



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

**Caracterización de los sistemas de captación
de hierro y zinc del patógeno animal
*Pasteurella multocida***

M^aElena Garrido Ocaña
2005

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE
BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

**Caracterización de los sistemas de
captación de hierro y zinc del patógeno
animal *Pasteurella multocida***

Memoria presentada por la
licenciada en Biología
M^aElena Garrido Ocaña para
optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas por la
Universidad Autónoma de
Barcelona.

Vo Bo

Los directores de la tesis

Dra. Montserrat Llagostera Casas

Dr. Jordi Barbé García

Barcelona 2005

A mis padres,
A José Manuel

"Que cada uno de vosotros sea su propia isla,
cada uno su propio refugio."

BUDA

RESUMEN

El hierro y el zinc son micronutrientes esenciales para el crecimiento normal de la gran mayoría de microorganismos, siendo los mecanismos de captación de estos cationes divalentes elementos fundamentales para que las bacterias patógenas sean capaces de promover un proceso infeccioso. Además, las proteínas receptoras de hierro se localizan en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, lo cual las hace candidatas a ser empleadas para el diseño de vacunas.

En este marco, el objetivo de la presente tesis doctoral ha sido profundizar en el estudio de los mecanismos de captación de cationes divalentes de *Pasteurella multocida*, una bacteria patógena que afecta a una gran variedad de animales originando importantes pérdidas económicas en el sector ganadero.

En este estudio se ha identificado un receptor de hierro de 60 kDa, al que se ha denominado HbpA, que presenta un mecanismo de regulación distinto al utilizado comúnmente por las bacterias, ya que es independiente del sistema Fur, determinándose que su regulación depende de Fe^{2+} , Mn^{2+} y hemina. Se ha demostrado que el gen que codifica esta proteína presenta un corrimiento programado de lectura que da lugar a un derivado truncado de 40 kDa. Se ha caracterizado así mismo la función de esta proteína, determinándose que une tanto hemina como hemoglobina, y que la capacidad de unión a ambas se mantiene en el derivado truncado de la proteína. Además, se ha estudiado la antigenicidad de la proteína HbpA, así como su efecto inmunogénico, demostrándose que la proteína HbpA y su derivada truncada son antigénicas, pero no se obtiene protección cuando se administra dicha proteína entera en experimentos de enfrentamiento utilizándose un modelo experimental animal de ratón.

Por lo que se refiere a los mecanismos de incorporación de zinc de *P. multocida*, desconocidos hasta el presente, se han caracterizado los genes de captación de zinc de alta afinidad (*znuABC*), determinándose que existe una separación de 820 kb entre los genes *znuA* y *znuCB* y que los genes *znuC* y *znuB* forman parte de una misma unidad transcripcional. A diferencia de lo que ocurre en *Escherichia coli* y en otras bacterias, en las cuales la proteína Zur regula la expresión de este sistema de

captación de zinc, en *P. multocida* no se ha encontrado una proteína homóloga a dicha proteína Zur. No obstante, se ha podido establecer que en este patógeno es la proteína Fur la responsable de la regulación de las unidades transcripcionales *znuA* y *znuCB*, juntamente con los iones Zn^{2+} y Fe^{2+} . Finalmente, mediante la construcción de mutantes *znuA* y *znuC*, también se ha demostrado que estos genes son imprescindibles para la virulencia de *P. multocida*.

ÍNDICE

	página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Pasteurella multocida</i> y su importancia como patógeno animal	1
1.2. EL HIERRO	1
1.2.1. Importancia del hierro en los microorganismos	1
1.2.2. El hierro y el estrés oxidativo	3
1.2.3. Disponibilidad de hierro en el huésped	4
1.2.4. Mecanismos de captación de hierro	5
1.2.4.1. Paso del hierro a través de la membrana externa. El complejo Ton	9
1.2.4.2. Paso del hierro a través de la membrana citoplasmática	12
1.2.4.3. Control de la expresión de los genes que codifican las proteínas implicadas en la captación de hierro	16
1.2.4.3.1. La proteína Fur	16
1.2.4.3.2. La caja Fur	18
1.2.4.3.3. Mecanismo de acción	21
1.2.4.3.4. Regulación del gen <i>fur</i>	23
1.2.4.3.5. El regulón Fur	24
1.2.4.3.6. Otros genes regulados por Fur	25
1.2.4.3.7. La proteína DtxR y la familia de reguladores similares a DtxR	27
1.2.4.4. Proteínas similares a Fur	28
1.2.4.4.1. La proteína PerR	28
1.2.4.4.2. La proteína Irr	28
1.2.5. Almacenamiento de hierro en las células bacterianas	29
1.2.6. Importancia antigénica de las proteínas receptoras de transportadores de hierro	30
1.2.6.1. Proteínas purificadas	30
1.2.6.2. Células inactivadas	32
1.3. EL ZINC	33
1.3.1. Importancia del zinc en los microorganismos	33
1.3.2. Importancia del zinc en el estrés oxidativo	34
1.3.3. Disponibilidad de zinc en el huésped	35

1.3.4.	Transporte de zinc	35
1.3.4.1.	Mecanismos de exportación de zinc	36
1.3.4.1.1.	Facilitadores de la difusión de cationes	36
1.3.4.1.2.	Exportadores de tipo RND (<i>Resistance Nodulation Division</i>)	37
1.3.4.1.3.	ATPasas de tipo P	37
1.3.4.2.	Reguladores de los genes que codifican proteínas implicadas en la exportación de zinc	39
1.3.4.3.	Mecanismos de captación de zinc	40
1.3.4.4.	Regulación de los sistemas de captación de zinc de alta afinidad	44
1.3.4.4.1.	La proteína Zur	44
1.3.4.4.2.	La caja Zur	47
1.3.4.5.	Sistemas de baja afinidad de captación de zinc	47
1.3.5.	Almacenamiento de zinc en las células bacterianas	49
1.3.6.	Importancia en la virulencia de las proteínas implicadas en la captación de zinc de alta afinidad	50
2.	OBJETIVOS	52
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
3.1.	Identificación de un receptor de hemina de <i>Pasteurella multocida</i> no regulado por la proteína Fur	53
3.1.1.	Detección de un corrimiento de lectura programado en la traducción en el genoma de <i>P. multocida</i>	53
3.1.2.	Caracterización de la función de la proteína PM0592	58
3.1.3.	Análisis de la antigenicidad e inmunogenicidad de la proteína HbpA	66
3.1.4.	Identificación de la región de unión del gen <i>hbpA</i> a su regulador	68
3.2.	Estudio del sistema de captación de zinc de alta afinidad en <i>P. multocida</i>	73
3.2.1.	Aislamiento de las unidades transcripcionales <i>znuA</i> i <i>znuCB</i> en <i>P. multocida</i>	74
3.2.2.	Análisis de la expresión de las unidades transcripcionales <i>znuA</i> y <i>znuCB</i>	78

3.2.3. Importancia en la virulencia de los genes <i>znuA</i> y <i>znuCB</i>	83
4. CONCLUSIONES	87
5. BIBLIOGRAFÍA	88
6. ANEXOS	
6.1. Artículo 1	108
6.2. Artículo 2	117
7. AGRADECIMIENTOS	124

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Pasteurella multocida* y su importancia como patógeno animal

Pasteurella multocida es una bacteria Gram negativa encuadrada en la subdivisión gamma de las proteobacterias, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*. Fue aislada por primera vez de sangre de pájaros por Louis Pasteur, en 1880, quien la caracterizó morfológica y bioquímicamente.

En el género *Pasteurella* se incluyen en la actualidad 20 especies que son, fundamentalmente, microorganismos patógenos de animales y que en ocasiones causan infecciones en el hombre. La mayoría de éstas son producidas por *P. multocida*. En animales, esta bacteria afecta desde pájaros hasta mamíferos, causando distintos tipos de enfermedad y es responsable de importantes pérdidas económicas en producción animal.

P. multocida es una bacteria aerobia facultativa, inmóvil que crece bien en medios de agar sangre, chocolate y Mueller-Hinton, pero es incapaz de desarrollarse en agar McConkey, eosina azul de metileno (EMB), o en otros medios selectivos o diferenciales empleados para el aislamiento de enterobacterias. Tras 24 horas de incubación en agar sangre, *P. multocida* crece formando colonias lisas de 1-2 mm de diámetro, de un color gris azulado brillante, no hemolíticas, presentando algunos serotipos un aspecto mucoso.

1.2. EL HIERRO

1.2.1. Importancia del hierro en los microorganismos

El hierro es un metal de transición que existe en dos estados redox: Fe^{2+} y Fe^{3+} , que a su vez puede adoptar distintos estados *spin* dependiendo del ligando ambiental. Estas propiedades hacen del hierro un elemento prostético altamente versátil para su incorporación en proteínas, participando los grupos hierro-sulfuro en la transferencia de electrones o bien actuando como centros catalíticos y sensores de hierro y oxígeno (Beinert *et al.*, 1997). Se trata, por tanto, de un cofactor de numerosas enzimas y

juega un papel importante en las reacciones redox, formando parte de moléculas clave como los citocromos, la ribonucleótido reductasa y otros muchos compuestos relacionados con el metabolismo; por ejemplo, participa en la síntesis de pirimidinas y ácidos grasos, así como en el ciclo de los ácidos carboxílicos (Crosa, 1997; Braun y Killmann, 1999; Ratledge y Dover, 2000; Köster, 2001). Es por ello que el hierro es un nutriente esencial para prácticamente todos los organismos vivos (Earhart, 1996), a excepción posiblemente de *Lactobacillus* (Weinberg, 1997). El potencial redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ está comprendido entre 1300 y 2500 mV, dependiendo del ligando. Su funcionalidad biológica depende de su incorporación en proteínas, tanto en forma mono o binuclear, o bien formando parte de los ya nombrados complejos Fe-sulfuro o de los grupos hemo (Andrews *et al.*, 2003).

Las bacterias necesitan una concentración de hierro comprendida entre 10^{-6} y 10^{-8} M (Pradel *et al.*, 2000), lo cual quiere decir que una célula requiere del orden de 10^5 - 10^6 iones de hierro por generación para poder crecer (Wandersman y Stojiljkovic, 2000). A densidades celulares altas (10^9 células/ml) cada generación puede consumir 10^{18} átomos de hierro por litro (Braun *et al.*, 1998).

El Fe^{2+} es soluble y accesible para las bacterias y tan sólo se requiere el transporte a través de la membrana celular. No obstante, en presencia de O_2 y a $\text{pH} \geq 7$ se oxida a Fe^{3+} , siendo insoluble y no biodisponible (Andrews *et al.*, 2003). Las bacterias pueden proveerse de hierro solubilizando los óxidos férricos. Esto lo pueden hacer de tres formas distintas: disminuyendo el pH para que el hierro sea soluble, reduciendo el ión férrico a ferroso, o bien utilizando quelantes de ión férrico. El uso de quelantes ya sea unidos a la superficie celular o bien excretándolos al exterior son las estrategias que han adoptado la mayoría de microorganismos (Guerinot, 1994).

La limitación de la disponibilidad de hierro afecta al crecimiento de prácticamente cualquier especie bacteriana. Es por ello que en el caso de las bacterias patógenas la adquisición de hierro es uno de los principales pasos en su desarrollo dentro del huésped y determinará su supervivencia en dicho huésped. Así pues, la captación de hierro puede ser importante a la hora de diseñar nuevos agentes quimioterapéuticos. Además, mutaciones en estos genes podrán dar lugar a la disminución de la virulencia de los patógenos o incluso producirán una cepa atenuada.

La disponibilidad de hierro es también un elemento muy importante en la infección bacteriana, ya que puede ser una señal ambiental que genere la expresión de distintos factores de virulencia (Litwin y Calderwood, 1993). Un ejemplo es la toxina I parecida a la toxina Shiga de *E. coli* enterohemorrágica, la cual se induce por privación de hierro (Calderwood y Mekalanos, 1987).

1.2.2. El hierro y el estrés oxidativo

En condiciones de riqueza de oxígeno, el hierro es además una fuente de radicales peligrosos para la célula, ya que si hay hierro libre en el citoplasma celular se forman las denominadas especies reactivas de oxígeno (EROs) como radicales hidroxilos (OH^\bullet), aniones superóxidos (O_2^-) y peróxidos (RO_2) a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Fig. 1.1) (Touati, 2000). Estas EROs pueden dañar lípidos, proteínas y DNA por oxidación, por lo que la célula debe eliminarlas antes de que causen daños significativos (Hansberg, 2002) (Fig. 1.1).

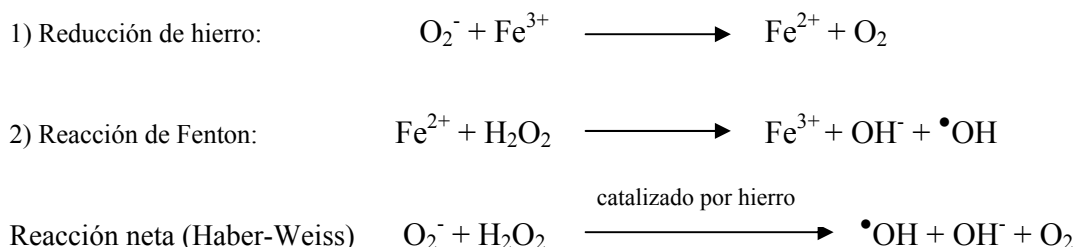


Fig. 1.1. Reacciones químicas que involucran al hierro en la formación de formas reactivas de oxígeno. Figura modificada de Andrews *et al.* (2003).

En la reacción de Fenton se forma el radical hidroxilo (OH^\bullet) que está considerado como el radical más reactivo en los sistemas biológicos. Su interacción con los ácidos grasos poliinsaturados que componen los fosfolípidos de las membranas, da lugar a la formación de uniones inusuales en estos lípidos, produciéndose un daño

oxidativo celular que disminuye la fluidez de la membrana y llega incluso a causar la lisis de las células (Hansberg, 2002).

Los mecanismos de defensa utilizados por las bacterias para evitar este daño oxidativo y que están probablemente mediados por la expresión de catalasas/peroxidasas y posibles reductasas alquilo-hidroxisas (Manca *et al.*, 1999) son esenciales para su supervivencia, especialmente para aquellas bacterias que pueden sobrevivir dentro de los macrófagos (Andrews, 1998; Miller y Britigan, 1997; Russell, 1999). Por ello, es muy importante mantener la homeostasis de hierro para evitar que se produzcan estos radicales en demasía.

1.2.3. Disponibilidad de hierro en el huésped

Se sabe que durante el proceso de infección por algún patógeno bacteriano, éste puede adquirir directamente todos los nutrientes que necesita del huésped que infecta, a excepción del hierro (Ratledge y Dover, 2000).

En los tejidos del huésped el hierro se encuentra unido a la **hemoglobina**, que es la proteína que viaja en los glóbulos rojos y media el transporte de oxígeno; o bien está almacenado intracelularmente en forma de **ferritina** (especialmente en el hígado pero también en otros tejidos); o es quelado por la **transferrina** en el suero o la **lactoferrina** en las superficies de las mucosas (Wooldridge y Williams, 1993). La **albúmina**, que es la proteína mayoritaria en el plasma, también tiene la capacidad de unir hasta 10 átomos de hierro por molécula (Genco y Dixon, 2001). Cuando se produce hemólisis de los glóbulos rojos, la hemoglobina pasa al torrente sanguíneo, pero rápidamente se une a otra proteína denominada **haptoglobina** en una relación 1:1. Si se satura la haptoglobina, la hemoglobina libre en el plasma se oxida, de modo que se disocian el grupo hemo de la globina el cual se une específicamente a otra proteína denominada **hemopexina**. Tanto la hemoglobina-haptoglobina como la hemopexina-hemo, son conducidas al hígado (Otto *et al.*, 1992).

En total, aproximadamente el 80% del hierro en humanos se encuentra formando parte del grupo hemo. Esto equivale a unos 3 g de hierro (Maret, 2001). El hierro que queda libre dista mucho de ser suficiente para suplir los requerimientos de las

bacterias patógenas (van Vliet *et al.*, 2002), pues su concentración en solución suele ser de 10^{-18} M (Ratledge y Dover, 2000), valor muy inferior al requerimiento bacteriano que como se ha indicado es del orden de 10^{-6} - 10^{-8} M (Pradel *et al.*, 2000).

Además, los huéspedes disponen también de mecanismos especializados para disminuir la concentración de hierro libre. Así, cuando ésta aumenta por alguna causa, se sintetiza en el hígado una proteína denominada **hemosiderina**, que tiene características similares a la ferritina (Otto *et al.*, 1992; Ratledge y Dover, 2000).

Otro mecanismo importante del que disponen las células del huésped y que responde directamente a la invasión de un microorganismo intracelular, es la alteración del estatus de hierro intracelular. Se ha descrito una proteína de resistencia natural asociada a macrófagos, denominada **Nramp1** que actúa aumentando la captación de hierro, por lo tanto aumenta la concentración de hierro intracelular para dañar a las bacterias al estimular la formación de radicales hidroxilos y aniones superóxidos ($\bullet\text{OH}$ y O_2^-) (Lissner *et al.*, 1985)

1.2.4. Mecanismos de captación de hierro

En las bacterias Gram negativas, el hierro biodisponible debe atravesar la membrana externa hasta el periplasma y de ahí ser internalizado al citoplasma a través de la membrana celular. Para ello, la célula posee receptores de membrana externa y un complejo que le suministra la energía necesaria para el transporte del hierro al periplasma (complejo Ton). En las bacterias Gram positivas, micobacterias y miembros del grupo micoplasma, ni el complejo Ton, ni los receptores de membrana externa que se describen a continuación son necesarios. En este caso las proteínas de unión al hierro son lipoproteínas ancladas en la membrana citoplasmática, por lo tanto deberán atravesar el peptidoglicano y esta membrana (Köster, 2001).

Los mecanismos de captación de hierro de que disponen las bacterias patógenas, tanto Gram negativas como Gram positivas, se pueden clasificar en dos tipos: los que implican la síntesis y liberación al exterior de moléculas de bajo peso molecular y

con elevada afinidad por el hierro, denominadas sideróforos, que secuestran el hierro de las moléculas del huésped y los que se basan en una interacción directa de los receptores con las proteínas del huésped que transportan el hierro (transferrinas, lactoferrina, hemoglobina, etc.) (Ratledge y Dover, 2000). Seguidamente se comentan brevemente ambos mecanismos.

A. Sideróforos

Los sideróforos son ligandos de hierro de baja masa molecular (<1000 Da) que se caracterizan por unir hierro con alta afinidad y especificidad.

Generalmente son secretados al exterior aunque algunos están permanentemente asociados a la envoltura celular, como la micobactina de las micobacterias (Ratledge y Dover, 2000). Estas moléculas son producidas por muchas bacterias, algunos hongos (Köster, 2001) y plantas monocotiledóneas en respuesta a la restricción ambiental de hierro (Ratledge y Dover, 2000).

Los sideróforos reconocen específicamente moléculas que contienen Fe^{3+} y secuestran dicho hierro. El poder de unión de los sideróforos a este catión es suficientemente grande como para secuestrarlo aun cuando éste se encuentre en moléculas como la ferritina, la transferrina y la lactoferrina, pero son incapaces de secuestrar el hierro de las hemoproteínas (Ratledge y Dover, 2000).

El número de sideróforos distintos producidos por bacterias, levaduras y otros hongos es superior a 500 (Drechsel y Jung, 1998; Drechsel y Winkelmann, 1997; Neilands, 1995; Telford y Raymond, 1996; Winkelmann, 1991; Winkelmann y Drechsel, 1997).

Una vez secretados, los sideróforos son capturados por la célula productora gracias a que ésta dispone de receptores, que, en el caso de las bacterias Gram negativas, están situados en la membrana externa (Fig. 1.2). La síntesis de estos receptores se induce en respuesta a la privación de hierro, ya que normalmente la expresión de los genes que los codifican está reprimida cuando hay suficiente hierro. Una razón importante para que dichos receptores no se expresen cuando hay suficiente hierro es que son lugares de entrada de colicinas y antibióticos, así como de adsorción de bacteriófagos.

Las bacterias poseen múltiples receptores de sideróforos de membrana externa y cada uno de ellos provee a la célula de una especificidad para distintos sideróforos. Por ejemplo, *E. coli* K-12 posee como mínimo seis receptores de sideróforos los cuales le permiten la adquisición de ocho complejos distintos de quelantes de hierro. De éstos, cuatro son producidos por otros organismos y sólo uno de ellos, la enterobactina, lo sintetiza *E. coli*. Esta estrategia es típica de las bacterias, utilizar sideróforos exógenos secuestrándolos de sus competidores (Silver, 1996).

B. Proteínas receptoras de transportadores de hierro

Los receptores de moléculas que transportan hierro se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram negativas o en la pared celular de las Gram positivas. Estos receptores pueden unir transferrinas/lactoferrinas y/o hemo/hemoproteínas (Fig. 1.2).

Así, muchos patógenos miembros de la familia *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae*, en condiciones de limitación de hierro, producen un complejo proteico que interacciona específicamente con las moléculas de transferrina de sus organismos huéspedes (Fuller *et al.*, 1998; Morton y Williams, 1989). Se trata de los receptores de membrana externa TbpA y TbpB. Ambas proteínas actúan conjuntamente (Cornelissen y Sparling, 1996). La proteína TbpB es una lipoproteína que se encuentra anclada por un pequeño dominio a la membrana externa y que tiene la mayor parte de su estructura expuesta fuera de la célula. Esta proteína reconoce y une la transferrina unida a hierro, luego la presenta al dímero formado por dos proteínas TbpA (Boulton *et al.*, 1999). El hierro es liberado de la transferrina y la proteína TbpA introduce el Fe^{3+} al periplasma, utilizando la energía proporcionada por el sistema ExbB-ExbD-TonB. Desde el periplasma pasa al citoplasma mediante un sistema de transporte de tipo ABC que viene dado por las proteínas Fbp (Fe [III] Binding Protein) (Khun *et al.*, 1998; Kirby *et al.*, 1997).

Algunas bacterias Gram positivas, como *S. epidermidis* y *S. aureus*, también pueden expresar receptores de transferrina (Modun *et al.*, 1994), los cuales se localizan en su pared celular (Modun y Williams, 1999). Inicialmente, se pensó que la proteína

responsable de la unión de la transferrina humana a *S. aureus* era una enzima asociada a la superficie celular de esta bacteria denominada gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa o Gap (Modun y Williams, 1999), pero Taylor y Heinrichs han demostrado que esta enzima no es la implicada en la unión a transferrina, sino que la responsable es una proteína que no presenta similitud con ninguna otra proteína de unión a transferrina conocida hasta el momento y que se denomina StbA (*staphylococcal transferrin-binding-protein A*). Se trata de una proteína anclada a la pared celular gracias a que contiene el típico motivo C-terminal (LPKTG) de anclaje a dicha estructura (Taylor y Heinrichs, 2002).

En cuanto a la captación de hemina/hemoproteínas, se han descrito hasta el momento dos mecanismos básicos en bacterias Gram negativas:

- El más común se basa en la unión directa y el procesamiento de la hemina o de la hemoproteína por un receptor de membrana externa dependiente de *tonB*. La hemina pasa a periplasma para ser transportada al citoplasma vía un sistema PBT (periplasmic binding-protein-dependent transport) (Fig. 1.2).
- El otro sistema consta de una proteína soluble, denominada hemóforo, que interacciona con las hemoproteínas y lleva la hemina a la superficie celular, donde interacciona con el receptor dependiente de *tonB* (Ratledge y Dover, 2000).

Además de estos mecanismos básicos, se ha descrito que algunos patógenos producen enzimas que aumentan la eficacia de estos sistemas, sintetizando proteasas que secretan al medio y degradan a las proteínas transportadoras de hierro del huésped (Genco y Dixon, 2001). Por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* sintetiza la proteínasa Kgp, que se une a hemoglobina, hemopexina y transferrina y las degrada. Otras bacterias producen hemolisinas, que son secretadas y se encargan de lisar a los eritrocitos, liberándose de este modo el contenido celular y generando por tanto hemoglobina libre (Genco y Dixon, 2001).

En cuanto a las bacterias Gram positivas, se ha descrito en *S. aureus* el sistema Isd, el cual está compuesto por un grupo de proteínas denominadas IsdABCDEFGG que se

encargan de unir hemoglobina y transportar el hierro ligado a la hemina a través de la pared bacteriana. Así, IsdB es la proteína encargada de unir la hemoglobina a la superficie bacteriana, IsdA e IsdB separan la hemina de la hemoglobina y la transfieren a IsdC. A su vez, esta proteína que se encuentra localizada en la pared celular, transfiere la hemina a los factores de translocación de membrana, IsdD, IsdE e IsdF, los cuales introducen dicha hemina al citoplasma. Finalmente, la proteína IsdG, localizada en el citoplasma, presumiblemente se encarga de liberar el hierro de la hemina (Mazmanian *et al.*, 2003). Otras bacterias como *L. monocytogenes* y *Bacillus anthracis* expresan proteínas Isd, así que probablemente también exista un sistema similar de adquisición de hierro en otras bacterias Gram positivas (Cabanes *et al.*, 2002).

1.2.4.1. Paso del hierro a través de la membrana externa. El complejo Ton.

En las bacterias Gram negativas, una vez la proteína que transporta el hierro se encuentra asociada a la membrana externa, debe atravesar la membrana para alcanzar el periplasma.

La permeabilidad de la membrana externa viene determinada por las proteínas formadoras de poros o canales a través de las cuales pueden difundir distintas moléculas. Hasta el presente se han descrito tres tipos de canales:

- Los **canales del tipo I** a través de los cuales pueden difundir hasta el periplasma compuestos hidrofóbicos de un tamaño inferior o igual a 600 Da. Estos canales están permanentemente abiertos y no presentan ninguna especificidad aunque algunos muestran preferencia por aniones o cationes determinados.
- Los **canales del tipo II** permiten la difusión no específica de compuestos de bajo peso molecular, aún cuando también reconocen sustratos específicos y permiten la difusión de compuestos mayores de los que penetran por los canales del tipo I.
- Los **canales del tipo III** son esenciales para la captación de hierro, vitamina B₁₂ y colicinas. Estos sustratos son normalmente muy grandes para penetrar

por los canales mencionados anteriormente y/o se encuentran en muy baja concentración en el medio, por lo que requieren receptores específicos de superficie celular. Estos receptores unen a sus ligandos con una afinidad mucho mayor ($K_m = 0,2\mu\text{M}$) que la de los canales del tipo II ($K_m = 0,1\text{mM}$) y necesitan energía para liberar el sustrato al periplasma.

Así pues, el hierro atraviesa la membrana externa por los canales del tipo III y se requiere energía para que este proceso tenga lugar, lo que en su momento planteó una paradoja, ya que no hay ninguna fuente de energía en la membrana externa ni en el espacio periplasmático adyacente. En el periplasma no hay canales proteicos abiertos, ni ATP (trifosfato de adenosina), PEP (fosfoenolpiruvato) u otros compuestos ricos en energía. Sin embargo, existía la evidencia de que se requería energía para la captación de ciertos compuestos (sideróforos, vitamina B₁₂, colicinas B y fagos T1 y $\phi 80$ en *E. coli*) a través de receptores específicos localizados en la membrana externa (Braun, 1995; Reynolds *et al.*, 1980).

Esta paradoja fue resuelta al demostrarse que dicha energía era proporcionada por el **complejo Ton**, el cual es una unidad funcional integrada por tres proteínas (TonB, ExbB y ExbD), anclado en la membrana citoplasmática (Fig. 1.2). Estas proteínas suministran a los receptores de membrana externa un potencial electroquímico desde la membrana celular. (Braun *et al.*, 1998; Kadner, 1990; Moeck y Coulton, 1998; Postle, 1999).

La proteína TonB se encuentra inserta en la membrana interna y es la responsable de proporcionar una fuerza motora de protones desde la membrana celular para activar el transporte a través de la membrana externa. Las proteínas ExbB y ExbD estabilizan a TonB y también contribuyen a su reciclaje cuando ésta sufre un ciclo de cambios conformacionales al translocar energía (Pradel *et al.*, 2000).

Algunas bacterias presentan más de un sistema TonB-ExbB-ExbD. Por ejemplo, *Vibrio cholerae* posee las proteínas TonB1 y TonB2 que parecen tener especificidad diferente para distintos receptores de membrana externa. La razón de esta dicotomía aún no está clara (Mey y Payne, 2001).

Las tres proteínas que componen el complejo Ton se encuentran localizadas en la membrana citoplasmática en una relación 1:7:2 de TonB:ExbB:ExbD (Higgs *et al.*, 1998).

La proteína **ExbB** presenta tres dominios transmembrana, mientras que su extremo N-terminal y un pequeño giro se encuentran en el periplasma. **ExbD** sólo se encuentra anclada a la membrana citoplasmática por su extremo N-terminal, y el resto de la proteína se localiza en el periplasma (Braun y Killman, 1999).

La proteína **TonB** es una proteína de 26 kDa inusual, ya que contiene una secuencia hidrofóbica en su extremo N-terminal por el que se ancla a membrana citoplasmática (Postle y Skare, 1988) y dos regiones ricas en prolina (EPEPEPEPIPEP y KPKPKPKPKPKP) que sugieren una estructura similar a una barra (Hannavy *et al.*, 1990), formándose una región rígida y extensa que se expande por el espacio periplasmático y permite que su dominio C-terminal interactúe con los receptores de membrana externa (Reynolds *et al.*, 1980). Se puede identificar también un motivo anfipático beta-alfa-beta, cercano al extremo C-terminal, por donde TonB podría conectar con dichos receptores de membrana externa (Moeck y Coulton, 1998). De este modo, la proteína TonB interaccionaría con el complejo ExbB-ExbD por su extremo N-terminal y con los receptores de membrana externa por su extremo C-terminal.

Actualmente se postula que la unión de la proteína transportadora de hierro a su receptor de membrana externa le provoca un cambio que permite que dicho receptor interactúe con TonB, el cual a su vez sufriría un cambio conformacional y transduciría la energía necesaria para que el receptor formara un poro en la membrana externa mediante un segundo cambio conformacional. Ello reduciría la afinidad del receptor por su ligando, permitiendo que éste pasara a través del poro hacia el periplasma. Seguidamente, la proteína TonB se disociaría del receptor y sería reciclada por el complejo ExbB-ExbD que no sólo se encarga de reciclar a TonB sino también de estabilizarla en todo momento. Finalmente, el receptor de membrana volvería a adquirir su conformación inicial (Moeck y Coulton, 1998).

1.2.4.2. Paso del hierro a través de la membrana citoplasmática

Una vez que el hierro se encuentra en el periplasma deberá entrar al citoplasma, lo cual se realiza a través de un mecanismo de tipo **ATP binding cassette (ABC)**, habiéndose descrito distintas rutas que implican la entrada de Fe^{2+} , Fe^{3+} y del ión férrico acomplejado a sideróforos o al grupo hemo (Köster, 2001).

Normalmente, existe un mayor número de receptores de membrana externa que de permeasas, dado que la especificidad de dichos receptores es mucho mayor que la de las permeasas. Así, se sabe que en *E. coli*, el paso de los sideróforos a través de la membrana externa es el que limita la entrada del hierro al citoplasma (Köster, 1997), debido probablemente a la elevada especificidad (Köster, 2001).

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema encargado del transvase de hierro a través de la membrana citoplasmática se realiza por un mecanismo de tipo ABC, el cual en general consta de:

- Una o varias **proteínas periplasmáticas de unión al sustrato** que pueden ser solubles o bien encontrarse ancladas a la membrana citoplasmática en forma de lipoproteínas como sucede en Gram positivos y en algunos Gram negativos. No está claro si la proteína de unión reconoce al sustrato (ferri-sideróforo, hemina o vitamina B_{12}) cuando está unido al receptor de membrana externa o si, simplemente, lo recoge del periplasma (Köster, 2001). La proteína de unión actúa como lanzadera, reconociendo al sustrato liberado del receptor de membrana externa y entregándoselo a la permeasa correspondiente de la membrana interna
- Una o dos proteínas politópicas (homodímero, heterodímero o pseudodímero) de membrana interna que forman la **permeasa transmembrana**
- Una o dos **ATP hidrolasas** o **ATPasas** encaradas hacia el citoplasma que aportan la energía al sistema (Köster, 2001) (Fig. 1.2).

La unión del sustrato a la proteína periplasmática induce en ésta un cambio conformacional que hace que sea reconocida por la permeasa, la cual extrae el ligando y lo introduce a través de la membrana citoplasmática usando la energía

proporcionada por la hidrolasa de ATP. La proteína periplasmática es la que envía la señal a la hidrolasa, evitándose así un consumo innecesario de ATP (Köster, 2001).

