoretic
502 mobility of the DNA fragments containing the indicated *S. suis* promoters in the
503 absence (-) or presence (+) of purified *S. suis* AdcR protein.

504

505 FIG. 2. (A) Strategy used to construct both pSET4 Δ adcR and pSET4 Δ fur vectors. See
506 Materials and Methods for details. (B) PCR analysis of chromosomal DNA from the
507 wild-type (wt) or UA5000 (Δ adcR) *S. suis* strains with *adcR*-ID1 and *adcR*-ID4
508 oligonucleotides (Table 2). Results of PCR reactions show the presence of 229-bp
509 deletion in the mutant strain. *Bst*EII digested- λ DNA was used as molecular size
510 marker. The length of PCR products as well as some molecular size marker fragments
511 are also indicated.

512

513 FIG. 3. Expression factors of several ORFs (Table 3) in the *S. suis* *adcR* mutant
514 (UA5000). The expression factor is the ratio of the mRNA concentration of each gene
515 from UA5000 strain with respect to the wild-type strain (P1/7). The amount of mRNA
516 of each gene was determined by using a standard curve generated by the amplification
517 of an internal fragment of the *S. suis* P1/7 ORF encoding the cysteine synthase enzyme
518 (Table 2). The results are the mean of two independent experiments (each carried out in
519 duplicate). The standard deviation is indicated by error bars.

520

521 FIG. 4. SDS-PAGE profile of cell-wall associated proteins of both *S. suis* P1/7 (wt) and
522 UA5000 (*AdcR*⁻) strains. Two overexpressed proteins of UA5000 cell extracts are
523 indicated by arrows with their apparent molecular mass. The molecular mass marker
524 (M) and its values are shown on the left side of the figure.

525

526 FIG. 5. (A) Schematic representation of *ssu1103* ORF with its promoter region (P1103).
527 Small arrows indicate the primer pairs used to amplify the promoters for EMSA
528 experiments. (B) Electrophoretic mobility of the DNA fragment containing the
529 indicated *S. suis* promoter in the absence (-) or presence (+) of purified *S. suis* *AdcR*
530 protein.

531

532 FIG. 6. Expression factors of Pht-encoding *ssu0309* and *ssu1103* ORFs in the *S. suis*
533 *adcR* mutant (UA5000). The expression factor is the ratio of the mRNA concentration
534 of each gene from UA5000 strain with respect to the wild-type strain (P1/7). The
535 amount of mRNA of each gene was determined by using a standard curve generated by
536 the amplification of an internal fragment of the *S. suis* P1/7 ORF encoding the cysteine
537 synthase enzyme (Table 2). The results are the means of two independent experiments
538 (each carried out in duplicate). The standard deviations are indicated by error bars.

539

540 FIG. 7. PCR analysis of chromosomal DNA from the wild-type (wt) or UA5002 ($\Delta*adcR*$
541 $\Delta*fur*$) *S. suis* strains with the two oligonucleotides pairs *adcR*-ID1+*adcR*-ID4 and *fur*-
542 ID1+*fur*-ID4 (Table 2). Results of PCR reactions show the presence of a 229-bp
543 deletion and 222-bp deletion in the *adcR* and *fur* genes, respectively. *Bst*EII digested- λ
544 DNA was used as molecular size marker. The length of PCR products as well as some
545 molecular size marker fragments are also indicated.

546

547 FIG. 8. Survival curve of mice vaccinated with cell extracts of either wild-type P1/7 (●)
548 or *adcR fur* UA5002 (■) *S. suis* strains. After the last immunization, an intraperitoneal
549 challenge with 10^8 cfu of wild-type *S. suis* 89/1591 cells was administered per animal
550 ($n = 8$ mice per group).

