



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Genètica i Microbiologia

**IMPORTANCIA DE LOS
METALOREGULADORES FUR Y ZUR
EN LA VIRULENCIA DE *Salmonella*
*typhimurium***

Susana Campoy Sánchez

2002

Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Genètica i Microbiologia

**IMPORTANCIA DE LOS METALOREGULADORES FUR Y
ZUR EN LA VIRULENCIA DE *Salmonella typhimurium***

Memoria presentada por la
Licenciada en Biología Susana
Campoy Sánchez para optar al
grado de Doctor en Ciencias
Biológicas por la Universitat
Autònoma de Barcelona.

Vº Bº
El Director

Dr. Jordi Barbé García

BARCELONA 2002

**a mis padres,
a Sergi,**

Agradecimientos

Ante todo quisiera expresar en estas líneas mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho realidad este sueño. Y muy especialmente:

A mi Director de Tesis, Dr. Jordi Barbé, por haber confiado en mi desde el principio y haberme ayudado siempre. Y a la Dra. Montserrat Llagostera. Ambos, con su ejemplo, me han enseñado a amar la ciencia.

Al Dr. Ignacio Badiola, a Montserrat Saco y a Ana M^a Pérez de Rozas, por haber estado siempre ahí. Sin su ayuda y enseñanzas este trabajo hubiera sido imposible.

A toda la gente del laboratorio que ha convivido conmigo durante todos estos años.

A Toni, por enseñarme en los inicios y en los finales.

A los que ya no están pero estuvieron: Àngels, Mar, Virginia, Julio, Mohamed, J.A., Raül, Susana E., Ricardo, Xavi...

A Alfonso, por aguantarme y contar.

A Maribel, por todo lo que hemos pasado juntas.

A Lorena, por ser la tía.

A mis niños, Mónica, Gerard y Núria, por orden de aparición, que son todos geniales. Y a Jordi C., que aunque no sea del grupo fucsia lo queremos igual.

A Iván, que casi es del laboratorio.

A los del laboratorio 2: Montse B., Montse R., M^a Elena, Mirle, José,...

A Pilar y Joan, for they excellent technical assistance y por todo lo demás que no es poco.

A los de reciente aparición: Marc, René y Anna.

A todos los profesores de prácticas de Microbiología, Marc, Olga, Maira, Toni, Esther, Raquel, Ana,... Y a Nuria y a Lidia, por las prisas.

A Conchi y a Julia.

A Toda la gente del Dpt. de Genética de la Universidad de Murcia, en especial al Dr. Francisco Murillo, por permitir que trabajara allí y tratarme como uno más de los miembros de su grupo, a la Dra. Marta Fontes, por ser como es y por toda su ayuda con *Myxococcus*. Y a Yogui por no hacerme sentir como una extraña estando lejos de casa.

A toda mi familia.

A Sergi, por apoyarme en todo momento de forma incondicional.

En último lugar, pero no menos importante querría agradecer a mis padres todo el esfuerzo que han hecho para que yo pudiera realizar mi sueño. Por haber hecho de mi lo que soy, por tener fe ciega, por ayudarme, por entenderme, por ser así, por todo.

RESUMEN

El eje central de la presente Tesis Doctoral ha sido la conexión existente entre la capacidad infectiva de *Salmonella typhimurium* y el mantenimiento de sus concentraciones intracelulares óptimas de hierro y zinc.

El estudio de la relación entre el hierro y la virulencia se realizó mediante la construcción y caracterización de un mutante *fur*. La proteína Fur es el regulador de los sistemas vinculados con la captación, transporte y almacenamiento de este elemento. La desregulación de estos sistemas en la cepa mutante provoca el aumento de la concentración intracelular de Fe²⁺ libre, lo que incrementa la actividad de algunas enzimas como la 3',5'-cAMP fosfodiesterasa codificada por el gen *cpdA*. Este hecho determina una disminución de la concentración de cAMP intracelular y, por consiguiente, una reducción de aquellos genes y regulones que están bajo el control del complejo CRP-cAMP, entre los que se encuentra el sistema de síntesis y ensamblaje de flagelos. Así mismo, se ha demostrado que existe una vinculación adicional entre la proteína Fur y la síntesis flagelar a través del control por parte de ésta del promotor *flhDC*, conocido también como *master operon*, y que se encuentra en la cúspide de la cascada de activación de todo el regulón. La reducción de la concentración intracelular de cAMP puede ser la causa de la menor virulencia de los mutantes *fur* cuando son inoculados intraperitonealmente en ratones BALB/c o Swiss.

La vinculación entre el zinc y la capacidad infectiva de *S. typhimurium* se abordó mediante la construcción de mutantes que tuvieran afectado el gen *zur*, que codifica el regulador transcripcional relacionado con este elemento, o el gen *znuC*, que forma parte de un sistema de transporte de alta afinidad. En el primer caso, cuando los sistemas de transporte de zinc de la cepa mutante están desregulados, se observa un ligero descenso de la capacidad infectiva cuando se inocula por vía intraperitoneal dicho mutante en ratones BALB/c. Sin embargo, es la inactivación del sistema de alta afinidad la que comporta una reducción más drástica de la virulencia de la cepa cuando se inocula ya sea por vía oral o intraperitoneal en el huésped. De acuerdo con estos datos, la cepa *ZnuC*⁻ es excluida por la salvaje a lo largo del proceso infectivo cuando se lleva a cabo una inoculación conjunta con ambas.

Finalmente, y mediante la construcción de una cepa *mutS* de *S. typhimurium* así como de otra portadora de un plásmido con los genes *umuDC* de *Escherichia coli*, se ha comprobado que el incremento de la frecuencia de mutagénesis, tanto espontánea como

inducida, no confiere una ventaja selectiva a lo largo del proceso infeccioso. En concordancia con ello, también se ha podido constatar que el DNA de las células de *S. typhimurium* no sufre un nivel de lesiones lo suficientemente elevado como para inducir el sistema de reparación de emergencia durante la infección.

Los artículos que se adjuntan en los anexos I, II y III de la presente memoria de Tesis Doctoral contienen los resultados en los que se basa este trabajo.

Anexo I: Campoy, S., A. M. Pérez de Rozas, J. Barbé e I. Badiola. 2000. Virulence and mutation rates of *Salmonella typhimurium* strains with increased mutagenic strength in a mouse model. FEMS Microbiol. Lett. 187:145-150

Anexo II: Campoy, S., M. Jara, N. Busquets, A. M. Pérez de Rozas, I. Badiola y J. Barbé. 2002. Intracellular cyclic AMP concentration is decreased in *Salmonella typhimurium fur* mutants. Microbiology 148:1039-1048

Anexo III: Campoy, S., M. Jara, N. Busquets, A. M. Pérez de Rozas, I. Badiola y J. Barbé. 2002. Role of the high-affinity zinc uptake *znuABC* system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. Infect. Immun. 70:4721-4725.

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 1.1. EL HIERRO | 5 |
| 1.1.1. Sistemas de los organismos superiores para limitar la concentración de hierro libre..... | 5 |
| 1.1.1.1. Las transferrinas | 6 |
| 1.1.1.2. La ferritina | 7 |
| 1.1.1.3. El grupo hemo | 9 |
| 1.1.1.4. La proteína Nramp1 | 10 |
| 1.1.2. Mecanismos bacterianos de captación de hierro | 11 |
| 1.1.2.1. Captación directa de hierro..... | 12 |
| 1.1.2.2. Captación de hierro mediante sideróforos | 12 |
| 1.1.2.2.1 Función de los sideróforos..... | 12 |
| 1.1.2.2.2 Tipos de sideróforos | 14 |
| 1.1.2.2.3 Internalización de sideróforos en bacterias Gram negativas | 17 |
| 1.1.2.2.3.1 El papel del sistema TonB..... | 17 |
| 1.1.2.2.3.2 La entrada al citoplasma o al espacio periplasmático..... | 19 |
| 1.1.2.2.4 Internalización en bacterias Gram positivas..... | 20 |
| 1.1.2.2.5 Internalización y reducción de Fe ³⁺ y Fe ²⁺ | 20 |
| 1.1.2.2.6 Las ferritinas bacterianas y las bacterioferrinas | 21 |
| 1.1.2.3. Receptores de transferrinas..... | 23 |
| 1.1.2.3.1 Receptores de hemoproteínas | 24 |
| 1.1.2.3.1.1 Sistemas de unión a hemoproteínas dependientes de TonB | 25 |
| 1.1.2.3.1.2 Captación del grupo hemo mediante factores solubles | 25 |
| 1.1.3. Control genético de los sistemas de captación de hierro en bacterias | 26 |
| 1.1.3.1. La proteína Fur | 26 |
| 1.1.3.1.1 Estructura de la proteína Fur | 26 |
| 1.1.3.1.2 La caja FUR..... | 30 |
| 1.1.3.1.3 Sistemas de detección de genes regulados por Fur | 31 |
| 1.1.3.1.4 Genes regulados por Fur..... | 34 |
| 1.1.3.2. La proteína DtxR | 38 |

| | | |
|---------------|--|----|
| 1.1.3.3. | La proteína PerR..... | 39 |
| 1.1.3.4. | La proteína Irr..... | 39 |
| 1.1.4. | Tratamientos antibacterianos basados en los sistemas de captación de hierro..... | 40 |
| 1.2. | EL ZINC..... | 41 |
| 1.2.1. | Disponibilidad de zinc en los organismos superiores..... | 41 |
| 1.2.2. | Control de la concentración de zinc en bacterias..... | 42 |
| 1.2.2.1. | Mecanismos de transporte de zinc en bacterias..... | 42 |
| 1.2.2.1.1 | Sistemas de captación de zinc..... | 43 |
| 1.2.2.1.1.1 | Mecanismos de transporte específico de alta afinidad..... | 43 |
| 1.2.2.1.1.1.1 | Transportadores del tipo ABC..... | 43 |
| 1.2.2.1.1.1.2 | Transportadores del tipo ZIP..... | 44 |
| 1.2.2.1.1.2 | Mecanismos de baja afinidad..... | 44 |
| 1.2.2.1.1.3 | Mecanismos de bombeo de zinc..... | 45 |
| 1.2.2.1.1.3.1 | La ATPasa ZntA..... | 45 |
| 1.2.2.1.1.3.2 | El sistema ZitB..... | 46 |
| 1.2.2.2. | Regulación de la captación de zinc en bacterias..... | 46 |
| 1.2.2.2.1 | La proteína Zur..... | 47 |
| 1.2.2.2.2 | Otros reguladores de la concentración intracelular de zinc..... | 49 |
| | i) ZntR..... | 50 |
| | ii) SmtB..... | 50 |
| | iii) ZiaR..... | 50 |
| 1.3. | EL MANGANESO..... | 50 |
| 1.3.1. | Importancia del manganeso en bacterias..... | 50 |
| 1.3.2. | Sistemas de transporte del manganeso..... | 51 |
| 1.3.2.1. | Sistemas de transporte del tipo ABC..... | 51 |
| 1.3.2.2. | Sistemas de transporte de tipo NRAMP..... | 52 |
| 1.3.3. | Regulación del transporte de manganeso..... | 53 |
| 1.3.3.1. | La proteína MntR..... | 53 |
| 1.3.3.2. | Otros reguladores del transporte de manganeso..... | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 1.3.4. Papel del manganeso en el control de patógenos en los fagosomas de macrófagos..... | 55 |
| 1.4. OBJETIVOS..... | 56 |
| 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 59 |
| 2.1 RELACIÓN ENTRE LA TASA DE MUTAGÉNESIS Y LA VIRULENCIA EN <i>S. typhimurium</i> | 59 |
| 2.1.1. Análisis de la ventaja selectiva de mutantes de <i>S. typhimurium</i> con una tasa espontánea de mutagénesis incrementada durante la infecciones en ratón | 60 |
| 2.1.1.1. Construcción de un mutante con una tasa de mutagénesis espontánea incrementada..... | 60 |
| 2.1.1.2. Virulencia del mutante <i>mutS</i> | 61 |
| 2.1.1.3. Comparación de la virulencia de la cepa salvaje y la mutante <i>mutS</i> en infecciones conjuntas..... | 62 |
| 2.1.2. Valoración de la ventaja selectiva aportada por los genes <i>umuDC</i> | 63 |
| 2.1.2.1. Construcción de una cepa de <i>S. typhimurium</i> portadora de un plásmido multicopia que contiene los genes <i>umuDC</i> | 63 |
| 2.1.2.2. Virulencia de la cepa de <i>S. typhimurium</i> portadora del plásmido pRW30..... | 64 |
| 2.1.2.3. Comparación de la capacidad infectiva de la cepa salvaje con las portadoras de los genes <i>umuDC</i> de <i>E. coli</i> mediante inoculaciones conjuntas..... | 64 |
| 2.1.3. Análisis de la mutagénesis a lo largo del proceso infectivo | 65 |
| 2.2. Caracterización de un mutante <i>fur</i> de <i>S. typhimurium</i> | 66 |
| 2.2.1. Obtención de un mutante <i>fur</i> | 67 |
| 2.2.1.1. Aislamiento del gen <i>fur</i> | 67 |
| 2.2.1.2. Construcción del mutante <i>fur</i> | 67 |
| 2.2.1.3. Estudio de las proteínas de membrana externa del mutante <i>fur</i> | 68 |
| 2.2.2. Expresión del regulón flagelar de <i>S. typhimurium</i> en el mutante <i>fur</i> | 69 |
| 2.2.2.1. Estudio de la expresión de genes de los diferentes niveles del regulón flagelar | 71 |

| | |
|---|----|
| 2.2.3. Relación entre el gen <i>fur</i> y el AMP cíclico | 72 |
| 2.2.3.1. Concentración de cAMP intracelular en el mutante <i>fur</i> de <i>S. typhimurium</i> | 73 |
| 2.2.4. Importancia de la 3',5'-cAMP fosfodiesterasa en el comportamiento del mutante <i>fur</i> | 74 |
| 2.2.4.1. Construcción de un mutante <i>cpdA</i> | 75 |
| 2.2.4.2. Concentración intracelular de cAMP en el doble mutante <i>fur cpdA</i> | 75 |
| 2.2.5. Comportamiento de los promotores regulados por cAMP en el doble mutante <i>cpdA fur</i> de <i>S. typhimurium</i> ATCC14028..... | 76 |
| 2.2.6. Virulencia del mutante <i>fur</i> | 78 |
| 2.2.7. Análisis de la producción de la flagelina FljB en el mutante <i>fur</i> | 80 |
| 2.2.7.1. Estudio de las proteínas de membrana externa del mutante <i>fur</i> en función de la fase flagelar expresada..... | 81 |
| 2.2.7.2. Determinación del grado de expresión del gen <i>fljB</i> en el mutante <i>fur</i> | 82 |
| 2.3. Importancia del sistema de captación de zinc en la virulencia de <i>S. typhimurium</i> ATCC14028 | 83 |
| 2.3.1. Caracterización de mutantes <i>zur</i> y <i>znuCB</i> de <i>S. typhimurium</i> | 84 |
| 2.3.1.1. Construcción de un mutante <i>zur</i> | 84 |
| 2.3.1.2. Construcción de un mutante <i>znuC</i> | 85 |
| 2.3.2. Caracterización del mutante <i>zur</i> | 87 |
| 2.3.2.1. Patrón de expresión de los genes <i>znuC</i> y <i>zur</i> | 87 |
| 2.3.2.2. Comparación de las características de los mutantes <i>zur</i> y <i>fur</i> | 88 |
| 2.3.2.3. Virulencia del mutante <i>zur</i> | 89 |
| 2.3.2.3.1 Comportamiento en el interior de las células del huésped | 89 |
| 2.3.2.3.2 Dosis letal del mutante <i>zur</i> | 89 |
| 2.3.3. Caracterización del mutante <i>znuC</i> | 90 |
| 2.3.3.1. Estudio del crecimiento en ausencia de zinc | 90 |
| 2.3.3.2. Expresión de la unidad transcripcional <i>znuCB</i> | 91 |
| 2.3.3.3. Virulencia del mutante <i>znuC</i> | 91 |
| 2.3.3.3.1 Comportamiento en el interior de las células del huésped | 91 |

| | |
|---|------------|
| 2.3.3.3.2 Dosis letal del mutante <i>znuC</i> | 92 |
| 3. CONCLUSIONES | 94 |
| 4. BIBLIOGRAFÍA | 96 |
| 5. ANEXOS | 121 |