Se han descrito los siguientes tipos de transportadores de hierro del tipo ABC:

- **Transportadores de sideróforo/hemo/vitamina B₁₂**

Están muy conservados tanto en bacterias como en arqueobacterias. Existen muy pocas especies bacterianas que no dispongan de algún representante de esta familia de transportadores. De hecho, sólo están ausentes en aquellas bacterias cuyo metabolismo está estrechamente relacionado con el de su huésped (como por ejemplo los micoplasmas) o en aquellas que no necesitan hierro (como las bacterias del ácido láctico) (Köster, 2001).

El transportador de este tipo mejor caracterizado es el sistema *fhuBCD* de *E. coli*, cuyos genes constituyen un operón regulado por hierro. El gen *fhuA* es el receptor de membrana externa (es receptor de ferricromo y de albomicina). Los genes del transportador ABC están a continuación del gen *fhuA* y presentan solapamientos transcripcionales entre ellos, los cuales son importantes para garantizar la estequiometría de los componentes del transportador (Köster, 2001).

- **Transportadores del Fe³⁺**

Estos transportadores median el transvase al citoplasma del hierro adquirido de transferrinas y lactoferrinas que se ha liberado en el periplasma gracias a un receptor dependiente del complejo TonB (Mietzner *et al.*, 1998; Schryvers y Stojiljkovic, 1999; Vasil y Ochsner, 1999).

El primer transportador de este tipo que se caracterizó fue el sistema Sfu de *Serratia marcescens* (Angerer *et al.*, 1990). Otro ejemplo es el sistema formado por las proteínas FbpA, FbpB y FbpC de *Neisseria*. FbpA es la proteína de unión a Fe³⁺, es el aceptor inicial, FbpB es una permeasa de membrana citoplasmática y FbpC es la ATPasa (Chen *et al.*, 1993). Esta

última proteína interacciona con FbpB y FbpC formando un típico transportador ABC (Sebastian y Genco, 1999).

- **Transportadores de elementos metálicos**

Este grupo de transportadores es el que se ha descubierto más recientemente. Las primeras proteínas de unión de este tipo fueron descritas como adhesinas en una gran variedad de patógenos estreptococales, describiéndose con posterioridad este tipo de transporte en numerosas especies. No todos ellos están implicados principalmente en el transporte de hierro, ya que algunos tienen una elevada afinidad por otros iones metálicos como Zn^{2+} y Mn^{2+} , mientras que otros sí son esenciales para la adquisición de hierro (Köster, 2001).

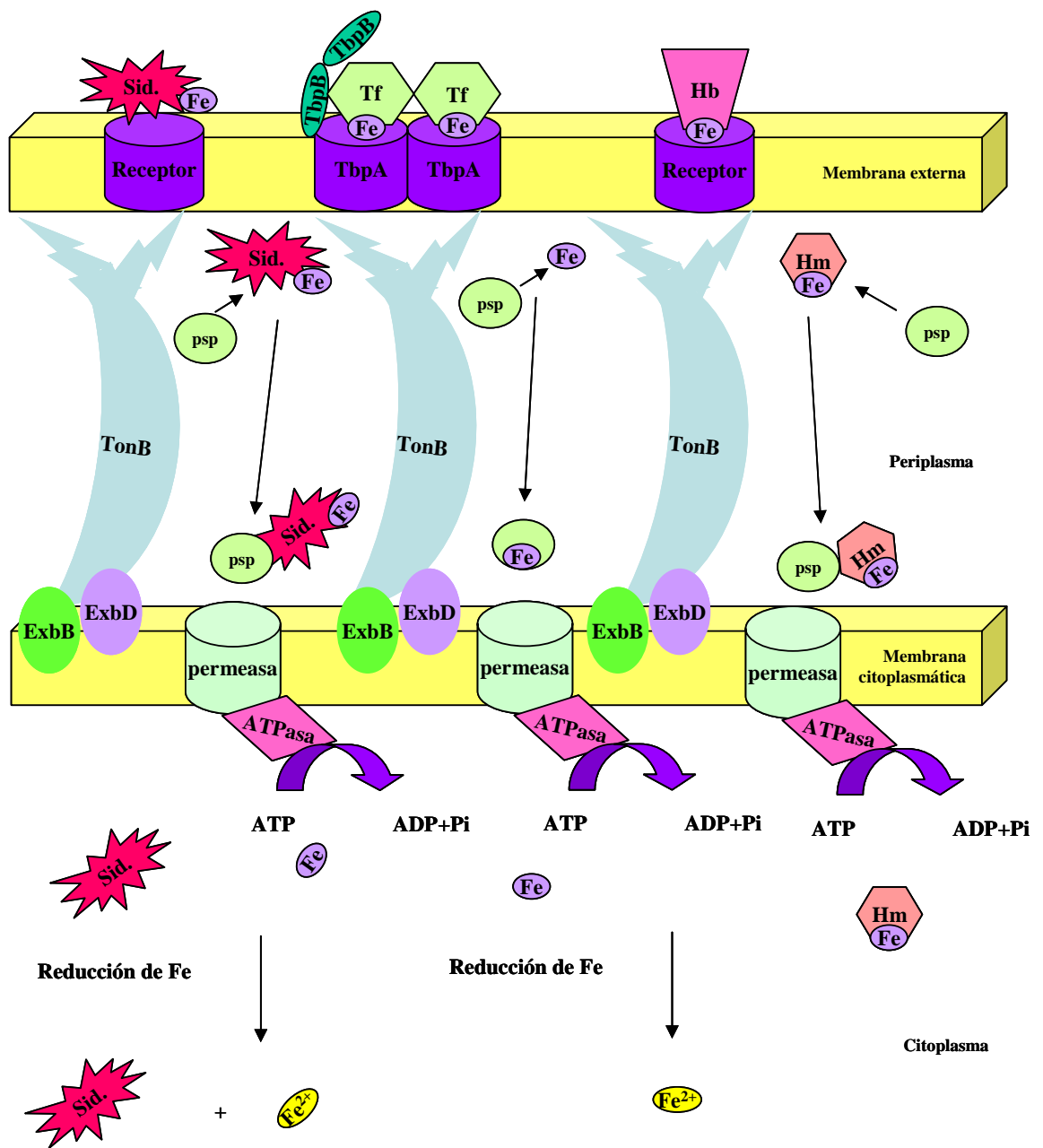


Fig. 1.2. Esquema de los distintos mecanismos de captación de hierro. Sid: sideróforo, Tf: transferrina, Hb: hemoglobina, Hm: hemina, psp: proteína soluble periplasmática, Fe: hierro, ATP: trifosfato de adenosina, AP: difosfato de adenosina, Pi: fosfato inorgánico. Figura modificada de Ratledge y Dover (2000) y Jacques y Mikael (2002).

1.2.4.3. Control de la expresión de los genes que codifican las proteínas implicadas en la captación de hierro

1.2.4.3.1. La proteína Fur

La gran mayoría de los genes que codifican proteínas implicadas en la captación de hierro están regulados negativamente por la proteína **Fur (Ferric Uptake Regulator)** unida a Fe (II). Por ello, en los mutantes *fur*, la mayor parte de los sistemas de transporte de hierro se expresan constitutivamente y además, estos mutantes presentan bajos niveles de proteínas de almacenamiento de hierro (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999; Keyer y Imlay, 1996).

La proteína Fur de *Escherichia coli* es un homodímero de 17 kDa que actúa como el principal represor transcripcional de las proteínas reguladas por hierro, gracias a su actividad de unión a DNA dependiente de Fe (II) (Escolar *et al.*, 1999). La secuencia de DNA que reconoce la proteína Fur y a la cual se une se denomina caja Fur. Cuando la proteína Fur se une a Fe (II) se forma el complejo Fur-Fe (II), lo que permite el reconocimiento y su unión a las cajas Fur, dando lugar al bloqueo de la transcripción de estos genes, ya que se impide el acceso de la RNA polimerasa. Por lo tanto, la transcripción sólo se bloquea en presencia de hierro (Ochsner y Vasil, 1996), a excepción de lo que ocurre en la regulación del gen *pfr* de *Helicobacter pylori* como se comentará más adelante.

La proteína Fur es una zinc-metaloproteína ya que se ha visto que tras su purificación, esta proteína contiene 2,1 mols de Zn (II) por mol de proteína Fur (Zn₂Fur). Uno de estos Zn (II) se elimina fácilmente si se trata a la proteína con agentes quelantes de zinc, pero el Zn (II) que queda, únicamente se puede eliminar desnaturando la proteína (Althaus, *et al.*, 1999). Así pues, la proteína Fur, por cada monómero contiene como mínimo un ión de zinc estructural, probablemente en un lugar que incluye a las cisteínas 92 y 95 del dominio C-terminal de la subunidad (Jacquamet *et al.*, 1998; Althaus *et al.*, 1999). De todos modos, este lugar no está siempre conservado y, además, el zinc no siempre está presente en las proteínas Fur de todas las bacterias (Lewin *et al.*, 2002). A pesar de ello, muchas proteínas Fur

presentan también estas cisteínas. De hecho se cree que las presentan todas las proteínas Fur con excepción de las de *Pseudomonas* y las de otros microorganismos relacionados (Patzner y Hantke, 2000).

En la secuencia de la proteína Fur de *P. multocida* PM70 ambas cisteínas están presentes aunque en las posiciones 94 y 97 (Fig. 1.3).

Met SEENIKLLKKAGLKITEPRLTILAL**Met** QEHQEEHFS
AEDVYK**Met**LLERGEEIGLATVYRVLNQFDEAKILIRHN
FEGNKSVFELAPTEHHDHIICVDCGKVFEEFNDDIIEKR
QREITKQHGIELATHSLYLYGKCSNVKKCDENGKK**Stop**

Fig. 1.3. Secuencia aminoacídica de la proteína Fur de *P. multocida* PM70. Las cisteínas presuntamente implicadas en la unión del Zn (II) se señalan en negrita y subrayado.

La proteína Fur consta de dos dominios: el amino-terminal que contiene un motivo hélice-giro-hélice, con un giro poco usual, y es el encargado de la unión al DNA; y el carboxi-terminal que contiene dos lugares de unión a metales y es muy importante para la dimerización. En *E. coli* un lugar de unión es para Zn^{2+} y el otro para Fe^{2+} , aunque *in vitro* también puede ser para Mn^{2+} , Co^{2+} u otros cationes divalentes. No obstante, esta unión a otros metales debe ser irrelevante dada su baja concentración *in vivo* (Bagg y Neilands, 1987).

La proteína Fur es sorprendentemente abundante en las células de *E. coli*. Durante la fase exponencial ésta dispone de unas 5000 copias por célula, aumentando a 10000 en la fase estacionaria (Zheng *et al.*, 1999). En *Vibrio cholerae* (Watnick *et al.*, 1997) se han descrito niveles similares (unas 2500 copias por célula). No se sabe con certeza la razón por la que esta proteína es tan abundante, habiéndose propuesto diversas hipótesis, como que podría intervenir en la polimerización del DNA, o bien podría deberse a la gran abundancia de genes regulados por Fur (más de 90 en *E.*

coli) o a que esta proteína tiene una función adicional tamponadora, uniendo el ión ferroso libre de la célula (Bagg y Neilands, 1987).

1.2.4.3.2. La caja Fur

Las cajas Fur a las que se une el complejo Fur-Fe (II) son secuencias de nucleótidos específicas, presentes en los promotores de los genes que este complejo regula y se hallan normalmente entre los lugares -35 y -10. Los primeros modelos sobre la composición nucleotídica de estas cajas sugerían que se trataba de una repetición invertida de 19 pb a la cual se uniría un solo dímero de la proteína Fur. Posteriormente, se revisó este modelo y se postuló que la proteína Fur reconocía series repetidas de GATAAT (Fig. 1.4 A) (Baichoo y Helmann, 2002).

El modelo actual postula que tanto la proteína Fur, como las proteínas represoras de la familia Fur, se unen al núcleo formado por una secuencia de nucleótidos que en *E. coli* consiste en una repetición hexamérica invertida de 13 pb (6-1-6), (Lavrrar *et al.*, 2002) o bien heptamérica de 15 pb en *B. subtilis* (7-1-7) (Baichoo y Helmann, 2002). Actualmente se propone que un único dímero Fur reconoce dicho núcleo (Fig. 1.4 B). La unión de dos dímeros de Fur a las caras opuestas del dúplex de DNA ocurre en la caja Fur de 19 pb que se regeneraría al encontrarse solapados los núcleos de dos secuencias semejantes (Fig. 1.4 B y Fig. 1.5). Es decir, en *E. coli*, un dímero se une al núcleo 6-1-6 de una de las cadenas y el otro al núcleo 6-1-6 de la otra cadena, de modo que coinciden dos monómeros en el solapamiento de los hexámeros centrales de las dos cadenas de DNA. En *B. subtilis* se ha propuesto un modelo similar (Fig. 1.4 C), así como en *Pseudomonas* (Fuangthong y Helmann, 2003). El modelo de unión de dímeros solapados explica que la proteína Fur, que es una proteína rígida, sea capaz de interactuar con las caras opuestas del DNA. Dos hexámeros invertidos y separados por G:C son la unidad de reconocimiento de un dímero de Fur. El separador de un par de bases (normalmente G:C) parece ser crítico, ya que su ausencia da lugar a una significativa disminución de la afinidad de la proteína Fur por la secuencia nucleotídica (Lavrrar y McIntosh, 2003).

Un examen de posibles lugares de unión de Fur en *E. coli* muestra que la mayoría de dichos lugares contienen regiones solapadas (Vassinova y Kozyrev, 2000). La presencia de lugares de unión solapados puede permitir un mayor rango de regulación de Fur, ya que sitios semejantes permiten la asociación de dímeros adicionales (Fig. 1.4 D). Así, lugares solapados pueden permitir la asociación de cómo mínimo un dímero adicional y otros dímeros pueden unirse fácilmente a continuación del lugar de unión inicial, dependiendo de la conservación del lugar inicial *per se* y de la riqueza en AT que haya. Dado que el lugar de unión del tercer dímero se solapa con el del primer dímero, podría pensarse en interacciones proteína-proteína entre los dímeros asociados a la secuencia. Estas interacciones pueden permitir polimerizaciones fáciles de proteínas en el DNA, ya que dímeros adicionales pueden asociarse a secuencias de unión de DNA menos conservadas (Lavrrar y McIntosh, 2003).

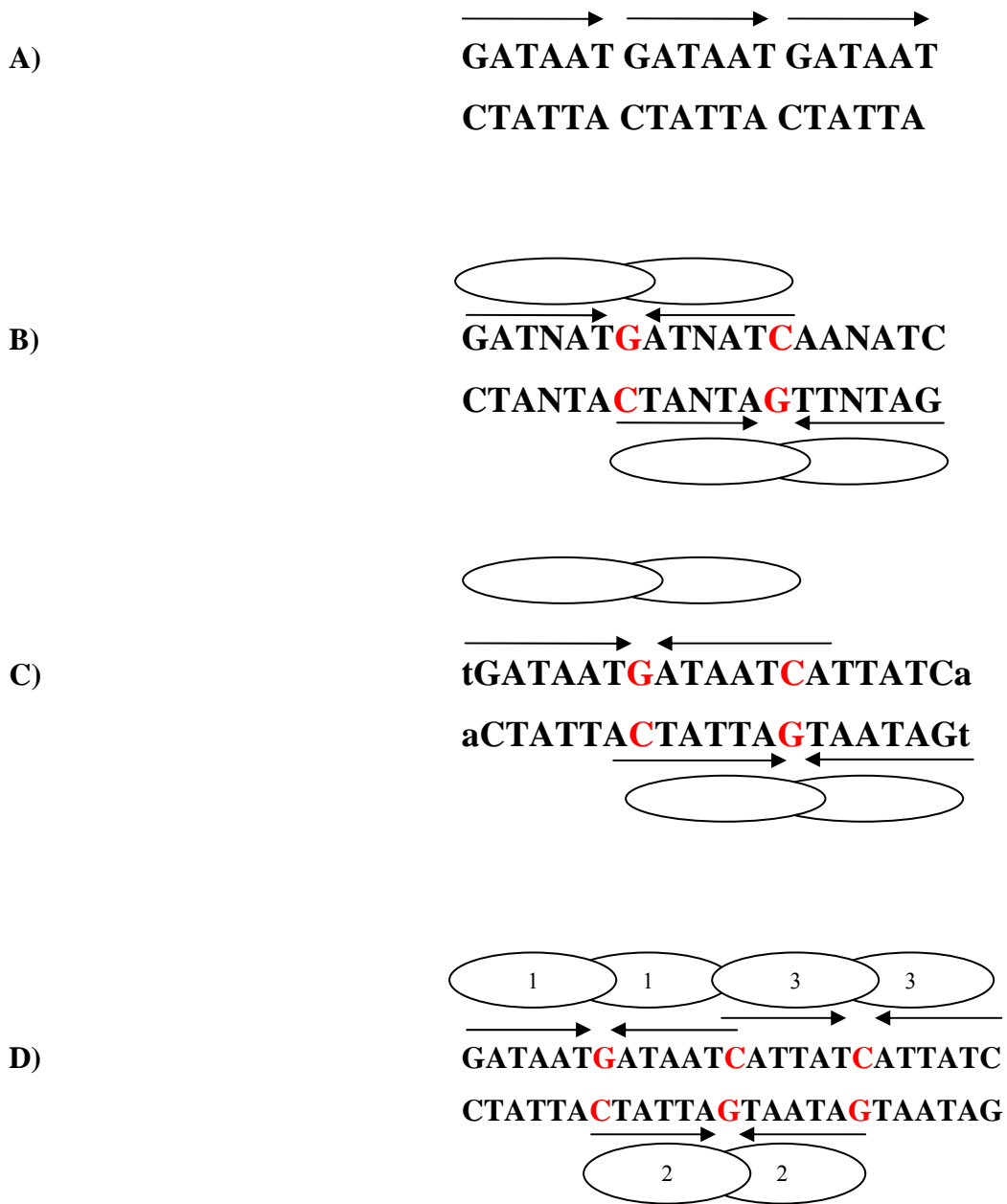


Fig. 1.4. Modelos de interacción de la proteína Fur con el DNA. A) Modelo hexamérico. B) Superposición de hexámeros (modelo en *E. coli*). C) Superposición de heptámeros (modelo en *B. subtilis*). D) Modelo de unión de dímeros solapados en lugares de unión extendidos. En los tres últimos modelos, cada monómero de la proteína Fur (mostrado como una elipse), se une a un hexámero invertido (o heptámero en C), (marcados con una flecha). Esquema modificado de Lavrrar y McIntosh, 2003.



Fig. 1.5. Modelo tridimensional de dos dímeros de Fur unidos a dos cajas Fur solapadas en una doble hebra de DNA.

1.2.4.3.3. Mecanismo de acción

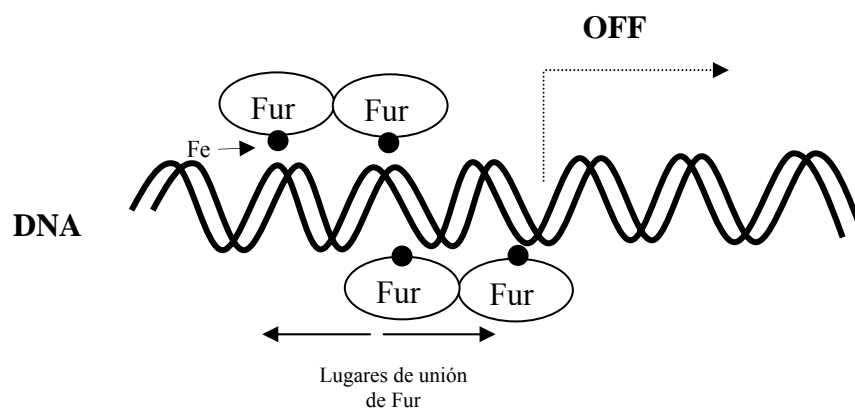
En condiciones de riqueza de hierro, la proteína Fur se une al ión divalente Fe^{2+} y adquiere así una configuración capaz de reconocer la secuencia de DNA diana (caja Fur), inhibiendo la transcripción de la mayoría de genes y operones reprimidos por este metal. Contrariamente, cuando el hierro escasea en la célula, el equilibrio se desplaza hacia la liberación de hierro y la proteína Fur sin hierro, o apo- Fur, no reconoce las cajas Fur, con lo cual la RNA polimerasa tiene acceso a los promotores de los genes anteriores que por lo tanto se transcribirán y darán lugar a la síntesis de las proteínas encargadas de la captación de hierro, entre otras (Escolar *et al.*, 1999) (Fig. 1.6).

La afinidad entre Fur y Fe^{2+} es débil, lo cual se justifica porque si se tratara de una unión fuerte se perdería la capacidad rápida de reacción, y, por lo tanto, se dificultaría la transcripción de los genes que son necesarios para la captación de hierro (Ratledge y Dover, 2000).

La proteína Fur también puede regular la captación de hierro de forma indirecta a través de sistemas de transducción de señales de dos componentes, mediante reguladores similares a *AraC*, los cuales controlan la síntesis de sideróforos, así

como su captación (Hantke, 2001b). En algunos casos, especialmente en *P. aeruginosa*, la proteína Fur puede también modular la expresión del factor sigma que, a su vez, promueve la transcripción de un conjunto discreto de genes (Escolar *et al.*, 1999).

A)



B)

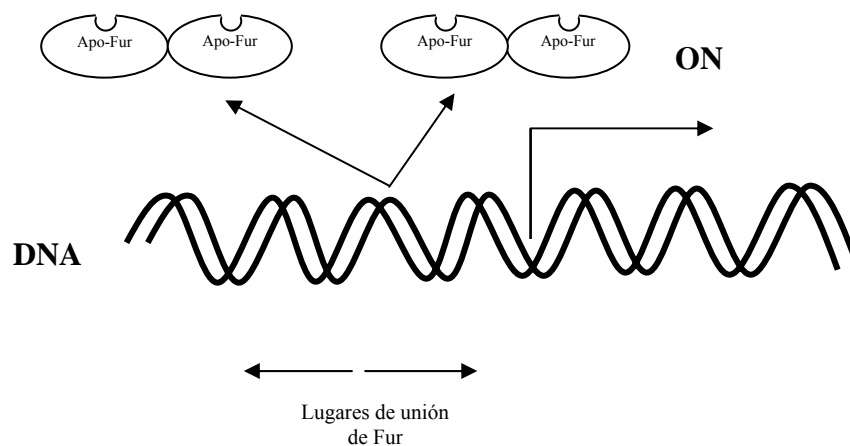


Fig. 1.6. Representación esquemática de la represión mediada por Fur. Concentración intracelular de hierro elevada (A) o baja (B). Fe: hierro, OF: transcripción bloqueada, ON: se permite la transcripción.

1.2.4.3.4. Regulación del gen *fur*

La regulación del gen *fur* también está ligada a la respuesta por estrés oxidativo, ya que, como se ha comentado anteriormente, el hierro es capaz de generar EROs en condiciones de riqueza de oxígeno. Así, durante el estrés oxidativo, en la medida en que aumentan los niveles de la proteína Fur, se incrementa la capacidad de unión a Fe^{2+} en el citosol, se reprime el transporte de hierro y se inducen los sistemas de almacenamiento de hierro. Todo ello conduce a una reducción del nivel libre de hierro en el citosol durante el estrés oxidativo y colabora a disminuir la toxicidad mediada por este elemento (Andrews *et al.*, 2003).

En *E. coli* y en otras muchas bacterias, *P. multocida* entre ellas, el gen *fur* se encuentra en un operón bicistrónico, tras el gen *fldA* (Zheng *et al.*, 1999). El gen *fldA* es esencial y codifica una flavodoxina, una proteína que contiene flavina, y está involucrada en procesos redox. Es posible que esta flavodoxina tenga un papel destacado en el mantenimiento del hierro libre citosólico en un estado reducido, por lo que puede ser importante en proveer de Fe^{2+} a la proteína Fur. Este operón aumenta su expresión 10 veces mediante el sistema SoxRS en respuesta al estrés redox, generado por superóxido (Zheng *et al.*, 1999).

El gen *fur* dispone también de su propio promotor, el cual está regulado por la proteína PerR en *B. subtilis* y otras bacterias Gram positivas (Fuangthong y Helmann, 2003) y por la proteína OxyR (Zheng *et al.*, 2001). Cuando OxyR se oxida por la presencia de H_2O_2 , se une al DNA y permite que también se una la RNA polimerasa, activando la transcripción. En estas condiciones la expresión del gen *fur* aumenta unas 10 veces. (Mongkolsuk y Helmann, 2002). Además, el gen *fur* se autorregula débilmente, ya que presenta una caja Fur localizada en la región intergénica entre *fldA* y *fur* (de Lorenzo *et al.*, 1988).

Proteínas tipo histonas como las proteínas H-NS (pequeña proteína asociada a la cromatina que actúa como modulador ambiental regulando la expresión génica) e IHF (*integration host factor*) contribuyen también a la regulación del gen *fur* en *E. coli* (Dubrac y Touati, 2000), modificando probablemente la conformación del DNA

para facilitar los contactos entre las proteínas reguladoras y/o la RNA polimerasa (Atlung y Ingmer, 1997, Dame y Goosen, 2002; Schroder y Wagner, 2002).

Un caso excepcional a lo comentado anteriormente es el de *Campylobacter jejuni*, en la cual el gen *fur* se expresa a partir de dos promotores, cuya expresión no está regulada por hierro (van Vliet *et al.*, 2000).

1.2.4.3.5. El regulón Fur

El regulón Fur está constituido por todos aquellos genes que se encuentran bajo el control del complejo Fur-Fe (II) y lo integran más de 30 unidades transcripcionales en muchas bacterias (Foster y Hall, 1992). Para la identificación de estos genes se han utilizado distintas estrategias. Una de ellas es el ensayo FURTA (*Fur Titration Assay*) que se basa en la utilización de una fusión génica entre el gen *fhuF* de *E. coli*, que se encuentra regulado por la proteína Fur, y el gen *lacZ* (Stojiljkovic *et al.*, 1994). La introducción de un vector de alto número de copias que lleve un promotor con una caja Fur en una célula que contenga dicha fusión, desplazará a la proteína Fur del promotor del gen *fhuF* permitiendo la síntesis masiva de β -galactosidasa.

A parte de codificar proteínas encargadas de la captación de hierro, los genes regulados por Fur codifican también: i) proteínas citoplasmáticas implicadas en el metabolismo de la glucosa como la aconitasa A (AcnA), ii) proteínas involucradas en el metabolismo del hierro, como la bacterioferritina, iii) proteínas de respuesta al estrés oxidativo, como la superóxido dismutasa (SodA), iv) genes que codifican factores de virulencia (colicinas, hemolisinas y toxina similares a Shiga), v) genes cuyos productos están implicados en la síntesis de flagelos en *E. coli* (*flbB*), vi) genes de respiración (*cyoA*) y vii) genes implicados en el encapsulamiento de DNA fágico (*nohB*).

Así pues, la proteína Fur es un regulador pleiotrópico que controla la expresión de muchos genes, tanto implicados en la captación de hierro como otros importantes para la vida de la célula (Escolar *et al.*, 1999; Stojiljkovic *et al.*, 1994; Touati, 1988). Se ha visto que mutantes deficientes en la proteína Fur, además de presentar una expresión constitutiva de los genes implicados en la captación de hierro, no pueden crecer utilizando fuentes de carbono no fermentables como el glicerol, el succinato o

el fumarato, lo cual sugiere un defecto en la respiración (Hantke, 1987). Además, en *S. enterica* Typhimurium estos mutantes son más sensibles al estrés ácido que las cepas salvajes (Foster y Hall, 1992). En algunas especies bacterianas, y debido a que la proteína Fur es un regulador pleiotrópico, no es posible obtener mutantes. Esto sucede por ejemplo en *Rhizobium leguminosarum* (de Luca *et al.*, 1998), *Synechococcus* (Ghassemian y Straus, 1996) y *H. influenzae* (Akerley *et al.*, 2002). En otras especies no pueden obtenerse mutantes *fur* por inserción y únicamente se han conseguido mutantes *fur* con mutaciones puntuales, utilizando un sistema de selección por resistencia a manganeso (Brickman y Armstrong, 1995; Hantke, 1987; Lam *et al.*, 1994; Staggs y Perry, 1992). Este es el caso de *P. aeruginosa* (Prince *et al.*, 1993), *P. putida* (Venturi *et al.*, 1995), *V. anguillarum* (Tolmasky *et al.*, 1994), *H. ducreyi* (Carson *et al.*, 1996), *Neisseria meningitidis* (Thomas y Sparling, 1994), *N. gonorrhoeae* (Berish *et al.*, 1993) entre otros. En algunas de estas especies, en lugar de obtenerse mutantes deficientes en la proteína Fur, se han conseguido mutantes que disponen de una proteína Fur con una reducida afinidad por sus lugares de unión, con lo cual, habrá también una desrepresión de los genes que esta proteína controla, aunque en menor grado (Thomas y Sparling, 1994).

1.2.4.3.6. Otros genes regulados por Fur

Distintos genes de *E. coli* están inducidos por hierro de un modo dependiente de Fur, aun cuando aparentemente estos genes no disponen de una caja Fur, por lo cual su regulación por Fur debe ser indirecta. Entre ellos cabe citar a *acnA*, *bfr*, *ftnA*, *fumA*, *fumB*, *sdhCDAB* y *sodB*. (Park y Gunsalus, 1995; Massé y Gottesman, 2002; Tseng, 1997).

La inducción por Fur del gen *sodB* necesita un elemento cis que consiste en un palíndromo en el lugar +1 y una secuencia adyacente rica en AT (Dubrac y Touati, 2000). Se sabe que la vida media del mRNA de *sodB* aumenta 3 veces en presencia de la proteína Fur, lo cual sugiere que la inducción por dicha proteína es, como mínimo en parte, a nivel post-transcripcional. Se sabe también que la proteína tipo histona H-NS reprime la transcripción de *sodB* interaccionando con el mismo elemento cis requerido para la inducción por la proteína Fur. Esto sugiere que Fur y

H-NS compiten por el mismo lugar de unión (Dubrac y Touati, 2000). De todos modos, parece que ni la proteína Fur ni H-NS afectan directamente a la transcripción y se sabe que la proteína Fur no se une al mRNA del gen *sodB*, por lo tanto no está clara la regulación (Dubrac y Touati, 2002).

Recientemente se ha descubierto un gen reprimido por Fur-Fe (II): *ryhB*, cuya transcripción da lugar a un RNA no codificante (RyhB). Este RNA podría explicar el mecanismo de activación de la transcripción de *sodB* por Fur-Fe (II) así como el de otros genes regulados positivamente por la proteína Fur (Massé y Gottesman, 2002). Se ha visto que la inducción por la proteína Fur de los genes *acnA*, *bfr*, *ftnA*, *sdh* y *sodB* se elimina inactivando el gen *ryhB*, lo cual sugiere que su dependencia de Fur esta mediada por RyhB. En presencia de hierro la proteína Fur reprime la transcripción de RyhB, uniéndose a su promotor y esta represión permite la expresión de estos genes inducidos por hierro. A pesar de esto, todavía no está claro a que nivel (transcripción o estabilidad del transcrito) afecta RyhB, ni que mecanismo utiliza. Tampoco se han encontrado elementos cis comunes en los genes regulados por RyhB ni se sabe si toda la expresión inducida por la proteína Fur en *E. coli* está mediada por RyhB. En cambio, sí se han encontrado homólogos a RyhB en otras bacterias (dos en *Salmonella*), lo cual sugiere que la inducción por la proteína Fur mediada por RyhB puede ser un mecanismo común (Massé y Gottesman, 2002). En este caso, la proteína Fur sigue actuando de inhibidora, su papel como activador es indirecto, por lo que no sería del todo correcto hablar de una regulación positiva por Fur, como se ha hecho hasta el presente.

Una excepción a esto último se ha descrito en *Neisseria gonorrhoeae*, cuyo gen *sodB* también se encuentra sobreexpresado cuando hay exceso de hierro, pero en este caso sí hay una unión entre la proteína Fur y el gen *sodB*, describiéndose incluso una posible caja Fur en el promotor de dicho gen (Sebastian *et al.*, 2002).

Se conoce un caso en que la forma apo-Fur reprime un gen uniéndose directamente a su promotor, el gen *pfr* (ferritina) de *Helicobacter pylori*. Éste es el único gen conocido hasta el momento que se encuentra inducido por hierro a través de una interacción directa entre su promotor y la proteína Fur, de modo que en presencia de

hierro se forma el complejo Fur-Fe(II) y se deja de producir esta represión. La secuencia de nucleótidos que reconoce la forma apo-Fur difiere mucho de la típica caja Fur comentada anteriormente (Delany *et al.*, 2001). Así pues, en este caso la proteína Fur sigue actuando como represora pero el ión Fe^{2+} como activador.