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant features	Source or reference
Strains		
<i>Streptococcus suis</i>		
P1/7	Virulent serotype 2 strain	GREMIP ^a
UA5000	Derived from P1/7. Δ <i>adcR</i>	This work
UA5002	Derived from P1/7. Δ <i>adcR</i> Δ <i>fur</i> double mutant	This work
<i>Escherichia coli</i>		
One Shot TOP 10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str^r) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen
ABLE-C	C <i>lac</i> (<i>LacZ</i> ω -) [Kan ^r McrA ⁻ McrCB ⁻ McrF ⁻ Mrr ⁻ HsdR ⁻ ($r_k m_k$)] [F' <i>proAB lacI^fZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
DH5 α	<i>supE4</i> Δ <i>lacUI169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Clontech
Plasmids		
pGEM-T	PCR cloning vector. Ap ^r	Promega
pCR4-TOPO	PCR cloning vector. Km ^r Ap ^r	Invitrogen
pSET4s	Temperature sensitive suicide vector for <i>S. suis</i> mutagenesis. Spc ^r	(31)
pSET4 Δ <i>adcR</i>	pSET4s vector carrying the construction for <i>adcR</i> mutagenesis	This work
pSET4 Δ <i>fur</i>	pSET4s vector carrying the construction for <i>fur</i> mutagenesis	This work

^aGroupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Université de Montréal (Canada)

TABLE 2. Oligonucleotide primers used in this work

Oligonucleotide name	Sequence	Application
adcR-ID1	5'- TGTATATAAAAGCGTGCCTAGC	Primer used to construct the pSET4 Δ adcR plasmid
adcR-ID2	5'- GCAGCCTTTTCAATAAGCATC	Primer used to construct the pSET4 Δ adcR plasmid
adcR-ID3	5'- TTTAGTTTGACTGAGGCTGC	Primer used to construct the pSET4 Δ adcR plasmid
adcR-ID4	5'- AGACTGCTGATCACGAACC	Primer used to construct the pSET4 Δ adcR plasmid
adcR-ID5	5'- ATTCTGGCTCATAACTTACGC	Primer used to construct the pSET4 Δ adcR plasmid
adcR-ID6	5'-GGTATGCGCGTGATGAGGATCCTTTGA CAAGAACCAACC	Primer used to construct the pSET4 Δ adcR plasmid
adcR-ID7	5'-GGTTGGTTCTTGTCAAAGGATCCTCATC ACGCGCATACC	Primer used to construct the pSET4 Δ adcR plasmid
adcR-ID8	5'- AATTCGTA AACCGTGCTCG	Primer used to construct the pSET4 Δ adcR plasmid
fur-ID1	5'-ATGGATTGCGGACTGATGAGGG	Primer used to construct the pSET4 Δ fur plasmid
fur-ID2	5'- CGTGACCAAATTGAAACGGACC	Primer used to construct the pSET4 Δ fur plasmid
fur-ID3	5'- TTTCAGCACTAGGGTGGTC	Primer used to construct the pSET4 Δ fur plasmid
fur-ID4	5'- CTTGCTACTGTAATGGTCCG	Primer used to construct the pSET4 Δ fur plasmid
fur-ID5	5'- GGCTGAAATGAAGAGGATAGG	Primer used to construct the pSET4 Δ fur plasmid
fur-ID6	5'CAGTCGTTGCCAAGCTTATCGTGGATGT AGAAATCCCGAGC	Primer used to construct the pSET4 Δ fur plasmid
fur-ID7	5'-GCTCGGGATTTCTACATCCACGATAAG CTTGCAACGACTG	Primer used to construct the pSET4 Δ fur plasmid
fur-ID8	5'- TACGACCTGCACCATGAAC	Primer used to construct the pSET4 Δ fur plasmid
M13F	5'- GTTTTCCAGTCACGAC	Forward primer to amplify from pGEM-T/pCR4 vectors. Labeled at its 5' end with DIG to obtain EMSA probes
M13R	5'- CAGGAAACAGCTATGAC	Reverse primer to amplify from pGEM-T/pCR4 vectors. Labeled at its 5' end with DIG to obtain EMSA probes
103.up	5'- GCTTCGACAAATTTACCGCTGAC	Forward primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0308 ORF
103.dw	5'- TAAGAGAAGGCTGTATGTTGAGTGAC	Reverse primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0308 ORF
309.up	5'- CAATTCCTCGGTTTCCTCA	Forward primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0309 ORF
309.dw	5'- ACTCTGGTAATTCGCATCAAG	Reverse primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0309 ORF
1237.up	5'- CATAGTGGGGAGAGGCATAG	Forward primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0115 ORF