Anexo I: Campoy, S., A. M. Pérez de Rozas, J. Barbé e I. Badiola. 2000. Virulence and mutation rates of *Salmonella typhimurium* strains with increased mutagenic strength in a mouse model. FEMS Microbiol. Lett. 187:145-150

Anexo II: Campoy, S., M. Jara, N. Busquets, A. M. Pérez de Rozas, I. Badiola y J. Barbé. 2002. Intracellular cyclic AMP concentration in decreased in *Salmonella typhimurium fur* mutants. Microbiology 148:1039-1048

Anexo III: Campoy, S., M. Jara, N. Busquets, A. M. Pérez de Rozas, I. Badiola y J. Barbé. 2002. Role of the high-affinity zinc uptake *znuABC* system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. Infect. Immun. 70:4721-4725

1.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los cationes metálicos como el Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} o Cd^{2+} , son oligoelementos esenciales para el crecimiento de todos los organismos. Muchos de ellos participan como cofactores en procesos enzimáticos o forman parte de estructuras anatómicas celulares. Sin embargo, una elevada concentración de estos elementos puede tener efectos deletéreos o incluso letales sobre las células, ya sea por inhibición de ciertos procesos metabólicos (como por ejemplo la respiración anaeróbica) o por acumulación de radicales libres generados en los procesos de reducción en los que participan. Por ello es fundamental que las células no sobrepasen la concentración intracelular a partir de la cual un determinado catión metálico resulta ser tóxico. Este control puede realizarse mediante dos procesos no excluyentes: el control preciso de la incorporación del catión y el bombeo de éste al exterior celular cuando se encuentre en exceso. Con esta finalidad, los organismos han ido desarrollando mecanismos específicos de captación así como sistemas de excreción. Obviamente, todos estos procesos deben estar perfectamente coordinados entre sí, y con las condiciones del entorno, por lo que, no sólo implican proteínas que realizan funciones concretas, sino también reguladores que controlan la expresión de éstas según las necesidades celulares.

Por otra parte, y desde la óptica de los organismos superiores, la necesidad de la adquisición de dichos cationes por parte de los microorganismos puede ser utilizada como mecanismo de defensa inespecífico frente al desarrollo de procesos infectivos. En este capítulo, llevaremos a cabo un breve repaso de las principales estrategias que los organismos superiores utilizan para limitar la accesibilidad de estos cationes a los microorganismos así como de los diversos procedimientos mediante los que estos últimos intentan sabotear esos sistemas genéricos de defensa.

Esta breve introducción se centrará en tres de estos elementos esenciales, el hierro, el zinc y el manganeso, que son, en este orden y hasta el momento, los más estudiados y de los que se dispone más información sobre los sistemas relacionados con su transporte, acumulación y regulación.

1.1. El hierro

1.1.1. Sistemas de los organismos superiores para limitar la concentración de hierro libre

De todos los cationes metálicos mencionados, es con toda seguridad el metabolismo del hierro el que más se conoce, tanto en lo que hace referencia a sus aspectos bioquímicos, como a su transporte y almacenamiento.

De hecho, el hierro es el elemento más controlado dentro del huésped, prácticamente no se halla en forma libre, gracias a la existencia de una serie de moléculas encargadas de retenerlo, tanto para facilitar sus diferentes funciones celulares en el organismo como para dificultar que los microorganismos dispongan de él (Fig. 1.1)(Kingsley et al. (1995)). La cantidad de hierro total presente en el organismo se encuentra mayoritariamente formando parte del grupo hemo, dando lugar a hemoproteínas, como la hemoglobina (que representaría un 65% del hierro total), la mioglobina (que representaría un 4%), diversos compuestos que controlarían los procesos de oxidación intracelular (aglutinando un 1% del hierro global) como los citocromos, alrededor del 0.1% se encontraría en forma de transferrina en el plasma sanguíneo y del orden del 15 al 30% se hallaría almacenado en forma, principalmente, de ferritina o a veces también como hemosiderina, en las células reticuloendoteliales y en los hepatocitos (Guyton (1994)).

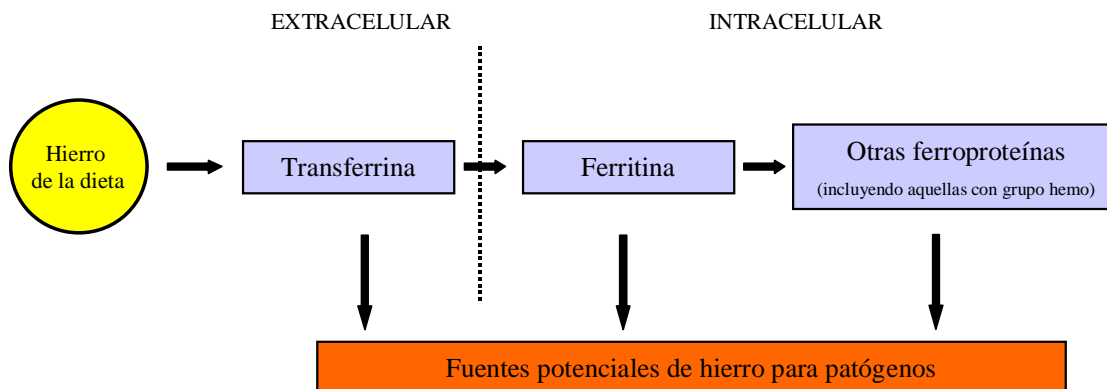


Fig. 1.1. Esquema general de la entrada y distribución del hierro en el interior de mamíferos (Tomado de Ratledge et al. (2000))

A continuación se describirán brevemente las principales características de dichas proteínas.

1.1.1.1. Las transferrinas

Los organismos superiores incorporan el hierro a través de la dieta. Este elemento se absorbe a su paso por el intestino delgado. Básicamente, el hígado secreta, en la bilis, cantidades moderadas de una globulina beta denominada apotransferrina que presenta una elevada afinidad por este ión. La combinación de ambos da lugar a la transferrina, que es reconocida por receptores específicos de las células de la mucosa intestinal, siendo trasvasada al torrente sanguíneo (Aisen (1998)).

Las transferrinas son un grupo ubicuo de proteínas, presentes en todos los vertebrados, y que presentan como característica esencial una elevada afinidad por Fe^{3+} (su constante de disociación es del orden de 10^{-23} M) (Baker et al. (1994)). Existen distintas variantes, todas con estructura análoga, como por ejemplo la serotransferrina (que se encuentra en el plasma), la lactoferrina o lactotransferrina (que se halla en la mayoría de los fluidos extracelulares como la leche, las lágrimas, saliva o fluidos gastrointestinales) o la ovotransferrina o conalbúmina (presente en los huevos) (Baker et al. (1994)). Las diversas transferrinas pueden llevar a cabo diferentes funciones. Así, mientras la serotransferrina se encarga básicamente del transporte de Fe^{3+} vía plasma siendo captada a través de receptores específicos por aquellas células que lo necesitan, la ovotransferrina y la lactotransferrina son quelantes de hierro, actuando, al disminuir la disponibilidad de hierro libre, como agentes antimicrobianos (Yang et al. (2000)).

El tamaño de estas proteínas es de unos 80.000 Da, no poseen estructura cuaternaria y se caracterizan por presentar dos lóbulos unidos a través de un péptido “puente” (Ratledge et al. (2000)). Cada uno de estos lóbulos presenta dos dominios, similares pero no iguales, que facilitan la unión del Fe^{3+} (Yang et al. (2000)). Los átomos de éste se unen a una estructura octaédrica que agrupa en un punto residuos aminoacídicos como Asp, la Tyr y la His que conforman un entorno ideal para dicha unión. La cesión del hierro por parte de las transferrinas es un proceso dependiente de pH y de la presencia de un receptor específico, ambos factores son necesarios para la rotación y apertura de los dominios proteicos y la

subsiguiente transferencia de este elemento para ser incorporado al interior celular (Bailey et al. (1998)).

Sin embargo, la característica más destacable de este grupo de proteínas es que, a pesar de presentar una gran afinidad por el hierro, prácticamente nunca se encuentran saturadas por este metal (Aisen (1998)). De hecho, por ejemplo, solamente una novena parte de las moléculas de transferrina que circulan por la sangre tienen todos los posibles lugares de unión a hierro ocupados; cuatro novenas partes contienen la mitad de todo el hierro que podrían unir y el resto se encuentra en forma de apotransferrina (es decir, sin hierro). En resumen, tan solo un tercio de los posibles puntos de unión a Fe^{3+} de las transferrinas que circulan por sangre está ocupado (Aisen (1998)). Esta característica permite que, si existe un aumento repentino de la concentración de hierro libre en el medio, éste pueda ser captado rápidamente, manteniéndose así siempre una concentración de hierro libre muy escasa. Este mecanismo de secuestro juega un papel importante dentro de los mecanismos de defensa del huésped frente a posibles infecciones. De hecho, se sabe que el suministro de hierro a pacientes con infecciones puede empeorar su patología (De Voss et al. (1999)). De acuerdo con ello, estudios recientes han demostrado que la inoculación de hierro exógeno potencia las infecciones experimentales de microorganismos como *Aeromonas spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Neisseria spp.*, *Pasteurella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Vibrio spp.*, *Yersinia spp.*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium tuberculosis* (De Voss et al. (1999), Achenbach et al. (1997)).

1.1.1.2. La ferritina

La ferritina se encarga del almacenamiento del hierro e, igual que pasaba con la transferrina, es una proteína presente en muchos organismos (animales, plantas, hongos y bacterias) (Theil (1987)). La ferritina almacena hierro en el interior de las células, de forma que éste se encuentra disponible, en forma soluble, para usarse cuando el metabolismo celular lo requiera (Harrison et al. (1996)). Pero además de mantener la homeóstasis celular para este metal, la ferritina también tiene un efecto protector sobre las células, pues almacena el hierro en una forma inocua evitando que tome partido en reacciones que podrían dar lugar a la formación de radicales libres (Chasteen et al. (1999)).

acumula en forma de hemosiderina como complejos de fosfato o hidróxido, aunque en esta forma es más difícil de volver a poner en circulación en caso de necesidad (Kingsley et al. (1995)).

1.1.1.3. El grupo hemo

Aunque las monedas de cambio del metabolismo del hierro sean fundamentalmente la transferrina y la ferritina, la mayor cantidad del hierro presente en el organismo está asociado al grupo prostético hemo, que forma parte de las denominadas hemoproteínas (Guyton (1994)). Entre ellas se encuentran:

- i) La hemoglobina, que es la más importante y abundante de todas ellas. Encargada del transporte de oxígeno, y puede llegar a contener un 65% del hierro total del organismo.
- ii) Los citocromos (citocromo *c* oxidasa, b/b6, b5, c554, f, cd, etc), que se encuentran en las mitocondrias y en el retículo endoplasmático, y que participan en las reacciones de transferencia de electrones.
- iii) Las catalasas y peroxidasas, que son enzimas encargadas de la protección celular frente a las especies químicas potencialmente dañinas generadas en las reacciones de oxidación en las que participa, entre otros sustratos, el peróxido de hidrógeno.

Desde un punto de vista químico, el grupo hemo forma parte del conjunto de compuestos que recibe el nombre de porfirinas (Lehninger et al. (1993)). Una parte de la síntesis de este grupo prostético tiene lugar en las mitocondrias, donde empieza y acaba el proceso, y la otra en el retículo endoplasmático. En todo caso, es en el espacio mitocondrial donde se añade el hierro, proceso que da lugar a la estructura final del grupo hemo (Fig. 1.3)

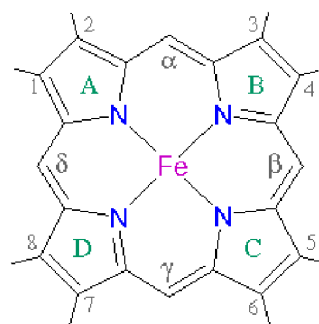


Fig. 1.3. Anillo característico del grupo hemo donde se inserta el átomo de hierro

La síntesis de este compuesto es complicada y requiere un gasto energético importante, por eso, al menos en los mamíferos, este grupo prostético puede ser directamente incorporado a partir de la dieta, existiendo receptores específicos en la membrana de la mucosa intestinal que lo reconocen e internalizan (Guyton (1994)).

1.1.1.4. La proteína Nramp1

El hierro no sólo está relacionado con los mecanismos de defensa del huésped de forma indirecta gracias a su secuestro, sino que también puede tener un efecto directo contra posibles patógenos (Ratledge et al. (2000)). Por esta razón, se ha incluido en este apartado la proteína Nramp1, que si bien no forma específicamente parte de los sistemas de almacenamiento de hierro, sí que parece desempeñar un papel fundamental en la defensa del huésped frente a las infecciones bacterianas (Wardrop et al. (1999)).

Los macrófagos son células involucradas en los mecanismos de defensa, pero, además, son también la diana de diversos patógenos intracelulares, como *Salmonella typhimurium*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium* o *Leishmania* spp. que pueden subsistir en su interior una vez han sido fagocitados (Ratledge et al. (2000)).

Los macrófagos presentan una tasa de adquisición de hierro, vía transferrina, más elevada que la mayoría de las células del huésped, debido, parece ser, a la producción de Nramp1 (Cellier et al. (1996)). Ésta es una proteína anclada en la membrana (contiene 12 dominios transmembrana) que cuando se encuentra en forma activa aumenta la cantidad de hierro intracelular (Ratledge et al. (2000)). Este exceso de hierro se utiliza para la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (vía reacciones de Fenton, Fig. 1.4) que pueden ser generadas en múltiples procesos metabólicos, como por ejemplo durante la síntesis de óxido nítrico (Miller et al. (1997)).