1.2.4.3.7. La proteína DtxR y la familia de reguladores similares a DtxR

Estas proteínas están presentes en bacterias con alto contenido en GC, como *Streptomyces*, *Corynebacteria* y *Mycobacteria* y se denominan **DtxR** en *C. diphtheriae* e **IdeR** en *M. tuberculosis* (Ding *et al.*, 1996; Pohl *et al.*, 1999). Dichas proteínas regulan genes análogos a los que controla Fur en las demás bacterias, desde genes de síntesis de sideróforos y de captación de hierro hasta genes de respuesta al estrés oxidativo. Además, la proteína DtxR también es la responsable de regular el gen *tox* que codifica la toxina de la difteria.

No hay similitud entre las secuencias de Fur y DtxR, es decir, que DtxR no es una proteína similar a Fur, en cambio ambas presentan muchas similitudes estructurales. Así, el dominio amino-terminal contiene un lugar de unión al DNA con el motivo hélice-giro-hélice, mientras que el dominio carboxi-terminal es el responsable de la dimerización y de la unión al metal (Hantke, 2001b).

En *Corynebacterium diphtheriae* la proteína DtxR de 25 kDa también utiliza Fe^{2+} como corepresor. No se une a secuencias operadoras reconocidas por la proteína Fur (Schmitt *et al.*, 1992), pero reconoce una secuencia de DNA palindrómica (Tao y Murphy, 1992) y su forma activa es un dímero que se une simétricamente al operador del gen *tox* (Schmitt y Holmes, 1993). Otros iones metálicos divalentes distintos al Fe^{2+} , como mínimo *in vitro*, también se pueden unir a DtxR (Ding *et al.*, 1996, Tao y Murphy, 1992).

En estas bacterias con proteínas DtxR o similares a DtxR también se han encontrado proteínas similares a Fur, las cuales regulan genes que codifican enzimas de respuesta al estrés oxidativo (Zou *et al.*, 1999).

1.2.4.4. Proteínas similares a *Fur*

1.2.4.4.1. La proteína PerR

En *B. subtilis* la proteína Fur regula la biosíntesis de sideróforos y la captación de hierro, pero no regula la expresión de las proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo. Esta función la realiza la proteína PerR, la cual actúa en combinación con manganeso o hierro, aun cuando uno preferentemente manganeso (Bsat *et al.*, 1998). PerR puede detectar el estrés por peróxido mediante dos vías: o bien por la oxidación del cofactor metálico, o bien por la oxidación de la propia proteína PerR. En *B. subtilis* hay indicios de que ambos mecanismos contribuyen a esta detección (Herbig y Helmann, 2001). Parece ser que la relación entre los niveles de hierro y manganeso determina la respuesta de PerR al estrés por peróxido. El manganeso es resistente a la peroxidación, no participa en la formación de EROs y además se encarga de reducirlos (Horsburgh *et al.*, 2002). Cuando el manganeso se une a PerR hace que éste reprima su regulón de defensa a peróxido y que se vuelva menos sensible a este peróxido. El hierro, como cofactor de PerR, en cambio, actúa como un pro-oxidante, ya que es sensible a la peroxidación y como consecuencia pierde su capacidad de unión al DNA, facilitando la desrepresión mediada por PerR. De este modo, cuando hay tanto hierro como peróxido en la célula, se disminuye la formación del radical hidroxilo (Touati, 2000; Jakubovics y Jenkinson, 2001; Horsburgh *et al.*, 2002).

El regulón PerR incluye genes como *katA* (catalasa A) y *aphC* (alquilhidroperóxido reductasa), pero también al gen *fur* y al propio gen *perR* (Bsat *et al.*, 1998).

1.2.4.4.2. La proteína Irr

La proteína Irr de *Bradyrhizobium japonicum* también presenta una similitud considerable con la proteína Fur (29% de identidad con la proteína Fur de *E. coli*) (Hamza *et al.*, 1999). Se trata, por lo tanto, de otra proteína similar a Fur.

Esta proteína controla la biosíntesis de hemo regulando al gen *hemB*, cuyo producto participa en la ruta de biosíntesis de hemina; y coordina este mecanismo con la homeostasis del hierro, la cual está regulada en esta bacteria por un homólogo de

Fur. A diferencia de Fur, la proteína Irr es activa en carencia de hierro (Hamza *et al.*, 1998).

1.2.5. Almacenamiento de hierro en las células bacterianas

Es muy importante que la célula controle la concentración intracelular de hierro, ya que tanto su carencia como su exceso puede generar problemas. Así, como ya se ha indicado, si hay hierro libre en la célula, se forman radicales hidroxilos que, en aerobiosis y vía reacción de Fenton, dan lugar a la formación de radicales hidroxilos los cuales, juntamente con los radicales de oxígeno y los superóxidos producidos también en el metabolismo, pueden dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de la célula. Es por ello que el hierro que no se utiliza directamente debe ser almacenado en las células bacterianas en un estado no reactivo, para prevenir la formación de especies tóxicas. Además, una ventaja adicional del almacenamiento de hierro es que también permite disponer de una reserva directamente accesible en condiciones de carencia de hierro.

Hay tres clases de proteínas bacterianas encargadas del almacenamiento de hierro: las **ferritinas** (también presentes en eucariotas), las **bacterioferritinas**, que contienen hemo, y sólo se encuentran en el dominio *Bacteria* y unas proteínas de pequeño tamaño, denominadas **Dps**, que son propias de procariotas (Andrews, 1998). Estos tres tipos de proteínas pueden coexistir en una misma bacteria y se caracterizan por presentar subunidades idénticas, 24 las ferritinas y bacterioferritinas y 12 las Dps. Estas subunidades se unen para formar una proteína aproximadamente esférica que consta de una cavidad central que actúa como reservorio y almacén de hierro. Cada subunidad se pliega formando una protuberancia de 4 α -hélices. La ferritina y la bacterioferritina, de unos 500 kDa, pueden acumular como mínimo de 2000 a 3000 átomos de hierro por molécula, mientras que las Dps, de unos 250 kDa, acumulan solamente unos 500 átomos de hierro.

Estas proteínas capturan Fe^{2+} , pero lo depositan en su cavidad central en forma de Fe^{3+} . La catálisis de la oxidación se realiza en lugares específicos de la propia proteína (Andrews *et al.*, 2003). Recientemente, se ha visto que la proteína Dps de *E.*

coli puede almacenar hierro y utiliza H₂O₂ como oxidante (Zhao *et al.*, 2002). Por lo tanto se ha postulado que la principal función de Dps en *E. coli* es la de proteger al DNA del daño ocasionado por el ión ferroso y el H₂O₂ en la producción de radicales libres hidroxilos (Andrews, 2003), es decir, que Dps de hecho no tendría una función estricta de almacenaje de hierro sino de defensa.

1.2.6. Importancia antigénica de las proteínas receptoras de transportadores de hierro

Las proteínas receptoras de transportadores de hierro de las bacterias Gram negativas son de gran tamaño, se localizan en la membrana externa y se exponen al medio, siendo por tanto proteínas idóneas para que el huésped desarrolle anticuerpos contra ellas. Al ser imprescindibles para la supervivencia del patógeno en su huésped, además de ser proteínas antigénicas, son también potencialmente inmunogénicas, por lo cual se han intentado utilizar para la obtención de vacunas, a través de diversas aproximaciones.

1.2.6.1. Proteínas purificadas

Esta estrategia se basa en purificar las proteínas receptoras de hierro mediante distintos procedimientos:

- directamente a partir de cultivos del patógeno
- por clonación del gen que codifica la proteína en un vector de sobreexpresión en *E. coli* y purificación posterior.

Utilizando estos sistemas con un receptor de transferrina de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se ha conseguido inducir una buena respuesta humoral y obtener protección homóloga (enfrentamiento con la misma cepa) (Rossi-Campos *et al.*, 1992). En otras especies, se ha logrado una protección heteróloga (enfrentamiento con una cepa distinta a la cepa de la que se ha obtenido la vacuna). Así, un antisuero específico obtenido contra el receptor de transferrina de una cepa de *N. meningitidis* confiere protección pasiva a ratones infectados tanto con dicha cepa como con otras cepas distintas. Del mismo modo, la inoculación de ratones con dicha proteína

aumenta su supervivencia frente a la infección producida por esta misma cepa (Danve *et al.*, 1993). Por otra parte, se ha demostrado que los anticuerpos contra la proteína Tbp2 de *N. meningitidis* inhiben la captación de transferrina de este patógeno, disminuyendo el crecimiento de dicha bacteria cuando crece con transferrina como única fuente de hierro (Lissolo *et al.*, 1995).

En *N. meningitidis* las dos proteínas (TbpA y TbpB) que constituyen el receptor de transferrina son capaces de inducir protección por separado, aunque parece que TbpB es más eficiente, ya que los anticuerpos contra TbpB presentan una mayor actividad protectora que los obtenidos contra TbpA (West *et al.*, 2001) y el antisero anti-TbpB muestra actividad bactericida, mientras que el antisero anti-TbpA no muestra dicha actividad (Myers *et al.*, 1998). De todos modos, TbpA induce mejor protección heteróloga que TbpB (West *et al.*, 2001).

Además de la utilización de receptores de transferrinas como vacunas, también se han utilizado en algunos casos receptores de lactoferrinas y de hemoglobinas.

En *Moraxella catarrhalis* las proteínas receptoras de transferrina y lactoferrina TbpB y LbpB son inmunogénicas, mientras que TbpA y LbpA no lo son (Yu *et al.*, 1999).

Cuando se utilizan anticuerpos contra la proteasa que une y degrada hemoglobina, hemopexina y transferrina (Kgp) de *P. gingivalis*, se inhibe la captación de estas fuentes de hierro por este patógeno y se induce la protección en ratones infectados con dicha bacteria (Kuboniwa *et al.*, 2001).

Estas estrategias pueden ser aplicables en patógenos que dispongan de pocas proteínas diferentes implicadas en la captación de hierro, pero si contienen una gran variedad de especies de proteínas receptoras de transportadores de hierro, como es el caso de *P. multocida* (Bosch *et al.*, 2004), no serían útiles, ya que supondría purificar todos y cada uno de dichos receptores para poder bloquear cualquier entrada de hierro en el patógeno. Desde un punto de vista industrial esto sería muy costoso y además sería necesario asegurar que se dispone de todos los receptores, lo cual es muy difícil debido al elevado número de genes que codifican los diversos receptores de hemina/hemoglobina o ambos a la vez.

1.2.6.2. Células inactivadas

Otra estrategia utilizada consiste en obtener cultivos de una cepa bacteriana crecida en condiciones de privación de hierro, mediante el uso de quelantes de cationes divalentes, con lo cual, las proteínas implicadas en la captación de este ión se encontrarán sobreexpresadas. Se pueden utilizar directamente estas células como vacuna una vez inactivadas mediante algún proceso físico o químico, o bien se pueden extraer las proteínas de membrana externa y utilizar estos extractos como vacuna.

En algunos casos, los resultados obtenidos han sido óptimos, pero estas estrategias presentan también algunas dificultades. La primera de ellas es que la limitación de hierro en el medio de cultivo comporta que el crecimiento se ralentice mucho y puede ser un inconveniente a la hora de optimizar la obtención de masa celular en biorreactores de elevado volumen. Otro inconveniente son las alteraciones que se pueden producir en la estructura de las proteínas durante el proceso de inactivación de las células con métodos abrasivos físicos o químicos, como son la utilización de formol o la sonicación, entre otros.

Una alternativa al uso de quelantes de cationes divalentes es utilizar mutantes *fur*, ya que éstos también tendrán sobreexpresadas las proteínas de membrana externa encargadas de la incorporación de hierro.

Para paliar el inconveniente de los métodos de inactivación comentados, se ha desarrollado una estrategia que se basa en la obtención de **células fantasma**. Este método consiste en situar el gen que codifica la lisina de un bacteriófago bajo el control de un promotor que sólo se inducirá en determinadas condiciones, por ejemplo un promotor termosensible. La síntesis de lisina dará lugar a la formación de una **perforina** en las membranas citoplasmática y externa, a través del cual se escapará todo el contenido citoplasmático, generándose una célula inerte pero con sus proteínas de membrana externa intactas. El bacteriófago que se ha utilizado es el PhiX174 y el gen de lisis es el **gen letal E** (Witte y Lubitz, 1989; Witte et al, 1990a). PhiX174 es un fago de DNA de cadena simple que lleva a cabo la lisis celular de su bacteria huésped expresando un único gen sin actividad enzimática (Witte y Lubitz, 1989). La expresión del gen de lisis *E* que se encuentra en un plásmido, permite la

formación de una estructura transmembrana en forma de túnel que atraviesa la envoltura celular (Witte *et al.*, 1993; Witte *et al.*, 1998). La estructura del túnel tiene un diámetro de 40-200 nm (Witte *et al.*, 1990a, Witte *et al.*, 1990b), por lo tanto constituye sólo una pequeña porción de la superficie celular total. Debido a la presión osmótica en el interior de la célula, el contenido citoplasmático que contiene el genoma bacteriano y los plásmidos, se escapa a través del túnel dejando una envuelta celular bacteriana vacía (fantasma) (Witte *et al.*, 1992). La lisis mediante el gen *E* no causa ningún estrés físico ni químico a las estructuras de la superficie celular, por lo tanto, el fantasma mantiene la morfología, estructura y propiedades inmunogénicas de una envoltura celular tal y como si se tratara de una célula viva (Witte *et al.*, 1990b; Witte *et al.*, 1992). De este modo, los epítomos presentados por una célula viva se mantienen en una célula fantasma.

1.3. EL ZINC

1.3.1. Importancia del zinc en los microorganismos

El zinc es también un microelemento esencial para los organismos vivos. Juega un papel importante como cofactor de numerosas enzimas y de proteínas de unión a DNA. También sirve como componente estructural de distintas proteínas (Vallee y Falchuk, 1993). Algunos ejemplos de estas proteínas son la fosfatasa alcalina, la RNA polimerasa, la aspartato transcarbamilasa, la FtsH (proteasa dependiente de Zn^{2+}) y aquellas proteínas que contengan dedos de zinc en *E. coli* (Patzner y Hantke, 1998). También se necesita zinc en el periplasma de las bacterias Gram negativas, ya que algunas enzimas periplasmáticas lo utilizan como cofactor (Hantke, 2005).

Se han identificado más de 300 enzimas dependientes de zinc (Vallee y Falchuk, 1993). De todos modos, elevadas concentraciones de zinc también son perjudiciales para la célula, ya que el Zn^{2+} a altas concentraciones inhibe la cadena de respiración aeróbica (Kasahara y Anraku, 1974; Beard *et al.*, 1995). Por razones desconocidas, el requerimiento de zinc para las bacterias parece ser mucho menor que para los hongos u otras células eucariotas. (Failla, 1977; Hughes y Poole, 1989). Las concentraciones

requeridas de zinc para un crecimiento bacteriano óptimo son de 0,5 a 1 μM (Lu *et al.*, 1997).

1.3.2. Importancia del zinc en el estrés oxidativo

A diferencia de lo que se ha comentado en el apartado 1.2.2 sobre el hierro y el estrés oxidativo, el zinc parece ser beneficioso en este proceso. Así, en *Bacillus subtilis* se ha descrito que el estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) da lugar a un aumento en la expresión de alguno de los genes implicados en la captación de zinc, ya que éstos juegan un papel importante en la resistencia a H_2O_2 y a bisulfitos. El gen que se activa es *zosA* que codifica una proteína captadora de zinc regulada por la proteína PerR (ver apartado 1.2.4.4.1). El zinc actúa directamente protegiendo a la célula del daño oxidativo y no actúa modulando la expresión de otras funciones protectoras. A pesar de que el H_2O_2 tiene muchos efectos fisiológicos en la célula, una consecuencia notable de esta molécula es la oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas para formar disulfitos. Un mutante *zosA*⁻ aumenta significativamente su sensibilidad a H_2O_2 , así como también al agente diamida, que es un oxidante específico de grupos tiol. Se postula que el Zn (II) protege los grupos tiol de la oxidación y puede desplazar a los metales unidos a las proteínas que son redox-activos. El Zn (II) también puede evitar que se produzcan otras oxidaciones químicas catalizadas por metales, desplazando a estos metales. Así, el Zn (II) actuaría de modo parecido al Mn (II), el cual también se ha asociado con la protección frente al estrés oxidativo en *Salmonella enterica* Typhimurium, en *Lactobacillus* (que en vez de disponer de superóxido dismutasas acumula altas concentraciones de este metal), en *N. gonorrhoeae* y también en *B. subtilis*. De todos modos, y a diferencia del Zn (II), no se sabe por el momento si la captación de Mn (II) está regulada por el estrés oxidativo. Así pues, ambos metales, Zn (II) y Mn (II) actuarían principalmente desplazando cationes metálicos divalentes peligrosos como el Fe (II) y el Cu (II) (Gaballa y Helmann, 2002a; Horsburgh *et al.*, 2002).

1.3.3. Disponibilidad de zinc en el huésped

En humanos, una cantidad de zinc similar a la de hierro (unos 3 g) se encuentra en humanos repartida entre miles de proteínas (Maret, 2001).

El zinc forma parte de más de 200 enzimas. También se encuentra en los dedos de zinc en las proteínas reguladoras de la transcripción. Estos dedos de zinc están directamente implicados en el reconocimiento molecular de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. El número de genes cuyos productos contienen dominios de unión a dedos de zinc es aproximadamente el 3% de los 32000 genes identificados en humanos.

La concentración de zinc en las células eucariotas es bastante elevada, aproximadamente 200 μM , pero la concentración de zinc libre es muy baja, del orden de 10^{-10} M (Lindsay y Foster, 2001). En el suero humano la concentración de zinc está comprendida entre 0,9 y 1,4 $\mu\text{g/ml}$, la mayoría del cual se encuentra unido a la albúmina y a la α -macroglobulina (Chen y Morse, 2001).

1.3.4. Transporte de zinc

Los mecanismos de transporte de zinc en bacterias son difíciles de abordar debido fundamentalmente a tres factores:

- la concentración extremadamente baja de zinc que requieren las bacterias
- la unión inespecífica del zinc a las superficies bacterianas
- el rápido intercambio de zinc entre los compartimentos intracelulares y extracelulares (Lewis *et al.*, 1999).

A pesar de ello, se conocen ya diferentes mecanismos tanto de exportación de zinc como de importación, así como algunos de los genes reguladores de estos procesos.

Según la concentración de Zn^{2+} que la bacteria encuentre en el medio, deberá sintetizar un tipo de transportadores u otros. Si la bacteria dispone de una alta concentración de Zn^{2+} , que puede llegar incluso a ser tóxica, deberá tener

mecanismos que exporten zinc de una forma muy eficiente para evitar que un exceso de este elemento en su citoplasma provoque la muerte celular. Por lo tanto, sólo se encontrarán estos exportadores de zinc en bacterias capaces de crecer a elevadas concentraciones de este ión. En cambio, cuando las células bacterianas se encuentren en medios pobres en zinc, deberán sobreexpresar los mecanismos de importación de este ión, es decir, deberán inducirse los sistemas de captación de zinc de alta afinidad. Los mecanismos reguladores de la exportación de Zn^{2+} actúan a concentraciones de Zn^{2+} de 0,1 mM, mientras que los de captación de Zn^{2+} desreprimen los genes que codifican proteínas de captación a concentraciones de alrededor de 10 μ M.

1.3.4.1. Mecanismos de exportación de zinc

1.3.4.1.1. Facilitadores de la difusión de cationes

Este mecanismo se ha descrito en cepas altamente resistentes a Zn^{2+} de *Ralstonia metallidurans* (Anton *et al.*, 1999; Grosse *et al.*, 1999) y *Staphylococcus aureus* (Xiong y Jayaswal, 1998). Así, se han aislado cepas de *R. metallidurans*, procedentes de tanques de decantación de industrias de zinc, que presentan una CMI (concentración mínima inhibitoria) de 12 mM de Zn^{2+} , habiéndose demostrado que, en parte, esta elevada resistencia se debe a un *cluster* de genes, denominado *czcNICBADRS*, que se localiza en un plásmido de elevado tamaño. Dicho *cluster* codifica dos sistemas de exportación de Zn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} . (Anton *et al.*, 1999; Grosse *et al.*, 1999) (Fig. 1.7 A). Uno de ellos es concretamente, la proteína CzcD, la cual actúa como facilitador de la difusión de cationes y se encarga de exportar estos metales a través de la membrana citoplasmática (Anton *et al.*, 1999).

Del mismo modo, en cepas de *S. aureus* resistentes a Zn^{2+} se ha identificado la proteína ZntA, la cual presenta un 38% de identidad con la proteína CzcD de otra especie de *Ralstonia*, *R. eutropha* (Xiong y Jayaswal, 1998). Un mutante que carezca de esta proteína pasa a ser sensible a una concentración de Zn^{2+} de 0,5 mM, a diferencia de la cepa salvaje que es capaz de resistir hasta 5 mM de Zn^{2+} (Hantke, 2001a).

En *E. coli* se encuentra un homólogo de estos genes. Se trata del gen *zitB* (previamente conocido como *ybgR*) que es también activo en el transporte de Zn^{2+} (Patzner y Hantke, 2001).

Conviene clarificar en este punto que *E. coli* también posee una proteína denominada ZntA, la cual, a pesar de su denominación, no es un facilitador de la difusión de cationes sino una ATPasa del tipo P (Hantke, 2001a).

1.3.4.1.2. Exportadores de tipo RND (Resistance Nodulation Division)

Como se ha indicado anteriormente, el *cluster czcNICBADRS* codifica dos sistemas de exportación de zinc. Así, además del facilitador CzcD, dicho *cluster* codifica también las proteínas CzcA, CzcB, i CzcC, las cuales forman un sistema de transporte sofisticado que exporta Zn^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} a través de la membrana citoplasmática y la externa, permitiendo de este modo que el espacio periplasmático quede también protegido de estos metales en la bacteria. CzcA es un antipuerto catión-protón (permite la salida de un catión a la vez que penetra un protón) localizado en la membrana citoplasmática. CzcB parece ser una proteína conectora ya que está relacionada con AcrA, con una identidad del 22%, la cual es una proteína periplasmática que forma parte de una bomba de exportación de acriflavina. CzcC tiene cierta similitud con TolC y podría conectar CzcB con la membrana externa (Rensing *et al.*, 1997a). Estas tres proteínas en conjunto permiten exportar el Zn^{2+} de la célula al medio exterior (Tseng *et al.*, 1999) (Fig. 1.7 B).

1.3.4.1.3. ATPasas de tipo P

Las ATPasas de tipo P, denominadas así por la enzima intermediaria fosforilada en el aminoácido aspartato que se forma, constituyen una gran familia de proteínas de membrana transportadoras de cationes que se encuentran en eucariotas y también en bacterias. Dos subgrupos de esta familia transportan Cu^+ y Ag^+ , y Zn^{2+} , Cd^{2+} , y Pb^{2+} (Gatti *et al.*, 2000).

En bacterias se han descrito exportadores de este tipo en una cepa resistente a Zn^{2+} de *S. aureus* (Yoon y Silver, 1991), *Stenotrophomonas maltophilia* (Alonso *et al.*,

2000) y *L. monocytogenes* (Lebrun *et al.*, 1994). Concretamente en *S. aureus* se han identificado en un plásmido los genes *cadA* y *cadC* que determinan resistencia a Cd^{2+} y Zn^{2+} (Yoon y Silver, 1991). *CadA* es una ATPasa de tipo P (Tsai *et al.*, 1992) y *CadC*, importante para la completa resistencia de *S. aureus*, es una proteína reguladora similar a la proteína *AraR* que regula las ATPasas de resistencia a arseniato y antimoniato (Shi *et al.*, 1994; Rosenstein *et al.*, 1994).

En la bacteria Gram negativa *S. maltophilia*, los genes que codifican el sistema de transporte *CadA/CadC* presentan un 96% de identidad de secuencia con los *cadA/C* del plásmido de *S. aureus* (Alonso *et al.*, 2000).

En *E. coli* se encuentra otro miembro de esta familia, la proteína *ZntA*, que también confiere resistencia a Cd^{2+} y Zn^{2+} (Beard *et al.*, 1997 y Rensing *et al.*, 1997b) (Fig. 1.7 C).

Este grupo de transportadores, al igual que los facilitadores de la difusión de cationes comentados anteriormente, dejan los cationes que expulsan en el espacio periplasmático (Hantke, 2001a) (Fig. 1.7).

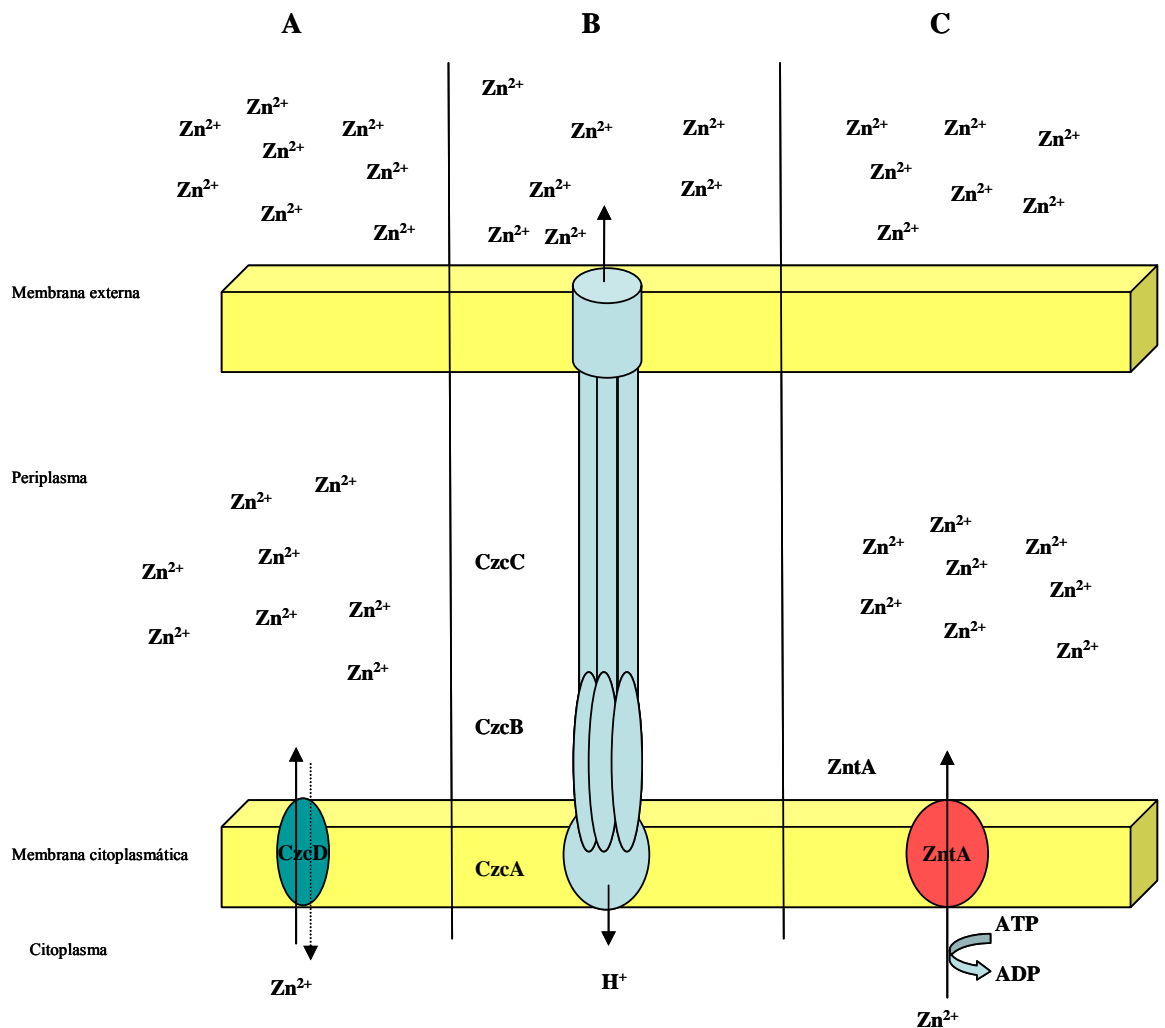


Fig. 1.7. Mecanismos de exportación de Zn²⁺. A: Facilitador de la difusión de cationes. B: Exportador de tipo RND (*Resistance Nodulation Division*). C: ATPasa de tipo P. ZntA: zinc-transporting P-type ATPase, Czc (cobalt-zinc-cadmium resistance system), ATP: adenosina trifosfato, ADP: adenosina difosfato. Esquema modificado de Hantke, 2001a.

1.3.4.2. Reguladores de los genes que codifican proteínas implicadas en la exportación de zinc

Hasta el presente, únicamente se conocen dos proteínas reguladoras de ATPasas tipo P (Hantke, 2001a).

La regulación del gen *zntA* que codifica la proteína ATPasa tipo P ZntA de *E. coli* la lleva a cabo la proteína **ZntR** permitiendo la transcripción de *zntA* cuando la concentración intracelular de Cd^{2+} o de Zn^{2+} es de 19 μM y 100 μM , respectivamente (Noll y Lutsenko, 2000). En presencia de Cd^{2+} o de Zn^{2+} , la proteína ZntR se convierte en un regulador transcripcional que cambia la conformación de la región promotora y hace que ésta se convierta en mejor sustrato para la RNA polimerasa (Outten *et al.*, 1999).

ZntR es un regulador parecido a MerR y por ello se le considera como similar a MerR. MerR interviene en el sistema de detoxificación de Hg^{2+} y está muy bien estudiado.

El Hg^{2+} es reconocido por un residuo aminoacídico (C82) de uno de los monómeros del dímero MerR y por otros dos residuos (C117 y C126) del otro monómero (Caguiat *et al.*, 1999).

Otras ATPasas de tipo P, como CadA, están reguladas por la proteína **SmtB**, la cual forma parte de la superfamilia de represores AraR/SmtB. SmtB es una proteína represora dimérica con el típico motivo hélice-giro-hélice, presentando una disposición de las regiones centrales de las hélices similar al de las proteínas HNF, CAP y al represor de la toxina de la difteria (DtxR) (Cook *et al.*, 1998). De todos modos, los lugares de unión a Zn^{2+} no están bien caracterizados (Hantke, 2001a).

1.3.4.3. Mecanismos de captación de zinc

El zinc difunde libremente por la membrana externa y el periplasma de las bacterias Gram negativas, así que para introducirlo en el citoplasma celular, únicamente se requiere que sea internalizado a través de la membrana citoplasmática.

Los mecanismos de captación de zinc de que disponen la mayoría de las bacterias se dividen en dos grupos: los de **alta afinidad**, que se expresan cuando la concentración de zinc es limitante, y los de **baja afinidad**, que se expresan constitutivamente pero

no son suficientes para proporcionar suficiente zinc a la célula cuando éste se halla en poca cantidad.

En *E. coli*, el sistema específico de captación de zinc pertenece a la familia de **transportadores de tipo ABC** y como se esquematiza en la Figura 1.8 está compuesto por una proteína periplasmática de unión (ZnuA), una ATPasa (ZnuC) y una proteína integral de membrana (ZnuB) (Patzer y Hantke, 1998).

En el grupo de genes *znu*, la transcripción del gen *znuA* es divergente respecto a la de los genes *znuCB*, encontrándose ambos genes separados por una región intergénica corta e inusual de 24 pb (Blattner *et al.*, 1997).

En un medio tamponado con HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid), la captación de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ es la misma para mutantes en estos genes que para la cepa parenteral. Sólo cuando las cepas crecen previamente en presencia de un quelante de cationes divalentes como el EGTA (Ethylene glycol-bis-(β -aminoethyl ether)-*N,N*-tetraacetic acid), los mutantes captan más Zn^{2+} que las células parenterales. Este resultado se puede interpretar si se tiene presente que en el mutante se induce otro transportador de Zn^{2+} . Así, la adición de 0,5 mM de EGTA hace que la captación disminuya 10 veces en la cepa parenteral, mientras que no se observa captación de zinc en los mutantes. La concentración de zinc tras añadir 0,5 mM de EGTA es inferior a 150 nM (Hantke, 2001a).

Por similitud de secuencia se sabe que la proteína ZnuA pertenece a una gran familia de proteínas de unión que reconocen tanto Zn^{2+} como Mn^{2+} , Fe^{2+} o Fe^{3+} como sustrato (Hantke, 2001a).

El sistema ZnuABC también se encuentra en *S. enterica* Typhimurium. En esta bacteria la disposición de los genes *znuA* y *znuCB* es la misma que en *E. coli*, pero se encuentran separados por 25 pb en lugar de 24, y también se transcriben divergentemente. Mutantes *znuC* de *S. enterica* Typhimurium crecen peor que la cepa salvaje en LB (Luria-Bertani) en presencia del quelante EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) y este crecimiento vuelve a ser normal (igual al de la cepa salvaje) cuando a este medio de LB con EDTA se le añade ZnSO_4 a 1mM.