1237.dw	5'- ATCTTCATCCGCAGCAACAC	Reverse primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0115 ORF
1238.up	5'- TTGACGAGGATACGGCATTGT	Forward primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0114 ORF
1238.dw	5'- GCACTCGCTGGGGTTTCTG	Reverse primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0114 ORF
1239.up	5'- AAGGTTGGTTTCGTCGTTGA	Forward primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0113 ORF
1239.dw	5'- GTCCCTGCATCCATCCCTGTTGTC	Reverse primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0113 ORF
1240.up	5'- GATTTGGTTGGTCTTTGTC	Forward primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0112 ORF
1240.dw	5'- GTATGCGCGTGATGATGAG	Reverse primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu0112 ORF
1390.up	5'- GCGTAAAACCAATCCCTAACAC	Forward primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu1390 ORF
1390.dw	5'- AAAACCAATCGAAGACCCTCAC	Reverse primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu1390 ORF
1352.up	5'- ATCAAAAATGGCACGCTATCAG	Forward primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu1352 ORF
1352.dw	5'- GAAGGTAATCCGACTCACAC	Reverse primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu1352 ORF
1103.up	5'- GAACATCGCTATCCGCAGAC	Forward primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu1103 ORF
1103.dw	5'- GACCATTGGCTATCGCACTAT	Reverse primer for real time quantitative RT-PCR assay of ssu1103 ORF
cys.up	5'- GGTAACACTGGTATCGGTCTTG	Forward primer for real time quantitative RT-PCR assay of cysteine synthase gene
cys.dw	5'- CCTGTCTGTGTATCTTCGTG	Reverse primer for real time quantitative RT-PCR assay of cysteine synthase gene
103.up	5'- TACTAATCACCTTTGCG	Forward primer to obtain EMSA probes of ssu0308 promoter region
103.50	5'- CGAGCAAGCTGCTAAAAC	Reverse primer to obtain EMSA probes of ssu0308 promoter region
1352.pr	5'- ACTGACAAACAGACTGGC	Forward primer to obtain EMSA probes of ssu1352 promoter region
1352.50	5'- TAGCGCTCGATTAACTCC	Reverse primer to obtain EMSA probes of ssu1352 promoter region
1390.pr	5'- GCGTTTGTCGTGGAATGG	Forward primer to obtain EMSA probes of ssu1390 promoter region
1390.50	5'- CAAGATAGGATAATGCCT	Reverse primer to obtain EMSA probes of ssu1390 promoter region
1606.pr	5'- AAGTAGCTCACTACTGTC	Forward primer to obtain EMSA probes of ssu1103 promoter region
1606.50	5'- TAACCAATGCTACAGCAC	Reverse primer to obtain EMSA probes of ssu1103 promoter region

TABLE 3. Nomenclature of *adcR*-regulated genes in P1/7 and 89/1591 *S. suis* strains

ORF (P1/7) ^a	ORF (89/1591) ^b	Putative function
ssu0112 ^c	ssuiDRAFT 1240	Regulatory protein (AdcR)
ssu0113 ^c	ssuiDRAFT 1239	ABC transporter component. ATPase
ssu0114 ^c	ssuiDRAFT 1238	ABC transporter component. Permease
ssu0115 ^c	ssuiDRAFT 1237	ABC transporter component. Zinc binding lipoprotein
ssu0308 ^d	ssuiDRAFT 0103	ABC transporter component. Zinc binding lipoprotein
ssu0309 ^d	ssuiDRAFT 1195	Pht protein
ssu1390	ssuiDRAFT 0326	Internalin A
ssu1352	ssuiDRAFT 0240	30S ribosomal protein S14
ssu1103	ssuiDRAFT 1606	Pht protein

^aORF name in *S. suis* P1/7 strain (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_suis/)

^bORF name in *S. suis* 89/1591 strain (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

^{c/d}Genes constituting a single transcriptional unit. The AdcR motif is located upstream of the first gene listed.