Los iones hidroxilo obtenidos en esta reacción son rápidamente introducidos en el fagosoma, donde pueden atacar a los microorganismos que han sido fagocitados.

El papel de Nramp1 en este tipo de defensa contra patógenos intracelulares parece ser importante al menos en los primeros estadios de la infección. Por ejemplo, se sabe que una mutación puntual en un lugar concreto de su cadena aminoacídica puede dar lugar a sensibilidad, en ratones, a la infección por *M. avium* (Govoni et al. (1996)). Así mismo, se ha descrito, aunque no en todos los casos, una correlación entre personas que tienen mayor

susceptibilidad a contraer tuberculosis y la presencia de alteraciones en la proteína Nramp1 (Govoni et al. (1996)).

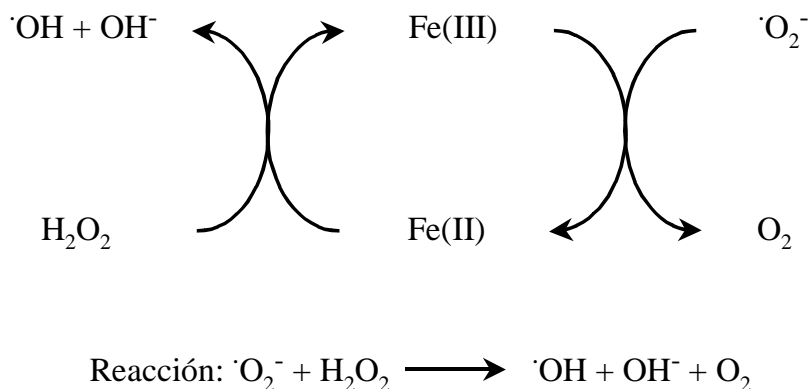


Fig. 1.4. Reacciones químicas que dan lugar a radicales libres de oxígeno. La reacción completa se conoce como ciclo de Haber-Weiss. El radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) puede producirse en los tejidos del huésped como consecuencia de distintas reacciones, como las que tienen lugar mediante las óxido-nítrico sintetasas, pero es el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) el que se considera potencialmente biotóxico. La parte izquierda del ciclo es la que se conoce típicamente como reacción de Fenton (Tomado de Ratledge et al. (2000)).

Los patógenos, intentan, a su vez, defenderse de esta agresión con una batería enzimática basada en la síntesis sobretodo de catalasas, peroxidasas y alquilperóxido reductasas, que les permiten la supervivencia en el interior del macrófago (Tsolis et al. (1995)). De hecho, éste no es un mecanismo exclusivo para poder sobrevivir al ataque directo en el interior de los macrófagos, sino que los microorganismos patógenos son capaces de generar radicales hidroxilo, que no parecen dañar su integridad pero sí a los tejidos del huésped, aumentando además la respuesta inflamatoria (Ratledge et al. (2000)), incrementándose así el número de macrófagos en el lugar de la infección.

1.1.2. Mecanismos bacterianos de captación de hierro

A pH neutro la concentración de Fe^{3+} viene marcada por la constante de solubilidad del hidróxido férrico, no siendo ésta mayor de 10^{-18}M , lo que comporta que la concentración de Fe^{3+} en solución sea extremadamente baja (Kingsley et al. (1995)). Se

estima que la concentración mínima de hierro para el crecimiento bacteriano óptimo es de, en general, 1 μM (Neilands (1995)). Por lo tanto, la escasa disponibilidad de hierro hace que este elemento actúe como factor limitante para el desarrollo de la mayoría de microorganismos. Debido a su importancia en el metabolismo, los microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos para la captación eficiente de dicho metal. En especial los microorganismos patógenos, ya que para ellos, la escasez de hierro en el medio se ve acentuada por la presencia, como hemos citado anteriormente, de proteínas específicas sintetizadas por el huésped encargadas de la adquisición, transporte y almacenamiento de dicho elemento. De esta forma se establece una competencia entre los mecanismos del patógeno y los del huésped (Ratledge et al. (2000)).

1.1.2.1. Captación directa de hierro

Algunos microorganismos anaeróbicos, como *Clostridium perfringens*, son capaces de captar hierro creando a su alrededor un microambiente de pH más ácido. En este ambiente reductor, se favorece la aparición de especies químicas más solubles, formadas por Fe^{2+} , además de facilitar la liberación de este metal por parte de proteínas del huésped como la transferrina o la lactoferrina (Neilands (1995)). La captación de hierro mediante esta estrategia parece involucrar un sistema de transporte activo en el que intervienen proteínas como FeoA y FeoB descritas también en anaeróbicos facultativos como *S. typhimurium* o *E. coli* (Ratledge et al. (2000)).

1.1.2.2. Captación de hierro mediante sideróforos

1.1.2.2.1 Función de los sideróforos

Además del mecanismo descrito anteriormente, usado por algunas bacterias anaeróbicas estrictas o facultativas, uno de los sistemas de captación de Fe^{3+} más extendido en el mundo microbiano es el uso de los denominados sideróforos (Ratledge et al. (2000)).

Los sideróforos (del griego *sideros phoros* “portadores de hierro”) son moléculas de bajo peso molecular sintetizadas por bacterias, levaduras y hongos, que actúan como agentes quelantes específicos para el Fe^{3+} y que ven normalmente incrementada su síntesis cuando el microorganismo se encuentra en un entorno pobre en dicho metal (Ratledge et al. (2000)).

La característica principal de este tipo de moléculas es que presentan una elevada constante de disociación del hierro, oscilando entre 10^{22} y 10^{55} . Esta afinidad tan elevada, a parte de facilitarles la captación de este metal presente en compuestos como el hidróxido férrico, les permite también arrancar los átomos de éste unidos a proteínas del huésped como la transferrina (con constante de disociación de 10^{23}) o la ferritina (Fig. 1.5) (Neilands (1995)).

Las concentraciones relativamente bajas de sideróforos que se hallan en los tejidos infectados ponen de manifiesto que su síntesis se halla fuertemente regulada, de forma que en el momento que los ferrisideróforos son interiorizados, la escasez de hierro para la bacteria disminuye y, por lo tanto, se bloquea su síntesis (Ratledge et al. (2000)). Además, y una vez ha tenido lugar la transferencia del hierro captado en el interior celular, los sideróforos pueden ser reciclados y exportados de nuevo al exterior, iniciándose otra vez el ciclo de captación y manteniéndose niveles constantes de adquisición sin necesidad de sintetizar nuevas moléculas.

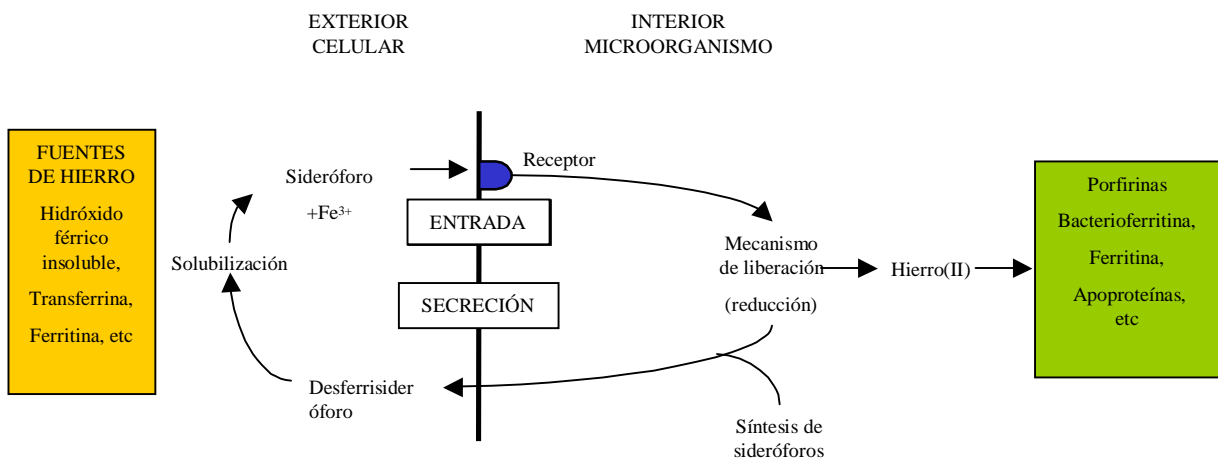


Fig. 1.5. La síntesis de sideróforos se ve incrementada cuando los microorganismos que los producen se hallan en un ambiente que presenta escasez de hierro. En estas condiciones se excretan al exterior, donde pueden captar el Fe^{3+} de las fuentes existentes en el huésped. Una vez formado el complejo, estos ferrisideróforos son reconocidos por receptores específicos de la pared celular bacteriana que, a través de un sistema activo, los introducen al interior. Una vez allí el Fe^{3+} es reducido a Fe^{2+} que interacciona con distintas proteínas para su uso como cofactor o para ser almacenada para su posterior utilización (Tomado de Ratledge et al. (2000)).

Por otra parte, también se ha descrito que una vez en el interior de las células del huésped, los patógenos intracelulares como *Salmonella spp.* no necesitan los sistemas específicos de captación de hierro. De hecho, la concentración de hierro presente en las vacuolas es lo suficientemente alta como para inhibir la expresión de dichos sistemas específicos. En ese ambiente, ciertos metabolitos primarios de la bacteria, pero también de la célula huésped, como α -keto y los α -hidroxiácidos, son esenciales para la captación de hierro y en consecuencia para la proliferación del patógeno en el interior celular (Kingsley et al. (1995)).

1.1.2.2 Tipos de sideróforos

Existen muchos tipos de sideróforos descritos. En la Tabla 1.1 y la Fig. 1.6 se presenta respectivamente una pequeña relación de los más bien caracterizados para algunas bacterias patógenas así como la estructura química de algunos de ellos.

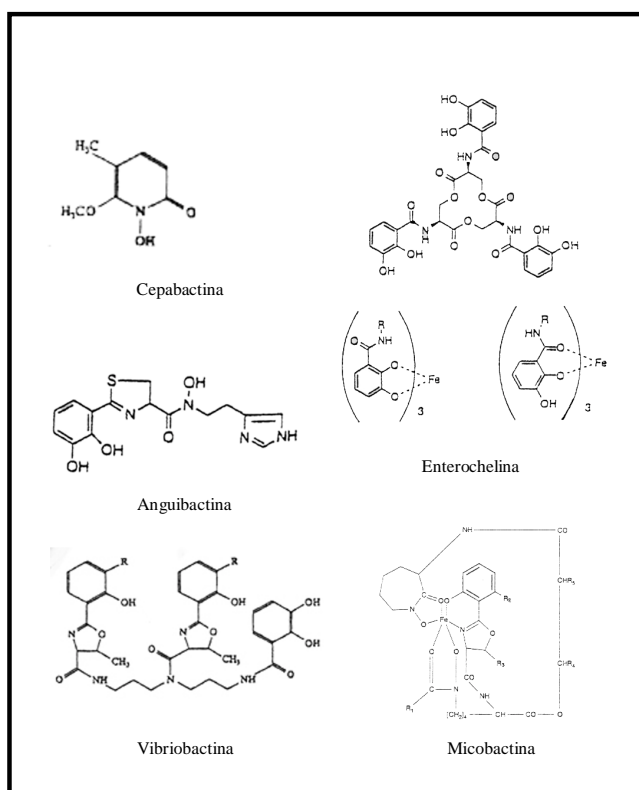


Fig. 1.6. Estructura de distintos sideróforos

Tabla 1.1. Sideróforos de microorganismos patógenos

| Microorganismo | Sideróforo producido | referencia |
|--|---|--|
| <i>Yersinia spp</i> | yersiniabactina | Perry et al. (1999) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burkholderia cepacia</i> | piochelina pioverdina o pseudobactina ornitina cepabactina ácido salicílico | Persmark et al. (1991), Meyer et al. (1989) |
| <i>Vibrio cholerae</i> <i>V. anguillarum</i> <i>V. vulnificus</i> <i>V. fluvialis</i> | vibriobactina anguibactina vulnibactina fluvibactina | Henderson et al. (1994), Okujo et al. (1994), Yamamoto et al. (1993) |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>M. leprae</i> <i>M. avium</i> | sideróforos intracelulares: micobactinas sideróforos extracelulares: exochelinas carbomicobactinas | De Voss et al. (2000), Ratledge et al. (2000) |
| <i>Nocardia</i> | sideróforos intracelulares: nocobactina formobactina sideróforos extracelulares: exochelinas carbomicobactinas | Murakami et al. (1996), Ratledge et al. (2000) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | staphyloferrina A staphyloferrina B aureochelina | Konetschny-Rapp et al. (1990), Courcol et al. (1997) |
| <i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i> | enterochelina o enterobactina aerobactina | Ratledge et al. (2000), Kingsley et al. (1995) |
| <i>Aeromonas spp</i> | amonabactina | Barghouthi et al. (1989) |

Cabe destacar el caso de los sideróforos (citados en la Tabla 1.1) producidos por *Mycobacterium* o *Nocardia* que pueden clasificarse en dos tipos, unos intracelulares (al parecer anclados en la membrana citoplasmática) y otros extracelulares o exochelinas, que permiten la captación del hierro de las distintas fuentes del huésped (De Voss et al. (1999)). La necesidad de la existencia de estos sideróforos intracelulares podría deberse a la gruesa envoltura lipoproteica que presentan estas especies bacterianas en su pared (De Voss et al. (1999)).

En el caso de las Enterobacterias, la mayoría de sus miembros sintetizan enterobactina o enterochelina (Kingsley et al. (1995)). Este sideróforo presenta una de las constantes de disociación para hierro más elevadas (10^{52}), pudiendo arrancarlo fácilmente de la transferrina. Algunas cepas de *E. coli*, *Shigella flexneri*, *K. pneumoniae* o *Salmonella spp.* son capaces de sintetizar un segundo sideróforo (normalmente codificado en megaplásmidos) conocido como aerobactina. Este quelante presenta una constante de disociación (del orden de 10^{25}) muy parecida a la de las transferrinas y parece usarse preferencialmente para la obtención de hierro de otras fuentes distintas del huésped, como la ferritina, presente en el interior de las células de éste (Ratledge et al. (2000)).

Existen bacterias capaces de utilizar no sólo los sideróforos que ellas sintetizan sino también los producidos por otras especies bacterianas e incluso por hongos. Aunque es *Salmonella* el microorganismo más conocido que utiliza xenosideróforos (Tabla 1.2) (Kingsley et al. (1995)), muchas otras especies bacterianas pueden usarlos. Así por ejemplo, *E. coli* puede incorporar el hierro quelado por ferricromos, coprógeno o por el ácido rodotorúlico, y seguramente ferroxiamina B (Ratledge et al. (2000)), todos ellos sintetizados por hongos o *Staphylococcus aureus* que también usa enterobactina, igual que *V. cholerae* (Morrissey et al. (2000), Wyckoff et al. (1997)).