Esto indica que la proteína ZnuC es específica de la captación de zinc. En LB la cepa mutante y la salvaje se comportan del mismo modo, lo cual se debe a que el sistema Znu es necesario para la captación de zinc cuando éste se encuentra a bajas concentraciones, ya que en elevadas concentraciones actúan los sistemas de captación de zinc de baja afinidad (Campoy *et al.*, 2002).

Se han encontrado homólogos a ZnuABC en numerosas bacterias como *Streptococcus pneumoniae* (Dinthilhac, *et al.*, 1997), *Streptococcus pyogenes* (Janulczyk, *et al.*, 1999) *H. influenzae* (Lu *et al.*, 1997), *H. ducreyi* (Lewis *et al.*, 1999) y *L. monocytogenes*. Esta última cuenta también con una proteína similar a Zur (Dalet *et al.*, 1999).

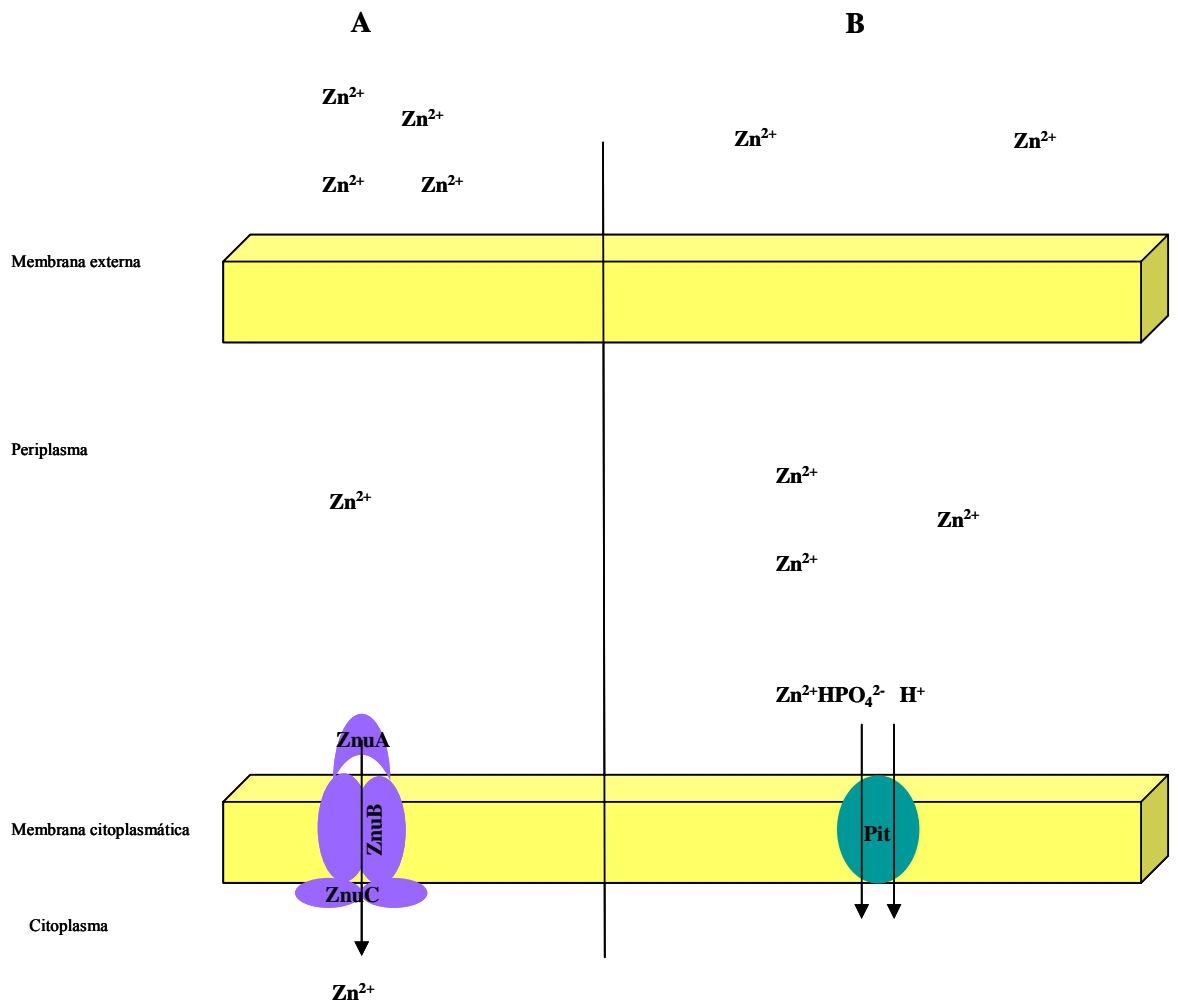


Fig. 1. 8. Mecanismos de captación de Zn²⁺ de alta (A) y de baja (B) afinidad. Pit: *phosphate inorganic transport system*, Znu: *high affinity zinc uptake system*. Mecanismo de captación de zinc de baja afinidad. Esquema modificado de Hantke, 2001a.

1.3.4.4. Regulación de los sistemas de captación de zinc de alta afinidad

1.3.4.4.1. La proteína Zur

En *E. coli* y otras bacterias Gram negativas el transportador de zinc de alta afinidad de tipo ABC (*znuABC*) está regulado por la proteína Zur, aumentando el transporte de $^{65}\text{Zn}^{2+}$ de alta afinidad 10 veces en un mutante *zur*. (Hantke, 2001a).

Hay algunas similitudes entre la proteína Zur y la Fur, comentada anteriormente. Así, la unión de la proteína Zur al DNA es dependiente de Zn^{2+} , al igual que la unión de Fur depende de Fe^{2+} . Las dos cisteínas de unión a zinc de Fur están conservadas en Zur, de hecho ambas proteínas tienen una identidad de secuencia significativa: 24% en *B. subtilis* y 27% en *E. coli*. Además, algunas secuencias de unión a la proteína Zur en promotores de genes relacionados con la captación de zinc (cajas Zur) son muy similares a la caja Fur. El análisis de proteínas mutantes Zur sugiere que el dominio que interacciona con el DNA es el amino-terminal, alrededor del residuo 65, mientras que el dominio carboxi-terminal sería el responsable de la dimerización de la proteína y de la unión de ésta al Zn^{2+} (Patzner y Hantke, 2000). Estos dominios son los mismos que los descritos en la proteína Fur. El contenido estimado de Zn^{2+} es de al menos 2 iones por dímero de Zur, lo cual sugiere que como mínimo un lugar del monómero de unión al metal está ocupado por Zn^{2+} .

Se sabe que la proteína Zur en su forma nativa ya es un dímero, independientemente de la unión con Zn^{2+} , al igual que pasa con la proteína Fur, pero solamente es activa en su forma reducida. Como proteína de localización citoplasmática contiene predominantemente grupos tiol reducidos más que bisulfitos oxidados, debido a las condiciones reductoras del citoplasma (Gilbert, 1990). *In vitro*, los residuos cisteína de la proteína Zur son fácilmente oxidados a disulfitos. La proteína Zur en su forma oxidada no puede unirse al DNA ni a cantidades considerables de Zn^{2+} . Esto podría indicar que el Zn^{2+} se une a alguna de las nueve cisteínas que se encuentran en la proteína Zur. En relación con esto, es de destacar que en la proteína Fur de *E. coli* hay únicamente cuatro cisteínas, pero todas ellas se encuentran conservadas en la proteína Zur (Patzner y Hantke, 2000).

Como ya se ha indicado anteriormente, la proteína Fur es una zinc-metaloproteína ya que contiene un ión de Zn^{2+} estructural por monómero. Esto hace que la relación entre las dos proteínas sea todavía más compleja (Althaus *et al.*, 1999).

El Zn^{2+} actúa como corepresor de la proteína Zur a muy bajas concentraciones y puede ser reemplazado *in vitro* por otros iones metálicos divalentes como el Mn^{2+} . La proteína Fur muestra una inespecificidad similar *in vitro*, ya que puede unir Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} o Zn^{2+} , actuando todos ellos como corepresores en experimentos de protección *footprint*. Ocurre lo mismo con las proteínas DtxR e IdeR que pueden utilizar como corepresores Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} o Zn^{2+} . De todos modos, hasta ahora se postula que la regulación por Fur e IdeR *in vivo* es específica de hierro.

La proteína Zur purificada también puede unir Fe^{2+} , si bien mucho menos eficientemente que Zn^{2+} . No obstante, el Fe^{2+} no puede sustituir al Zn^{2+} como corepresor con Zur, como mínimo a las concentraciones probadas *in vitro*; por lo cual se supone que no hay una interacción directa entre el hierro y la proteína Zur (Patzner y Hantke, 2000).

Los genes *znu* pueden ser desreprimidos por iones metálicos divalentes como el Fe^{2+} , el Mn^{2+} , el Cu^{2+} y el Cd^{2+} , lo cual se puede explicar ya sea por la unión de estos cationes divalentes a la proteína Zur, dando lugar a un cambio de conformación que inactive a la proteína, de modo que no pueda reprimir la expresión de los genes *znu*, o bien por un efecto indirecto al provocar una disminución de los niveles intracelulares de zinc. Esta posibilidad se deriva del hecho de que los iones metálicos, mencionados anteriormente, competirían con el Zn^{2+} por un transporte inespecífico y por lo tanto inhibirían la captación de Zn^{2+} .

La proteína Zur, al igual que la proteína Fur, se encuentra ampliamente distribuida en muchas especies bacterianas, pero sólo en algunas de ellas se ha demostrado la existencia de un regulador dependiente de Zn^{2+} funcional. De todos modos, en cada caso habría que examinar la funcionalidad de estas proteínas, ya que pequeños

cambios en la secuencia pueden dar lugar a variaciones en la especificidad por el metal (Hantke, 2001a).

Hasta el momento, se ha demostrado que disponen de proteína Zur bacterias como *B. subtilis* (Gaballa y Helmann, 1998), *L. monocytogenes* (Dalet *et al.*, 1999) y *S. aureus* (Lindsay y Foster, 2001). En muchos de los genomas total o parcialmente secuenciados se han encontrado posibles genes *zur*, es el caso de los genomas de *Klebsilea pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis*, *Caulobacter crescentus*, *P. aeruginosa* y en cepas de *Neisseria*. Dado que estas especies también disponen de genes homólogos a los *znu*, se ha propuesto que sus proteínas Znu estarían reguladas por esta posible proteína Zur.

Basándose en la similitud de secuencia, la proteína propuesta como Fur para la bacteria *Staphylococcus epidermidis* (Heidrich *et al.*, 1996) podría ser una proteína Zur en lugar de Fur. Es de destacar que es posible que muchas proteínas identificadas en un primer momento como Fur, sean en realidad Zur (Hantke, 2001a).

A partir de los datos obtenidos al alinear las secuencias de las proteínas Zur, se ha propuesto clasificar a estas proteínas en dos grupos, uno para las bacterias Gram negativas y otro para las Gram positivas. Las proteínas Zur de las bacterias Gram positivas, son más similares a las proteínas Zur de las bacterias Gram negativas que a la proteína Fur de *E. coli* (Patzer y Hantke, 2000).

La proteína Zur tiene una función muy limitada de regular la captación de Zn^{2+} de alta afinidad, a diferencia de lo que pasa con la proteína Fur. En *B. subtilis* el regulón Fur está formado por 30 operones, mientras que el regulón Zur está constituido por 6 genes (Fuangthong y Helmann, 2003) si bien es cierto que el regulón Fur está más estudiado que el Zur.

En referencia a la regulación del gen *zur*, se sabe que su transcripción está bajo su propio control en *S. aureus* (Lindsay y Foster, 2001) y *L. monocytogenes* (Dalet *et al.*, 1999), pero no en *E. coli* (Patzer y Hantke, 2000), ni en *S. enterica* Thyphiumurium (Campoy *et al.*, 2002).

No se ha encontrado, en cambio, ninguna proteína homóloga a la proteína Zur en la familia *Pasteurellaceae*.

1.3.4.4.2. La caja Zur

Al igual que lo comentado para la proteína Fur de *E. coli*, las proteínas Zur y PerR de *B. subtilis*, reconocen en los promotores de los genes que regulan el núcleo de secuencias repetidas inversas 7-1-7, las cuales son idénticas en 5 o más posiciones de estas repeticiones. Tan sólo uno o dos cambios de bases son suficientes para cambiar la regulación, por lo tanto solo existen pequeñas diferencias entre el lugar de unión de las cajas Fur, Zur y PerR. Debido a la elevada similitud entre estas cajas, podría pensarse en un posible solapamiento entre los regulones, pero no se han obtenido datos al respecto. En cambio, se ha demostrado que algunos genes de estos regulones están bajo el control de varios de estos reguladores. Así, el gen *fur* de *E. coli* se autorregula ya que contiene una caja Fur pero también responde a la regulación mediada por la proteína PerR. Igualmente el gen *feu_{Per}* está regulado por las proteínas PerR y Fur, aunque *in vitro* sólo se ha detectado su regulación por PerR. Puede ser que otras interacciones proteína-DNA sean importantes a la hora de establecer el rango de lugares operadores reconocidos *in vivo* por cada proteína. Por ejemplo, en *B. subtilis* las cajas Per normalmente se encuentran separadas, mientras que las Fur están solapadas de dos en dos o incluso más de dos. Esto sugiere que la cooperatividad de unión puede ser importante para que se establezca la represión por Fur. En el caso de Zur los alineamientos de secuencia indican que hay tres bases adicionales conservadas en cada una de las secuencias repetidas, pasándose a la estructura 10-1-10. Hay estudios que sugieren que estas bases adicionales pueden influir en la habilidad de estas proteínas para regular la expresión de genes *in vivo* (Fuangthong y Helmann, 2003).

1.3.4.5. Sistemas de baja afinidad de captación de zinc

Tanto en *E. coli* como en otras bacterias se sabe poco sobre los sistemas de captación de Zn^{2+} de baja afinidad. Estos sistemas se encuentran activos a elevadas

concentraciones no tóxicas de Zn^{2+} , cuando el sistema *znuABC* se encuentra reprimido (Hantke, 2001a), siendo su expresión constitutiva en algunos casos.

Únicamente se han descrito tres transportadores de baja afinidad implicados en la captación de zinc: la proteína ZupT y el fosfato inorgánico Pit en *E. coli* y la proteína YciC de *B. subtilis*.

La proteína ZupT pertenece a la familia ZIP (*Zrt-, Irt-like protein*) (Grass *et al.*, 2002). Este tipo de transportador había sido descrito previamente en eucariotas (Gaither y Eide, 2001). Aunque las proteínas ZnuABC presentan mayor afinidad por zinc que la proteína ZupT, esta última también se encarga junto con las primeras de la incorporación de zinc cuando la concentración de este metal en el medio es limitante (Grass *et al.*, 2002).

El sistema Pit está relacionado con el transporte de fosfato inorgánico, y, en *E. coli*, el gen *pitA* parece expresarse constitutivamente (Beard *et al.*, 2000) (Fig. 1.8).

Se ha observado el cotransporte de metales (van Veen, 1994) y de Zn^{2+} (Beard *et al.*, 2000) a través de este sistema de transporte. Además, parece ser que este sistema también es responsable de la captación de Zn^{2+} , ya que en mutantes defectivos en la proteína Pit la acumulación intracelular de zinc es menor que la de las células salvajes (Beard *et al.*, 2000); pero posiblemente también se cataliza el intercambio de otros metales bajo ciertas condiciones de flujo (Hantke, 2001a).

La proteína YciC de *B. subtilis* es una proteína de baja afinidad captadora de zinc, pero, en este caso, dicha proteína también está bajo el control de la proteína Zur, al igual que sucede con las proteínas captadoras de zinc de alta afinidad. Además, en el promotor del gen *yciC* se ha identificado una región que presenta una repetición inversa, similar a las que se encuentran en los promotores regulados por Zur, habiéndose demostrado esta regulación mediante distintos ensayos (Gaballa y Helmann, 1998).

Además de los mecanismos comentados anteriormente, diversos resultados experimentales señalan que en el mundo bacteriano existen otros mecanismos adicionales implicados en la captación de zinc. Así, *Amycolatopsis orientalis* bajo condiciones de carencia de Zn^{2+} secreta el ácido EDDS (*ethylenediamine diisuccinate*) (Zwicker *et al.*, 1997), el cual acompleja Zn^{2+} y otros cationes divalentes. El EDDS es un isómero del quelante EDTA y su estructura está relacionada con la de ciertos sideróforos. Es posible que el EDDS sea utilizado por *A. orientalis* como un zincóforo para satisfacer su demanda de Zn^{2+} . Actualmente no hay pruebas experimentales que corroboren estos datos y se sabe que *E. coli* es incapaz de utilizar el Zn^{2+} unido a EDDS pero también se sabe que la producción de este zincóforo está estimulada por hierro e inhibida por zinc en *E. coli* (Patzner y Hantke, 1998).

Por otra parte, en *E. coli* se ha descrito una proteína periplasmática de unión a Zn^{2+} , denominada ZraP y se ha postulado que esta proteína está bajo el control de la proteína ZntR. La expresión de ZraP se regula por un sistema de dos componentes histidina quinasa. ZraS, con una secuencia similar a un sensor quinasa, se encuentra en la fracción de membrana y se ha demostrado una unión específica entre el activador ZraP y las regiones promotoras de los genes *zraP* y *zraSR*. Aunque la proteína ZraP une zinc en el periplasma, su función es desconocida. Podría tratarse de una proteína de unión a zinc con la misión de proteger a las enzimas periplasmáticas de altas concentraciones de zinc, o bien podría ser un sensor de zinc en el periplasma acoplado a ZraS, la cual transmitiría la señal a ZraR y se induciría la expresión de ZraP y ZraS/R, así como de otras proteínas desconocidas hasta el presente (Hantke, 2001a).

1.3.5. Almacenamiento de zinc en las células bacterianas

En la mayoría de especies bacterianas el almacenamiento de zinc no constituye un mecanismo regulador de la homeostasis (Hantke, 2005), probablemente no se requieran proteínas de almacenamiento dada la baja concentración de zinc que requiere la célula y el rápido intercambio de zinc entre el citoplasma y el medio

externo (Lewis *et al.*, 1999). Así, como ya se ha señalado anteriormente, si hay bacterias capaces de vivir a elevadas concentraciones de zinc, es porque disponen de mecanismos de exportación de este catión, por tanto no lo acumulan en su citoplasma.

Una excepción a lo comentado anteriormente es el caso de las cianobacterias, en las cuales se da una detoxificación del zinc almacenándolo en la metalotioneína SmtA (Blindauer *et al.*, 2002).

De todos modos, y dado que el zinc, al igual que el manganeso, es un ión metálico menos reactivo que el hierro o el cobre, su presencia es beneficiosa para evitar el estrés oxidativo debido a la acumulación de hierro o cobre libre. Este beneficioso papel se debe a que el Zn^{2+} actúa compitiendo por los lugares de unión a proteínas y protegiendo los grupos tiol de la oxidación (Gaballa y Helmann, 2002b).

1.3.6. Importancia en la virulencia de las proteínas implicadas en la captación de zinc de alta afinidad

Como se ha puesto de manifiesto en apartados anteriores, se conoce poco sobre los mecanismos de transporte de zinc y, hay muy pocos datos sobre su importancia en la virulencia de los patógenos. No obstante, los estudios que se han realizado hasta el presente sugieren que estos mecanismos podrían ser relevantes. Así, se ha descrito que mutantes *znuC* de *S. enterica* Typhimurium (Campoy *et al.*, 2002) y *znuA* de *H. ducreyi* (Lewis *et al.*, 1999) son menos virulentos que las cepas salvajes, en sus respectivos modelos animales.

Según se ha indicado, el sistema *znuABC* debe ser el principal mecanismo de captación de zinc de *S. enterica* Typhimurium (Campoy *et al.*, 2002) y podría decirse que la baja disponibilidad de zinc puede interferir en el crecimiento de los mutantes *znuC*, dado que el zinc es esencial tanto para los procesos celulares bacterianos generales como para la actividad de proteínas específicas inducidas durante la infección bacteriana.

No obstante, no puede descartarse que la mutación en alguno de estos genes pudiera afectar a la virulencia de una forma indirecta, ya sea a nivel de la regulación de otros

genes de virulencia o bien, como ya se ha dicho, debido al hecho de que el zinc es un cofactor esencial para muchas proteínas relacionadas con la virulencia (Lewis *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS

Siguiendo el trabajo iniciado hace algunos años por este grupo de investigación sobre la caracterización de los mecanismos de captación de cationes divalentes de *P. multocida* y su posible utilización en el diseño de vacunas, el primer objetivo de la presente tesis doctoral ha sido profundizar en el estudio de los mecanismos de captación de hierro de *P. multocida*. Con el fin de alcanzar este propósito, los objetivos parciales han sido:

- estudiar las proteínas de membrana externa que se inducen bajo condiciones de carencia de cationes divalentes
- caracterizar la función de uno de estos receptores
- estudiar su antigenicidad, así como su efecto inmunogénico en un modelo experimental animal de ratón.

Por otro lado, el segundo objetivo fundamental de esta tesis ha sido el estudio de los mecanismos de captación de zinc de *P. multocida*. Para ello, los objetivos parciales han sido:

- estudiar el sistema de captación de zinc de alta afinidad ZnuABC en *P. multocida*
- estudiar la regulación de los genes *znuABC*
- determinar la importancia de los genes *znuABC* en la virulencia de esta bacteria, mediante la construcción de mutantes *knockout* en estos genes.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación de un receptor de hemina de *Pasteurella multocida* no regulado por la proteína Fur

El primer objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el estudio de los mecanismos de captación de hierro de *Pasteurella multocida* ya que, como se ha comentado en la introducción de la presente tesis doctoral, el hierro es un factor muy importante para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. Es por ello que las bacterias patógenas han desarrollado mecanismos para su captación. Siguiendo el trabajo realizado por nuestro grupo en el estudio de captación de este metal, el primer objetivo de la presente tesis ha sido proseguir en la identificación de receptores de hierro de este patógeno.

3.1.1. Detección de un corrimiento programado en la traducción en el genoma de *P. multocida*

Con el objetivo de caracterizar las proteínas receptoras de hierro de *P. multocida*, se obtuvieron extractos de membrana externa de la cepa salvaje PM25, crecida en presencia y en ausencia de dipiridil (DP), un quelante de cationes divalentes, y se analizó su perfil electroforético. Como puede observarse en la Figura 3.1, se detectó la inducción de proteínas de elevado peso molecular, así como la de dos proteínas de 60 y 40 kDa.

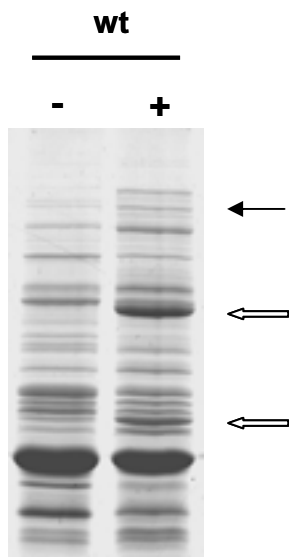


Fig. 3. 1. Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa de la cepa PM25 crecida en ausencia (-) y en presencia (+) de 150 mM de DP. La flecha negra indica la sobreexpresión de las proteínas de elevado peso molecular y las blancas las de las proteínas de 60 y 40 kDa por tratamiento con el quelante DP.

Para averiguar si ambas proteínas, estaban reguladas por la proteína Fur, se realizaron extractos de membrana externa de un mutante *fur* de *P. multocida*. Las proteínas reguladas negativamente por dicha proteína Fur estarán inducidas también en la cepa *fur*, crecida tanto en ausencia como en presencia de DP, ya que habrá una desregulación constitutiva. Como se muestra en la Figura 3.2, se observó que en la cepa *fur*, crecida en medio rico sin el quelante, se inducen las proteínas de elevado peso molecular, pero no se detectó la inducción de las proteínas de 60 y 40 kDa. Estos resultados sugirieron que su regulación era independiente de Fur, por lo cual se decidió identificar y caracterizar ambas proteínas, así como estudiar la regulación de su expresión.

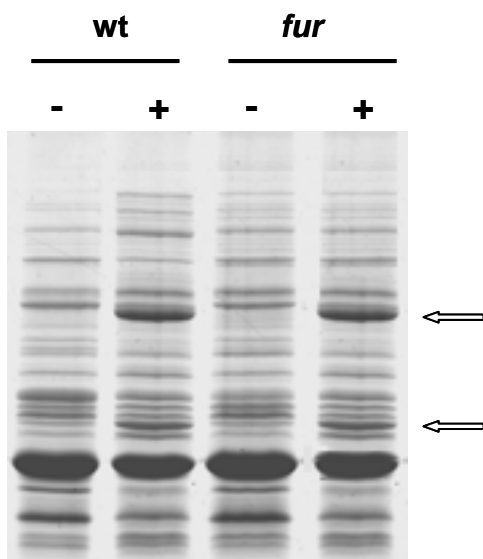


Fig. 3. 2. Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa de la cepa salvaje (wt) y del mutante *fur*, crecidos en ausencia (-) y en presencia (+) de 150 mM de DP. Las flechas indican la sobreexpresión de las proteínas de 60 y 40 kDa.

Para identificar ambas proteínas se determinó su secuencia amino-acídica N-terminal mediante degradación de Edman utilizando un secuenciador de proteínas (Modelo 477A de Applied Biosystems). Sorprendentemente, ambas proteínas presentaban la misma secuencia N-terminal: SNKTFINCVSRAP. Una búsqueda BLAST en la base de datos GenBank database reveló una total identidad entre esta secuencia y la secuencia N-terminal del ORF (marco abierto de lectura) PM0592 del genoma de *P. multocida* PM70. El gen codificado en este ORF es monocistrónico, ya que su dirección transcripcional es la opuesta a los dos ORFs que lo flanquean, uno de los cuales codifica una proteína hipotética de función desconocida y el otro una proteína similar a ThrS (Fig. 3.3 A).



B

```

atgaagttgacaaccaaactctcatttcattgcccgcaggattgatgatTTTTAACAGTGCACAAGCCAGTAATAAACCTT
tattaactgCGTcagccgtgcaccaagtagctttagccctgccctcgtcatggaaggtatTTTCGTATAATGCCAGTTCTC
aacaagtgTACAATCGTTTGATTGAATTTAAACGAGGATCGACCgatatCGAACCTGCGTTGGCAGAAAGTTGGCAAATT
agcGATgacggatTgacgtacactTTTcattTACGTAAAGGCGTgaaattCCACAAAACCAAAGACTATCAGCCGAGTCG
TGAATTTAACGCCGATgacgtgattTTTctctTTCCAACGTCAGTTGGACAAAACCCATCCTTATCAGGAGGTATCGAAAG
GCCTTATCCGATTTCAATGCGATGAAGTTTCCAAAATGTTGCAAGCAGTAGAAAAAGTGGATGATACACAGTGAAA
ATCACCTAACCAAGCCCGATGCGACTTTCTTAGCGAGCTTAGGATGGATTTTATTTCTATTTATCTGCCGAATATGC
CGATAAAATGATGAAGCAGGTACACCAGAAAAAGTAGATACCACCCGATGGTACGGTCCCTTTATTTTTGCAGGTT
ATCAGTTAGAACAAAAATTCCTTTCTCGCAACCCTGATTTATGGCAACCgaaagccgaaattgatCGTTTGATTTTT
GATATGTGCCTGATGCGGGGACACGTTATGCCAAATACAATCTGGTGCGTGATGATGATCGACTTCCCGAATATCGC
CGATTTAGCCAAAATGAAAGCCGATCCGAAAATTCAGTTGATGTCAAAAGAAGGCTTAAACATGCTATATGCGTTTA
ATACCgaaaaagcgcgcttgataatgtgaaagtgcgccaagctttaaactatgctaccgataAAAAAGCCATCATGAT
GTGGTGTACCAAGGCGTGGTGTGATGGCGAAAAATGTCCTACCACCAACGATTTGGAGCTATAACGATGATGTACAGGA
CTACCCATTTGATATTGAAAAAGCCAAACAACCTCTAGCCGAAGCCGGTTATCCAAACGGATTTGAAACCGAAATTTGGG
TGCAACCGGTGGTGCCTCAAACCCGAACCCAGTCGTATGGCTGAAGTgattcaaaatgactgggcaaaagcgggt
GTGAAAGCTAAATGGTCAGTTATGAATGGGGGGATTACATTAACGCAACCAAGCAGGTGAACCTCACCGGGTACTTA
CGTTGGTCAGGCGATAATGGCGATCCAGATAACTTCTTATCACCGTTATAGGCACCGAAAACATCGGTAACAGTAACT
ATGCCCGTTGGAGCAATCCAGAGTTTGATGCGTTATTAAGCAAAGCAATCAGCTTATCTAACCAAGCAGAACCGCTGAA
CTATAAAAAAGCGCAAGTgATCGCGAAAGAACAAGCACCGTGGATTACTGTCGCCACTCCATTACCAATACCGCATT
AAGTCTGCGCGTTAAAGACTATAAACAAAGCCCATTTGGTTATAGTTACTTCTACGGCCTAAGTTAGCGGATTA

```

Fig. 3.3. A. Organización genética de la región cromosómica de *P. multocida* que contiene el ORF PM0592. Las flechas indican la dirección transcripcional de cada gen. **B.** Secuencia de DNA de la región codificante del ORF PM0592. La secuencia del poliA y los dos codones sepia que se leerían al producirse un corrimiento de lectura, están subrayados y marcados en negrita.

Al realizar un análisis detallado de la secuencia del gen PM0592 se detectó un hexanucleótido (AAAAAA) que empieza en la posición 943, codón 315 respecto a su hipotético codón de inicio de traducción (Fig. 3.3 B). Se sabe que la presencia de regiones poliA puede dar lugar a errores en la traducción por corrimiento de lectura, lo cual puede conducir a un final prematuro de la proteína (Chandler y Fayet, 1993; Baranov *et al.*, 2002). Al observar detalladamente la secuencia de PM0592 se detectaron codones de fin de traducción sepia tanto a 14 pb como a 40 pb después del

poliA, que pueden ser leídos si se produce un corrimiento de lectura a partir del poliA de una o de dos bases (Fig.3.3 B). El tamaño de estos dos polipéptidos finalizados prematuramente coincidió con el del polipéptido de 40 kDa detectado en la Fig. 3.1, por lo tanto dicho polipéptido podría ser una proteína PM0592 truncada. Otra posibilidad que explicaría los resultados presentados en la Figura 3.3 sería que en el genoma de *P. multocida* PM25 hubieran dos copias del gen PM0592, una truncada y la otra entera. Esto se descartó mediante análisis por *Southern blot* al detectarse una única banda correspondiente a un solo gen (Fig. 3.4) utilizando como sonda un fragmento interno del gen PM0592 que está 186 pb por delante del poliA.

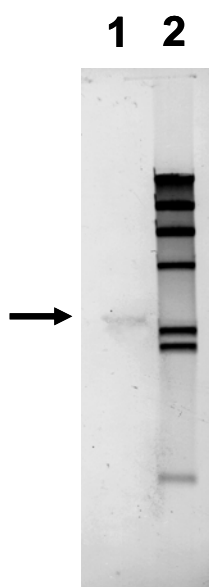


Fig. 3.4. Southern-blot en el que se muestra la única banda de hibridación obtenida de la unión de la sonda cuya secuencia es un fragmento interno del gen PM0592 con el DNA cromosómico de la cepa PM25, digerido con *DraI* (carril 1). El marcador de pesos moleculares de DNA de λ digerido con *HindIII* y marcado con digoxigenina se muestra en el carril 2.

Así pues, se puede afirmar que un corrimiento de lectura programado modula la finalización del mRNA del gen PM0592 *in vivo*. Se ha propuesto que esta estrategia la utilizan algunos microorganismos patógenos para escapar de las defensas del huésped (Dorman y Smith, 2001) o para adaptarse a variaciones en la disponibilidad y en la concentración de fuentes de hierro (Lewis *et al.*, 1997; Schryvers y Stojiljkovic, 1999).

Otro ejemplo de corrimiento de lectura se ha descrito para la síntesis de las subunidades τ y γ de la holoenzima polimerasa III en distintas bacterias como *E. coli*

y *Thermus thermophilus* (Tsuchihashi y Kornberg, 1990 y Yurieva *et al.*, 1997). En este caso, la información que codifica las dos subunidades se encuentra en el mismo gen *dnaX*, y a través de un mecanismo eficiente de corrimiento de lectura se producen las subunidades τ y γ . De hecho, la subunidad τ es esencialmente las 2/3 partes N-terminal de la subunidad γ y el corrimiento de lectura se produce aproximadamente en un 50 % de los casos. Además, la constitución de la holoenzima polimerasa III funcional requiere de la presencia de ambas subunidades, cuyos extremos N-terminales estabilizan el complejo (Xiao *et al.*, 1995). En este contexto, otra explicación para el corrimiento de lectura producido en el caso de PM0592 podría estar relacionado con un proceso de ensamblaje de esta proteína en la membrana externa de *P. multocida*.