FIG. 1

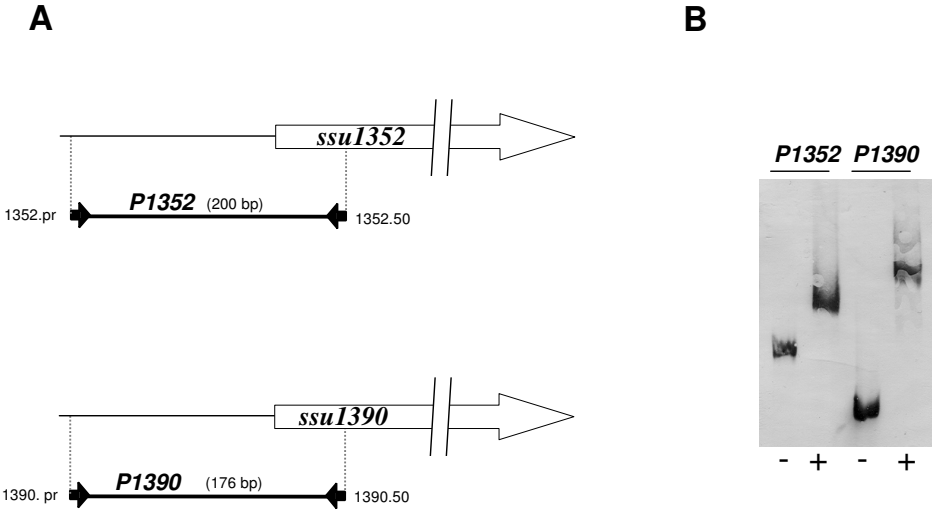
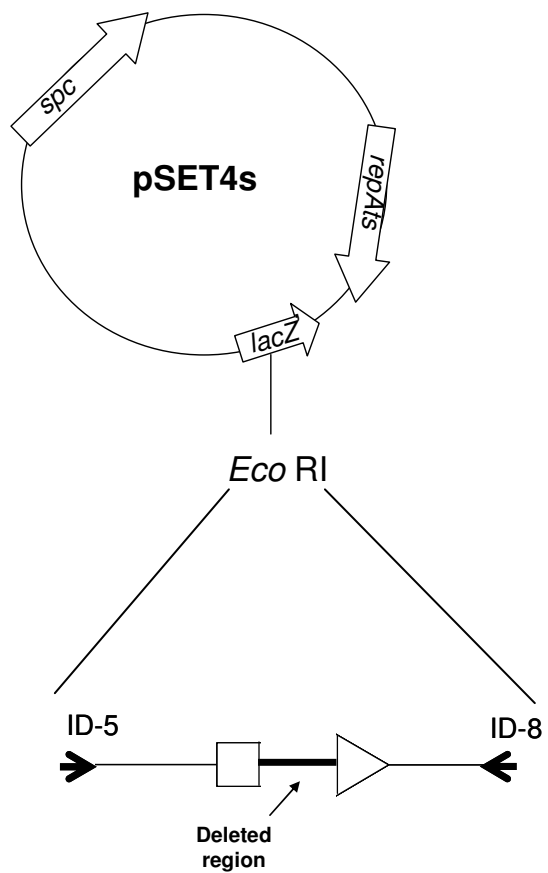