Tabla 1.2. Esquema de los sideróforos y xenosideróforos usados por cepas de *Salmonella*

| Sideróforos que pueden ser usados por cepas de <i>Salmonella</i> | | |
|---|--|---|
| Endógenos | Exógenos o Xenosideróforos | |
| | Tipo | Organismo productor |
| enterobactina aerobactina (según cepa) ácido 2,3-dibenzóico 2,3-dihidroxibenzoilserina ácido α -ketoisocarpoico ácido α -hidroxiiisovalérico | Myxochelina | Myxobacterias |
| | Amonabactina | <i>Aeromonas spp</i> |
| | Ferricromo | Hongos |
| | Ferricosina | Hongos |
| | Coprógeno | Hongos |
| | ferrioxamina B | <i>Streptomyces pylosus</i> |
| | ferrioxamina E | <i>Erwinia herbicola</i> |
| | ferrioxamina G | <i>Hafnia alvei</i> |
| | ácido 2,3-dibenzoico 2,3-hidroxibenzoilserina ácido α -ketoisocarpoico ácido α -hidroxiiisovalérico | Metabolitos producidos por muchos microorganismos e incluso por las células del huésped |

1.1.2.2.3 Internalización de sideróforos en bacterias Gram negativas

1.1.2.2.3.1 El papel del sistema TonB

La pared de las bacterias Gram negativas está compuesta por la membrana citoplasmática, el periplasma, donde encontramos la maraña del peptidoglicano, y la membrana externa. Este eficaz protector también es un impedimento para el intercambio de nutrientes y otros compuestos con el exterior. La presencia de porinas en la membrana externa facilita enormemente dicho intercambio, pero el tamaño del poro generado por estas estructuras proteicas no es suficiente para la importación de moléculas demasiado grandes (Moeck et al. (1998)). Tal es el caso de los ferrisideróforos, que requieren para su internalización la presencia de receptores específicos, los complejos sideróforo-receptor presentan constantes de disociación extremadamente pequeñas (del orden de $10^6 - 10^9$), permitiendo una eficiencia máxima de internalización a concentraciones muy bajas de ligando, diferenciándose claramente del transporte vía porinas (Moeck et al. (1998)).

El transporte a través de la membrana externa de moléculas asociadas a receptores de alta afinidad, como pueden ser los sideróforos (Wyckoff et al. (1997)) así como la

1.1.2.2.4 Internalización en bacterias Gram positivas

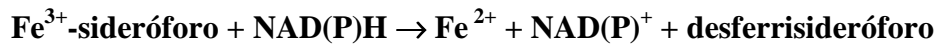
En comparación con las bacterias Gram negativas, los datos que se poseen sobre el transporte, internalización y biosíntesis de sideróforos en las especies Gram positivas son escasos. En estos microorganismos los trabajos realizados se han llevado a cabo fundamentalmente en *S. aureus* (staphyloferrina A o B, y aureochelina) y el uso de xenosideróforos como enterobactina (Morrissey et al. (2000)).

En este tipo de bacterias, y probablemente debido al tamaño relativamente pequeño de los sideróforos que producen, éstos pueden difundir libremente a través de la pared bacteriana, desde el interior celular hacia el medio externo (Ratledge et al. (2000)). Sin embargo, existen mecanismos de recepción específica anclados en la membrana citoplasmática. Se han descrito, por ejemplo, cuatro transportadores del tipo ABC para *S. aureus*, que presentan homología con proteínas involucradas en el transporte de hierro de bacterias Gram negativas (Morrissey et al. (2000)). Así, se ha caracterizado el operón *sirABC*; el transportador FhuABC (Xiong et al. (2000)) (también presente en *B. subtilis* y muy parecido al de *E. coli* (Howard et al. (2001)) , pese a que en este caso, el transportador FhuD tiene una especificidad más restrictiva que en Gram negativas al unirse exclusivamente a ferricromo); un posible transportador de hierro y manganeso (denominado SitABC (Janakiraman et al. (2000)) y que también ha sido identificado en *S. epidermidis*) y el operón *sstABCD* (que por homología parecería estar involucrado igualmente en el transporte de magnesio). Al igual que en otros sistemas de transporte del tipo ABC, en el complejo proteico que forma el transportador existen proteínas con regiones de unión y catálisis para ATP y otras encargadas de generar un poro en la membrana que permite el trasvase del ferrisideróforo hacia el interior (Ratledge et al. (2000)).

1.1.2.2.5 Internalización y reducción de Fe³⁺ y Fe²⁺

Las ferrisideróforo-ferrireductasas se han identificado en numerosos microorganismos como *Bacillus spp.*, *Paracoccus denitrificans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Legionella pneumoniae*, *Spirillum itersonii*, *M. smegmatis* y en algunos hongos (Ratledge et al.

(2000)). En todos los casos, la molécula que actúa como reductor es el NADH o el NADPH y la reacción que llevan a cabo:



El Fe^{2+} es liberado al citoplasma donde interacciona con las distintas proteínas bacterianas que lo usan como cofactor.

La especificidad de sustrato de la ferrireductasa es muy amplia, de forma que por ejemplo la descrita para *E. coli* reduce cualquiera de los ferrisideróforos que se han analizado (aerobactina, ferricromo, arthrobactina, schizokina y otros sideróforos del tipo hidroxamato, además de distintos quelantes sintetizados artificialmente) independientemente de si éstos son o no usados por la bacteria (Ratledge et al. (2000)).

Debido al bajo potencial redox que presentan algunos ferrisideróforos, parecería difícil aceptar que fueran reducidos por NAD(P)H u otro agente biológico. Sin embargo, no es descabellado pensar que la incorporación rápida del Fe^{2+} generado en las proteínas bacterianas podría desplazar el equilibrio de la reacción hacia la reducción del ferrisideróforo (Ratledge et al. (2000)).

1.1.2.2.6 Las ferritinas bacterianas y las bacterioferrinas

El hierro internalizado se asocia a proteínas bacterianas como porfirinas o apoproteínas dando lugar a complejos que presentan este metal incorporado en su estructura. Pero el hierro también puede ser almacenado (Abdul-Tehrani et al. (1999)), en procariotas se han descrito dos tipos de proteínas que se encargarían de su acumulación en el interior celular (Andrews (1998)): Las ferritinas, que están presentes también en eucariotas (que se han descrito anteriormente en el apartado 1.1.1.2); y las bacterioferritinas o bacterioferrinas (Andrews et al. (1995)), sintetizadas casi exclusivamente por bacterias aunque también se han detectado en algunos hongos (Carrano et al. 1996). Estas moléculas, al igual que las ferritinas, están formadas por 24 subunidades que se agrupan dando lugar a una estructura esférica que puede acumular hierro en su interior (Theil (1987)). La diferencia entre ambas es la existencia, en las bacterioferrinas, de 12 grupos hemo en su

estructura, que se postula podrían intervenir en el proceso de liberación de hierro cuando éste es requerido por el metabolismo celular (Andrews (1998)).

Estas proteínas encargadas del almacenamiento de hierro están ampliamente distribuidas en todos los procariotas, encontrándose en bacterias Gram positivas, con alto y bajo contenido en G-C, en arqueobacterias, en cianobacterias, en *Bacteroides*, *Thermotogales*, y en las cuatro subdivisiones de las Proteobacterias (Abdul-Tehrani et al. (1999)).

En *E. coli* se han descrito, como mínimo, cuatro genes involucrados en el almacenamiento de dicho metal (Andrews (1998)): *bfd* que codifica la ferredoxina asociada a bacterioferrina; *ftnA* que da lugar a la ferritina; *ftnB* (o *yecI*) que por homología podría describirse como “ferritina-like” (aunque su actividad con relación al almacenamiento de hierro está en entredicho porque no presenta un centro activo de acción para la ferroxidasa; y *bfr* que da lugar a la bacterioferrina.

Solamente se han caracterizado FtnA y Bfr, confirmándose su estructura análoga a la ferritina sintetizada por mamíferos. Aunque algunos estudios sugieren que ambas proteínas son capaces de secuestrar hierro del citosol (Hudson et al. (1993), Andrews et al. (1993)), otros en cambio, demuestran que, si bien la ferritina acumula hasta el 50% del hierro intracelular durante la fase postexponencial, la bacterioferrina únicamente acumula un 1% , cuestionando su implicación en el proceso de almacenamiento (Abdul-Tehrani et al. (1999)). Por otra parte, algunas hipótesis formuladas sobre el efecto protector de éstas proteínas que al acumular hierro impedirían que éste interviniera en reacciones de producción de radicales libres, han quedado descartadas por los resultados obtenidos en estudios realizados en mutantes defectivos para los genes *ftnA* y *bfr*, en los que no se detecta una mayor sensibilidad a H₂O₂ ni un incremento de la cantidad de hierro reactivo (Abdul-Tehrani et al. (1999)).

Independientemente de los datos acumulados, la importancia de estas proteínas queda demostrada tanto por su amplia distribución como también por la descripción de la presencia conjunta de ambas, no sólo en *E. coli*, sino en muchas otras bacterias. Este es el caso por ejemplo de *V. cholerae*, *M. tuberculosis* o *Clostridium acetobutylicum* (Abdul-Tehrani et al. (1999)).

1.1.2.3. Receptores de transferrinas

Como se ha comentado anteriormente, las transferrinas son las proteínas encargadas del transporte de hierro o del secuestro de éste en los diferentes fluidos del huésped. Numerosas bacterias son capaces de unir transferrina a través de receptores específicos y utilizarla como fuente de hierro.

En diferentes bacterias Gram negativas de familias como *Pasteurellaceae* o *Neisseriaceae* se ha descrito la existencia, en la membrana externa, de dos tipos distintos de receptores de transferrinas altamente conservados (Ratledge et al. (2000)). Además parece que uno de ellos es capaz de reconocer la ferritransferrina y diferenciarla de la apotransferrina.

La unión entre la transferrina y sus receptores específicos, al igual que la cesión de los átomos de hierro, no es un proceso que parezca necesitar energía, aunque sí que se requiere la participación de TonB para la liberación de la apotransferrina que consecuentemente dejará activo el receptor (Moeck et al. (1998)). El paso del hierro a través del periplasma, al igual que sucede en el transporte de sideróforos, requiere la presencia de una proteína de unión a Fe^{3+} , inbrincada en un sistema de transporte del tipo ABC (Fig. 1.9).

El papel que juegan este tipo de proteínas durante la infección parece ser importante ya que la disrupción de uno de estos sistemas de captación de transferrina produce la disminución acentuada de la virulencia de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (Cornelissen et al. (1998)).

Las bacterias patógenas Gram positivas también presentan receptores específicos para el transporte de transferrina. Los más conocidos son los descritos en *S. aureus* y *S. epidermidis* (Ratledge et al. (2000)). En esos dos casos se ha demostrado la existencia de un receptor específico de 42 kDa capaz de reconocer los diferentes tipos de transferrinas presentes en mamíferos.

exterior y reconocido posteriormente por un receptor de membrana. Ambas estrategias se discutirán brevemente a continuación.

1.1.2.3.1.1 Sistemas de unión a hemoproteínas dependientes de TonB

Existe un gran número de receptores de membrana capaces de reconocer como ligandos al grupo hemo o a hemoproteínas. Los sistemas de transporte que se conocen pueden dividirse, en función de su especificidad en dos grupos: Los presentes en patógenos extremadamente adaptados al huésped (como sería el caso de *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* o *N. meningitidis*) que han desarrollado receptores específicos para el grupo hemo o para la hemoglobina (Ratledge et al. (2000)). O bien los relacionados con otros patógenos como *Y. pestis* o *Y. enterocolitica*, que presentan receptores capaces de captar el hierro presente en numerosas hemoproteínas (Thompson et al. (1999)).

A pesar de las diferencias entre los diversos receptores con esta función todos tienen en común la liberación del grupo hemo de la hemoproteína, que una vez en el periplasma es trasvasado al interior del patógeno donde puede ser incorporado directamente en las enzimas bacterianas en forma de grupo hemo o bien se puede reutilizar el hierro que contiene por degradación del anillo porfirínico (Ratledge et al. (2000)).

1.1.2.3.1.2 Captación del grupo hemo mediante factores solubles

En algunos sistemas de captación del grupo hemo se ha descrito la presencia de un componente extracelular, denominado hemóforo por analogía con los sideróforos. Sería el caso por ejemplo de *S. marcescens* que cuando se encuentra en condiciones de escasez de hierro produce una proteína extracelular denominada HasA (Létoffé et al. (1994)). Este hemóforo no libera el hierro de la hemoproteína, sino que se une y escinde el grupo hemo de la hemoglobina. Esta proteína HasA, que también se encuentra en *E. coli* o en *P. aeruginosa*, presenta una homología significativa con los componentes de sistemas de receptores de membrana externa asociados a TonB (Ratledge et al. (2000)). La caracterización de su estructura sugiere que la unión de este hemóforo a la hemoglobina induce en ésta una disminución de su afinidad por el grupo hemo, de forma que éste se une a HasA. Una vez formado el complejo HasA-grupo hemo, es relativamente fácil su transferencia al periplasma vía HasR, que actuaría como receptor anclado en la membrana (Létoffé et al. (1994)).

Así mismo, se ha detectado en los sobrenadantes de cultivos y en la membrana externa de *H. influenzae* la presencia de una proteína de unión a hemo o hemo-hemopexina, denominada HxuA, que forma parte de un sistema de transporte del tipo ABC. Se ha descrito que mutaciones en este transportador suprimen la habilidad de este patógeno de crecer en medios con alguno de estos compuestos como fuente de hierro (Cope et al. (1995)).

1.1.3. Control genético de los sistemas de captación de hierro en bacterias

Como ya se ha comentado, en las bacterias existen multitud de sistemas relacionados con la importación de hierro. En *E. coli*, probablemente una de las especies más estudiadas en este aspecto, se pueden citar más de 20 genes implicados en esta función (Escobar et al. (1999)).

Por otra parte, debido a la toxicidad que comportan elevadas concentraciones de hierro en el citoplasma celular y teniendo en cuenta que en bacterias no se han descrito bombas de excreción para este elemento (Ratledge et al. (2000)), la única forma de control de su homeóstasis intracelular es la regulación de los mecanismos de importación a través de la membrana. Esta función de control es la que desarrolla la proteína Fur (ferric uptake regulator), que ejerce una regulación transcripcional sobre casi todos los genes implicados en el transporte e incorporación de dicho metal en función de la concentración intracelular existente y también sobre otros sistemas no vinculados directamente con este metal (Tsolis et al. (1995)). Esto, unido al hecho que parece ser una proteína ubicua en procariotas, ha dado pie a que algunos autores la describan como un regulador global del metabolismo celular, al igual que otros reguladores transcripcionales como Fis, HU, Lrp o H-NS (Hall et al. (1996)).