Como ya se ha indicado, la regulación de la proteína PM0592 es idéntica, tanto en la cepa salvaje como en la cepa mutante, es decir, su síntesis no se ve desregulada en el mutante *fur*. Esto indica que la expresión de este gen es independiente de *fur*. Observando el promotor del gen PM0592 se confirmó este dato, ya que delante del gen PM0592 no se detecta ningún lugar de unión a Fur y además los ensayos FURTA realizados fueron negativos, confirmando de nuevo los resultados obtenidos anteriormente.

3.1.2. Caracterización de la función de la proteína PM0592

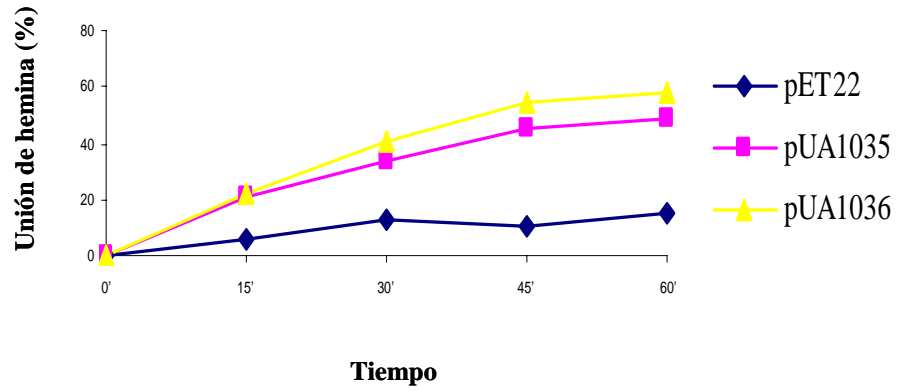
Debido a su localización en la célula y al hecho de que su concentración aumente en ausencia de cationes divalentes, se hipotetizó que el producto del ORF PM0592 podría tratarse de un receptor de hierro de membrana externa. De hecho, dicho ORF ya se había anotado como una proteína hipotética de unión a hemina (May *et al.*, 2001). Además al analizar su secuencia aminoacídica se observó que contenía la secuencia consenso (D/E)TXXVXA(A/S) (donde la X es variable), característica de los receptores dependientes de TonB (Lundrigan y Kadner, 1986). Para confirmar esta hipótesis se realizó un experimento de unión a hemina de células de *E. coli* que contenían únicamente el gen PM0592 completo o el gen PM0592 truncado en la posición 957 en el vector de sobreexpresión pET22-b (Fig.3.5 A). Como control

negativo se utilizaron células de *E. coli* que contenían el vector pET22-b . Este ensayo se basa en la capacidad que presenta la hemina de absorber luz a 400 nm de longitud de onda. Así, si se incuban las células en presencia de hemina se observará progresivamente una disminución de la A_{400} del sobrenadante del cultivo a lo largo del tiempo si las células han unido hemina ya que ésta pasará al sedimento.

Los resultados obtenidos indicaron que las células de *E. coli* que expresan cualquiera de las dos proteínas unen hemina, mientras que las que contienen el vector únicamente no presentan esta capacidad (Fig. 3.5). Estos resultados demuestran claramente que la proteína PM0592 es un receptor de membrana externa y que une específicamente hierro. En atención a estos resultados se denominó *hbpA* (*haemin-binding protein*) al gen PM0592.

Posteriormente, y en atención a los resultados con otros receptores de hemina y hemoglobina obtenidos por nuestro grupo (Bosch et al., 2004), se decidió probar la posibilidad de que este receptor también pudiera unir hemoglobina. Para ello, se realizó un experimento similar al descrito anteriormente, pero utilizando hemoglobina en lugar de hemina y se determinó la A_{410} del sobrenadante del cultivo a las 16 horas de incubación, ya que a esta longitud de onda se detecta específicamente la hemoglobina. Como puede observarse en la Figura 3.5 B, los resultados obtenidos demostraron que ambas proteínas presentan también la capacidad de unir hemoglobina.

A



B

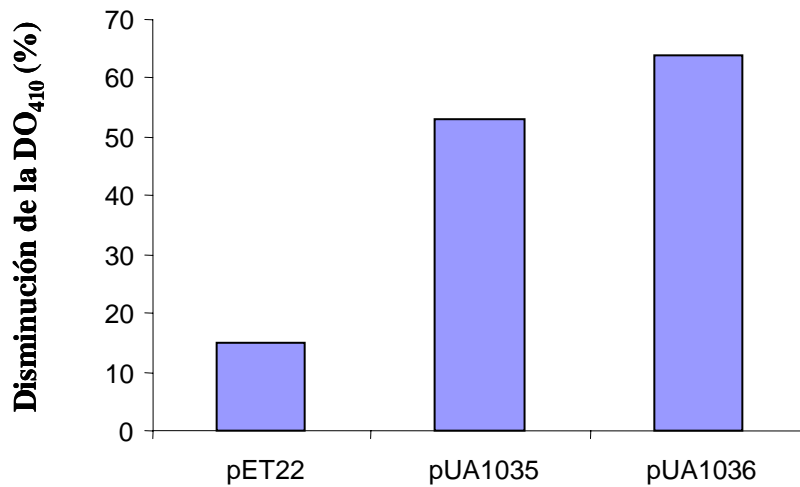


Fig. 3.5. A. Determinación de la unión de hemina a células de *E. coli* que expresan la proteína completa codificada en el ORF PM0592 (pUA1035) o la truncada (pUA1036). Se muestra como control el porcentaje de unión de hemina a *E. coli* con el vector pET22-b. **B.** Determinación de la unión a hemoglobina. Los valores presentados corresponden al porcentaje de disminución de la DO_{410} del sobrenadante de los cultivos centrifugados después de 16 horas de incubación.

Con el fin de iniciar los estudios de regulación del gen *hbpA* se evaluó el efecto que ejercía el quelante DP en la síntesis de mRNA de dicho gen. Para ello, se extrajo el RNA de la cepa salvaje de *P. multocida* crecida en ausencia y en presencia de DP y se realizaron análisis de RT-PCR competitiva utilizando cebadores internos del gen *hbpA* y cebadores del gen *recA* de *P. multocida* como competidor, el cual se expresará por igual tanto en ausencia como en presencia de DP. En la figura 3.6 puede observarse claramente como la banda de *hbpA* que se detecta en presencia de DP es más intensa que en ausencia del quelante, mientras que la banda control de *recA* presenta aproximadamente la misma intensidad en ambos casos.

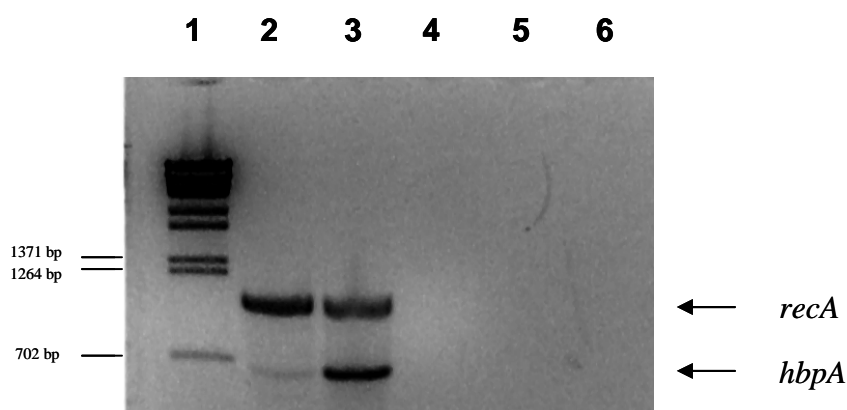


Fig. 3.6. RT-PCR competitiva de la expresión de los genes *hbpA* y *recA* de *P. multocida* en ausencia (carril 2) y en presencia (carril 3) de 150 mM de DP.

Los resultados obtenidos en experimentos de PCR sin transcriptasa inversa usando extracciones de RNA de células de *P. multocida* crecidas en las mismas condiciones se muestran como controles negativos (carriles 4 y 5). Estos controles demuestran que no hay contaminación de DNA en el RNA extraído. La mezcla de PCR en ausencia de RNA se presenta también como control negativo (carril 6). En el primer carril se muestra el DNA del fago λ digerido con *BstEII* como marcador de peso molecular.

Estos análisis de expresión muestran que hay una mayor cantidad de mRNA del gen *hbpA* en presencia del quelante de cationes divalentes DP. Esto indica que el efecto de dicho quelante sobre la expresión del gen *hbpA* ocurre o bien a nivel transcripcional o bien aumentando el tiempo de vida media del mRNA de este gen, tal y como se ha descrito en otros casos (Rosner *et al.*, 2002). Para averiguar cual de las dos hipótesis era la correcta, se estudió la síntesis de β -galactosidasa bajo el control del promotor del gen *hbpA*. Para ello, se realizó una fusión transcripcional entre el promotor del gen *hbpA* y el gen *lacZ*, utilizando como vector el plásmido de amplio espectro de huésped pHRP309, que es estable en *P. multocida* (Parales y Harwood, 1993). Si se observa la Figura 3.7, se puede apreciar un claro aumento de la β -galactosidasa en las células de *P. multocida* crecidas no sólo en presencia de DP sino también en presencia de otros quelantes de cationes divalentes como el EDTA o el EGTA. Estos resultados muestran que el aumento en la expresión no viene determinado por el DP *per se*, ya que otros agentes quelantes producen el mismo efecto. Según los resultados anteriores este comportamiento era esperable, ya que se trata de una proteína implicada en la captación de hierro que debe inducirse cuando hay carencia de este catión. Del mismo modo, con estos resultados también se demuestra que la sobreexpresión de la proteína HbpA causada por el DP es debida a un aumento de la transcripción y no a un incremento de la vida media del mRNA del gen *hbpA*.

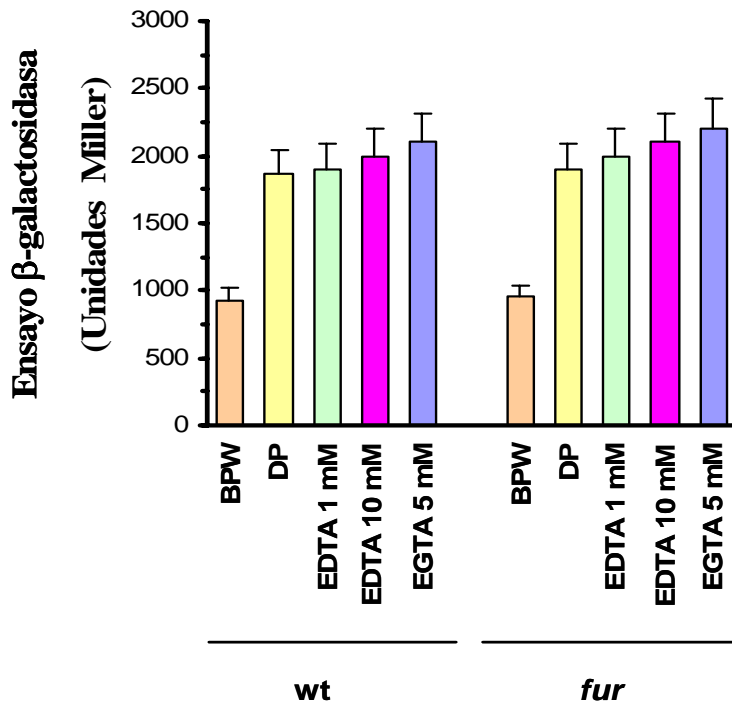


Fig.3.7. Expresión de las fusiones *hbpA-lacZ* en la cepa salvaje (*wt*) y en el mutante *fur* de *P. multocida* en distintas condiciones de cultivo. La concentración utilizada de DP fue de 150 mM. El medio de cultivo siempre es BPW, en el caso en que éste no se ha tratado con ningún quelante se ha anotado como BPW.

Asimismo, se estudió el efecto de la adición de hierro, manganeso y hemina a cultivos de la cepa salvaje y del mutante *fur* tratados con DP. Los resultados obtenidos indicaron que tanto la adición de Fe^{2+} como de Mn^{2+} a cultivos tratados previamente con DP provoca un descenso significativo de la expresión del gen *hbpA* y que la presencia simultánea de ambos cationes produce la recuperación de la expresión basal de *hbpA* (Fig. 3.8). De la misma manera, la adición de hemina disminuye los niveles basales de expresión de *hbpA* y elimina el efecto estimulador del quelante. Los resultados obtenidos fueron los mismos para el mutante *fur* de *P. multocida* y para la cepa salvaje, corroborando nuevamente que la proteína Fur no participa en la regulación del gen *hbpA*.

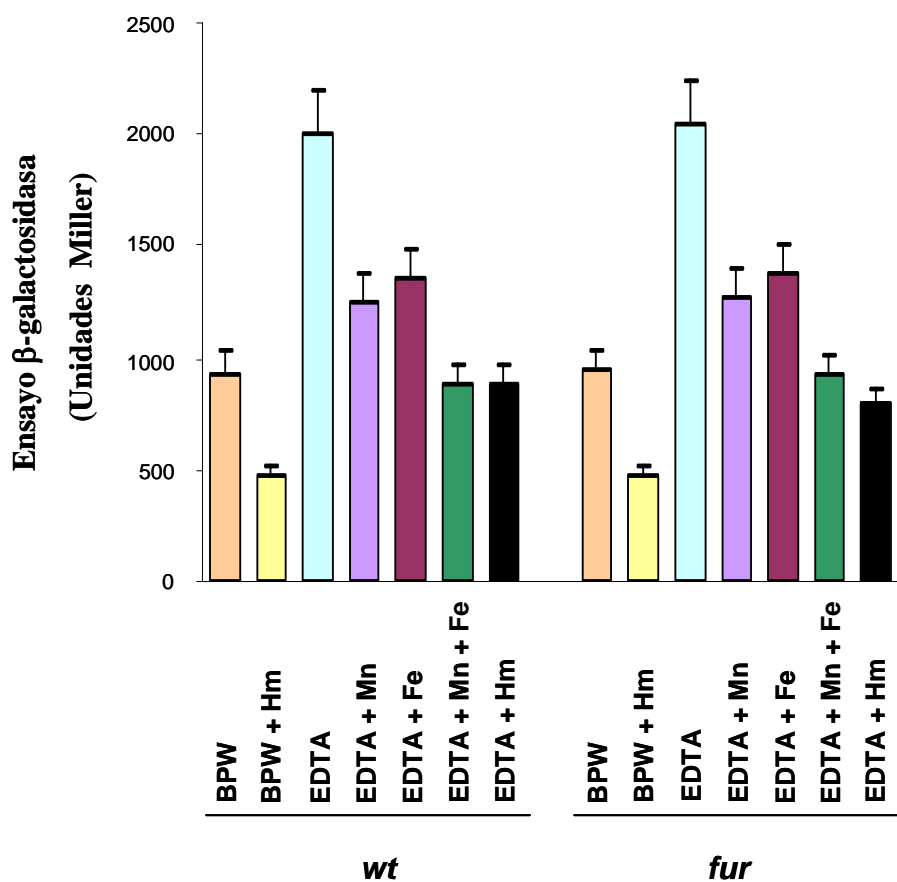


Fig. 3.8. Expresión de la fusión génica *hbpA-lacZ* en la cepa salvaje (*wt*) y en el mutante *fur* en distintas condiciones de crecimiento. Las concentraciones utilizadas de cada compuesto fueron: 1mM de EDTA, 1 mM de FeSO_4 , 1mM de MnCl_2 y 150 mM de hemina.

Los resultados que se acaban de comentar se confirmaron al analizar el perfil de proteínas de membrana externa. Así, en la Figura 3.9 puede observarse que el perfil electroforético de las proteínas de membrana externa de la cepa salvaje es el mismo que el de dicha cepa en presencia de DP y con la adición simultánea de hierro y manganeso o de hemina.

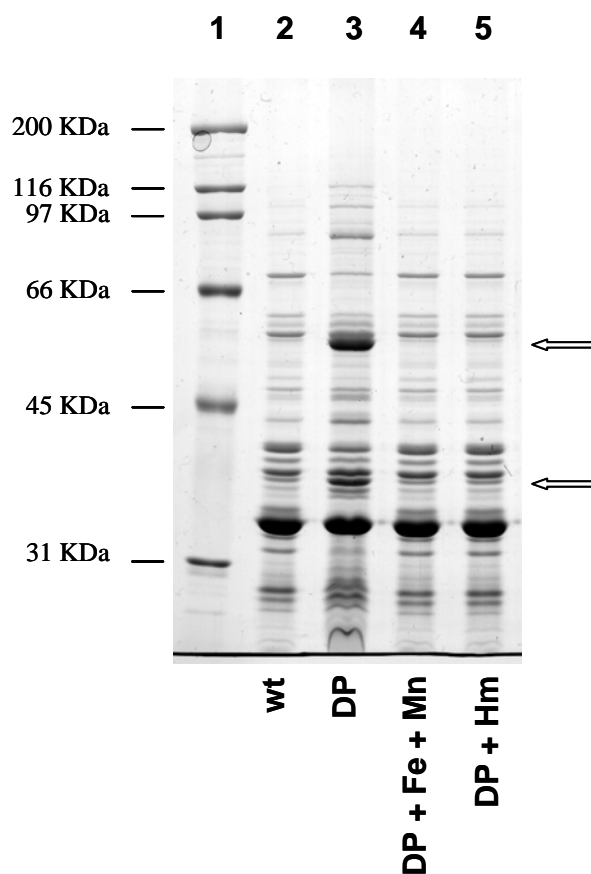


Fig. 3.9. Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa de células de *P. multocida* crecidas en ausencia (carril 2) o en presencia de 150 mM de DP (carril 3), DP con Fe²⁺ (1mM) y Mn²⁺ (1 mM) (carril 3) y DP con hemina (150 mM) (carril 5). Las flechas blancas indican la sobreexpresión de las proteínas de 60 y 40 kDa por tratamiento con DP y reprimidas tanto por Fe²⁺ y Mn²⁺ como por hemina. El marcador de peso molecular Broad Range (BIO-RAD), así como sus valores, se muestran en el carril 1.

El efecto represor que ejerce la hemina en la expresión del receptor HbpA ya había sido descrito para receptores de hemina de otros microorganismos, como *Porphyromonas ginigivalis* (Smalley, *et al.*, 1991) y *Shigella dysenteriae* (Mills y

Payne, 1997). En esta última bacteria, el receptor ShuA se reprime por hierro vía Fur, pero también por hemina, aunque la represión causada por esta molécula es menor que la debida al complejo Fur-Fe(II) (Mills y Payne, 1997). En cambio, el efecto negativo que ejerce el Mn^{2+} en la transcripción del gen *hbpA* de *P. multocida* es un resultado inesperado. La importancia de este catión fue demostrada en *S. enterica* Typhimurium (Boyer *et al.*, 2002), al descubrirse que esta bacteria posee una red génica que se encuentra regulada por el producto del gen *mntR* (Patzner y Hantke, 2001). En atención a ello, se realizó un análisis TBLASTN de dicho gen *mntR* en el genoma de *P. multocida*, pero al no encontrarse ningún gen parecido puede concluirse que el control del Mn^{2+} sobre el gen *hbpA* de *P. multocida* debe realizarse a través de una proteína reguladora distinta a MntR. Tal vez, el regulador transcripcional del gen *hbpA* pueda actuar tanto con Fe^{2+} como con Mn^{2+} como corepresores, aunque su máxima represión se obtiene con la acción conjunta de ambos, ya que sólo se recupera la expresión basal cuando los dos iones están presentes.

3.1.3. Análisis de la antigenicidad e inmunogenicidad de la proteína HbpA

Como ya se ha comentado en la introducción de esta memoria, las proteínas receptoras de hierro de membrana externa suelen ser proteínas antigénicas y, en algunos casos, también inmunogénicas. Por ello, se decidió estudiar la antigenicidad y el posible papel protector de la proteína HbpA. Para dicho estudio se obtuvo suero de ratones hembra Swiss, inoculados con *P. multocida* salvaje. Este suero se utilizó en el análisis de Western-blot de extractos celulares de *E. coli* que contenían los plásmidos pUA1035 y pUA1036 que sobreexpresaban la proteína HbpA entera de 60 kDa y la proteína HbpA truncada de 40 kDa, respectivamente.

El hecho de que en ambos casos se detectaran bandas inmunoreactivas (Fig. 3.10) demuestra que ambas proteínas son antigénicas, tal y como era de esperar por su localización superficial.

En la Figura 3.10 también se aprecian bandas más pequeñas y de menor intensidad, fruto de la degradación de la propia proteína HbpA, debido a que *E. coli* no reconoce

a esta proteína como propia. De hecho, si se observa con detenimiento el perfil electroforético de las proteínas totales, también pueden observarse dichas bandas de degradación.

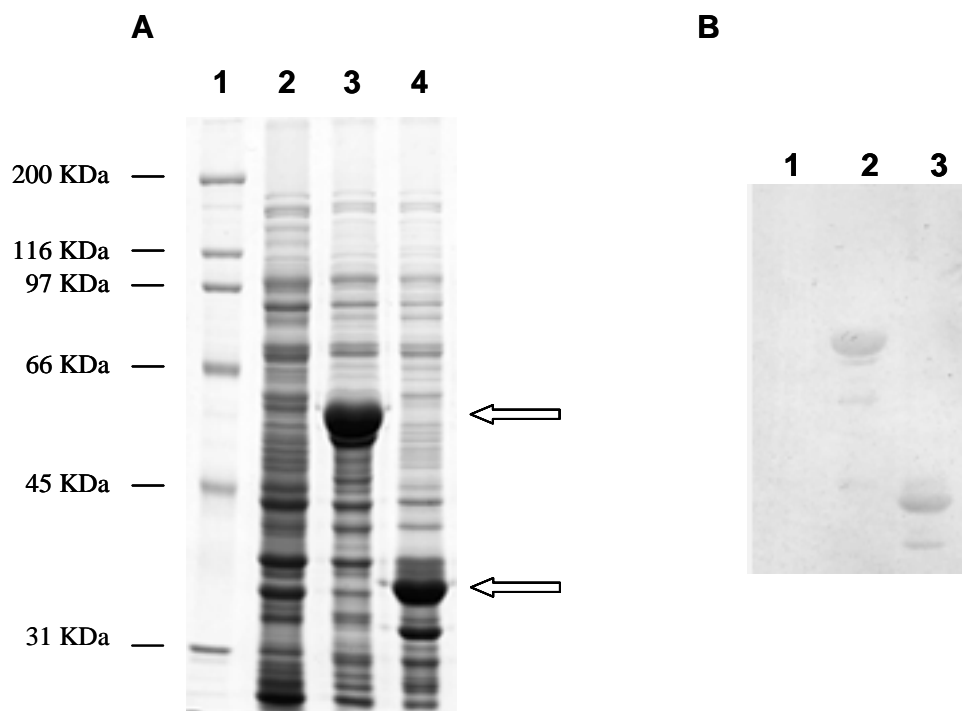


Fig. 3.10. A. Perfil electroforético de extractos crudos de *E. coli* BL21(λDE3) que contienen el vector pET22-b (carril 2), la proteína sobreexpresada entera HbpA (carril 3) o su derivada truncada (carril 4), ambas indicadas con flechas blancas. En el carril 1 se muestra el marcador de pesos moleculares Broad Range (BIO-RAD) . **B.** Western-blot realizado utilizando el suero recuperado de ratones infectados con *P. multocida* salvaje frente a células de *E. coli* que contienen únicamente el vector pET22-b (carril 1), el vector con el gen *hbpA* (carril 2), o el vector con el gen truncado de *hbpA* (carril 3).

Así pues, los resultados obtenidos en este estudio muestran que ambas proteínas, tanto la truncada como la completa, pueden unir tanto hemina como hemoglobina y además son antigénicas. Por tanto, parece improbable que el corrimiento de lectura que se produce para generar la proteína truncada sea un mecanismo de defensa para que la bacteria pueda escapar del huésped, tal y como ocurre en otras bacterias, que

utilizan el cambio de antigenicidad de la célula para escapar de los sistemas de defensa del huésped (Dorman y Smith, 2001).

A pesar de que la proteína HbpA es antigénica, cuando se purificó y se inocularon ratones hembra Swiss, previamente a la realización de un enfrentamiento con *P. multocida* salvaje, no se observó un efecto protector, contrariamente a lo que sucede cuando se inmuniza con un extracto total de proteínas de membrana externa de *P. multocida*. Esto se debe a la existencia de otros receptores de membrana externa de *P. multocida* encargados de unir hemina y hemoglobina, muchos de los cuales tienen la capacidad de unir tanto hemina como hemoglobina (Bosch *et al.*, 2004), al igual que HbpA. Por tanto, el bloqueo de un único receptor por los anticuerpos generados en el ensayo de protección no es suficiente para impedir la captación de hierro de la bacteria, debiendo administrarse juntos todos los receptores para conseguir una protección efectiva (Bosch *et al.*, 2004).

3.1.4. Identificación de la región de unión del gen *hbpA* a su regulador

Con el fin de controlar mejor los sistemas de regulación, muchos represores transcripcionales bacterianos se reprimen a sí mismos, es decir, disponen en su promotor de una caja igual a la caja existente en los promotores de los genes que regulan. Así pues, para identificar al regulador de la expresión de la proteína HbpA, se trató de identificar en primer lugar la zona de unión de dicho regulador al promotor del gen *hbpA*. Para ello, se realizó una extracción de proteínas totales de las cepas salvaje y *fur* de *P. multocida* para posteriores ensayos de retraso electroforético en los que se marcó con digoxigenina la secuencia de DNA del promotor del gen *hbpA*. Estos ensayos se basan en que si hubiera alguna proteína en el extracto proteico que reconociera y se uniera a alguna zona del promotor del gen *hbpA*, el DNA marcado correría menos en un gel de acrilamida que el que no tuviera la proteína unida, ya que habría aumentado su masa. Al realizar dichos estudios se observó un retraso electroforético tanto al utilizar el extracto crudo de la cepa salvaje como el de la cepa *fur* (Fig. 3.11), lo cual indica una vez más que la proteína Fur no es la responsable de la regulación del gen *hbpA*. Se demostró que dichas uniones

DNA-proteína son específicas, al añadir a la mezcla de reacción DNA del promotor del gen *hbpA* sin marcar a una concentración 100 veces superior a la del DNA marcado con digoxigenina. Si la unión es específica, este promotor no marcado competirá con el marcado desplazando a éste último, ya que se encuentra en menor concentración e impidiendo, por lo tanto, que se observe la banda de retraso electroforético (Fig. 3.11). Para terminar de confirmar que la proteína Fur no se une al promotor del gen *hbpA*, se utilizó como DNA competidor el promotor del gen *fur*, el cual está regulado por la proteína Fur. Tal como se esperaba, al añadir este competidor se siguió observando el retraso, ya que no había tal competición (Fig. 3.11).

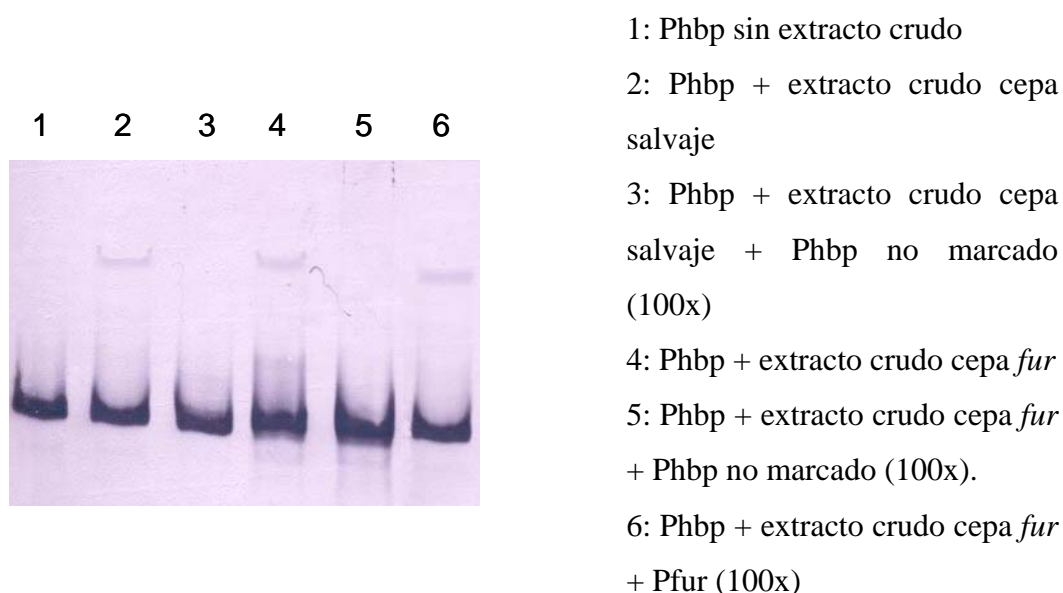


Fig. 3. 11. Ensayos de retraso electroforético utilizando extractos crudos de la cepa salvaje y del mutante *fur* de *P. multocida*.

Para identificar la secuencia de nucleótidos concreta a la cual se une el regulador del gen *hbpA* se diseñaron distintos cebadores de la zona del promotor de dicho gen que se iban acercando progresivamente al lugar de inicio de traducción. Con estos cebadores calle arriba o *upstreams (ups)* y el cebador calle abajo o *downstream (dw)* que se mantiene siempre marcado con digoxigenina se amplificaron una serie de fragmentos que eran progresivamente de menor tamaño (Fig. 3. 12).

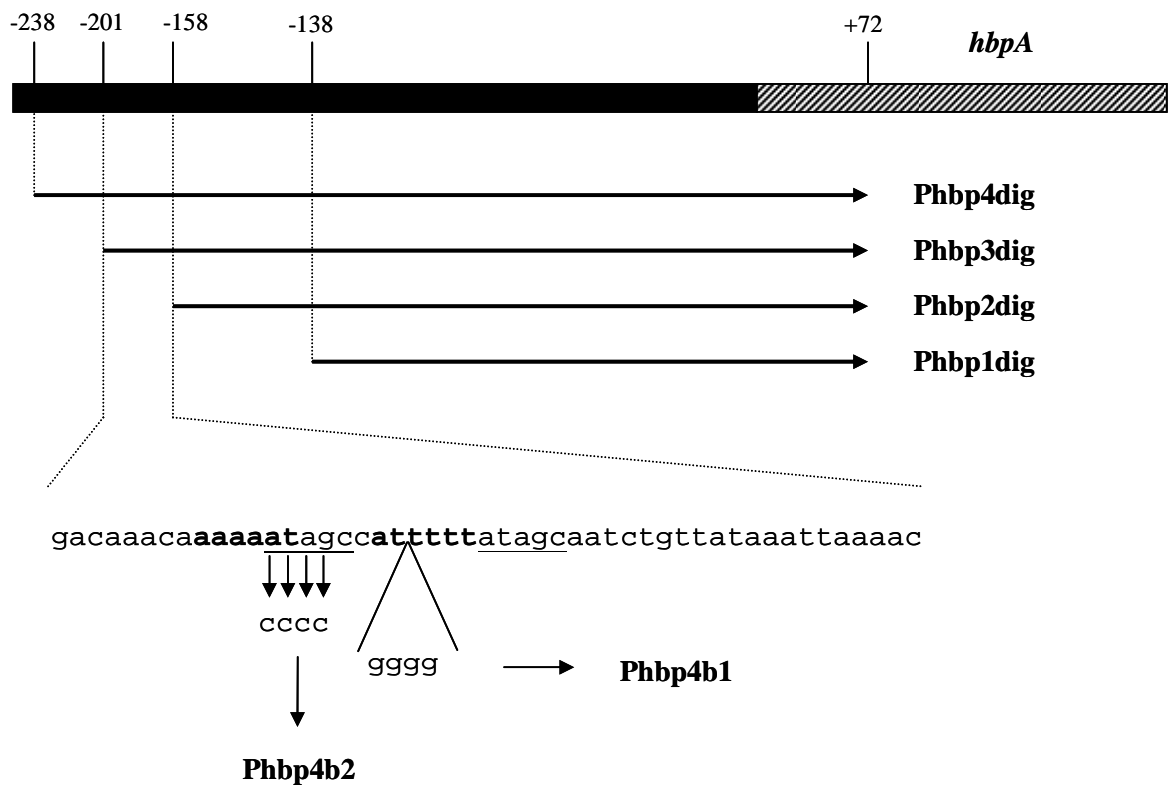


Fig. 3.12. Esquema de los fragmentos utilizados en los distintos ensayos electroforéticos. En la secuencia ampliada se detalla la región del promotor del gen *hbpA* que contiene los dos posibles lugares de unión de la proteína reguladora. La secuencia repetida invertida se ha marcado en negrita, la repetición directa se ha subrayado. Se indican las mutaciones introducidas en estas secuencias mediante el diseño de cebadores que contienen dichas mutaciones.