FIG. 2

A



B

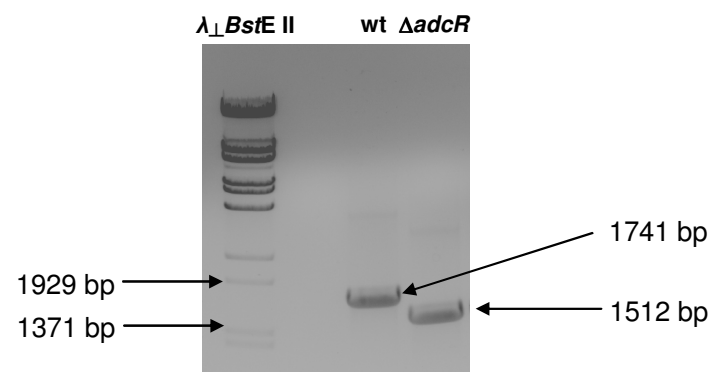


FIG. 3

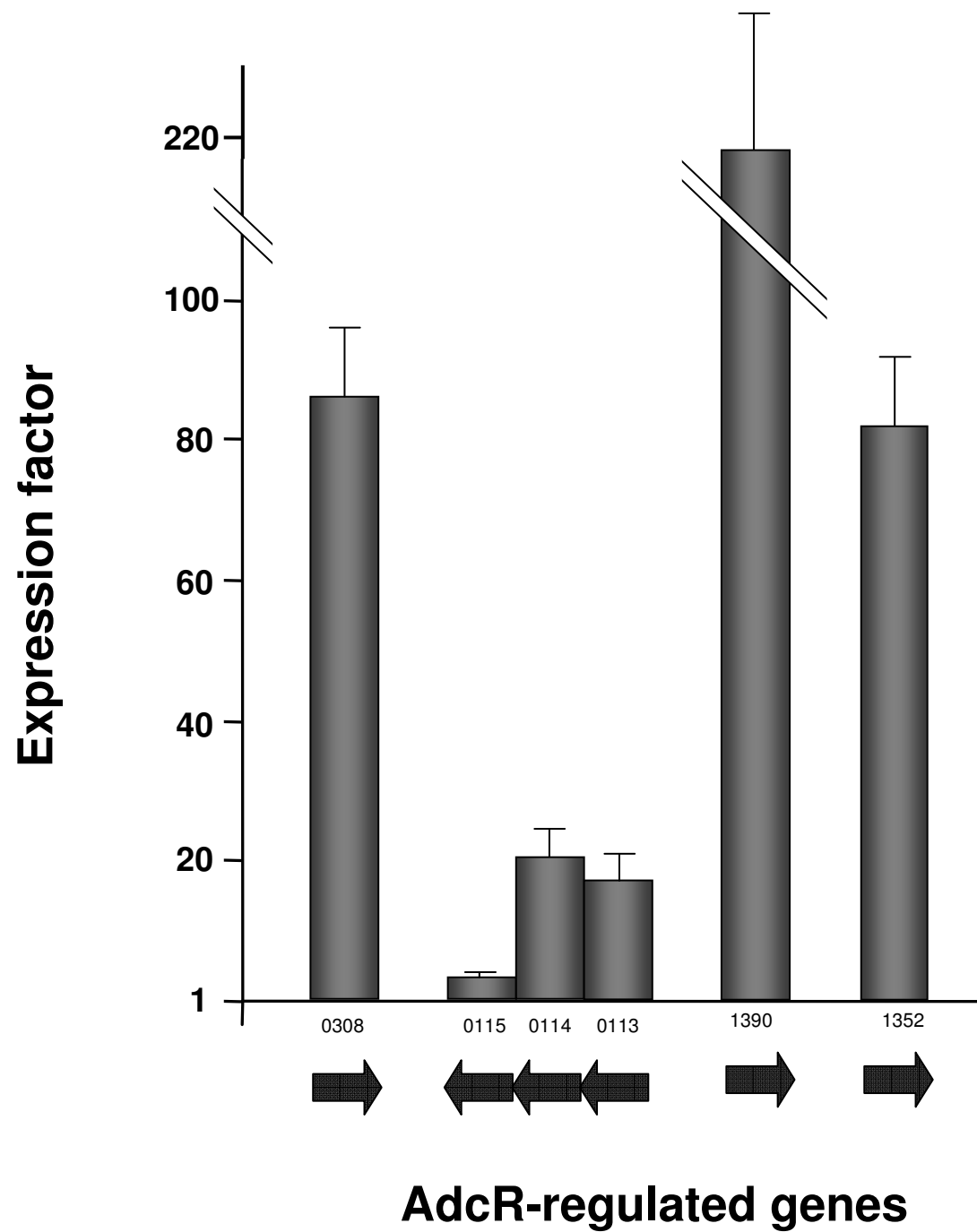