1.1.3.1. La proteína Fur

1.1.3.1.1 Estructura de la proteína Fur

El tamaño de esta proteína oscila en los distintos microorganismos en los que se ha descrito entre los 128 a los 160 aminoácidos (Tabla 1.3) En el caso de *E. coli*, cuya proteína es sin duda la mejor estudiada a nivel estructural, tiene un tamaño de 17 kDa y se ha

observado que en solución se encuentra formando homodímeros de 148 aminoácidos /unidad.

Tabla 1.3. Microorganismos en los que se ha descrito la presencia de un gen *fur*

| Microorganismos | | Grupo |
|--|---|----------------------------|
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | <i>Brucella melitensis</i> biovar <i>Abortus</i> <i>Rhizobium leguminosum</i> | Proteobacterias alfa |
| <i>Bordetella pertussis</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>N. gonorrhoeae</i> | <i>N. meningitidis</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Ralstonia eutropha</i> | Proteobacterias beta |
| <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter upsaliensis</i> | <i>Helicobacter pylori</i> | Proteobacterias épsilon |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Alteromonas</i> <i>E. coli</i> <i>H. influenzae</i> <i>H. ducreyi</i> <i>Histophilus ovis</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Listonella anguillarum</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i> | <i>P. stutzeri</i> <i>S. typhimurium</i> <i>V. cholerae</i> <i>V. fischeri</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificans</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>translucens</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>phaseoli</i> <i>Xanthomonas oryzae</i> <i>Yersinia pestis</i> | Proteobacterias gamma |
| <i>M. bovis</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. leprae</i> | <i>M. marinum</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>Streptomyces coelicolor</i> | Actinobacterias |
| <i>B. subtilis</i> <i>C. acetobutylicum</i> <i>C. perfringens</i> <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Grupo Bacillus/Clostridium |
| <i>Halobacterium</i> spp. | <i>Sulfolobus tokodaii</i> | Arqueobacterias |

MENALKKAGGLKVTLPRLKILELLQEHHLSAEDLYKALEEGEEIGL

ATVYRVLNQFEDAGIVTRHNFEGGKSVFELAQGHHHDHLVCLDCG

KVIEFSDDEIEARQREIAAKHGFKLTDHSLYLYGVCCK

Fig. 1.10. Secuencia consenso (utilizando el método de Clustalw) obtenida por comparación de todas las proteínas Fur citadas en la Tabla 1.3. En rojo se indican los aminoácidos que se conservan en todos los casos. Éstos acostumbran a estar englobados en regiones hélice- α o plegamiento- β señaladas en la secuencia por líneas simples o dobles, respectivamente.

En la proteína Fur se pueden identificar dos dominios perfectamente diferenciados. El C-terminal, responsable de la unión con los iones metálicos así como de las interacciones proteína-proteína que dan lugar a la dimerización. Y el N-terminal encargado del reconocimiento y anclaje al DNA (Stojiljkovic et al. (1995)).

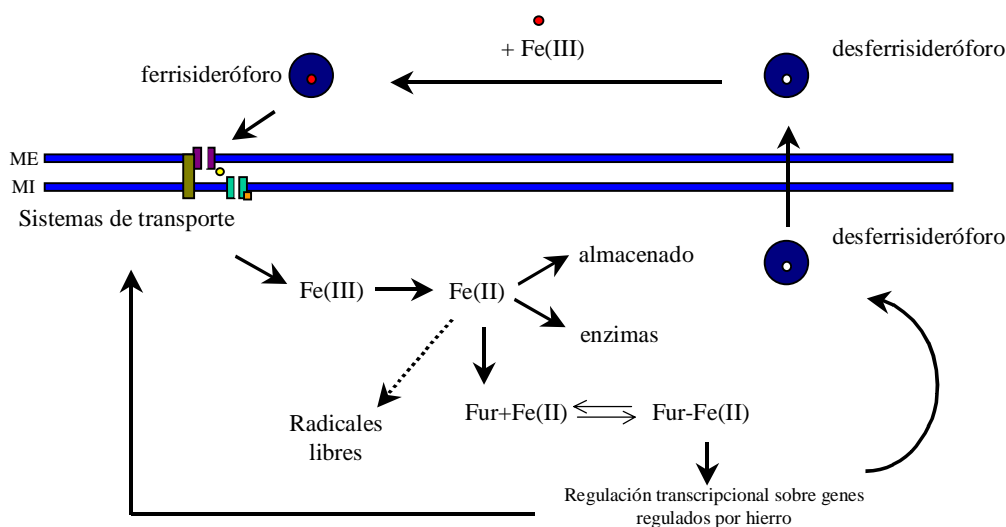


Fig 1.11. Diagrama esquemático de la función de la proteína Fur sobre promotores regulados por la concentración de hierro (modificado de Escolar et al. (1999))

De hecho, el complejo Fe^{2+} -Fur (Fig. 1.11) es el que tiene capacidad de unión a los operadores de los genes que están bajo su control (González de Peredo et al. (2001)). De esta forma, cuando la concentración intracelular de este ión es suficientemente alta para permitir la formación de dicho complejo es cuando tiene lugar la represión de la transcripción de los sistemas bajo este control. En el momento que la cantidad de hierro disminuye, también lo hace el complejo Fe^{2+} -Fur, lo que libera las regiones operadoras y permite la expresión de las unidades transcripcionales encargadas de la importación de hierro que permitirá el reestablecimiento de su concentración intracelular (Escolar et al. (1999)).

La estructura secundaria prevista para la proteína Fur de *E. coli*, al igual que la secuencia consenso que hemos obtenido por comparación de los productos de los 60 genes *fur* descritos hasta el momento (Tabla 1.3 y Fig. 1.10), está constituida por tres hélices- α seguidas de cadenas- β , siendo similares a las regiones de unión a DNA descritas para otros reguladores como CAP, LexA o DtxR (González de Peredo et al. (2001)) (Fig. 1.12).

1.1.3.1.2 La caja FUR

Estudios comparativos entre diferentes genes regulados por la presencia de hierro, además de estudios de protección con DNAsa I (“footprint”), han permitido definir en *E. coli*, una región consenso de 19 pb a la que se une la proteína Fur. La naturaleza aparentemente palindrómica de esta secuencia, además de la descripción estructural hecha anteriormente, sugieren que la interacción entre Fur-DNA debería ser parecida a la descrita para otros represores celulares como por ejemplo LexA (Escolar et al. (1999)).

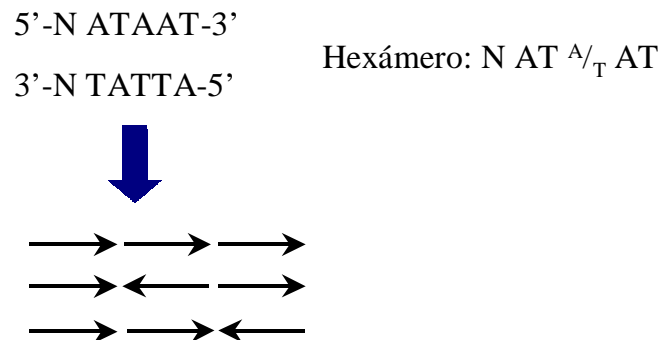


Fig. 1.13. En la parte superior la secuencia de unión (Caja Fur) de la proteína Fur. En la parte inferior las distintas orientaciones en las que se puede encontrar esta secuencia en los promotores a los que se une dicho represor. Cada flecha corresponde a una unidad del hexámero (modificado de Escolar et al. (1999)).

Sin embargo, el estudio comparativo de las regiones promotoras de los genes regulados por hierro permite observar la presencia de múltiples cajas Fur, a veces incluso solapadas, descartando el modelo de unión de dímero-palíndrome (Le Cam et al. (1994)). De hecho, la caja Fur puede definirse como una combinación de tres repeticiones adyacentes de la secuencia NAT(A/T) tal y como se muestra en la Fig. 1.13 (Escolar et al. (1999)).

Si bien es necesaria la existencia de, como mínimo, tres repeticiones del hexámero para permitir la unión estable de la proteína, la orientación en la que se encuentren no parece ser importante. Este tipo de secuencias de unión permite una gran variabilidad en las

regiones promotoras reguladas, y tolerar, en cierto modo, cambios en éstas sin dar lugar a una desregulación del sistema (Escolar et al. (1999)).

La gran conservación de la caja Fur en diferentes especies bacterianas muy separadas filogenéticamente, y el hecho que, en muchas el gen *fur* se encuentre en megaplásmidos o dentro de islas de patogenicidad, hace sospechar su incorporación, en algunos casos, como consecuencia de procesos de transferencia horizontal (Achenbach et al. (1997)).

El propio gen *fur* presenta una caja Fur en su región promotora y su autorregulación ha sido confirmada por estudios de *footprint*, aunque el grado de represión parece menor que el de otros genes del sistema (Escolar et al. (1999)). De hecho los niveles basales de transcripción de este gen son superiores a los que muestran otras proteínas que se autorregulan.

Además, el gen *fur* también ve modulada su transcripción por otros reguladores como el complejo CRP-cAMP (Zheng et al. (1999)), que tiene un efecto activador, reforzando la interacción entre el estado metabólico en el que se encuentra la célula y la cantidad de hierro intracelular. Se ha descrito la presencia de cajas SoxR y OxyR en el promotor de Fur (Zheng et al. (1999)). Estos dos reguladores se encargan de la activación del sistema de respuesta a estrés oxidativo (Touati et al. (2000)). Esta regulación dual de la incorporación de hierro y el estado oxidativo celular se ha descrito también en eucariotas (Hantke (2001)). De forma que cuando las cantidades de peróxido de hidrógeno o de iones superóxido son suficientes para su activación, aumenta la concentración intracelular de Fur, paralizándose, en primera instancia, la entrada de hierro que en caso de ser muy elevada podría ser dañina para la célula al generar lesiones en su DNA vía reacciones de Fenton (Touati et al. (2000)).

1.1.3.1.3 Sistemas de detección de genes regulados por Fur

Se han utilizado muchos métodos para detectar las proteínas cuya síntesis depende de la abundancia de hierro en el medio. De hecho, la comparación de patrones de electroforesis de proteínas de un microorganismo crecido en presencia o ausencia de un quelante químico permite la visualización de muchas cuya expresión está regulada por este elemento. La combinación de este sencillo sistema con diferentes técnicas de biología molecular ha permitido la identificación de muchos genes y proteínas regulados por este metal y por lo tanto relacionados de algún modo, directo o indirecto con Fur en diferentes

bacterias como *Campylobacter jejuni*, *V. cholerae*, *Y. pestis*, *N. gonorrhoeae* o *S. typhimurium* (Panina et al. (2001), Tsolis et al. (1995)).

Pero además de la que acabamos de citar, también se han desarrollado otras estrategias genéticas y bioquímicas para identificar genes directamente vinculados a la acción de la proteína Fur. Entre ellas podemos destacar los siguientes:

- i) *Los ensayos FURTA (Fur titration assay)*. Su principio es relativamente simple y a la vez ingenioso (Vassinova et al. (2000), Escolar et al. (1999), Zheng et al. (1999), Tsolis et al. (1995)). Se basan en el uso de una cepa de *E. coli* que presenta insertada en su cromosoma la fusión de un promotor regulado por la proteína Fur con el gen *lacZ* (normalmente se usan promotores de genes como *fiu* o *fhuF*, que presentan baja afinidad por la proteína Fur). Si a continuación se introduce en dicha cepa una genoteca construida en un vector de alto número de copias, si uno de los plásmidos es portador de un fragmento de DNA que contiene una caja Fur se producirá una desregulación del sistema (la concentración intracelular de Fur disminuirá al aumentar el número de operadores a los que debe unirse) que dará lugar a un incremento de la síntesis de β -galactosidasa fácilmente detectable cualitativamente en placas diferenciales (McConkey, EMB, X-Gal, etc) o cuantitativamente mediante la determinación de la actividad β -galactosidasa (Tsolis et al. (1995)).

- ii) *Selección cíclica de genes regulados por hierro*. Éste es un proceso derivado de técnicas de SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) (Ochsner et al. (1996)). Se basa en la capacidad de unión de la proteína Fur a DNA. En este caso, se pone en contacto dicha proteína con fragmentos de DNA derivados de una digestión parcial del DNA genómico a estudiar, a los que se han unido unos fragmentos conocidos (linkers). A esta mezcla se añaden anticuerpos que reconozcan específicamente al regulador Fur, y se pasa la mezcla por una columna que retenga los anticuerpos. Posteriormente se eluye el DNA unido a Fur y se hace una PCR de

ha permitido por ejemplo el aislamiento de el gen *fur* de *Pasteurella multocida* (Bosch et al. (2001)).

- iv) *Utilización de manganeso.* Se ha comprobado que a concentraciones muy elevadas el Mn^{2+} mimetiza la acción del hierro en su unión a Fur, provocando los mismos cambios conformacionales. Esto permite el aislamiento de mutantes *fur*, ya que solamente éstos son capaces de sobrevivir en medios extremadamente ricos en manganeso pero con concentraciones de hierro escasas (Hantke (1987)). Mediante este procedimiento se han obtenido mutantes *fur* de *C. jejuni*, *V. cholerae*, *Y. pestis*, *N. gonorrhoeae* y de *S. typhimurium* (Escolar et al. (1999)).