En los ensayos de retraso electroforético se observó un retraso al utilizar los fragmentos Phbp4dig y Phbp3dig, pero no con los fragmentos Phbp2dig y Phbp1dig (Fig. 3.13).

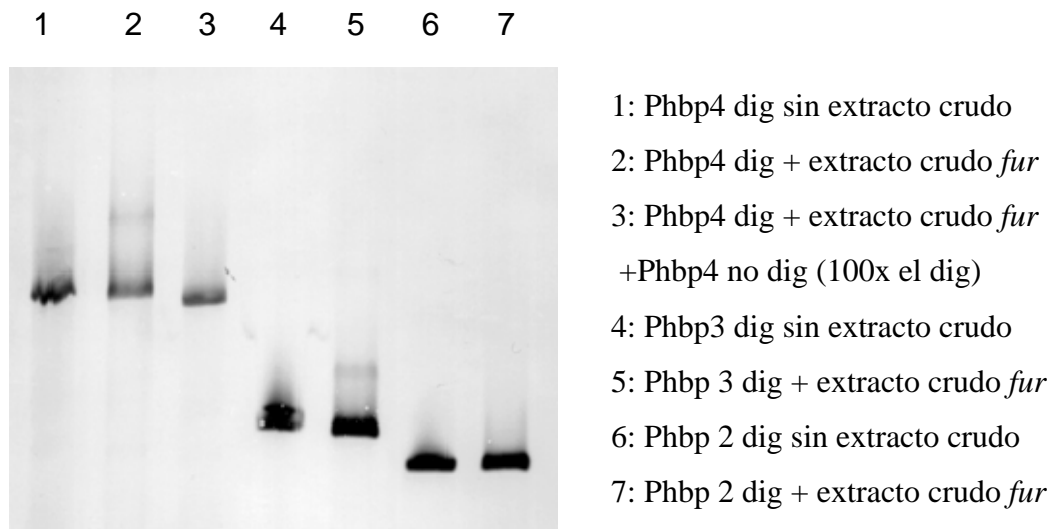


Fig. 3.13. Ensayos de retraso electroforético utilizando extractos crudos de la cepa *fur* y distintas zonas del promotor del gen *hbpA*.

En función de estos resultados puede concluirse que la zona de unión del regulador estará comprendida entre la base -201 y la -158 respecto al ATG. Al analizar esta secuencia de DNA se identificaron dos posibles lugares de unión para una proteína reguladora los cuales se muestran en la Figura 3.12. Se trata de una región flanqueada por una secuencia repetida invertida y de otra flanqueada por una repetición directa (Fig. 3. 12).

Con la finalidad de determinar cual de dichos lugares era la zona de unión del regulador al gen *hbpA*, así como la importancia de estas posibles cajas, se diseñaron nuevos cebadores que contuvieran mutaciones en dichas cajas. En la figura 3.12 se muestran los fragmentos amplificados con las mutaciones introducidas. En el primero de ellos (Phbp4b2) se cambiaron 4 bases que afectan a la primera de las secuencias de la repetición directa, mientras que en el segundo caso se introdujeron cuatro guaninas en la segunda de las secuencias de la repetición invertida (Phbp4b1). Los fragmentos obtenidos se marcaron con digoxigenina utilizando durante la amplificación cada uno de estos cebadores juntamente con el cebador downstream

(dw) marcado con digoxigenina. Seguidamente se realizaron ensayos de retraso electroforético con cada uno de estos fragmentos obtenidos utilizando el extracto crudo de la cepa *fur*.

Cuando se utilizó el fragmento obtenido con el cebador Phbp4b1 se continuó observando retraso electroforético, lo cual indicaba que la mutación introducida no afecta a la unión de la proteína reguladora, descartándose, por lo tanto, que el lugar de unión sea la secuencia repetida invertida. En cambio, cuando se utilizó el fragmento obtenido con el cebador Phbp4b2 no se observó retraso electroforético, lo cual demostraba que la mutación introducida estaba afectando a la unión de la proteína reguladora (Fig. 3.14). Estos datos muestran claramente que la región flanqueada por la repetición directa puede ser la caja de unión del regulador.

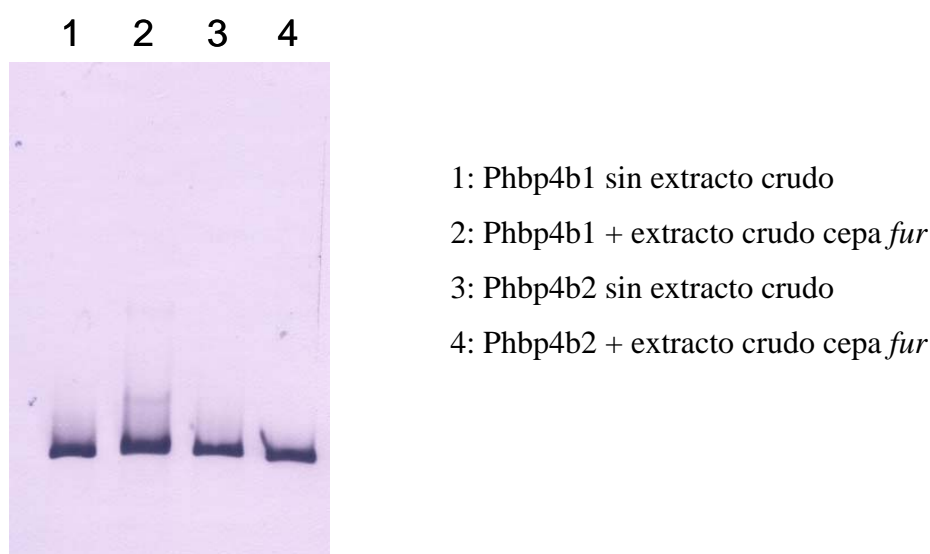


Fig. 3. 14. Ensayos de retraso electroforético utilizando los cebadores mutados diseñados con la finalidad de determinar la caja de unión del regulador.

Finalmente, con el objetivo de determinar si el genoma de *P. multocida* contiene algún gen, en particular algún candidato a regulador, en cuyo promotor se encuentre la secuencia que se había identificado, se realizó una búsqueda en dicho genoma utilizando como sonda la secuencia identificada y el programa RCGScanner (Erill *et*

al., 2003). Los resultados de esta búsqueda no identificaron ningún gen con dicha secuencia en su promotor, por lo cual parece probable que el gen *hbpA* no forme parte de ningún regulón.

La presencia de sistemas de captación de hemina negativamente regulados tanto por hierro como por hemina se ha descrito en numerosas especies bacterianas y en todas ellas el control dependiente de hierro está mediado por la proteína Fur (Stojiljkovic y Hantke, 1992; Letoffe *et al.*, 1994; Mills y Payne, 1995; Thompson *et al.*, 1999; Ochsner *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 2001). En este trabajo, queda claramente demostrado que el gen *hbpA* de *P. multocida*, que codifica una proteína de unión a hemina y hemoglobina, se encuentra regulado por hierro, manganeso y hemina a través de un mecanismo independiente de Fur, siendo HbpA el primer receptor conocido de hemina regulado por hierro en el que la proteína Fur no se ve involucrada.

3.2. Estudio del sistema de captación de zinc de alta afinidad en *P. multocida*

Como se ha comentado en la introducción de esta memoria, otro catión divalente importante para el correcto desarrollo de las bacterias es el zinc y, a pesar de que aún hay pocos casos descritos, la mutación en algunos de los genes implicados en la captación de alta afinidad de zinc, limita la virulencia de las bacterias patógenas. Por todo ello, el segundo objetivo de este trabajo ha sido el estudio de los genes de *P. multocida* implicados en la captación de alta afinidad de zinc, para determinar su regulación y su importancia en la virulencia de este patógeno.

3.2.1. Aislamiento de las unidades transcripcionales *znuA* y *znuCB* en *P. multocida*

Para clonar los genes *znuABC* de *P. multocida*, se realizaron análisis TBLASTN en el genoma de *P. multocida* (May *et al.*, 2001), utilizando como sondas sus proteínas homólogas de *E. coli*. Los resultados obtenidos revelaron la presencia de dos ORFs independientes en el genoma de *P. multocida* (PM0926 y PM0242), cuyos productos mostraban una similitud del 66% y del 73% con los genes *znuA* y *znuC* de *E. coli*, respectivamente.

Se clonaron por amplificación mediante PCR los operones *znuA* y *znuCB* de *P. multocida* utilizando los cebadores indicados en la Fig. 3.15 y en la Tabla 3.1. Los productos obtenidos se clonaron en el vector pGEM-T y se transformaron las construcciones en *E. coli* DH5 α secuenciándose los fragmentos de DNA insertados para confirmar la presencia de los genes deseados.

Contrariamente a lo que ocurre en el genoma de *E. coli*, los genes *znuA* y *znuC* no están físicamente ligados en *P. multocida*, sino que se encuentran separados por 820 kb (Fig. 3.15). Además, tras el gen *znuC* de *P. multocida* se encuentra otro marco abierto de lectura (PM0241) que muestra una similitud del 69% con el gen *znuB* de *E. coli*.

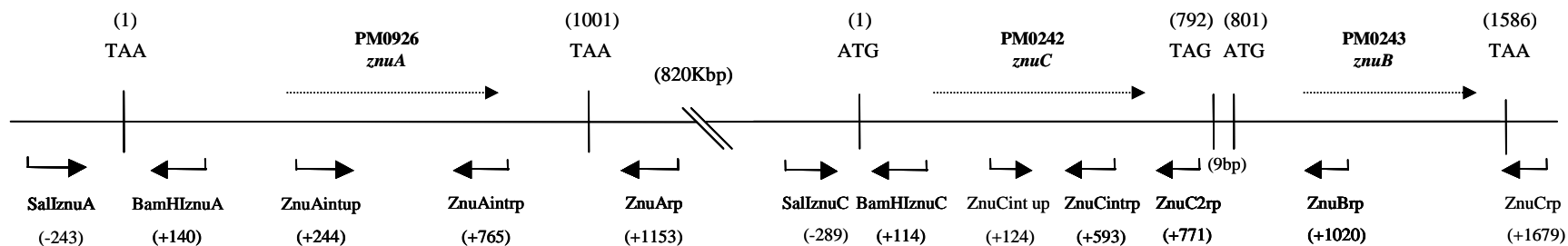


Fig. 3.15. Organización genética de los genes *znuA*, *znuC* y *znuB* de *P. multocida*. Los codones de inicio y fin de traducción se muestran entre paréntesis. Las posiciones de los cebadores que se han empleado, se señalan con flechas. Las posiciones numéricas están referidas respecto al inicio de traducción de los genes *znuA* y *znuC*. Las flechas discontinuas indican la dirección transcripcional de cada gen.

Tabla 3.1 Cebadores utilizados en el estudio de los genes *znuA* y *znuCB* de *P. multocida*.

Cebador	Secuencia ^a	Posición	Aplicación
ZnuCrp	5'-GCTTTATGCTAGATTAATGC-3'	+1679 ^b	Cebador reverso para obtener un fragmento de 1968-pb que contenga el gen <i>znuCB</i>
SaIznuC	5'-GTCGACACAACGAGAACG-3'	-289 ^b	Cebador directo para obtener un fragmento de 1968-pb que contenga el <i>znuC</i> . También se ha utilizado como primer directo para obtener el promotor del gen <i>znuC</i>
BamHIznuC	5'-GGATCCGATCGAATTGGG-3'	+114 ^b	Cebador reverso para obtener el promotor del gen <i>znuC</i>
ZnuCintup	5'-GTCGGTCCTAATGGTGGCGG-3'	+124 ^b	Cebador directo para obtener el fragmento interno de 470-pb del gen <i>znuC</i> . También utilizado para detectar el transcripto de <i>znuCB</i> por RT-PCR
ZnuCintrp	5'-AGCCTTCATTGGTATCTGCC-3'	+593 ^b	Cebador reverso directo para obtener el fragmento interno de 470-pb del gen <i>znuC</i>
ZnuC2rp	5'-TTGAGATTGGAAATCTGACG-3'	+771 ^b	Cebador reverso utilizado para confirmar la interrupción del gen <i>znuC</i>
ZnuBrp	5'-GCCATACCATAGGATGGCG-3'	+1020 ^b	Cebador reverso utilizado para detectar el transcripto de <i>znuCB</i> transcript por RT-PCR
ZnuArp	5'-AAAGGGCTTCCAAACAGAAG-3'	+1153 ^c	Cebador reverso para obtener un fragmento de 1396-pb que contenga el gen <i>znuA</i>
SaIznuA	5'-GTCGAGATGAACTGTGCC-3'	-243 ^c	Cebador directo para obtener un fragmento de 1396-bp que contenga el gen <i>znuA</i> . También utilizado para confirmar la interrupción del gen <i>znuA</i> y para obtener el promotor del gen <i>znuA</i>
BamHIznuA	5'-GGATCCTTACCCCATCAG-3'	+140 ^c	Cebador reverso para obtener el promotor del gen <i>znuA</i>
ZnuAintup	5'-CGGGGAAGACATTGATGC-3'	+244 ^c	Cebador directo para obtener el fragmento interno de 522-pb del gen <i>znuA</i>
ZnuAintrp	5'-AACTGGTGCGAGTTGCTG-3'	+765 ^c	Cebador reverso para obtener el fragmento interno de 522-bp del gen <i>znuA</i>
Aad	5'-CGGCGATCACCGCTTCCC-3'	+2 ^d	Cebador para confirmar la interrupción de los genes <i>znuC</i> y <i>znuA</i> por la inserción de los plásmidos pUA976 y pUA977, respectivamente.

^a Cuando estén presentes, los lugares de restricción añadidos se muestran en cursiva.

^b Posición del extremo 5'- del oligonucleótido con respecto al codón de inicio de traducción del gen *znuC*.

^c Posición del extremo 5'- del oligonucleótido con respecto al codón de inicio de traducción del gen *znuA*.

^d Posición del extremo 5'- del oligonucleótido con respecto al codón de inicio de traducción del gen *aad* del plásmido pUA826.

Como sucede en *E. coli*, los genes *znuC* y *znuB* de *P. multocida* constituyen una única unidad transcripcional, como se demuestra mediante análisis de RT-PCR (Fig.3. 16). Así, con un cebador del gen *znuC* y con otro cebador del gen *znuB* utilizando RNA total de *P. multocida* como molde se obtiene una banda del tamaño esperado.

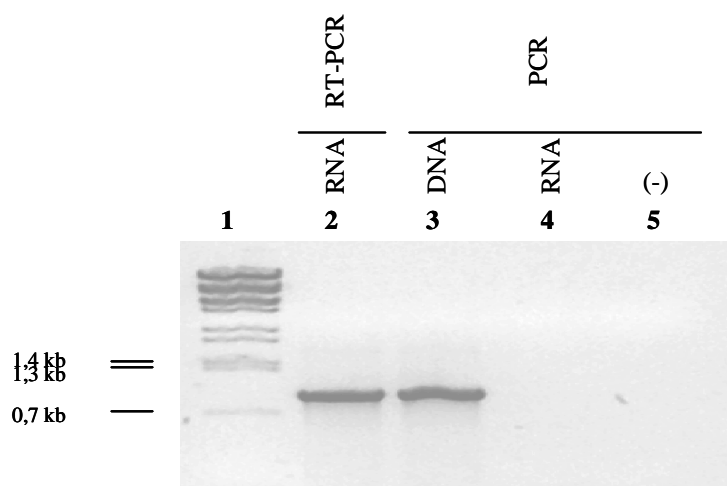


Fig. 3.16. Análisis RT-PCR del transcrito del operón *znuCB* de *P. multocida* con los cebadores ZnuCintup y ZnuBrp (señalados en la Fig. 3.15), utilizando RNA total de *P. multocida* como molde (carril 2). Como controles se muestran los resultados obtenidos cuando se realiza la PCR utilizando los mismos cebadores pero sin transcriptasa inversa, con DNA (carril 3), RNA (carril 4) o sin DNA ni RNA (carril 5). En el primer carril se muestra el DNA del fago λ digerido con *BstEII* como marcador molecular.

La secuencia proteica deducida de PM0926 incluye una extensa región rica en residuos histidinas, aspartato y glutamato que se propone como secuencia de unión de Zn^{2+} o de liberación de Zn^{2+} hacia otras proteínas. Esta región se encuentra justo delante del motivo HXW, situado en la posición 200 de PM0926 (Fig. 3.17). Solamente una proteína que inequívocamente una Zn^{2+} puede contener la estructura

rica en histidinas (H), aspartato (D) y glutamato (E) inmediatamente delante de este motivo HXW, ya que parece ser que esta región central es la que permite la discriminación con los transportadores de manganeso (Claverys, 2001 y Hantke, 2001a). En cambio, el ORF PM0926 aparecía anotado en el genoma de *P. multocida* Pm70 como un hipotético gen *fimA*, el cual codifica una adhesina. Se ha descrito que la proteína FimA en *Streptococcus parasanguis* es una proteína de membrana multifuncional implicada tanto en la adhesión, como en el posible transporte de sustratos aún desconocidos en bacterias Gram negativas. (Fenno *et al.*, 1995). Dado que hay una cierta similitud de PM0926 con diferentes FimAs de Gram positivos, la proteína PM0926 podría tratarse también en este caso de una proteína multifuncional.

Met ARFIKTLKKTALAASIASLATVANATIVTSIKPLGFI
 ASSIADGVTDTEVLVPAGASPHDYSLKPSDIQKLQGAE
 LILWVGEDIDAFLDKTLRPMet PFKKVLSIADFAEIGGLL
 EGE **AHDHKHEHDHTHKHDHDHKHDHDHKHDHDHK**
HEHDHKHDHDHKHDHDHKHDHAHKHEHDHKHDHE
HKHDHAHGHEHDHSTNWHVWYSPEISKIVATRLATR
 LTEAYPEKKEKIAQNLAEFNRTLAEQSEKIKQQLAPVK
 EKGfYVFHDAYSyFNNAyGLKQTGYFTINPLVAPGAK
 TLAKIKQEIKEHKVNCLFAEPQFTPKVIESLSKGTGVH
 VGRLDPMet GDAVKLVNSYANFLQYTADSYFACLSK
Stop

Fig. 3.17. Secuencia de la proteína ZnuA de *P. multocida*. La región extensa rica en residuos histidinas, aspartato y glutamato que se propone como secuencia de unión de Zn²⁺ o de liberación de Zn²⁺ hacia otras proteínas está indicada en rojo y en azul los residuos HVW delante de los cuales se encuentra la secuencia anterior.

3.2.2. Análisis de la expresión de las unidades transcripcionales *znuA* y *znuCB*

Como se ha indicado en la introducción de esta memoria, en las especies en las que se ha estudiado la regulación de los genes *znuABC*, se ha demostrado que su

regulador es la proteína Zur. Así mismo, en aquellas bacterias en las que únicamente se han identificado dichos genes, se ha detectado la presencia de homólogos del gen *zur* de *E. coli*, los cuales muy probablemente sean los responsables de la regulación de *znuABC*. Sin embargo, y a pesar de que *P. multocida* contiene los genes *znuA* y *znuCB*, no se pudo detectar un homólogo al gen *zur* de *E. coli* cuando se realizaron los análisis pertinentes TBLASTN utilizando este gen como sonda.

Este resultado podría tener dos explicaciones: i) la expresión de los genes *znuACB* en *P. multocida* es constitutiva y ii) los genes *znuABC* se encuentran bajo el control de un regulador distinto de *Zur*. Con la finalidad de averiguar cual de estas dos hipótesis era la válida se analizó la producción de β -galactosidasa bajo el control de los promotores de los genes *znu* en diferentes condiciones de cultivo. Para ello, se construyeron fusiones transcripcionales entre los promotores de los genes *znuA* y *znuCB* y el gen *lacZ* de *E. coli*, se clonaron en el vector pHRP309, estable en *P. multocida*, y se introdujeron en distintas cepas de *P. multocida* mediante conjugación triparental.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 3.18, en la cual puede observarse como se triplica la expresión de los genes *znuCB* en presencia de DP. Además, y según era de esperar tratándose de genes de captación de zinc de alta afinidad, la adición de $ZnCl_2$ a los cultivos tratados con DP reestablece el nivel basal de transcripción del promotor de los genes *znuCB* (Fig.3.18 A). A pesar de ello, y sorprendentemente, la adición de $FeSO_4$ da lugar a una disminución significativa de la expresión del promotor *znuCB* en células creciendo en presencia de DP.

Dado este efecto del hierro se analizó si el gen *fur* de *P. multocida* podía jugar algún papel en la expresión del gen *znuC*. Para ello se introdujo el plásmido derivado de pHRP309 que contenía la fusión entre el promotor de *znuCB* - *lacZ* en el mutante *fur* *P. multocida*. Los datos obtenidos en estos análisis indican claramente que el promotor de *znuCB* se encuentra totalmente desregulado en la cepa *fur* creciendo en presencia de Zn^{2+} (Fig. 3.18 A). Los mismos resultados se obtuvieron al realizar estos

mismos estudios de expresión de la proteína β -galactosidasa pero ahora bajo el control del promotor del gen *znuA* (Fig. 3.18 A).

Seguidamente, y para confirmar estos resultados, se introdujeron las fusiones *znuA-lacZ* y *znuCB-lacZ* en los mutantes *zur* y *fur* de *S. enterica* Typhimurium, y también en la cepa salvaje UA1770 y se analizó su expresión en medio rico. Como puede observarse en la Figura 3.18 B, la expresión basal de los genes *znuCB* y del gen *znuA* es la misma en el mutante *zur* y en la cepa salvaje, mientras que está muy aumentada en el mutante *fur*.

Estos resultados se corroboraron al determinarse que tanto el promotor del gen *znuA* como el de los genes *znuCB* fueran positivos en el ensayo FURTA realizado. En la Figura 3.18 se aprecian claras diferencias en el nivel de expresión de los genes *znuA* y *znuCB* según la especie en que se encuentren las fusiones. Ello puede atribuirse probablemente a que la afinidad de la proteína Fur de *S. enterica* Typhimurium por los operadores de los genes *znuA* y *znuC* de *P. multocida* debe ser menor que la de la proteína Fur de la propia *P. multocida*. De hecho, el contenido en G+C de *S. enterica* Typhimurium y de *P. multocida* es significativamente diferente, 50% y 40% respectivamente. De este modo, y a pesar de que ambos microorganismos pertenezcan al mismo grupo filogenético, pueden esperarse pequeñas variaciones en la composición de las secuencias reguladoras de la expresión génica.

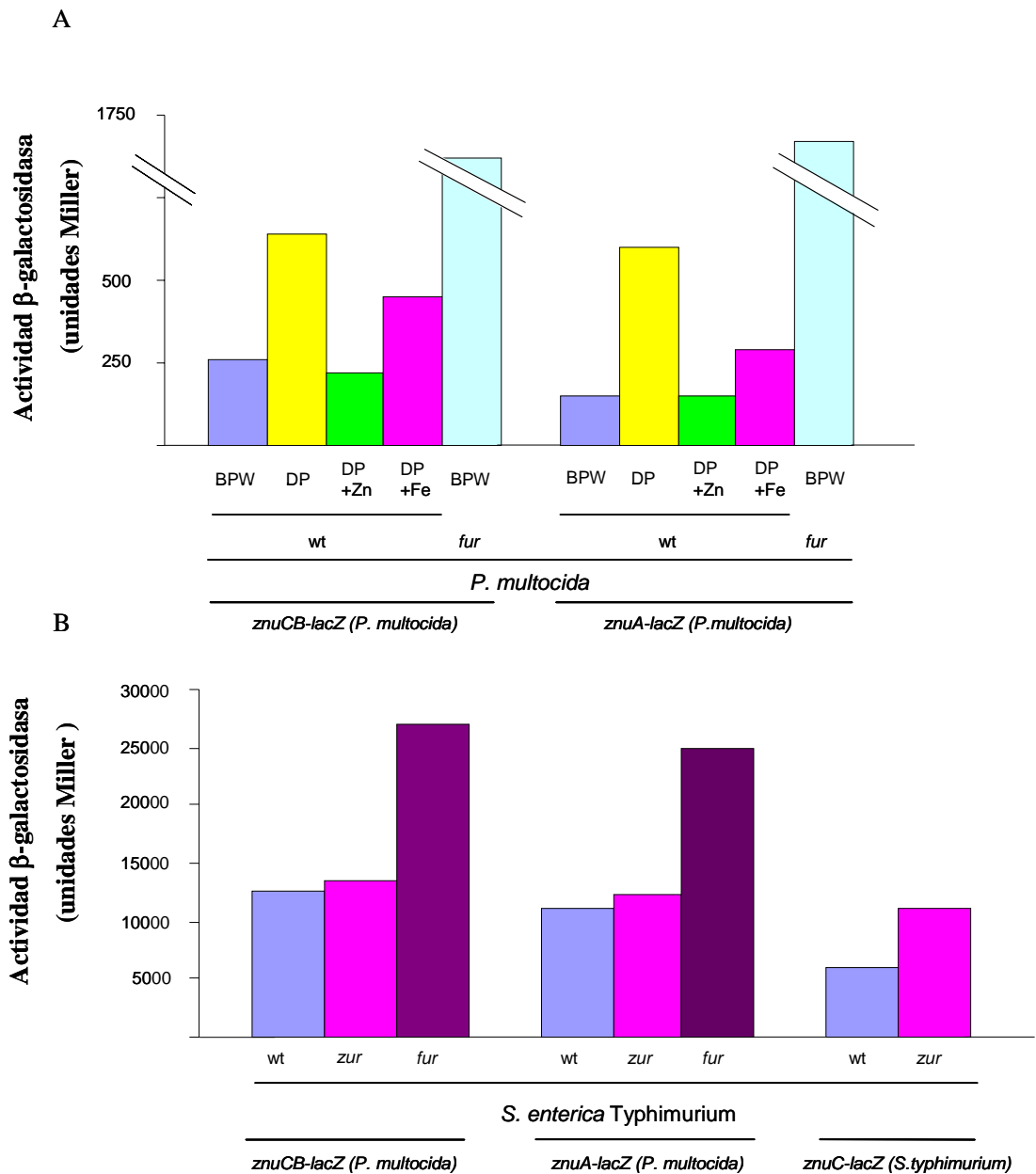


Fig. 3.18. A. Expresión de las fusiones de *znuA* y *znuCB* de *P. multocida* con el gen *lacZ* de *E. coli* en la cepa salvaje (*wt*) y en el mutante *fur* de *P. multocida* crecidos en BPW en ausencia y en presencia de 150 mM de DP y con $ZnCl_2$ (1 mM) o $FeSO_4$ (1 mM). **B.** Expresión de dichas fusiones en la cepa salvaje (*wt*) y en los mutantes *zur* y *fur* de *S. enterica* Typhimurium crecidos en medio rico LB. Se muestra como control del experimento el comportamiento de la fusión *znuC-lacZ* de *S. enterica* Typhimurium tanto en la cepa salvaje (*wt*) como en su mutante *zur*.

En la introducción de la presente memoria se ha indicado que la proteína Fur de *E. coli* puede unir Zn^{2+} *in vitro* (Althaus *et al.*, 1999). Se interpreta que el zinc se une en posición 2 (la 1 es para la unión del metal regulador) y tiene un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la proteína, ya que la pérdida de este metal puede dar lugar a desplegamientos parciales y/o agregación (Pohl *et al.*, 2003). En *P. aeruginosa* se ha descrito que el zinc solo es suficiente para activar a la proteína Fur *in vitro*, ya que es capaz de proteger los lugares de unión a Fur no sólo secundarios (posición 2) sino también primarios (posición 1) de la región promotora del gen *pvdS*. Es decir, el zinc jugaría un papel no sólo de metal estructural sino también de metal regulador (Ochsner *et al.*, 1995). Pero nunca hasta el presente se había descrito que la proteína Fur pueda encargarse directamente de la regulación de la captación de zinc en ninguna bacteria. De hecho, mutantes *fur* tanto de *E. coli* como de *S. enterica* Typhimurium no presentan ninguna alteración en la expresión del sistema *znuABC* (Patzer y Hantke, 2000; Campoy *et al.*, 2002). Tampoco la proteína Fur de *B. subtilis* está involucrada en el control de su sistema de captación de zinc (Gaballa y Helmann, 1998). En relación con esto, debe tenerse presente que estas tres especies bacterianas, al igual que muchas otras pertenecientes a las Gram positivas y al dominio Gamma Proteobacteria, disponen tanto de genes *fur* como *zur*.

En cambio, los resultados obtenidos en el análisis TBLASTN realizado durante este estudio en las bases genómicas de bacterias pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *H. ducreyi* y *H. influenzae*) cuyos genomas están total o parcialmente secuenciados, indican que en ninguna de ellas hay un gen homólogo al *zur*, a pesar de que presentan tanto el sistema *znuABC* como el gen *fur*. Por lo tanto, nuestros resultados indican que probablemente el ancestro de la familia *Pasteurellaceae* perdió el gen *zur* en algún momento dado de su historia evolutiva, mientras que su sistema *znuABC* de captación de zinc de alta afinidad evolucionó hacia un control por la proteína Fur, para lograr, de este modo, un mecanismo que le permitiera mantener la homeostasis de zinc.

3.2.3. Importancia en la virulencia de los genes *znuA* y *znuCB*

Existen pocos datos sobre la importancia de los sistemas de captación de zinc en la virulencia bacteriana. De hecho, sólo se sabe que mutantes *znuA* de *H. ducreyi* y *znuC* de *S. enterica* Typhimurium son menos virulentos que sus respectivas cepas salvajes (Lewis *et al.*, 1999; Campoy *et al.*, 2002).

Para estudiar la importancia de estos genes en la virulencia de *P. multocida* se construyeron cepas mutantes en los genes *znuA* y *znuCB*. Estos mutantes se obtuvieron por la inserción en la cepa salvaje de un derivado del plásmido suicida pUA826 que contenía un fragmento interno de 522 pb o bien de 470 pb de los genes *znuA* y *znuC*, respectivamente (Fig. 3.19).

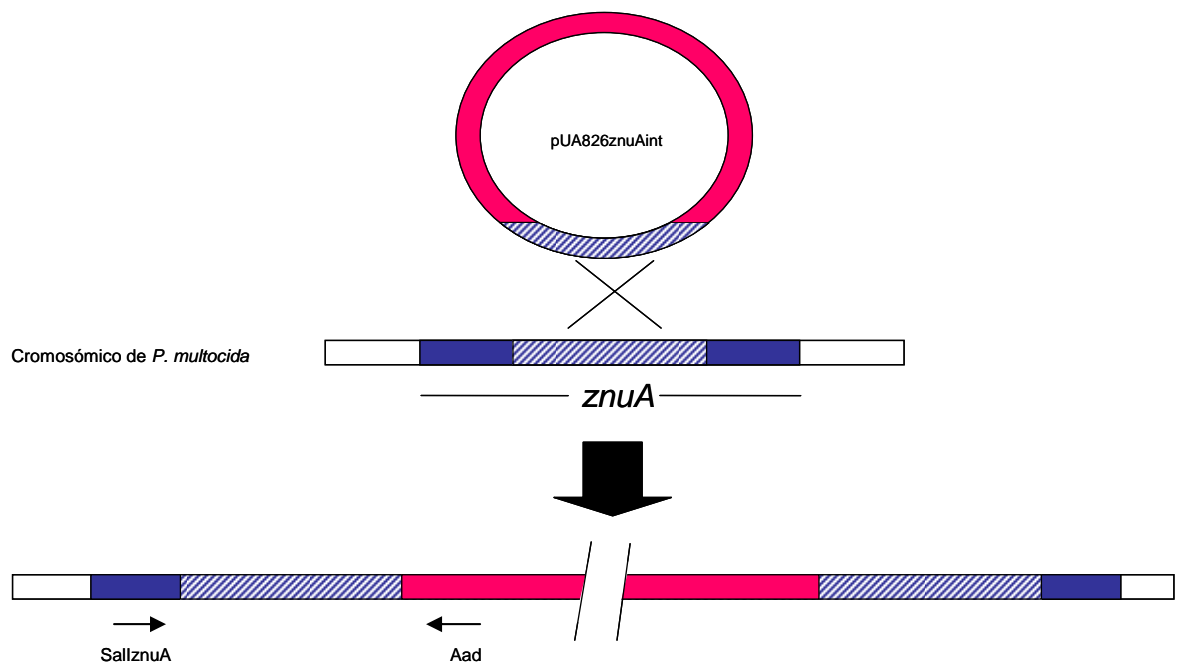


Fig. 3.19. Esquema de la integración del plásmido pUA826znuAint por recombinación homóloga en el genoma de *P. multocida* para obtener el mutante *znuA*. Un esquema equivalente pero con una banda interna del gen *znuC* en el vector pUA826 explicaría la interrupción de este gen para conseguir el mutante *znuC* de *P. multocida*.