FIG. 4

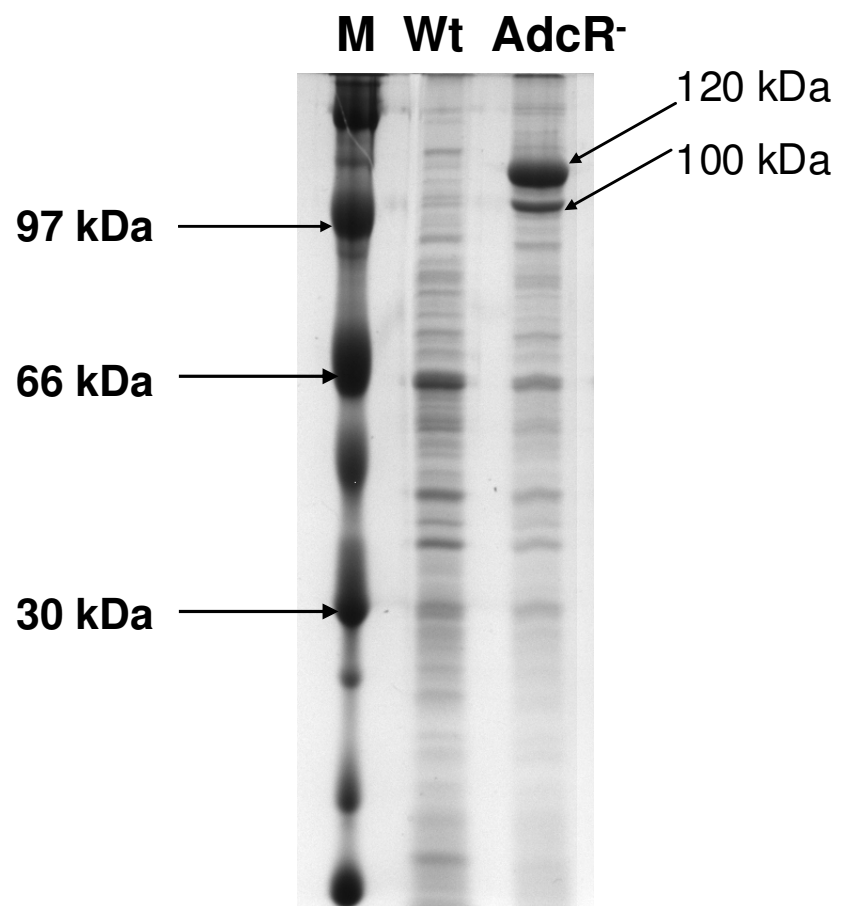
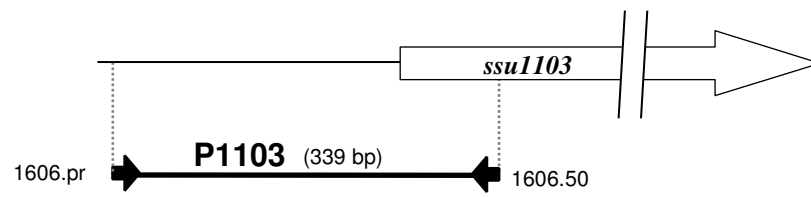