1.1.3.1.4 Genes regulados por Fur

La identificación de genes regulados por el producto del gen *fur* ha revelado la implicación de este sistema no sólo en el transporte, la reducción e incorporación de hierro en la célula (Ratledge et al. (2000), Foster et al. (1992), Bäumlner et al. (1998), Hassett et al. (1996)) sino también en otros procesos, algunos de ellos no involucrados directamente en el metabolismo del hierro (Serkin et al. (2000), Foster et al. (1992)). Existen más de 90 genes de *E. coli* que se han relacionado con el regulón Fur, 60 de ellos se encargan de la biosíntesis y el transporte de sideróforos, 18 codifican proteínas citoplasmáticas involucradas en el metabolismo global, y otras relacionadas con el metabolismo de hierro, el estrés oxidativo y otras funciones (Hantke (2001), Hall et al. (1996), McCarter et al. (1989)). De todo este grupo heterogéneo más de 30 son factores de virulencia (Serkin et al. (2000), Wang et al. (1996)). A continuación se comentarán brevemente las características de alguno de ellos:

- i) *Regulación de toxinas*

La síntesis de diferentes toxinas como la Siga de Shigella, la “Siga-like”, la hemolisina de *E. coli*, la hemolisina de *V. cholerae* o la exotoxina A de *P. aeruginosa* están reguladas por la proteína Fur (Litwin et al. (1996), Escolar et al. (1999), Prince et al. (1993)). En este contexto, se puede hipotetizar que

una baja disponibilidad de hierro sería la señal de la entrada del microorganismo al interior del huésped en el que mediante la acción de diversos factores de virulencia, como dichas toxinas, podría permitir el acceso a fuentes de hierro, como la ferritina o el grupo hemo de la hemoglobina, ubicadas en el interior de las células del huésped (Escolar et al. (1999).

ii) *Síntesis de adhesinas o fimbrias*

El gen *iha* de *Y. pestis* o de *E. coli* presenta una caja Fur, de forma que estas proteínas que son reguladores de la producción de adhesinas se sintetizan cuando hay escasez de hierro en el medio, que como en el caso anterior podría ser el mecanismo indicador de la entrada en el huésped (Kajalainen et al. (1991)).

iii) *Regulación de la quimiotaxis*

La quimiotaxis parece jugar también un papel importante en la patogénesis de distintos microorganismos. Se ha destacado, por ejemplo, la presencia de cajas Fur en los promotores de genes implicados en todos los procesos de regulación y transducción de señal de quimiotaxis tanto en *E. coli* como en *V. cholerae* (Panina et al. (2001)).

iv) *Regulación de la respuesta a estrés oxidativo*

En este caso se ha descrito que la proteína Fur es capaz de interaccionar con los promotores de diferentes genes implicados en la detoxificación de los derivados reactivos del oxígeno. Así, las superóxido dismutasas dependientes de manganeso, codificadas por el gen *sodA* de *S. typhimurium*, *E. coli* o *P. aeruginosa* (Tsolis et al. (1995)) forman parte también del regulón Fur. Por otro lado, se ha demostrado que la superóxido dismutasa dependiente de hierro y codificada por *sodB* (Touati et al. (1995)) está también controlada por Fur (Dubrac et al. (2000), Hassett et al. (1996)), aunque en este caso su síntesis se ve incrementada en presencia de hierro. De hecho éste es uno de los primeros genes en los que se describió el papel activador de la proteína Fur, si bien aún no se conocen claramente los mecanismos mediante los que se ejerce este efecto. En cualquier caso, el

sentido biológico de esta activación se ha de buscar en la necesidad de evitar el daño que puedan causar los radicales libres generados cuando la concentración de hierro intracelular es elevada.

v) *Resistencia frente a la acidez*

La resistencia a pH ácido es un paso importante en la virulencia de determinados patógenos como *S. typhimurium* o *H. pylori* (Wilmes-Riesenberg et al. (1996), Bijlsma et al. (2002), Hall et al. (1996)). Muchos sistemas de regulación global se ven implicados en la respuesta al estrés por pH ácido, como RpoS, OmpR, PhoP y también Fur (Bearson et al. (1997)). La implicación de este último se ha demostrado tanto en *S. typhimurium* como en *H. pylori* (Bijlsma et al. (2002), Hall et al. (1996), Foster et al. (1992)), comprobándose en el primero que su actuación es independiente de la presencia de hierro intracelular y que además, las dos funciones, la de regulador de la tolerancia a ácido y la relacionada con el transporte de hierro, pueden separarse funcionalmente (Hall et al. (1996)).

En la mayoría de los casos descritos, la proteína Fur actúa como represor de la transcripción en presencia de hierro, si bien, y además de la regulación del gen *sodB* ya mencionada, existen otros ejemplos en los que este regulador tiene un efecto positivo sobre la expresión. Así, el análisis de proteínas totales mediante electroforesis en dos dimensiones en células de *S. typhimurium* en condiciones de limitación de hierro ha puesto de manifiesto la existencia de aproximadamente 15 genes regulados positivamente a parte de *sodB*. Entre estos se encuentran, por ejemplo, los genes de ferritinas *bfr* y *ftn*, la aconitasa codificada por *acnA*, la fumarasa FumA o proteínas vinculadas a la respuesta de pH ácido (Bijlsma et al. (2002); Hall et al. (1996); Foster et al. (1992)). En ninguno de estos casos se ha observado alguna caja Fur en la región promotora o la presencia de otro regulador transcripcional dependiente de Fur (Hassett et al. (1996)). Se había sugerido que la regulación de estos sistemas pudiera llevarse a cabo a nivel postranscripcional (Dubrac et al. (2000)). A este respecto, se ha demostrado recientemente la implicación en esta regulación de un RNA de cadena sencilla de 90 nucleótidos, denominado RyhB, cuya transcripción está controlada por la proteína Fur (Massé et al. (2002)). Cuando se produce

la síntesis de RhyB, éste se une al mRNA codificado por genes como *ftn*, *acnA*, *fumA* o *sobB*, produciendo su rápida desaparición (Fig 1. 16). Este hecho concuerda con la observación de que la vida media del mRNA de los genes controlados positivamente por Fur disminuye drásticamente en mutantes deficientes en esta proteína (Dubrac et al. (2000), Hantke (2001)).

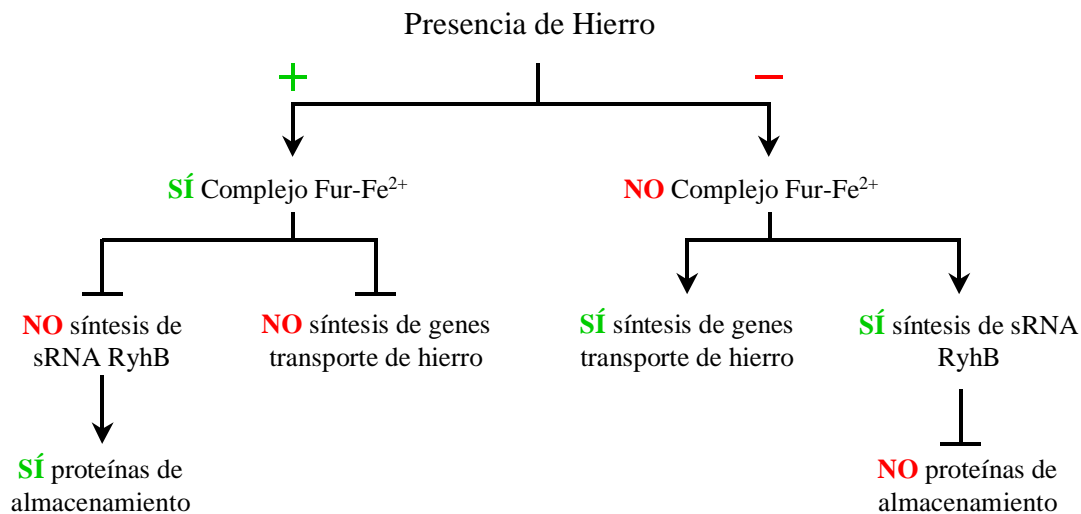


Fig. 1.16. Modelo de la interacción entre Fur y RyhB para regular la expresión de los genes implicados en la utilización de hierro (Tomado de Massé et al. (2002))

Por otra parte, la proteína Fur parece tener diferentes funciones dependiendo del microorganismo en cuestión. Así, esta proteína es esencial para *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *V. anguillarum*, en los que ha sido imposible hasta el momento la construcción de mutantes defectivos, pero no para *S. typhimurium*, *E. coli*, *Bacillus*, *Yersinia* o *V. cholerae* donde son completamente viables (Vasil et al. (1999)). En todo caso, se podría hipotetizar la relación entre el tipo de respiración que presentan estos microorganismos con la viabilidad del mutante (Hassett et al. (1996)), que sería prácticamente nula para los aeróbicos estrictos.

Una de las características sorprendentes de la proteína Fur es el número de copias de esta proteína en el interior celular que para *E. coli* oscila entre 5000 copias en una célula en estado exponencial, o del orden de las 10000 cuando el sistema está activado, por ejemplo, por señales de estrés oxidativo (Escolar et al. (1999)). Esta concentración es extraordinariamente alta, sobretodo si se compara con las cifras obtenidas para otros reguladores transcripcionales que tienen entre 10-20 (LacI) o 50-300 (represor Trp). Además, estos valores no tan solo se han encontrado en *E. coli*, sino que valores comparables se han obtenido en otros microorganismos como *V. cholerae* (Watnick et al. (1997)).

Una explicación a este gran número de copias podría encontrarse en la gran cantidad de genes que forman parte de este regulón y en consecuencia a la presencia de un elevado número de operadores a los que la proteína Fur debe unirse. No obstante, también se ha postulado la posibilidad que esta gran concentración intracelular de proteína Fur pueda servir como almacén transitorio de hierro cuando su concentración sea demasiado elevada (Escolar et al. (1999), Abdul-Tehrani et al. (1999), Zheng et al. (1999)). Esta acción quelante permitiría, por un lado, evitar los efectos nocivos causados por el hierro libre, y a su vez mantenerlo secuestrado hasta la síntesis de cantidades suficientes de ferritina u otras proteínas que incorporan hierro a su estructura (Abdul-Tehrani et al. (1999)).

1.1.3.2. La proteína DtxR

A parte de tener una proteína homóloga a Fur, en algunas bacterias Gram positivas se ha detectado la presencia de un regulador que, aunque no presenta homología con Fur, tiene una estructura global comparable y es capaz, además, de actuar como represor cuando se une a hierro (Hantke (2001)). Esta proteína se conoce con el nombre de DtxR ya que fue caracterizada por primera vez en *Corynebacterium dysenteriae* en el que regula la síntesis de la toxina de la difteria (Boyd et al. (1990)). DtxR tiene un tamaño de unos 25 kDa y se une en forma dimérica a la región operadora de los genes que controla. Se han detectado proteínas similares a DtxR en *Streptomyces spp.*, *Brevibacterium lactofermentum*, *S. epidermidis* (conocido en este caso como SirR) o *Mycobacterium spp.* (donde recibe el nombre de IdeR de iron-dependent regulator) (Escolar et al. (1999)). En el caso de IdeR se ha demostrado su implicación en la regulación de la biosíntesis de la exochelina MS o de la

micobactina S, además de la regulación de otros productos que, al igual que pasaba con el regulón Fur, no parecen tener una relación directa con el metabolismo de hierro (Schmitt et al. (1995)). Se ha relacionado a este regulador con la alcohol deshidrogenasa, una serin proteasa, una proteína ribosomal 16S, la subunidad α de la nitrato reductasa, genes involucrados con la síntesis de histidina, algunas proteínas de membrana o con otras proteínas de función desconocida. En *M. smegmatis* es necesaria la presencia de este regulador para mantener los altos niveles de transcripción del gen *katG* que codifica una catalasa así como de la superóxido dismutasa dependiente de hierro codificada por el gen *sodA* (De Voss et al. (1999)). Estos datos, demuestran, una vez más, la estrecha relación existente entre la importación de hierro y los sistemas de respuesta al estrés oxidativo (Hantke (2001)). La importancia de este regulador en la virulencia queda demostrada por la disminución de la capacidad infectiva del mutante IdeR de *M. tuberculosis* cuando es inoculado en ratones (Manabe et al. (1997)).

1.1.3.3. La proteína PerR

En algunos microorganismos como *Bacillus spp*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenus* o *C. jejuni* se ha descrito también la presencia de otro regulador transcripcional, denominado PerR que es dependiente de hierro o manganeso (Bsat et al. (1998)). Se encarga del control de la transcripción de proteínas encargadas del almacenamiento y acumulación de hierro a nivel intracelular. Presenta cierta similitud con OxyR, regulando la transcripción de genes que codifican catalasas o alquil peroxidoreductasas. Se ha vinculado a PerR con la regulación transcripcional del gen *fur* (Bsat et al. (1998)), de forma que en este caso también existiría una nueva relación entre el transporte de hierro y el estado oxidativo celular (Horsburgh et al. (2001)).

1.1.3.4. La proteína Irr

La proteína Irr se ha descrito en *Bradyrhizobium japonicum* (Hamza et al. (1998)) donde actúa como regulador de la biosíntesis de hemo, coordinando ésta con la homeóstasis de hierro, regulada por Fur, proteína también presente en este microorganismo y que presenta un 29% de homología con Irr (Escolar et al. (1999)). A diferencia del efecto general de Fur, Irr es un activador transcripcional en presencia de hierro.

1.1.4. Tratamientos antibacterianos basados en los sistemas de captación de hierro

La correlación existente entre la expresión de sistemas de captación de hierro de alta afinidad, la virulencia y la capacidad de colonización de determinados patógenos ha sido demostrada en muchas ocasiones mediante el estudio de diferentes mutantes (Ratledge et al. (2000)). Esto hace de todo el sistema de captación de hierro una diana ideal para el desarrollo de nuevos agentes quimioterápicos o nuevas estrategias para el control de las infecciones provocadas por estos microorganismos (De Voss et al. (2000), Panina et al. (2001)). A modo de ejemplo, se pueden comentar brevemente las siguientes:

- i) *El uso de análogos de sideróforos*, que son reconocidos por los sistemas de transporte pero que no pueden ser metabolizados, de forma que bloquean las vías de entrada de hierro mediante estos receptores (Adilkashmi et al. (2000)).
- ii) *La fusión entre sideróforos y agentes antimicrobianos*. El reconocimiento específico de la parte del sideróforo permitiría la entrada directa del agente al espacio intracelular. En esta línea se han sintetizado conjugados de sideróforos con β -lactamasas, ácido nalidíxico, vancomicina o eritromicina, sin embargo, sólo en pocos casos dichas moléculas parecen conservar su capacidad antimicrobiana (Ratledge et al. (2000), Möllmann et al. (1998)).
- iii) *Utilización de proteínas de membrana externa reguladas por hierro*. La respuesta humoral del huésped contra los microorganismos genera, entre otros, anticuerpos contra epítomos superficiales del patógeno, mayoritariamente contra el lipopolisacarido, contra las proteínas de la pared o contra proteínas de membrana externa en el caso de bacterias Gram negativas. Si tenemos en cuenta que la expresión de las proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IRMP) se ve incrementada en diferentes entornos del huésped (Rutz et al. (1991)), se puede inferir que estas son también objetivo de los anticuerpos generados en la respuesta humoral (Brown et al. (1984), Meyer et al. (1990)). Los anticuerpos contra IRMP, además de bloquear la capacidad de importación de sideróforos y otras fuentes de hierro al interior celular, han demostrado poseer un efecto

bactericida o bacteriostático sobre *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* o *A. baumannii* (Pettersson et al. (1990), Goel et al. (2001)). Asimismo, incrementan la eficiencia de la fagocitosis gracias a un efecto opsonizador (Goel et al. (2001)). Por todo ello, la presencia de anticuerpos contra las IRPMs tiene un efecto protector contra los microorganismos que las han generado. De hecho, existen en el mercado productos como Salenbac[®], que se utiliza como vacuna contra *S. enterica* Serovar Enteritidis, basados en la inoculación de bacterias inactivas que han sido crecidas en medios con quelante, induciendo en ellas la aparición de IRMP. Del mismo modo, se ha descrito que la inoculación directa de IRMPs en animales también tiene un efector protector frente a posteriores infecciones (Sokol et al. (1983)).