La inactivación de los genes cromosómicos *znuA* y *znuC* se confirmó mediante amplificación por PCR de un fragmento mixto entre el vector y el cromosoma utilizando un cebador interno de cada gen con un cebador del vector (Fig. 3.19 y 3.20). En esta construcción, sólo puede haber amplificación si la copia cromosómica del gen está interrumpida por la inserción del plásmido suicida.

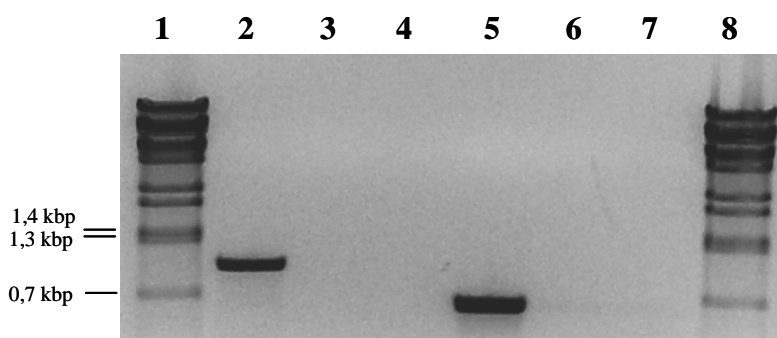


Fig. 3. 20. Análisis mediante PCR de los mutantes *znuA* (carril 2) y *znuCB* (carril 5) de *P. multocida*, utilizando como cebadores el oligonucleótido del plásmido (Aad) y los oligonucleótidos SalIznuA y ZnuC2rp respectivamente. Se muestran como controles negativos los resultados de las reacciones de PCR con DNA cromosómico de la cepa salvaje (carriles 3 y 6) con estos pares de cebadores, así como las reacciones sin DNA (carriles 4 y 7). Los carriles 1 y 8 corresponden al marcador de peso molecular λ DNA digerido con *BstEII*

La estabilidad de las integraciones de ambos mutantes (*znuA* y *znuC*) fue posteriormente confirmada mediante siembras en medio BHI sin antibióticos. Después de 10 pases *in vitro*, se analizaron 100 colonias por mutante y todas ellas seguían manteniendo la resistencia a estreptomicina codificada en el plásmido, indicando que estos dos mutantes son estables en ausencia de presión selectiva.

Asimismo, se analizó la implicación de estos genes en la captación de zinc. Para ello se estudió el crecimiento de ambos mutantes y de la cepa salvaje en diferentes

condiciones de cultivo. Según era de esperar, el crecimiento del mutante $ZnuA^-$ y $ZnuCB^-$ es pobre en medio líquido BPW en presencia de DP, recuperándose cuando se añade $ZnCl_2$ a una concentración de 500 μM (Fig. 3.21). En las células salvajes la recuperación total del crecimiento se produce a una concentración menor de $ZnCl_2$, del orden de 100 μM . Finalmente, los resultados obtenidos en la Figura 3.21 demuestran que el crecimiento deficiente es debido a las mutaciones $ZnuA^-$ y $ZnuCB^-$, ya que al complementar ambas mutaciones en trans, mediante la introducción de un plásmido estable con los genes *znuA* o *znuCB*, se suprimieron los defectos de crecimiento de ambos mutantes.

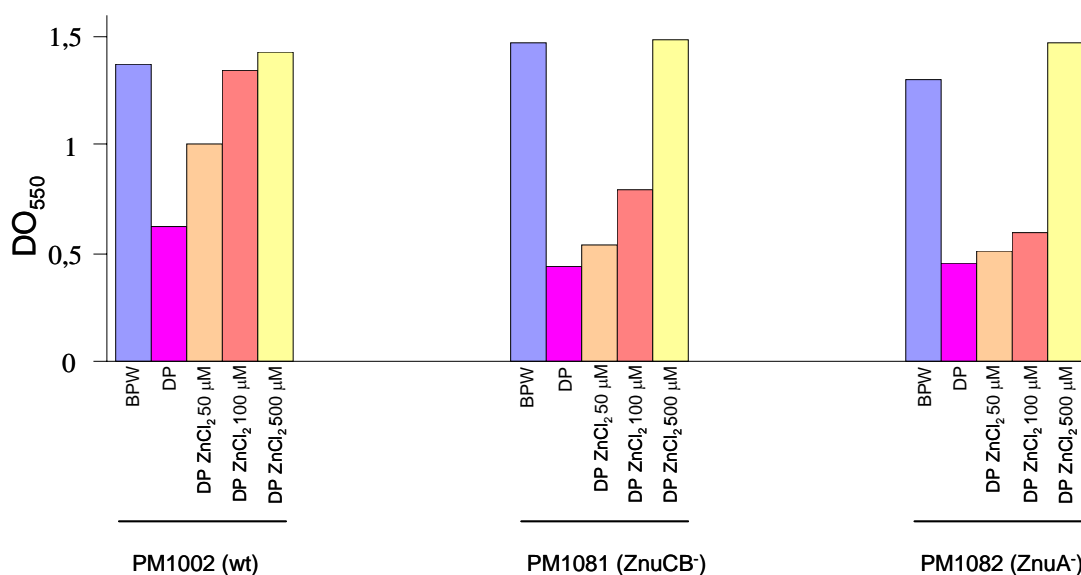


Fig. 3.21. Crecimiento de la cepa salvaje PM1002, y de los mutantes PM1081 y PM1082 de *P. multocida* crecidos en medio BPW en ausencia o presencia de 150 mM de DP sólo o con distintas concentraciones de $ZnCl_2$. La DO_{550} se midió tras la incubación a 37°C durante 14 horas en las que se había aplicado el tratamiento específico.

Una vez caracterizados estos mutantes, se analizó la importancia en la virulencia de los genes *znuA* y *znuCB*. Para ello se estudió su dosis letal 50 (DL₅₀), en un modelo animal de experimentación con ratones Swiss hembra. En la tabla 3.2 se presentan los resultados obtenidos, los cuales indican que ambos mutantes presentan una disminución en su virulencia, siendo su DL₅₀ superior en más de tres órdenes de magnitud a la de la cepa salvaje. Finalmente señalar que el nivel de virulencia de ambos mutantes es similar al de la cepa salvaje cuando a éstos se les introduce un plásmido con los genes *znuA* y *znuCB* (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 DL₅₀ de mutantes *znuA* y *znuCB* de *P. multocida*.

Cepa	Fenotipo	DL₅₀ (cfu/animal)
PM1002	wt	2
PM1081	ZnuCB ⁻	>2.1x10 ³
PM1081/pUA974	wt	2
PM1082	ZnuA ⁻	>3.7x10 ³
PM1082/pUA975	wt	3

4. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que pueden extraerse a partir de los datos obtenidos en el presente trabajo son las siguientes:

1. Se ha aislado e identificado el gen *hbpA* de *Pasteurella multocida* que codifica una proteína de 60 kDa, cuya expresión se induce en presencia de cationes divalentes. Sin embargo, dicho gen no está bajo el control de la proteína Fur.
2. En cepas de *P. multocida* tratadas con quelantes de cationes divalentes, la adición de Fe^{2+} y Mn^{2+} inhibe la transcripción del gen *hbpA*, recuperándose el nivel de transcripción basal cuando se añaden ambos iones a la vez, o bien cuando se añade hemina a los cultivos tratados con el quelante.
3. La región ATAGCN₇ATAGC del promotor del gen *hbpA* es el lugar al que se une el regulador de HbpA.
4. El gen *hbpA* presenta un corrimiento programado en la traducción que puede generar una proteína HbpA truncada de unos 40 kDa, la cual al igual que la proteína entera, es capaz de unir hemina y hemoglobina.
5. La proteína HbpA es antigénica, si bien su administración intraperitoneal no da lugar a protección en experimentos de enfrentamiento en ratones.
6. Los genes *znuA* y *znuCB* que integran el sistema de captación de zinc de alta afinidad están separados en *P. multocida* por 820 kb y los genes *znuC* y *znuB* forman parte de una misma unidad transcripcional.
7. La expresión de los genes *znuA* y *znuCB* se induce en presencia del quelante de cationes divalentes dipiridil y esta inducción desaparece si se añade Zn^{2+} o Fe^{2+} al medio de cultivo.
8. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las especies bacterianas, *P. multocida* no dispone de la proteína Zur, encargada de la regulación de los genes *znuABC*, siendo la proteína Fur la responsable de esta regulación.
9. Los genes *znuA* y *znuCB* son imprescindibles para la virulencia de *P. multocida* ya que mutantes *knockout* de dichos genes presentan una atenuación significativa.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y., Timmus, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., Harrison, P. M., Guest, J. R. y Yrews, S. C.** (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* 181:1415-1428.
- Akerley, B. J., Rubin, E. J., Novick, V. L., Amaya, K., Judson, N. y Mekalanos, J.J.** (2002) A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:966-971.
- Alonso, A., Sánchez, P., Martínez, J. L.** (2000) *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrob. Agents Chemother* 44:1778-1782.
- Althaus, E. W., Outten, C. E., Olson, K. E., Cao, H. y O'Halloran, T. V.** (1999) The ferric uptake regulator (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* 38:6559-6569.
- Yrews, S. C.** (1998) Iron storage in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 40:281-351.
- Yrews, S. C., Robinson, A. K. y Rodríguez-Quñones, F.** (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215-237.
- Angerer, A., Gaisser, S. y Braun, V.** (1990) Nucleotide sequences of the *sfuA*, *sfuB*, and *sfuC* genes of *Serratia marcescens* suggest a periplasmic binding-protein-dependent iron transport mechanism. *J. Bacteriol.* 172:572-578.
- Anton, A., Grosse, C., Reissmann, J., Pribyl, T. y Nies, D. H.** (1999) CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Rashtonia* sp. Strain CH34. *J. Bacteriol.* 181:6876-6881.
- Atlung, T. y Ingmer, H.** (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* 24:7-17.
- Bagg, A. y Neilys, J. B.** (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 25,26:5471-5477.
- Baichoo, N. y Helmann, J. D.** (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* 184:5826-5832.

- Baranov, P. V., Gestely, R. F. y Atkins, J. F.** (2002) Recoding: translational bifurcations in gene expression. *Gene* 286:187-201.
- Beard, S. J., Hashim, R., Membrillo-Hernández, J., Hughes, M. N. y Poole, R. K.** (1997) Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that a *zntA* gene (*o732*) encodes a cation transport ATPase. *Mol. Microbiol.* 25:883-891.
- Beard, S. J., Hashim, R., Wu, G., Binet, M. R. B., Hughes, M. N. y Poole, R. K.** (2000) Evidence for the transport of zinc(II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 184:231-235.
- Beard, S. J., Hughes, M. N. y Poole, R. K.** (1995) Inhibition of the cytochrome bd-terminated NADH oxidase system in *Escherichia coli* K-12 by divalent metal cations. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:205-210.
- Beinert, H., Holm, R. H. y Munck, E.** (1997) Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277:653-659.
- Berish, S. A., Subbarao, S., Chen, C. Y., Trees, D. L. y Morse, S. A.** (1993) Identification and cloning of a *fur* homolog from *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* 61:4599-4606.
- Blattner, F. R., Plunkett, G. I., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burlly, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. y Shao, Y.** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1474.
- Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Robinson, A. K., Parkinson, J. A., Bowness, P. W., Sadler, P. J. y Robinson, N. J.** (2002) Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.* 45:1421-1432.
- Bosch, M., Tarragó, R., Garrido, E., Campoy, S., Fernández de Henestosa, A. R., Pérez de Rozas, A. M., Badiola, I. y Barbé, J.** (2001) Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 203:35-40.
- Bosch, M., Garrido, E., Llagostera, M., A. R., Pérez de Rozas, A. M., Badiola, I. y Barbé, J.** (2002 a) *Pasteurella multocida exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiol. Lett.* 210:201-208.

- Bosch, M., Garrido, E., Llagostera, M., A. R., Pérez de Rozas, A. M., Badiola, I. y Barbé, J.** (2002 b) Characterization of the *Pasteurella multocida* *hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infect. Immun.* 70:5955-5964.
- Bosch, M., Garrido, M. E., Pérez de Rozas, A.M.: Badiola, I., Barbé, J., Llagostera, M.** (2004) *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. *Vet Microbiol.* 99:103-112.
- Boulton, I. C., Gorrings, A. R., Shergill, J. K., Joannou, C. L. y Evans, R. W.** (1999) A dynamic model of the meningococcal transferrin receptor. *J. Theor. Biol.* 198:497-505.
- Boyer, E., Bergevin, I., Malo, D., Gros, P. y Cellier, M. F. M.** (2002) Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium. *Infect. Immun.* 70:6032-6042.
- Braun, V.** (1995) Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:295-307.
- Braun, V. y Killman, H.** (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *TIBS* 24:104-109.
- Braun, V., Hantke, K. y Köster, W.** (1998) Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met. Ions Biol. Syst.* 35:67-145.
- Brickman, T.J. y Armstrong, S. K.** (1995) *Bordetella pertussis* *fur* gene restores iron repressibility of siderophore and protein expression to deregulated *Bordetella bronchiseptica* mutants. *J. Bacteriol.* 177:268-270.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martínez, L., Setlow, P. y Helmann, J. D.** (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol. Microbiol.* 29:189-198.
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Franeul, L. y Cossart, P.** (2002) *Trends Microbiol.* 10:238.
- Caguiat, J. J., Watson, A. L. y Summers, A. O.** (1999) Cd(II)-responsive and constitutive mutants implicate a novel domain in MerR. *J. Bacteriol.* 181:3462-3471.
- Calderwood, S. B. y Mekalanos, J. J.** (1987) Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J. Bacteriol.* 169:4759-64.

- Campoy, S., Jara, M., Busquets, N., Pérez de Rozas, A. M., Badiola, I. y Barbé, J.** (2002) Role of the high-affinity zinc uptake *znuABC* system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. *Infect. Immun.* 70:4721-4725.
- Cárdenas, M., Fernández de Henestosa, A. R., Campoy, S., Pérez de Rozas, A. M., Barbé, J., Badiola, I. y Llagostera, M.** (2001) Virulence of *Pasteurella multocida recA* mutants. *Vet. Microbiol.* 80:53-61.
- Carson, S. A., Thomas, C. E. y Elkins, C.** (1996) Cloning and sequencing of a *Haemophilus ducreyi fur* homolog. *Gene* 176:125-129.
- Chandler, M. y Fayet, O.** (1993). Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Mol. Microbiol.* 7:497-503.
- Chen, C. Y. y Morse, S. A.** (2001) Identification and characterization of a high-affinity zinc uptake system in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 202:67-71.
- Chen, C. Y., Berish, S. A., Morse, S. y Mietzner, T. A.** (1993) The ferric iron-binding protein of the pathogenic *Neisseria* spp. functions as a periplasmic transport protein in iron acquisition from human transferrin. *Mol. Microbiol.* 10:311-318.
- Choi, K. K., Maheswaran, S. K., Felice, L. J., y Molitor, T. W.** (1991) Relationship between the iron regulated outer membrane proteins of *in vivo* grown *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 28:75-92.
- Claverys, J. -P.** (2001). A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res. Microbiol.* 152:231-243.
- Cook, W. J., Kar, S. R., Taylor, K. B. y Hall, L. M.** (1998) Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins. *J. Mol. Biol.* 275:337-346.
- Cornelissen, C. N. y Sparling, P. F.** (1996) Binding and surface exposure characteristics of the gonococcal transferrin receptor are dependent upon both transferrin-binding proteins. *J. Bacteriol.* 178:1437-1444.
- Crosa, J. H.** (1997) Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated gene in Bacteria. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 61:319-336.
- Dalet, K., Gouin, E., Cenatiempo, Y., Cossart, P. y Hechard, Y.** (1999) Characterization of a new operon encoding a Zur-like protein and an associated ABC zinc permease in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 174:111-116.

- Dame, R. y Goosen, N.** (2002) HU: promoting or counteracting DNA compaction? FEBS Lett. 529:151-156.
- Danve, B., Lissolo, L., Mignon, M., Dumas, P., Colombani, S., Schryvers, A. B. y Quentin-Millet, M. J.** (1993) Transferrin-binding proteins isolated from *Neisseria meningitidis* elicit protective and bacterial antibodies in laboratory animals. Vaccine 11:1214-1220.
- de Lorenzo, V., Giovannini, F., Herrero, M. y Neily, J. B.** (1988) Metal ion regulation of gene expression. Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30. J. Mol. Biol. 203:875-884.
- de Luca, N., Wexler, M., Pereira, M., Yeoman, K. H. y Johnston, A. W.** (1998) Is the *fur* gene of *Rhizobium leguminosarum* essential? FEMS Microbiol. Lett. 168:289-295.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. y Scarlato, V.** (2001) The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol. 42:1297-1309.
- Ding, X., Zeng, H., Shiering, N., Ringe, D. y Murphy, J. R.** (1996) Identification of the primary metal iron-activation sites of the diphtheria *tox* repressor by X-ray crystallography and site-directed mutational analysis. Natl. Struct. Biol. 3:382-387.
- Dinithilac, A., Alloing, G., Granadel, C. y Claverys, J. -P.** (1997) Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: AdcA and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. Mol. Microbiol. 25:727-739.
- Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X. W., Finlay, D. R., Guiney, D. y Helinski, D. R.** (1985) Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. Plasmid. 13:149-53.
- Dorman, C. J. y Smith, S. G.** (2001). Regulation of virulence gene expression in bacterial pathogenesis. In *Principles of Bacterial Pathogenesis*, pp. 75–132. Edited by E. A. Groisman. New York: Academic Press.
- Drechsel, H. y Jung, G.** (1998) Peptide siderophores. J. Pept. Sci. 4:147-181.

- Drechsel, H. y Winkelmann, G.** (1997) Iron chelation and siderophores. Transition Metals in Microbial Metabolism, ed. G. Winkelmann, C. J. Carrano, pp. 1-9. Amsterdam, the Netherlands: Harwood Acad.
- Dubrac, S. y Touati, D.** (2000) Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. J. Bacteriol. 182:3802-3808.
- Dubrac, S. y Touati, D.** (2002) Fur mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. Microbiology 148:147-156.
- Earhart, C. F.** (1996). Uptake and metabolism of iron and molybdenum. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd edn, (Neidhardt, F. C., Ed.). pp. 1075-1090. ASM Press, Washington, DC.
- EMBO J. 11:4359-67.
- Erill, I., Escribano, M., Campoy, S. y Barbé, J.** (2003) In silico analysis reveals substantial variability in the gene contents of the gamma proteobacteria LexA-regulon. Bioinformatics 19:2225-2236.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. y de Lorenzo, V.** (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. J. Bacteriol. 181:6223-6229.
- Failla, M. L.** (1977) Zinc: Functions and transport in microorganisms. Microorganisms and Minerals, ed. by E.D. Weinberg (Marcel Dekker, Inc., New York, New York), pp. 151-214, 1977.
- Fenno, J. C., Shaikh, A., Spatafora, G. y Fives-Taylor, P.** (1995) The *fimA* locus of *Streptococcus parasanguis* encodes an ATP-binding transport system. Mol. Microbiol. 15:849-863.
- Fernández de Henestrosa, A. R., Badiola, I., Saco, M., Pérez de Rozas, A. M., Campoy, S., Barbé, J.** (1997) Importance of the *galE* gene on the virulence of *Pasteurella multocida*. FEMS Microbiol. Lett. 154:311-316.
- Foster, J. W. y Hall, H. K.** (1992) The effect of *Salmonella typhimurium* ferric-uptake regulator (*fur*) on iron and pH-regulated protein synthesis. J. Bacteriol. 174:4317-4323.
- Fuangthong, M. y Helmann, J. D.** (2003) Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 185:6348-6357.

- Fuller, C. A. Yu, R., Irwin, A. W. y Schryvers, A. B.** (1998) Biochemical evidence for a conserved interaction between bacterial transferrin binding protein A and transferrin binding protein B. *Microb. Pathog.* 24:75-87.
- Gaballa, A. y Helmann, J. D.** (1998) Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180:5815-5821.
- Gaballa, A. y Helmann, J. D.** (2002 a) Functional analysis of the *Bacillus subtilis* Zur regulon. *J. Bacteriol.* 184:6508-6514.
- Gaballa, A. y Helmann, J. D.** (2002b) A peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 45:997-1005.
- Gaither, L. A. y Eide, D. J.** (2001) Eucaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometal* 14:251-270.
- Gatti, D., Mitra, B. y Rosen, B. P.** (2000) *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. *J. Biol. Chem.* 275:34009-34012.
- Genco, C. A. y Dixon, D.W.** (2001) Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbiol.* 39:1-11.
- Genco, C. A., Odusanya, B. M. y Brown, G.** (1994) Binding and accumulation of hemin in *Porphyromonas gingivalis* are induced by hemin. *Infect. Immun.* 62:2885-2892.
- Ghassemian, M. y Straus, N. A.** (1996) Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology* 142:1469-1476.
- Gilbert, H. F.** (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 63:69-172.
- Grass, G., Wong, M. D., Rosen, B. P., Smith, R. L. y Rensing, C.** (2002) ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:864-866.
- Grosse, C., Grass, G., Anton, A., Franke, S., Santos, A. N., Lawley, B., Brown, N. L. y Nies, D. H.** (1999) Transcriptional organization of *czc* heavy-metal homeostasis determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 181:2385-2393.
- Guerinot, M. L.** (1994) Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:743-772.

- Hamza, I., Chauhan, S., Hassett, R. y O'Brian, M. R.** (1998) The bacterial Irr protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. *J. Biol. Chem.* 273:21669-21674.
- Hamza, I., Hassett, R. y O'Brian, M.** (1999) Identification of a functional *fur* gene in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 181:5843-5846.
- Hannavy K., Barr, G. C., Dorman, C. J., Adamson, J., Mazengera, L. R., Gallagher, M. P., Evans, J. S., Levine, B. A., Trayer, I. P. y Higgins, C. F.** (1990) TonB protein of *Salmonella typhimurium*. A model for signal transduction between membranes. *J. Mol. Biol.* 216:897-910.
- Hansberg, W.** (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. <http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico>.
- Hantke, K.** (1987) Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K12: Fur not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 210:135-139.
- Hantke, K.** (2001 a) Bacterial zinc transporters and regulators. *BioMetals* 14:239-249.
- Hantke, K.** (2001 b) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:172-177.
- Hantke K.** (2005) Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr Opin Microbiol.* 8:196-202.
- Heidrich, C., Hantke, K., Bierbaum, G. y Sahl, H. G.** (1996) Identification and analysis of a gene encoding a Fur-like protein of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 140:253-259.
- Henderson, D. P., Wyckoff, E. E., Rashidi, C. E., Verlei, H. y Oldham A. L.** (2001) Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. *J. Bacteriol.* 183:2715-2723.
- Herbig, A. F. y Helmann, J. D.** (2001) Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol. Microbiol.* 41:849-859.

- Higgs, P. I., Myers, P. S. y Postle, K.** (1998) Interactions in the Ton-Dependent Energy Transduction Complex: ExbB and ExbD Form Homomultimers. *J. Bacteriol.* 180:6031-6038.
- Horsburgh, M. J., Wharton, S. J., Karavolos, M., Foster, S. J.** (2002) Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends Microbiol.* 10:496-501.
- Hughes, M. N. y Poole, R. K.** (1989) Metal Toxicity. *Metals and Microorganisms* (Hughes MN, Poole RK, eds). New York:Chapman and Hall, 252-302.
- Infect. Immun.* 66:4183-92.
- Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J. L., Latour, J. M. y Michaud-Soret, I.** (1998) X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37:2564-2571.
- Jacques, M. y Mikael, G. M.** (2002) Virulence Factors of *Pasteurellaceae*, Formidable Animal Pathogens. *ASM News* 68:174-179.
- Jakubovics, N. S. y Jenkinson, H. F.** (2001) Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology* 147:1709-1718.
- Janulczyk, R., Pallon, J. y Björck, L.** (1999) Identification and characterization of *Streptococcus pyogenes* ABC transporter with multiple specificity for metal cations. *Mol. Microbiol.* 34:596-606.
- Jordan, A., Aragall, E., Gibert, I. y Barbé, J.** (1996) Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* *nrdEF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol. Microbiol.* 19:777-790.
- Kadner, R. J.** (1990) Vitamin B₁₂ transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes. *Mol. Microbiol.* 4:2027-2033.
- Kasahara, M. y Anraku, Y.** (1974) Succinate- and NADH oxidase systems of *Escherichia coli* membrane vesicles. Mechanism of selective inhibition of the systems by zinc ions. *J. Biochem.* 76:967-976.
- Keyer, K. y Imlay, J. A.** (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:13635-13640.
- Khun, H. H., Kirby, S. D. y Lee, B. C.** (1998) A *Neisseria meningitidis* *fbpABC* mutant is incapable of using a non-heme iron for growth. *Infect. Immun.* 66:2330-2336.

- Kirby, S. D., Gray-Owen, S. D. y Schryvers, A. B.** (1997) Characterization of a ferric-binding protein mutant in *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* 25:979-987.
- Köster, W.** (1997) Transport of iron (III) hydroxamates across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Trautwein A.X. (Ed.), *Bioinorganic Chemistry, Transition metals in biology and their coordination chemistry*, Wiley-VCH, pp.56-68.
- Köster, W.** (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B₁₂. *Res. Microbiol.* 152:291-301.
- Kuboniwa, M., Amano, A., Shizukuishi, S., Nakagawa, I. y Hamada, S.** (2001) Specific Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Lys-Gingipain by DNA Vaccination Inhibit Bacterial Binding to Hemoglobin and Protect Mice from Infection. *Infect. Immun.* 69:2972-2979.
- Lam, M. S., Litwin, C. M., Carroll, P. A. y Calderwood, S. B.** (1994) *Vibrio cholerae fur* mutations associated with loss of repressor activity: implications for the structural-functional relationships of Fur. *J. Bacteriol.* 176:5108-5115.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.
- Lavrrar, J. L. y McIntosh, M. A.** (2003) Architecture of a Fur binding site: a comparative analysis. *J. Bacteriol.* 185:2194-2202.
- Lavrrar, J. L., Christoffersen, C. A. y McIntosh, M. A.** (2002). Fur-DNA interactions at the bidirectional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 322:983-995.
- Lebrun, M., Audurier, A. y Cossart, P.** (1994) Plasmid-born cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. *J. Bacteriol.* 176:3040-3048.
- Letoffe, S., Ghigo, J. M. y Wyersman, C.** (1994) Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:9876-80.
- Lewin, A. C., Doughty, P. A., Flegg, L., Moore, G. R. y Spiro, S.** (2002) The ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion. *Microbiology* 148:2449-2456.

- Lewis, D. A., Klesney-Tait, J., Lumbley, S. R., Ward, C. K., Latimer, J. L., Ison, C. A. y Hansen, E. J.** (1999) Identification of the *znuA*-encoded periplasmic zinc transport protein of *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* 67:5060-5068.
- Lewis, L. A., Gray, E., Wang, Y. P., Roe, B. A. y Dyer, D. W.** (1997) Molecular characterization of *hpuAB*, the haemoglobin-haptoglobin utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 23:737-749.
- Lindsay, J. A. y Foster, S. J.** (2001) Zur: a Zn²⁺-responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 147:1259-1266.
- Lissner, C. R., Weinstein, D. L. y O'Brien, A. D.** (1985) Mouse chromosome 1 Ity locus regulates microbicidal activity of isolated peritoneal macrophages against a diverse group of intracellular and extracellular bacteria. *J. Immun.* 135:544-547.
- Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, G., Dumas, P., Mignon, M., Danve, B. y Quentin-Millet, M. J.** (1995) Evaluation of transferrin-binding protein 2 within the transferrin-binding protein complex as a potential antigen for future meningococcal vaccines. *Infect. Immun.* 63:884-90.
- Litwin, C. M. y Calderwood, S. B.** (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:137-149.
- Lu, D., Boyd, B. y Lingwood, C. A.** (1997) Identification of the key protein for zinc uptake in *Haemophilus influenzae*. *J. Biol. Chem.* 272:29033-29038.
- Lundrigan, M. D. y Kadner, R. J.** (1986) Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB. *J. Biol. Chem.* 261:10797-10801.
- Manca, C., Paul, S., Barry, C. E. III, Freedman, V. H. y Kaplan, G.** (1999) *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes *in vitro*. *Infect. Immun.* 67:74-79.
- Maret, W.** (2001) Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis – recent insights and current trends. *BioMetals* 14:187-190.
- Massé, E. y Gottesman, S.** (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. USA* 99:4620-4625.

- May, B. J., Zhang, Q., Li, L. L., Paustian, M. L., Whittam, T. S. y Kapur, V.** (2001) Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida* Pm70. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:238-243.
- Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D. M. y Schneewind, O.** (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. Science 299:906-909.
- Mey, A. R. y Payne, S. M.** (2001) Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. Mol. Microbiol. 42:835-849.
- Mietzner, T. A., Tencza, S. B., Adhikari, P., Vaughan, K. G., Nowalk, A. J.** (1998) Fe(III) periplasm-to-cytosol transporters of gram-negative pathogens. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 225:113-135.
- Miller, J. H.** (1992). A Short Course in Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, R. A. y Britigan, B. E.** (1997) Role of oxidants in microbial pathophysiology. Clin. Microbiol. Rev. 10:1-18.
- Mills, M. y Payne, S. M.** (1997) Identification of *shuA*, the gene encoding the heme receptor of *Shigella dysenteriae*, and analysis of invasion and intracellular multiplication of a *shuA* mutant. Infect. Immun. 65:5358-5363.
- Mills, M. y Payne, S. M.** (1995) Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. J. Bacteriol. 177:3004-3009.
- Modun, B., Kendall, D. y Williams, P.** (1994) Staphylococci express a receptor for human transferrin: identification of a 42-kilodalton cell wall transferrin-binding protein. Infect. Immun. 62:3850-3858.
- Modun, B. y Williams, P.** (1999) The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Infect. Immun. 67:1086-1092.
- Moeck, G. S. y Coulton, J. W.** (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. Mol. Microbiol. 28:675-681.
- Mongkolsuk, S. y Helmann, J. D.** (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. Mol. Microbiol. 45:9-15. Review.

- Morton, D. J., Williams, P.** (1989) Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins. FEMS Microbiol. Lett. 53:123-127.
- Myers, L. E., Yang, Y. P., Du, R. P., Wang, Q., Harkness, R. E., Schryvers, A. B., Klein, M. H., Loosmore, S. M.** (1998) The transferrin binding protein B of *Moraxella catarrhalis* elicits bactericidal antibodies and is a potential vaccine antigen. Infect. Immun. 66:4183-4192.
- Neilys, J. B.** (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. J. Biol. Chem. 270:26723-26726.
- Noll, M. y Lutsenko, S.** (2000) Expression of ZntA, a zinc-transporting P1-type ATPase, is specifically regulated by zinc and cadmium. IUBMB Life 49:297-302.
- Ochsner, U. A., Vasil, A. I. y Vasil, M. L.** (1995) Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters. J. Bacteriol. 177:7194-7201.
- Ochsner, U. A. y Vasil, M. L.** (1996) Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:4409-4414.
- Ochsner, U. A., Johnson, Z. y Vasil, M. L.** (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 146:185-198.
- Xiao, H., Naktinis, V. y O'Donnell, M.** (1995) Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. J. Biol. Chem. 270:13378-13383.
- Otto, B.R., Verweij-van Vught, A. M., MacLaren, D. M.** (1992) Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 18:217-233.
- Outten, C. E., Outten, F. W. y O'Halloran, T. V.** (1999) DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II) responsive MerR homologue in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 274:37517-37524.

- Parales, R. E., y Harwood, C. S.** (1993) Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram- bacteria. *Gene*. 133:23-30.
- Park, S. -J. y Gunsalus, R. P.** (1995) Oxygen, iron, carbon and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: Role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products. *J. Bacteriol.* 177:6255-6262.
- Patzer, S. I. y Hantke, K.** (1998) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 28:1199-1210.
- Patzer, S. I. y Hantke, K.** (2000) The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275:24321-24332.
- Patzer, S. I. y Hantke, K.** (2001) Dual repression by Fe²⁺-Fur and Mn²⁺-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn²⁺ transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:4806-4813.
- Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. y Vasil, M. L.** (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* 47:903-915.
- Pohl, E., Holmes, R. K. y Hol, W. G.** (1999) Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J. Mol. Biol.* 285:1145-1156.
- Postle, K.** (1999) Active transport by customized beta-barrels. *Nat. Struct. Biol.* 6:3-6.
- Postle, K. y Skare, J. T.** (1988) *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *J. Biol. Chem.* 263:11000-11007.
- Pradel, E., Guiso, N., Menozzi, F. D y Locht, C.** (2000) *Bordetella pertusis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect. Immun.* 68:1919-1927.
- Prince, R. W., Cox, C. D. y Vasil, M. L.** (1993) Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J. Bacteriol.* 175:2589-2598.