FIG. 5

A



B

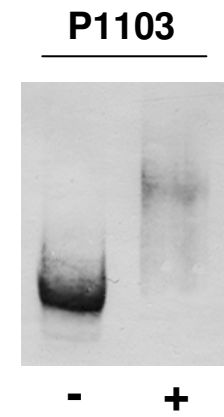


FIG. 6

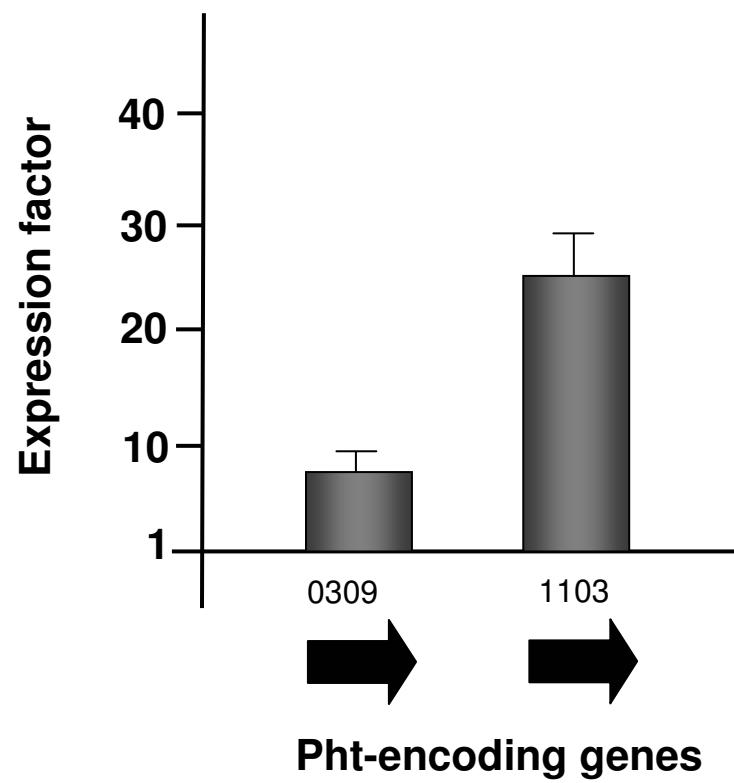


FIG. 7

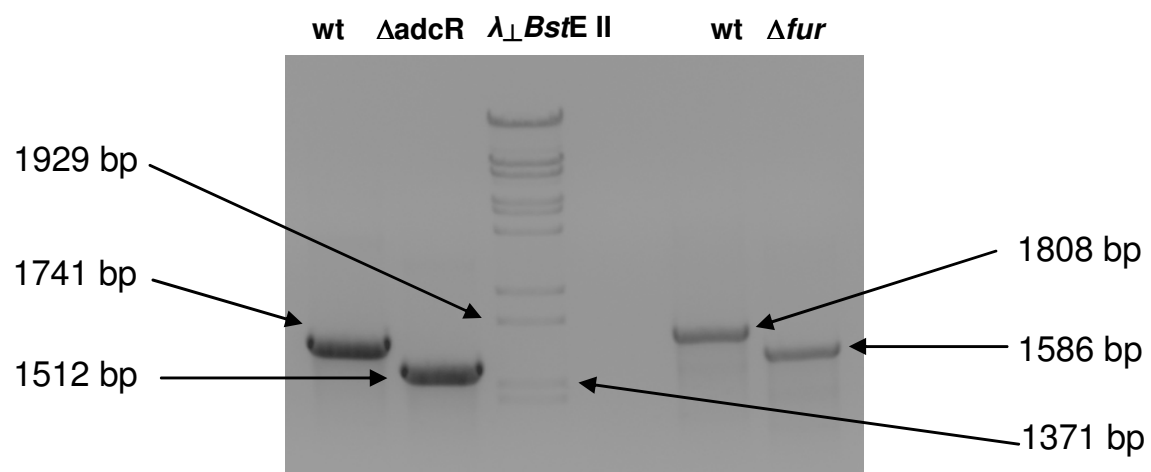


FIG. 8