1.2. El zinc

1.2.1. Disponibilidad de zinc en los organismos superiores

El zinc es un nutriente esencial para los organismos debido a los muchos papeles que desarrolla en los procesos bioquímicos celulares. Se encarga del mantenimiento de la estructura y de la actividad catabólica de diversas proteínas, así como de la estabilización de diferentes motivos presentes en reguladores transcripcionales en los que este metal de transición forma parte de estructuras como los denominados dedos de zinc, los anillos de zinc o los dominios LIM (Lu et al. (1997), Schmiedeskamp et al. (1997)).

Pese a que la disponibilidad de zinc en los organismos superiores no está tan controlada como en el caso del hierro. En eucariotas se ha descrito la presencia de sistemas de transporte de zinc de alta afinidad (como la familia de proteínas ZIP) o de baja afinidad, al igual que una serie de bombas de eflujo (como la familia CDF, de Cation Difusión Facilitator) que permiten la expulsión de zinc del citoplasma hacia el exterior o bien hacia compartimentos intracelulares donde es acumulado para su uso en condiciones limitantes, evitando los efectos nocivos de su acumulación en el citoplasma (Gaither et al. (2001)).

En los mamíferos las concentraciones de zinc son muy variables. Así pueden ser limitantes en el plasma, con una concentración de 0.9-1.4 µg/ml (Chen et al. (2001)), en el que mayoritariamente se encuentra unido a proteínas como la albúmina o la α_2 -

macroglobulina, si bien en otros fluidos como el semen pueden ser muchísimo más altas, llegando a 53 $\mu\text{g/ml}$, niveles que resultan potencialmente tóxicos para microorganismos como *N. gonorrhoeae* (Chen et al. (2001)). Esta variabilidad hace que las bacterias patógenas hayan desarrollado también sistemas de control de la homeóstasis para este metal.

1.2.2. Control de la concentración de zinc en bacterias

En bacterias existen más de 300 enzimas dependientes de zinc por su papel en la estabilidad estructural o para su actividad catalítica. La concentración necesaria de este elemento para el desarrollo es de 0.5-1 μM (Lu et al. (1997)), mucho menor que la necesaria para el crecimiento de células eucariotas o hongos (Rensing et al. (1997), Lu et al. (1997)).

Sin embargo, elevadas concentraciones de zinc pueden resultar nocivas ya que, entre otros efectos, puede producir la inhibición de la respiración por afectación directa de algunos citocromos (Agaarad et al. (2001), Beard et al. (1995)) o interferir, por competencia directa, en la unión de otros iones metálicos que, como él, se encuentran en los centros catalíticos o estabilizando determinadas estructuras proteicas (Patzner et al. (2000)).

Las fluctuaciones de la concentración de zinc existentes en los mamíferos (Chen et al. (2001)), y la necesidad de control de la homeóstasis de este metal en el interior de las células bacterianas, han llevado a desarrollar diferentes mecanismos de control de los sistemas de entrada y de exportación de este metal al exterior.

1.2.2.1. Mecanismos de transporte de zinc en bacterias

El estudio de los sistemas de transporte de zinc ha sido difícil debido a los problemas que genera la detección de las cantidades ínfimas necesarias para el metabolismo celular bacteriano, la elevada afinidad de este metal por la superficie bacteriana o el rápido intercambio entre el interior y el exterior celular (Lewis et al. (1999), Turk (1985)). Estos problemas se han superado mediante técnicas de análisis de absorción atómica o por activación de neutrones, además de la caracterización y el estudio de mutantes en los que se ve afectada la importación o exportación de dicho metal.

Estos avances han permitido la descripción, al igual que en las células eucariotas (Gaither et al. (2001)), de diversos sistemas implicados en la captación de zinc y el bombeo de éste hacia el exterior celular, ambos encargados del mantenimiento de las concentraciones óptimas de zinc en el interior celular (Zhao et al. (1996), Eide et al. (1996)).

1.2.2.1.1 Sistemas de captación de zinc

La importación de zinc al interior de las células puede llevarse a cabo mediante dos sistemas, los de alta afinidad, expresados cuando la presencia de dicho metal en el entorno es limitante, y los sistemas de baja afinidad (no exclusivos para este catión) que se encargan de su captación cuando su concentración en el medio es elevada.

1.2.2.1.1.1 Mecanismos de transporte específico de alta afinidad

1.2.2.1.1.1.1 Transportadores del tipo ABC

Estos transportadores de alta afinidad aparecen en la superficie celular cuando existe una deficiencia de zinc. Al igual que otros miembros de esta familia de transportadores, este sistema está formado por tres proteínas, una de unión al metal (en el caso de *E. coli* denominada ZnuA), otra integral de membrana (ZnuB) y una tercera con actividad ATPasa (ZnuC) (Patzner et al. (1998)). Estos transportadores se han descrito en distintos microorganismos, tanto Gram positivos como Gram negativos, así por ejemplo se encuentran en *S. pneumoniae* (donde se conoce como *adcABC*), *H. influenzae*, *H. ducreyi*, *B. subtilis* (donde el transportador está formado por YcdH, YceA y YcdI), *T. pallidum* (*troABC*), *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. paratyphi*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *B. pertussis*, *Caulobacter crescentus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (Dintilhac et al. (1997), Xiong et al. (2000), Thewell et al. (1998), Patzner et al. (1998), Lu et al. (1997), Lewis et al. (1999), Gaballa et al. (1998), Lee et al. (1999), Lee et al. (1999)).

En algunos de estos organismos como *E. coli* o *S. pneumoniae*, estos genes se encuentran formando un *cluster* en el que la transcripción de *znuA* es divergente respecto a la de *znuCB*, siendo la separación entre las dos unidades transcripcionales de tan solo 25 pb (Patzner et al. (2000)). En otros casos como *N. gonorrhoeae* o *B. subtilis*, también se

encuentran formando un *cluster*, pero en este caso se produce una única unidad transcripcional que contiene los tres componentes del sistema (Gaballa et al. (1998), Chen et al. (2001)). Sin embargo, en otras especies bacterianas, como *H. influenzae*, los tres genes se encuentran distribuidos en puntos dispares del genoma, hecho que normalmente dificulta su identificación (Lewis et al. (1999)).

La expresión de estos sistemas de alta afinidad se produce en los momentos que la concentración de zinc es limitante. Estudios de expresión llevados a cabo con fusiones entre los promotores de estos transportadores y el gen *lacZ*, han permitido definir que concentraciones superiores a 5 μM de Zn^{2+} son capaces de reprimir el sistema (Patzner et al. (1998)).

De las tres proteínas que forman este transportador, la más estudiada es la que se une directamente al metal (ZnuA en el caso de *E. coli*). En las bacterias Gram negativas, dicha proteína parece estar localizada en el espacio periplasmático (Lewis et al. (1999)). Si bien el conjunto de estudios llevados a cabo no descartan tampoco la posibilidad de que esta proteína pueda ser excretada al exterior para actuar como captador externo de zinc, de forma análoga a los sideróforos (Lewis et al. (1999)).

1.2.2.1.1.2 Transportadores del tipo ZIP

Recientemente se ha descrito la presencia en *E. coli* de la proteína ZupT, perteneciente a la familia ZIP (de Zrt-, Irt-like protein) (Grass et al. (2002)). Hasta el momento, este tipo de transportadores había sido descrito únicamente en eucariotas (Gaither et al. (2001)). Esta clase de transportadores fueron caracterizados en un principio por su participación en el transporte de metales como el zinc o el hierro, si bien se ha observado que también están relacionados con el manganeso o el cadmio, aunque la especificidad por éstos depende de cada receptor (Gaither et al. (2001)).

La proteína ZupT está relacionada directamente con el transporte de zinc y aunque parece que los transportadores tipo ZnuABC presentan mayor afinidad por zinc, ambos se encargan de la incorporación de éste cuando su concentración en el entorno es limitante (Grass et al. (2002)).

1.2.2.1.1.2 Mecanismos de baja afinidad

La proteína PitA, que forma parte del transportador de baja afinidad de fosfato inorgánico, parece estar también relacionada con el transporte de este catión divalente, ya que en mutantes defectivos para esta proteína se observa una menor acumulación intracelular de zinc en comparación con las células salvajes (Beard et al. (2000)).

Así mismo, en *B. subtilis* se ha descrito la presencia de una proteína de membrana codificada por el gen *yciC*, cuyo producto parece ser una ATPasa de membrana y cuya expresión se regula en función de la concentración de zinc existente (Gaballa et al. (1998)). Aparentemente, mutaciones en esta proteína sólo tienen efecto en el crecimiento cuando están asociadas a deficiencias en el sistema de captación de alta afinidad de zinc y cuando la concentración de este metal en el medio es baja, además este defecto en el crecimiento puede suprimirse por la adición de zinc. Por este motivo, se ha propuesto que esta proteína es un componente de un transportador de zinc de baja afinidad (Gaballa et al. (1998)).

1.2.2.1.1.3 Mecanismos de bombeo de zinc

Las bacterias han desarrollado también mecanismos de expulsión de zinc al exterior, con la finalidad de evitar la acumulación de éste en el citoplasma y prevenir así sus posibles efectos tóxicos.

En *E. coli* se han descrito dos tipos de sistemas de eflujo de zinc, uno perteneciente a la familia de las ATPasas de tipo-P y otro relacionado con la familia de facilitadores de la difusión de cationes, ambas implicadas no solo en el bombeo de zinc sino también de otros cationes divalentes.

1.2.2.1.1.3.1 La ATPasa ZntA

La familia de las ATPasas del tipo-P incluye muchísimas proteínas (más de 50) que están presentes tanto en eucariotas como en procariotas. En el caso concreto del zinc, la ATPasa responsable de su transporte está codificada en *E. coli* por el gen *zntA* (de zinc tolerance) (Rensing et al. (1997)). El descubrimiento de este transportador se hizo gracias al estudio de mutantes espontáneos que presentaban mayor sensibilidad a diferentes metales que no la cepa original de la que derivaban. En este caso, la cepa portadora de la mutación del gen *zntA* presentaba una clara sensibilidad a la presencia de Zn^{2+} en el medio, que se

podía suprimir si se complementaba la mutación en trans (Beard et al. (1997)). También se observó una mayor sensibilidad del mutante frente a otros cationes divalentes como Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} y Ni^{2+} , aunque en mucho menor grado que la observada para zinc (Beard et al. (1997)). Su definición como ATPasa del tipo-P se hizo en base a la similitud de esta proteína con las pertenecientes a dicha familia (Rensing et al. (1997)).

Se ha descrito también la presencia de proteínas ortólogas a ZntA, por ejemplo de ZiaA (de zinc ATPasa) presente en *Synechocystis* (Beard et al. (1997)) o la metalotioneína codificada por el gen *smtA* en cianobacterias (Turner et al. (1993)).

1.2.2.1.1.3.2 El sistema ZitB

La vinculación del gen *zitB* al bombeo del zinc (previamente conocido como *ybgR*) se hizo en función de la similitud de la secuencia de su producto con otras proteínas pertenecientes a la familia de facilitadores de difusión de catión (CDF) presentes también en eucariotas y vinculadas con el transporte de metales (Grass et al. (2001)).

Estas proteínas, que tienen como característica estructural seis dominios transmembrana y otro rico en histidinas que parece extenderse en el citosol, confieren resistencia a elevadas concentraciones de zinc cuando son sobreproducidas por *Saccharomyces cerevisiae* (Eide (1998)). Esta resistencia parece ser debida al eflujo de metales hacia el exterior que obviamente es mayor cuanto más elevado es el número de transportadores existentes. Sin embargo, los mutantes ZitB^- no presenta una mayor sensibilidad a zinc, que solo se manifiesta en los dobles mutantes *zitB zntA*, siendo estos mucho más sensibles que los mutantes *zntA* (Grass et al. (2001)). Por ello, se hipotetiza que el transportador ZntA es el responsable del bombeo de zinc cuando éste se encuentra a concentraciones elevadas, mientras que ZitB sería un sistema de control de la homeóstasis cuando los niveles de este metal son más bajos (Grass et al. (2001)).

1.2.2.2. Regulación de la captación de zinc en bacterias

Al igual que pasaba con el hierro, el sistema de mantenimiento de las concentraciones intracelulares de zinc presenta también una serie de reguladores transcripcionales que actúan como sensores de este metal y permiten la expresión de los elementos que controlan cuando son necesarios.

Se han descrito diversos reguladores relacionados con la homeóstasis del zinc, pero ninguno de ellos presenta la red reguladora que se ha descrito para la proteína Fur.

Todos ellos pertenecen a la familia de los metaloreguladores, presentando cierta homología estructural entre sí.

1.2.2.2.1 La proteína Zur

Se ha detectado la presencia del gen *zur* (zinc uptake regulator) en numerosos microorganismos como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *S. typhi*, *N. meningitidis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *A. tumefaciens*, *S. meliloti*, *Y. pestis*, *V. cholerae* o *B. melitensis*. Debido a la similitud que presentan con la proteína Fur, se cree que muchos de los genes catalogados como *fur* pueden ser en realidad genes *zur* (Patzner et al. (2000) Panina et al. (2001), Gaballa et al. (1998)).

La proteína Zur se encarga de la regulación transcripcional de algunos sistemas de importación de zinc al interior celular. Concretamente se ha demostrado su implicación directa en la regulación de la expresión del sistema de transporte ZnuABC de *E. coli* o de los dos sistemas de entrada de zinc en *B. subtilis* (*yciI* e *ycdHIyceA* que codifican los sistemas de importación de baja y alta afinidad, respectivamente) (Patzner et al. (2000), Gaballa et al. (1998)).

Al igual que Fur, la proteína Zur se encuentra en forma de dímeros cuando está en solución y la formación de éstos, dependiente de la región C-terminal de la proteína, no parece estar sujeta a la presencia de zinc en la suspensión (Patzner et al. (2000)). Los estudios realizados sobre la unión al catión, indican que cada dímero de Zur es capaz de interaccionar como mínimo con 2 átomos de zinc. Esta interacción, igual que pasa con otros metaloreguladores, es imprescindible ya que da lugar a una serie de cambios conformacionales que permiten la unión del regulador al DNA, bloqueando así la transcripción de los genes a cuyos promotores es capaz de unirse (Patzner et al. (2000)).

La secuencia aminoacídica de esta proteína también presenta una estructura de hélice-giro-hélice característica de otros reguladores transcripcionales (Fig. 1.16).

1.2.2.2.2 Otros reguladores de la concentración intracelular de zinc

No es la proteína Zur el único regulador transcripcional descrito para el control de los sistemas vinculados con el zinc. Así por ejemplo, las bombas de transporte descritas anteriormente presentan reguladores transcripcionales propios. Entre ellos se pueden destacar:

i) ZntR

Es el regulador de la bomba de exportación de cationes codificado por *zntA*. Se ha descrito en *E. coli* (Brocklehurst et al. (1999)) y pertenece a la familia MerR-like, que incluye otros reguladores transcripcionales de procariotas relacionados con la resistencia a mercurio, con bombas de eflujo de amplio espectro de *B. subtilis*, reguladores transcripcionales de *S. coelicolor* o el regulador GinR de *B. cereus*.

ii) SmtB

Otro metaloregulador relacionado con zinc y que se encarga de la represión del gen que codifica para la metalotioneína SmtA, que confiere resistencia a iones pesados (Patzner et al. (2000)).

iii) ZiaR

Un regulador similar al anterior que controla la expresión de la bomba de expulsión de zinc codificada por *ziaA* e identificada en *Synechocystis* (Thelwel et al. 1998).

1.3. El Manganeseo

1.3.1. Importancia del manganeseo en bacterias

La información que se tiene de otros cationes también esenciales para el metabolismo bacteriano y, que al igual que el hierro o el zinc, resultan ser nocivos cuando sus concentraciones son demasiado altas, es escasa y está prácticamente restringida al caso del manganeseo.

A excepción de microorganismos como *Treponema spp.* o *Lactobacillus spp.* que utilizan manganeso como sustituto bioquímico del hierro para todos las enzimas de su metabolismo (Horsburgh et al. (2001), Reichard (1994)), la concentración necesaria de éste para el desarrollo de la mayoría de bacterias es extremadamente baja, del orden de 10^{-7} M (Kehres et al. (2002)). Se sabe que, *in vitro*, el Mn^{2+} puede actuar como sustituto de otros iones divalentes como el Mg^{2+} , Fe^{2+} o el Zn^{2+} , manteniendo las características estructurales y catalíticas de algunas metaloproteínas como por ejemplo Fur o Zur (de Lorenzo et al. (1988)). Aunque no se ha demostrado si esta sustitución puede darse también *in vivo*.

De hecho se conocen pocas proteínas que tengan una preferencia de unión *in vivo* a manganeso sobre otros cationes divalentes presentes en el citoplasma. Se han descrito ciertas oxidoreductasas, hidrolasas y transferasas que lo utilizan como regulador o como centro catalítico. Por ejemplo, en *E. coli* y en *S. typhimurium* existe la superóxido dismutasa citosólica dependiente de manganeso SodA, cuya expresión está regulada por Fur (Tsolis et al. (1995)). También se ha descrito en estos dos organismos que la serin-treonin-fosfatasa PrpA y PrpB, implicadas en la transducción de señales entre el periplasma y el citosol, tienen la capacidad de unir manganeso en sus centros catalíticos (Patzner et al. (2001)).

El manganeso, además, parece presentar *per se* un efecto protector contra radicales libres como el peróxido o superóxido a través de la formación de complejos bicarbonados mediante un sistema no enzimático (Berlett et al. (1990)). Esta propiedad intrínseca del metal, además de la implicación directa de sus sistemas de transporte con la virulencia de ciertos microorganismos como *S. typhimurium*, *S. pneumoniae* o *Y. pestis*, ha realzado la importancia de dicho metal y de los mecanismos de control de su concentración (Kehres et al. (2002)).

1.3.2. Sistemas de transporte del manganeso

Se han identificado distintos sistemas de transporte implicados en la introducción de manganeso al interior de la célula bacteriana. Algunos son sistemas del tipo ABC, similares a los que se han comentado para el hierro o el zinc. Otros, sin embargo, pertenecen a la familia Nramp, proteínas descritas en eucariotas pero que presentan ortólogos en muchos

procariotas. La característica principal de todos ellos es que también se encargan de la importación de otros oligoelementos necesarios para el desarrollo celular.

1.3.2.1. Sistemas de transporte del tipo ABC

Transportadores específicos para manganeso del tipo ABC (designados como Mnt de *manganes transport*) se han descrito en diversas bacterias como *Synechococcus spp.*, *S. pneumoniae*, *S. gordonii*, *T. pallidum*, *B. subtilis*, *Y. pestis* y *S. typhimurium* (donde se conoce como SitABCD) (Kehres et al. (2002), Patzer et al. (2001), Que et al. (2000)). Como era de esperar, se ha observado que este sistema de transporte incrementa su expresión en condiciones de deficiencia de manganeso y que además, mutantes defectivos en este sistema presentan una menor sensibilidad a este metal.

Estos sistemas son importantes para la capacidad infectiva de algunas bacterias patógenas, a modo de ejemplo, mutantes defectivos de *S. typhimurium*, *Y. pestis* o *S. pneumoniae* presentan una menor virulencia (Kehres et al. (2002)).

1.3.2.2. Sistemas de transporte de tipo Nramp

Las proteínas Nramp1 (de natural resistance-associated macrophage protein) se describieron por primera vez en mamíferos, donde confieren a los macrófagos y a los monocitos la capacidad de controlar la proliferación de algunas bacterias y protozoos patógenos (Lissner et al. (1985)). Estas proteínas pueden participar en el transporte de cationes divalentes asociado a un cotransporte de protones. Se han descrito homólogos en otros animales, insectos, plantas, levaduras y también en organismos procariotas (Makui et al. (2000)).

Los miembros de esta familia proteica descritos en bacterias han sido identificados gracias a su gran homología (alrededor del 35%) con las proteínas Nramp previamente determinadas en eucariotas (Cellier et al. (2001)), y se han designado como MntH (de transporte de manganeso asociado a H^+) (Que et al. (2000)). Se han descrito en bacterias Gram positivas como *B. subtilis*, *S. aureus* o *M. tuberculosis* (Domenech et al. (2002)), y en Gram negativas como *S. typhimurium*, *S. typhi*, *Y. pestis* o *E. coli* (Makui et al. (2000), Kehres et al. (2000), Kehres et al. (2002))

La expresión de estos transportadores de manganeso, además de verse afectada por la disminución de cationes divalentes, es inducida por la presencia de peróxido de hidrógeno. De hecho, en la región promotora de *mntH* se ha detectado la presencia de cajas de unión para los reguladores OxyR y para Fur (Kehres et al. (2000), Kehres et al. (2002)). Hecho que conecta nuevamente los sistemas de importación de cationes divalentes y el estado oxidativo de la célula.

1.3.3. Regulación del transporte de manganeso

1.3.3.1. La proteína MntR

Además de la regulación de los sistemas de transporte de manganeso por señales relacionadas con la concentración de otros cationes divalentes o el estado oxidativo en el que se encuentra la célula, a través de Fur y OxyR, que se ha descrito anteriormente, la expresión de éstos se ve modulada por la concentración de manganeso existente en la célula a través de la intervención del regulador MntR (de *manganese transport regulator*) (Patzer et al. (2001), Que et al. (2000)).

Este regulador transcripcional, identificado por primera vez en *B. subtilis* (Que et al. (2000)) y posteriormente en otras bacterias como *E. coli* y *S. typhimurium* (Patzer et al. (2001)), presenta cierta homología con el regulador DtxR, descrito anteriormente y vinculado con la homeóstasis del hierro. Su estructura proteica puede dividirse en dos dominios diferenciales: La parte N-terminal está relacionada con la unión a DNA y la C-terminal que se encarga de la unión a manganeso (Patzer et al. (2001)).

Al igual que otros metaloreguladores, la proteína MntR reconoce una secuencia palindrómica concreta en la región promotora de los genes cuya expresión regula. Esta secuencia es distinta para Enterobacterias (*E. coli* y *S. typhimurium*) (Patzer et al. (2001)) que para *B. subtilis* (Que et al. (2000)) (Fig 1.18). Además, por los estudios de “footprint” realizados con la proteína purificada, se observa un patrón de unión similar al que se encontraba en la proteína Fur, ya que la región de protección se amplía a medida que se incrementa la concentración de proteína utilizada en el ensayo (Patzer et al. (2001)). Como en el caso del Zur, los reguladores MntR caracterizados no se autorregulan (Patzer et al. (2001)).

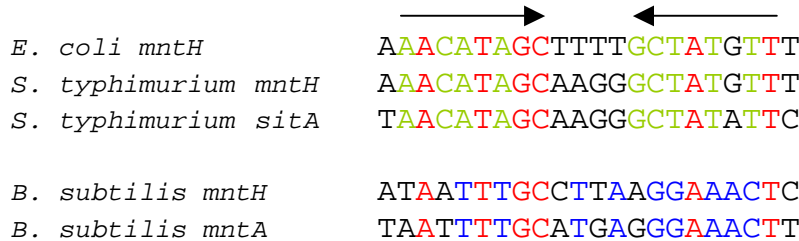


Fig. 1.18. Secuencia de unión de MntR en los distintos promotores de genes de *E. coli*, *S. typhimurium* y *B. subtilis*. Las bases en rojo son las comunes para la caja de los tres microorganismos. En verde se marcan las que se conservan entre la región de unión de *E. coli* y *S. typhimurium*. En azul las bases comunes en los dos promotores de *B. subtilis*. El palíndromo existente en *E. coli* y *S. typhimurium* se señala con dos flechas.

En *E. coli* y *S. typhimurium* la proteína MntR se encarga de la regulación de los transportadores de manganeso codificados por *mntH* y *sitABCD* (Makui et al. (2000)). En el caso de *B. subtilis*, se ha comprobado mediante experimentos de retraso y estudios con fusiones génicas, la unión al promotor y la regulación de la expresión de los genes *mntH* y *mntABCD*, implicados ambos en el transporte de manganeso (Que et al. (2000)). Si bien el control ejercido sobre la transcripción es negativo en los casos anteriores, este regulador de *B. subtilis* puede ejercer un control positivo sobre la expresión de determinados genes, como se ha demostrado para el gen *mntA*.

Los mecanismos de control de la homeóstasis del manganeso no están aún demasiado claros, pero parece que a concentraciones intracelulares de dicho catión bajas, el regulador MntR se encontraría en forma de apoproteína, pudiendo en este estado actuar como activador transcripcional de ciertos genes (como *mntA* de *B. subtilis* (Que et al. (2000))). Sin embargo, cuando los niveles intracelulares de manganeso aumentan, éste se une a MntR, que sería entonces capaz de reconocer la región promotora de los sistemas de transporte de manganeso evitando su transcripción y regulando así la incorporación de dicho elemento.

1.3.3.2. Otros reguladores del transporte de manganeso

Dentro de la familia de metaloreguladores similares a DtxR existen algunos miembros que se encargan del control de la expresión de genes implicados en el transporte de manganeso y que tienen también a este catión como cofactor. Éstos presentan, en realidad, mayor similitud estructural y funcional con el MntR que con DtxR. Este sería el caso de la metaloproteína TroR presente en *T. pallidum* que actúa como regulador de sistemas de transporte de manganeso tipo ABC de este microorganismo (Posey et al. (1999)), la proteína SirR de *S. epidermidis* implicada en la regulación de un transportador también del tipo ABC pero vinculado en este caso no sólo con el transporte de manganeso sino también de hierro (Hill et al. (1998)), o el regulador ScaR, sintetizado por *S. gordonii* y que regula la expresión del transportador ScaABC (Jakubovics et al. (2000)). Además todos ellos presentan secuencias de reconocimiento bastante parecidas entre si en las regiones promotoras de los genes que regulan (Fig. 1.19) (Patzner et al. (2001)).



Fig. 1.19. Comparación entre la secuencia de unión de MntR con otros reguladores de manganeso como TroR de *T. pallidum*, que se une a su propio promotor o ScaR de *S. gordonii*, que reprime a la región promotora del transportador ScaABC. Se destacan las bases más conservadas entre ellos (Patzner et al. (2001)).

1.3.4. Papel del manganeso en el control de patógenos en los fagosomas de macrófagos

Los transportadores Nramp se describieron inicialmente en los macrófagos de mamíferos y su actividad se determinó a raíz de la identificación de estas proteínas como transportadores de cationes divalentes en otras células del huésped, en concreto las que formaban parte del epitelio intestinal y sintetizaban Nramp2 (Cellier et al. (1996)). Pero el papel desarrollado por estos transportadores durante los procesos infecciosos no está claro aún, si bien existen al respecto diferentes hipótesis en las que, evidentemente, cationes divalentes como Fe²⁺ o Mn²⁺ ocupan un papel central (Makui et al. (2000)).

Una de estas hipótesis postula que los transportadores Nramp1, presentes en la membrana del endosoma, competirían con el patógeno por los cationes de hierro y manganeso necesarios para la actividad catalítica de las superóxido dismutasas sintetizadas por la bacteria para defenderse de los radicales tóxicos generados por el macrófago (Kehres et al. (2000)). Esta privación es sobretodo de cationes de manganeso ya que las cantidades de Fe^{2+} existentes en el endosoma son demasiado bajas para ser captadas por Nramp1. De hecho, mutantes *sodA* de *Moraxella catarrhalis* son menos virulentos que la cepa salvaje de la que proceden (Luke et al. 2002). Parece que la entrada en el macrófago da lugar a la inducción de MntH del patógeno, lo que permite una acumulación de manganeso en el interior, que a parte de tener un efecto protector *per se*, generaría una concentración suficiente de éste para la actividad de SodA, permitiendo en consecuencia la detoxificación de especies reactivas de nitrógeno u oxígeno generadas por el huésped (Luke et al. 2002).

1.4. Objetivos

El objetivo fundamental de la presente tesis ha sido determinar la importancia de la regulación de la concentración intracelular de hierro y de zinc en microorganismos patógenos intracelulares facultativos, concretamente en *S. typhimurium*, determinando cual era, si es que existía, el grado de afectación de la virulencia de cepas Fur⁻, en el caso del hierro, y Zur⁻ o ZnuCB⁻ para el estudio de las alteraciones de la concentración intracelular de zinc.

Por otro lado se ha descrito que cepas patógenas con mutaciones en los genes *mut*, cuyos productos participan en la reparación de DNA a través de los sistemas de reparación de apareamientos incorrectos, se aíslan de muestras clínicas con una frecuencia superior a la que cabría esperar por la tasa de mutagénesis espontánea intrínseca para cada cepa (LeClerc et al. (1996)). Estos mutantes *mut* presentan una frecuencia de mutagénesis espontánea marcadamente superior a la de cepas salvajes (Eisen (1998)). Se ha postulado que esta tasa de mutación más elevada podría representar una ventaja sobre el resto de la población patógena emergente, hipotetizándose incluso que el abanico de variación generado por el aumento de la mutagénesis permitiría mayor capacidad de evasión de los

sistemas de respuesta inmune del huésped (Horst et al. (1999), Sokuerenko, et al.. (1999), LeClerc et al. (1996)). Para determinar la validez de esta hipótesis así como estimar cual era el nivel de daño en el DNA generado durante el proceso de infección, se ha llevado a cabo también un estudio del efecto que ejerce sobre la virulencia una elevada tasa de mutación debida a alteraciones relacionadas con dos sistemas de reparación distintos, el de reparación por *mismatch* (representado por un mutante *mutS*) y la reparación tendente al error del sistema SOS (utilizando la expresión del sistema UmuDC de *E. coli* en *S. typhimurium*). Este último estudio está relacionado con la capacidad dañina para el DNA bacteriano que ejercen concentraciones intracelulares elevadas de diferentes cationes divalentes como el Fe^{2+} y el Zn^{2+} que se ha comentado a lo largo de los apartados precedentes de la introducción.