- Ratledge, C. y Dover, L. G.** (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881-942.
- Reed, L. J. y Muench, J.** (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- Rensing, C., Mitra, B. y Rosen, B. P.** (1997b) The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14326-14331.
- Rensing, C., Pribyl, T. y Nies, D. H.** (1997a) New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J. Bacteriol.* 179:6871-6879.
- Reynolds, P. R., Mottur, G. P. y Bradbeer, C.** (1980) Transport of vitamin B₁₂ in *Escherichia coli*. Some observations on the roles of the gene products of BtuC and TonB. *J. Biol. Chem.* 255:4313-4319.
- Rosenstein, R., Nikoleit, K. y Götz, F.** (1994) Binding of ArsR, the repressor of the *Staphylococcus xylosus* (pSX267) arsenic resistance operon to a sequence with dyad symmetry within the *ars* promoter. *Mol. Gen. Genet.* 242:566-572.
- Rosner, J. L., Dangi, B., Gronenborn, A. M. y Martin, R. G.** (2002) Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyriddy in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:1407-1416.
- Rossi-Campos, A., Yerson, C., Gerlach, G. F., Klashinsky, S., Potter, A. A. y Willson, P. J.** (1992) Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine* 10:512-518.
- Russell, D. G.** (1999) *Mycobacterium* and the seduction of the macrophage. *Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence*, ed. C. Ratledge, J. Dale, pp. 371-388. Oxford, UK: Blackwell Sci.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Laboratory.
- Silver, S.** (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions. *Gene* 179:9-19
- Schmitt, M. P. y Holmes, R. K.** (1993) Analysis of diphtheria toxin repressor-operator interactions and characterization of a mutant repressor with decreased binding activity for divalent metals. *Mol. Microbiol.* 9:173-181.

- Schmitt, M. P., Twiddy, E. M. y Holmes, R. K.** (1992) Purification and characterization of the diphtheria toxin repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7576-7580.
- Schroder, O. y Wagner, R.** (2002) The bacterial regulatory protein H-NS a versatile modulator of nucleic acid structures. *Biol. Chem.* 383:945-960.
- Schryvers, A. y Stojiljkovic, I.** (1999) Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* 32:1117-1123.
- Sebastian, S. y Genco, C. A.** (1999) FbpC is not essential for iron acquisition in *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* 67:3141-3145.
- Sebastian, S., Agarwal, S., Murphy, J. R. y Genco, C. A.** (2002) The gonococcal Fur regulon: identification of additional genes involved in major catabolic, recombination, and secretory pathways. *J. Bacteriol.* 184:3965-3974.
- Shi, W., Wu, J. y Rosen, B. P.** (1994) Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 269:19826-19829.
- Smalley, J. W., Birss, A. J., McKee, A. S. y Marsh, P. D.** (1991) Haemin-restriction influences, hemin-binding haemagglutination and protease activity of cells and extracellular membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* W50. *FEMS Microbiol. Lett.* 69:63-67.
- Snipes, K. P., Hansen, L. M. y Hirsh, D. C.** (1988) Plasma- and iron-regulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 49:1336-1338.
- Staggs, T. M. y Perry, R. D.** (1992) Fur regulation in *Yersinia* species. *Mol. Microbiol.* 6:2507-2516.
- Staggs, T. M., Fetherston, J. D. y Perry, R. D.** (1994) Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis* fur mutation. *J. Bacteriol.* 176:7614-7624.
- Stojiljkovic, I. y Hantke, K.** (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria.
- Stojiljkovic, I., Bäumlner, A. J. y Hantke, K.** (1994) Fur regulon in Gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur Titration Assay. *J. Mol. Biol.* 236:531-545.

- Tao, X. y Murphy, J. R.** (1992) Binding of the metalloregulatory protein DtxR to the diphtheria *tox* operator requires a divalent heavy metal iron and protects the palindromic sequences from DNaseI digestion. *J. Biol. Chem.* 267:21761-21764.
- Tapias, A., Fernández, S., Alonso, J. C., Barbé, J.** (2002) *Rhodobacter sphaeroides* LexA has dual activity: optimising and repressing *recA* gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 30:1539-1546.
- Taylor, J. M. y Heinrichs, D. E.** (2002) Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol. Microbiol.* 43:1603-1614.
- Telford, J. R. y Raymond, K. N.** (1996) Siderophores. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, ed. J. L. Atwood, J. E. D. Davis, D. D. MacNicol, F. Vogtle. Vol. 1, pp. 245-266. Oxford, UK: Elsevier Sci.
- Thomas, C. E. y Sparling, P. F.** (1994) Identification and cloning of a *fur* homologue from *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 11:725-737.
- Thomas, C. E. y Sparling, P. F.** (1996) Isolation and analysis of a *fur* mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 178:4224-4232.
- Thompson, J. M., Jones, H. A. y Perry, R. D.** (1999) Molecular characterization of the hemin uptake locus (*hmu*) from *Yersinia pestis* and analysis of *hmu* mutants for hemin and hemoprotein utilization. *Infect. Immun.* 67:3879-3892.
- Tolmasky, M. E., Wertheimer, A. M., Actis, L. A. y Crosa, J. H.** (1994) Characterization of the *Vibrio anguillarum fur* gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. *J. Bacteriol.* 176:213-220.
- Todd, J. D., Wexler, M., Sawers, G., Yeoman, K. H., Poole, P. S. y Johnson, A. W. B.** (2002) RirA, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 148:4059-4071.
- Touati, D.** (1988) Transcriptional and posttranscriptional regulation of manganese superoxide dismutase biosynthesis in *Escherichia coli*, studied with operon and protein fusions. *J. Bacteriol.* 170:2511-2520.
- Touati, D.** (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 373:1-6.
- Tsai, K. J., Yoon, K. P. y Lynn, A. R.** (1992) ATP-dependent cadmium transport by the *cadA* cadmium resistance determinant in everted membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174:116-121.

- Tseng, C. P.** (1997) Regulation of fumarase (*fumB*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, iron and heme availability: role of the *arcA*, *fur*, and *hemA* gene products. FEMS Microbiol. Lett. 157:67-72.
- Tseng, T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A. y Saier, M. H. J.** (1999) The RND permease superfamily : an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1:107-125.
- Tsuchihashi, Z. y Kornberg, A.** (1990) Translational frameshifting generates the γ subunit of DNA polymerase III holoenzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2516-2520.
- Vallee, B. L. y Falchuk, K. H.** (1993) The biochemical basis of zinc physiology Physiol. Rev. 73:79-118.
- van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J., Konings, W. N. y Zehnder, A. J.** (1994) Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. Biochemistry. 33:1766-1770.
- van Vliet, A. H. M., Ketley, J. M., Park, S. F. y Penn, C. W.** (2002) The role of iron in *Campylobacter* gene regulation, metabolism and oxidative stress defense. FEMS Microbiol. Rev. 26:173-186.
- van Vliet, A. H. M., Wooldidge, K. G. y Ketley, J. M.** (1998) Iron-responsive gene regulation in a *Campylobacter jejuni fur* mutant. J. Bacteriol. 180:5291-5298.
- van Vliet, A. H., Rock, J. D., Madeleine, L. N. y Ketley, J. M.** (2000) The iron-responsive regulator Fur of *Campylobacter jejuni* is expressed from two separate promoters. FEMS Microbiol. Lett. 188:115-118.
- Vasil, M. L., Ochsner, U. A.** (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. Mol. Microbiol. 34:399-413.
- Vasil, M. L., Ochsner, U. A., Johnson, Z., Colmer, J. A. y Hamood, A. N.** (1998) The Fur-regulated gene encoding the alternative sigma factor PvdS is required for iron-dependent expression of the LysR-type regulator PtxR in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 180:6784-6788.
- Vassinova, N. y Kozyrev, D.** (2000) A method for direct cloning of Fur-regulated genes: identification of seven new Fur-regulated loci in *Escherichia coli*. Microbiology 146:3171-3182.

- Venturi, V., Ottevanger, C., Bracke, M. y Weisbeek, P. J.** (1995) Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein. *Mol. Microbiol.* 15:1081-1093.
- Wyersman, C. y Stojiljkovic, I.** (2000) Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:215-220.
- Watnick, P. I., Eto, T., Takahashi, H. y Calderwood, S. B.** (1997) Purification of *Vibrio cholerae fur* and estimation of its intracellular abundance by antibody sywich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Bacteriol.* 179:243-247.
- Weinberg, E. D.** (1997) The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspect. Biol. Med.* 40:578-583.
- West, D., Reddin, K., Matheson, M., Heath, R., Funnell, S., Hudson, M., Robinson, A. y Gorringer, A.** (2001) Recombinant *Neisseria meningitidis* Transferrin Binding Protein A Protects against Experimental Meningococcal Infection. *Infect. Immun.* 69:1561-1567.
- Winkelmann, G** (1991) ed. CRC Hybook of Microbial Iron Chelates. Boca Raton, FL: CRC 366pp.
- Winkelmann, G. y Drechsel, H.** (1997) Microbial Siderophores. *Biotechnology*, ed. H. J. Rehm, G. Reed. 2nd edn, 7:199-246. Weinheim, Germany: Verlag Chem.
- Witte, A. y Lubitz, W.** (1989) Biochemical characterization of PhiX174 protein *E* mediated lysis of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 180:393-398.
- Witte, A., Bläsi, U., Halfmann, G., Szostak, M., Wanner, G. y Lubitz, W.** (1990 a) PhiX174 protein *E*-mediated lysis of *E. coli*. *Biochimie* 72:191-200.
- Witte, A., Bry, E., Schrot, G. y Lubitz, W.** (1993) Pathway of PhiX174 protein *E* mediated lysis of *Escherichia coli*. In: Pedro, M. A., Hölje, J. V., Löffelhard, W. editors. *Bacterial Growth and Lysis*. New York: Plenum Press p. 227-283.
- Witte, A., Wanner, G., Bläsi, U., Halfman, G., Szostak, M, y Lubitz, W.** (1990 b) Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by ΦX174 lysis protein *E*. *J. Bacteriol.* 172:4109-4114.
- Witte, A., Wanner, G., Lubitz, W. y Hölte, J. V.** (1998) Effect of PhiX174 *E*-mediated lysis on murein composition of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 164:149-157.

- Witte, A., Wanner, G., Sulzner, M. y Lubitz, W.** (1992) Dynamics of PhiX174 protein *E*-mediated lysis of *E. coli*. Arch. Microbiol. 157:381-388.
- Wooldridge, K. G. y Williams, P. H.** (1993) Iron uptake mechanism of pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12:325-348.
- Xiong, A. y Jayaswal, R. K.** (1998) Molecular characterization of a chromosomal determinant conferring resistance to zinc and cobalt ions in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 180:4024-4029.
- Yoon, K. P y Silver, S.** (1991) A second gene in the *Staphylococcus aureus cadA* cadmium resistance determinant of plasmid pI258. J. Bacteriol. 173:7636-7642.
- Yu, R. -H., Bonnah, R. A., Ainsworth, S. y Schryvers, A. B.** (1999) Analysis of the Immunological Responses to Transferrin and Lactoferrin Receptor Proteins from *Moraxella catarrhalis*. Infect. Immun. 67:3793-3799.
- Yurieva, O., Skangalis, M., Kuriyan, J. y O'Donnell, M.** (1997) *Thermus thermophilus dnaX* homolog encoding γ - and τ -like proteins of the chromosomal replicase. J. Biol. Chem. 272:27131-27139.
- Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T. M., Chiancone, E. y Chasteen, N. D.** (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. J. Biol Chem. 277:27689-27696.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D. y Storz, G.** (1999) OxyR and SoxRS regulation of *fur*. J. Bacteriol. 181:4639-4643.
- Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K.A., Schneider, T.D. y Storz, G.** (2001) Computation-directed identification of OxyR DNA binding sites in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 183:4571-4579.
- Zou, P., Borovok, I, Ortiz de Oroue Lucana. D., Müller, D. y Schrempf, H.** (1999) The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS. Microbiology 145:549-559.
- Zwicker, N., Theobald, U., Zähler, H. y Fiedler, H. -P.** (1997) Optimization of fermentation conditions for the production of the ethylene-diamine-disuccinic acid by *Amycolatopsis orientalis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19:280-285.

fur-independent regulation of the *Pasteurella multocida hbpA* gene encoding a haemin-binding protein

M. Elena Garrido,¹ Montserrat Bosch,¹ Ricardo Medina,^{1†} Anna Bigas,¹ Montserrat Llagostera,^{1,2} Ana M. Pérez de Rozas,² Ignacio Badiola² and Jordi Barbé^{1,2}

Correspondence
Jordi Barbé
jordi.barbe@uab.es
Ignacio Badiola
ignacio.badiola@irta.es

¹Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 – Barcelona, Spain

²Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (UAB-IRTA), Bellaterra, 08193 – Barcelona, Spain

Treatment of bacterial cultures with chelating agents such as 2,2'-dipyridyl (DPD) induces expression of iron-regulated genes. It is known that in the γ -*Proteobacteria*, the Fur protein is the major regulator of genes encoding haem- or haemoglobin-binding proteins. Electrophoretic analysis of outer-membrane proteins of the γ -proteobacterium *Pasteurella multocida* has revealed the induction of two proteins of 60 and 40 kDa in DPD-treated cultures in both wild-type and *fur*-defective strains. These two proteins have the same N-terminal amino acid sequence, which identifies this protein as the product of the PM0592 ORF. Analysis of the sequence of this ORF, which encodes a protein of 60 kDa, revealed the presence of a hexanucleotide (AAAAAA) at which a programmed translational frameshift can occur giving rise to a 40 kDa protein. Analyses conducted in *Escherichia coli*, using the complete PM0592 ORF and a derivative truncated at the hexanucleotide position, have shown that both polypeptides bind haemin. For this reason, the PM0592 ORF product has been designated HbpA (for haemin-binding protein). Expression studies using both RT-PCR and *lacZ* fusions, as well as electrophoretic profiles of outer-membrane protein composition, have demonstrated that the *hbpA* gene is negatively regulated by iron, manganese and haemin through a *fur*-independent pathway. Despite the fact that serum of mice infected with *P. multocida* contained antibodies that reacted with both the 60 and 40 kDa products of the *hbpA* gene, these proteins did not offer protection when used in immunization assays against this micro-organism.

Received 27 March 2003
Revised 8 May 2003
Accepted 12 May 2003

INTRODUCTION

Bacterial species have developed different strategies for iron uptake. Some of them (e.g. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) produce small molecules, known as siderophores, which are secreted from the cells and which can chelate iron present in the environment (Ratledge & Dover, 2000). Other bacteria have outer-membrane proteins which are specific receptors for iron-binding host molecules, such as transferrin, lactoferrin, haemoglobin or haem (Ratledge & Dover, 2000). After iron has been captured by these molecules, its transport into the bacterial cell requires the activity of the *exbB*, *exbD* and *tonB* gene products which supply the energy necessary for this process (Braun, 1995).

In bacteria, two families of global regulators involved in the control of genes whose products participate in several pathways of iron uptake have been described (Hantke, 2001). The Fur family has the Fur, PerR and Irr proteins as members, while the DtxR family includes the DtxR and IdeR proteins. Of these regulators, Fur seems to be present in all classes of proteobacteria (Radledge & Dover, 2000; Hantke, 2001). The *irr* gene has only been described so far in *Bradyrhizobium japonicum* (Hamza *et al.*, 1998), a member of the α -*Proteobacteria*, although in this organism the *fur* gene is also present (Hamza *et al.*, 1999). Likewise, the Fur protein has also been identified in some Gram-positive bacteria such as *Bacillus subtilis* (Bsat *et al.*, 1998). The rest of the regulatory proteins have so far only been described for Gram-positive bacteria (Hantke, 2001), with the exception of PerR, whose presence has been reported in *Campylobacter jejuni* (van Vliet *et al.*, 2002).

The Fur protein has been studied in several bacterial species,

[†]Present address: Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de las Villas, Carretera Camajuani, km 5, Villa Clara, Cuba.

Abbreviation: DPD, 2,2'-dipyridyl.

whereas much less information is available about the product of the *B. japonicum irr* gene. The Fur protein, which has a size of about 17 kDa, exhibits Fe²⁺-dependent DNA-binding activity (Escobar *et al.*, 1999). Genes under Fur control require the presence in their promoters of at least three contiguous NATA/TAT-like hexamers in either direct or inverse orientations to which this protein binds, repressing transcription, when the iron concentration is high (Escobar *et al.*, 1999). This sequence, known as the Fur box, is widespread in bacteria because it has been detected in the promoters of iron-regulated genes of several species belonging to families as diverse as the *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Neisseriaceae*, *Pasteurellaceae* and *Bacillaceae* (Hantke, 2001). Thus treatment of cultures of these organisms with iron-chelating agents like 2,2'-dipyridyl (DPD) induces expression of genes negatively regulated by the Fur protein. Nevertheless, it has also been demonstrated that Fur can act as a positive regulator, although the exact mechanism by which it stimulates gene expression has not been definitively established (Dubrac & Touati, 2000).

Pasteurella multocida is responsible for causing diseases in many species of mammals and birds, originating important economic losses in farms. The presence of several iron-binding proteins regulated by the Fur protein has been reported for this organism (Bosch *et al.*, 2001, 2002a, b). In this context, a *fur*-knockout mutant of *P. multocida* has been constructed in our laboratory (Bosch *et al.*, 2001). This mutant shows constitutive expression of high-molecular-mass proteins which have been associated with iron-uptake processes (Snipes *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 1991). We noted the presence of two proteins that are strongly induced in

DPD-treated cultures of *P. multocida*. In this work, we have shown that these two proteins are encoded by the same gene, *hbpA*, that both gene products bind haemin, and that expression of *hbpA* is regulated by iron in a Fur-independent manner.

METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Bacteria used in this study are listed in Table 1. *E. coli* strains were grown in LB medium (Sambrook *et al.*, 1989). *P. multocida* was grown in brain-heart infusion (BHI) or buffered peptone water (BPW) liquid medium and on sheep-blood agar (SBA) plates (Fernández de Henestrosa *et al.*, 1997). Unless otherwise indicated, the concentration of DPD, when used, was 150 µM. Antibiotic concentrations were as reported by Cardenas *et al.* (2001). In the Fur-titration assay (FURTA) (Stojiljkovic *et al.*, 1994), Lac-EMBO agar plates supplemented with 1 mM FeSO₄ (Miller, 1992) were used. β-Galactosidase activities were measured as previously reported (Jordan *et al.*, 1996).

DNA and RNA techniques. DNA methodology, including Southern blotting experiments, and DNA sequence analyses were as described by Cardenas *et al.* (2001). A 1970 bp DNA fragment of *P. multocida* chromosomal DNA including the *hbpA* gene and its surrounding region was isolated using the primers indicated in Table 2. The entire nucleotide sequence of this fragment was determined for both DNA strands by the dideoxy method on an ALF Sequencer (Pharmacia Biotech). Total cellular RNA extraction and competitive reverse transcriptase (RT)-PCR analyses were performed as reported by Jordan *et al.* (1996).

Genetic methods. To obtain the *hbpA-lacZ* fusion used in this work, a 339 bp DNA fragment containing 266 bp of the upstream region, as well as 73 bp of the coding sequence of the *hbpA* gene, was isolated by PCR amplification with the primers indicated in Table 2. This DNA fragment was then cloned into pUA949 which

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

Strain/plasmid	Relevant features	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5α	F'/supE4 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Clontech
H1717	aroB <i>fluF</i> ::lacMu53	Stojiljkovic <i>et al.</i> (1994)
<i>P. multocida</i>		
PM25	Wild-type	This laboratory
PM1002	As PM25, but Rif ^r	This laboratory
PM1056	As PM1002, but <i>fur</i> defective	Bosch <i>et al.</i> (2001)
Plasmids		
pGEM-T	PCR cloning vector, Ap ^r	Promega
pRK2013	<i>rep</i> (colE1), Mob ⁺ Tra ⁺ Km ^r	Ditta <i>et al.</i> (1985)
pHRP309	A broad-host-range cloning vector for transcriptional- <i>lacZ</i> fusion constructions, Gm ^r Mob ⁺	Parales <i>et al.</i> (1993)
pUA1034	As pHRP309 but carrying the <i>P. multocida hbpA</i> promoter	This work
pET22-b	Overexpression plasmid, Ap ^r	Stratagene
pUA1035	As pET22-b, but carrying the entire <i>hbpA</i> gene	This work
pUA1036	As pET22-b, but carrying the truncated <i>hbpA</i> gene	This work
pUA949	A pBSK derivative containing a Km ^r cassette	Tapias <i>et al.</i> (2003)

Table 2. Primers used in this work

Primer	Sequence*	Position	Application
Fhbpup	5'-GAATTCGCACTTTAGACTC-3'	-266†	Upper primer to obtain the promoter of the <i>hbpA</i> gene and the entire 1970 bp <i>hbpA</i> gene
Fhbprp	5'-GGATCCCTAAAGCTACTTG-3'	+73†	Lower primer to obtain the promoter of the <i>hbpA</i> gene
Hbpexpup	5'-CATATGAAGTTGACAACCAAAAC-3'	+1‡	Upper primer to obtain the entire and truncated encoding region of the <i>hbpA</i> gene
Hbpexprp1	5'-GCGGCCGCCTTTTATTAATCC-3'	+1704†	Lower primer to obtain the entire encoding region of the <i>hbpA</i> gene and the entire 1970 bp <i>hbpA</i> gene
Hbpexprp2	5'-GCGGCCGCCATCAATGATGATGG- CTTTATCGGTAGCATA-3'	+960†	Lower primer to obtain the truncated coding region of the <i>hbpA</i> gene
RThbpintup	5'-CCTTATCACGAGGTATCG-3'	+379†	Upper primer to detect the <i>hbpA</i> transcript
RThbpintrp	5'-GGCTAAGAGTTGTTTGGC-3'	+1080†	Lower primer to detect the <i>hbpA</i> transcript
RTrecAintup	5'-ATTGAGGATTCAACATGGC-3'	-15‡	Upper primer to detect the <i>recA</i> transcript
RTrecAintrp	5'-ATAATCCGCTTCTAAGCCCG-3'	+1057‡	Lower primer to detect the <i>recA</i> transcript
hbpintup	5'-CCTTATCACGAGGTATCG-3'	+379†	Upper primer to obtain the <i>hbpA</i> internal fragment used as a probe in Southern blot
hbpintrp	5'-AATTTGGCATAACGTGTCCC-3'	+759†	Lower primer to obtain the <i>hbpA</i> internal fragment used as a probe in Southern blot

*When present, added restriction sites are shown in italics.

†Position of the 5'-end of the oligonucleotide with respect to the translational starting point of the *P. multocida hbpA* gene.

‡Position of the 5'-end of the oligonucleotide with respect to the translational starting point of the *P. multocida recA* gene.

had been digested with *EcoRI* and *BamHI*. The plasmid obtained was then digested with *Sall* and *BamHI*, and the 2.6 kb fragment containing the *hbpA* promoter and a cassette encoding Km resistance was cloned upstream of the *lacZ* gene of the promoter-probe vector pHRP309, which had previously been digested with *Sall* and *BamHI*. Taking advantage of the fact that pHRP309 is a broad-host-range plasmid which is stable in *P. multocida* cells (Parales & Harwood, 1993), its derivative carrying the *hbpA-lacZ* fusion was introduced into this organism by triparental mating as reported by Bosch *et al.* (2002b) using the pRK2013 plasmid as the mobilizing system (Ditta *et al.*, 1985).

Protein and immunoblot analysis. Outer-membrane proteins from the *P. multocida* wild-type or *fur* strains were extracted from cultures grown under the desired conditions as described by Bosch *et al.* (2001). Briefly, cultures were centrifuged at 48 000 g and pellets were resuspended in 0.1 M acetate buffer/0.2 M lithium chloride at pH 5.8, incubated for 2 h at 45 °C in a shaking water-bath, and passed through a 21-gauge needle. These suspensions were then centrifuged at 10 000 g, and the pellets were discarded. Membrane fragments were obtained from the supernatant by centrifugation at 30 000 g for 2.5 h, and the pellet was resuspended in distilled water. The protein concentration of outer-membrane samples was determined by the Lowry method, and their profiles were examined by 12% PAGE in the presence of SDS (Laemmli, 1970).

To identify both the 60 and 40 kDa proteins, SDS-PAGE gels were electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad), and stained with Coomassie Brilliant Blue. Both proteins were then recovered from the membrane and their N-terminal amino acid sequences were determined by Edman degradation using Protein Sequencer 477A (Applied Biosystems).

The antigenicity of the 60 and 40 kDa proteins was determined by Western blot analysis. Crude extracts of *E. coli* BL21 cells over-expressing these proteins were subjected to SDS-PAGE. Gels were

transferred to Immobilon-P membranes (Millipore) using a Hoefer miniVe (Amersham Pharmacia Biotech) TransBlot Cell. Membranes were air-dried for 20 min and blocked for 2 h in blocking solution (10 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.4 g Block Reagent and 0.2 ml Tween 20 brought up to 200 ml H₂O). Transferred proteins were immunostained overnight with specific antiserum at a dilution of 1/100 in blocking solution. Following this, membranes were washed three times (10 min each) with PBS and incubated in a 1/30 000 dilution in blocking solution of anti-mouse IgG, Fc-specific (Sigma), for 1 h. Afterwards, the membranes were washed three times with PBS and reactive polypeptides were visualized in alkaline phosphate buffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 5 mM MnCl₂) containing 4-nitro blue tetrazolium chloride and X-phosphate-5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP, 4-toluidine salt), as recommended by the supplier (Roche Diagnostics). All procedures were carried out at room temperature.

Protection studies. Two groups of five female 3-week-old Swiss mice (obtained from Harlan Iberica; Barcelona, Spain) were injected intraperitoneally with either 3 µg HbpA protein recovered from polyacrylamide gels or 0.5 µg outer-membrane proteins from *P. multocida* wild-type cells. A third group of five mice was injected with PBS as the negative control. After 2 weeks, a second immunization was carried out. The challenge was made 3 weeks later by intraperitoneal inoculation of 100 × LD₅₀ of the *P. multocida* wild-type strain.

The number of animals which were alive 24, 48 and 72 h post-inoculation was recorded, and the virulence power was calculated as reported by Reed & Muench (1938). These animals were afterwards used to obtain serum for Western blot assays. To perform this, mice were bled from the vena cava and the blood was incubated at 37 °C for 2 h, and then kept overnight at 4 °C, to facilitate clot formation. Following this, the blood was centrifuged at 2000 g for 15 min and the serum was recovered and maintained at 4 °C.

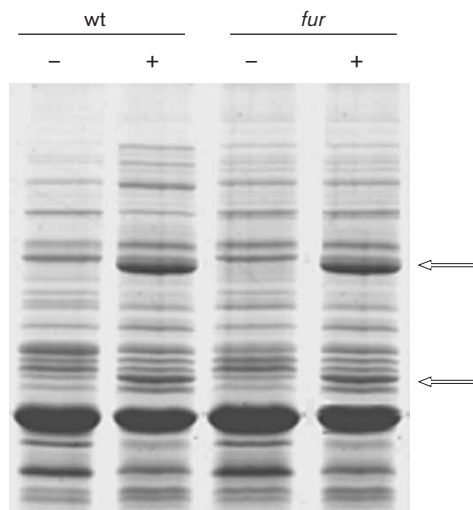


Fig. 1. SDS-PAGE profiles of outer-membrane proteins from wild-type (lanes 1 and 2) and *fur* (lanes 3 and 4) strains of *P. multocida* grown in the absence (lanes 1 and 3) or in the presence (lanes 2 and 4) of DPD at 150 μ M. White arrows indicate the 60 and 40 kDa proteins induced by DPD but not by the inactivation of the *fur* gene.

To eliminate the antibodies against *E. coli* that could be present in recovered serum, this was incubated overnight at 4 °C with a sediment of *E. coli* cells harbouring the pET22-b vector alone.

Haemin binding of *E. coli* cells expressing the *P. multocida* wild-type and truncated *hbpA* genes. Haemin binding was analysed as described by Genco *et al.* (1994). *E. coli* BL21(λ DE3) cells carrying the pUA1035 or pUA1036 plasmid containing the whole or the truncated *hbpA* gene, respectively, were grown in LB medium and harvested after IPTG (1 mM) addition. The cells were washed with PBS and adjusted to an OD₅₅₀ of 1.0, and 0.8 ml aliquots of the cell suspension in this buffer were mixed with 0.2 ml haemin to a concentration of 10 μ M. Samples were incubated at 37 °C for 1 h and centrifuged. Afterwards, the A₄₀₀ of the supernatant was measured. Haemin diluted in PBS was incubated under the same conditions as an appropriate control. The binding of haemin was determined by the decrease of the absorbance of the supernatant compared to that of control samples, which were set as being 100 %.

RESULTS

Two proteins induced in DPD-treated cells are products of the same gene whose expression is Fur-independent

Two proteins of approximately 60 and 40 kDa are induced in the presence of DPD in both *P. multocida* wild-type and *fur*-defective cells (Fig. 1). These proteins are located in the outer membrane of *P. multocida*. To identify these proteins, their N-terminal amino acid sequences were determined in order to clone their respective genes. Surprisingly, the N-terminus of both proteins was identical: SNKTFINVS RAP. A BLAST search of the GenBank database found total identity of this sequence with the N-terminus of the ORF PM0592 of the *P. multocida* genome. The gene encoding PM0592 is monocistronic, since its transcriptional direction is opposite to its two flanking ORFs, encoding a putative protein of unknown function and a ThrS-like protein (Fig. 2). A detailed analysis of the PM0592 gene sequence revealed a hexanucleotide (AAAAAA) beginning at position 943 (codon 315), with respect to its putative translational initiation codon (Fig. 2). It has been reported that the presence of polyA tracts can produce translational frameshifts, which can give rise to premature translational termination (Chandler & Fayet, 1993; Baranov *et al.*, 2002). It must be noted that either 14 or 40 bp downstream of the polyA tract (positions 957 and 983, respectively) there is an opal stop codon, which could be read if a translational frameshift of one or two bases occurred in this hexanucleotide sequence (Fig. 2). Furthermore, the size of these two prematurely terminated polypeptides is in accord with the truncated 40 kDa polypeptide of the PM0592 protein detected in Fig. 1. Another possibility could be that in the chromosome of the *P. multocida* PM25 strain there are both a complete and a truncated copy of the PM0592 gene. However, Southern blot analysis using a 381 bp internal fragment of PM0592 as a probe, which is 186 bp upstream of the AAAAAA hexanucleotide, demonstrated that *P. multocida* PM25 cells have only one copy of this gene (data not shown).

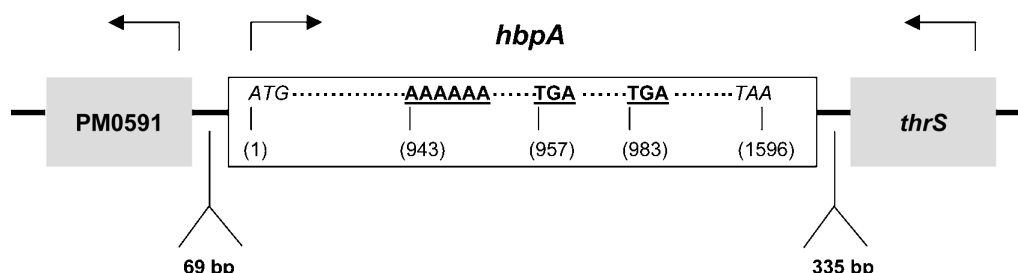


Fig. 2. Genetic organization of the *P. multocida* chromosome region containing the PM0592 ORF (*hbpA* gene). The distance between each of the three ORFs is shown in bp. Arrows indicate the transcriptional direction of each gene. The hexanucleotide at which a translational frameshift is predicted to occur, as well as the opal stop codons, are in bold and underlined. The translational initiation and termination codons of the *hbpA* gene are in italics.

Identical regulation of PM0592 in the wild-type and a *fur* mutant indicated that expression of the gene is Fur-independent. Indeed, upstream of the PM0592 gene no Fur-binding site could be detected. In further agreement with this fact, the PM0592 promoter was negative when analysed in a FURTA assay, which enables the detection of Fur-regulated promoters (data not shown).

Identification of PM0592 (HbpA) as a haemin-binding protein

The product of the PM0592 ORF includes the consensus amino acid sequence (D/E)TXXVXA(A/S) (where X is variable), which is characteristic of the TonB-dependent receptor proteins (Lundrigan & Kadner, 1986), which has been proposed to be a putative haemin-binding protein (May *et al.*, 2001). To confirm this possibility, a haemin-binding test was performed with *E. coli* cells carrying the pET22-b expression vector containing either the wild-type PM0592 gene or the PM0592 gene truncated at position 957 (Fig. 3). The results indicate that *E. coli* cells expressing either of these two proteins can bind haemin, whereas those that only carry the pET22-b vector can not (Fig. 3). For this reason, and since to our knowledge this is the first protein of *P. multocida* in which a haemin-binding activity has been experimentally demonstrated, the gene was redesignated *hbpA* (for haemin-binding protein).

Analysis of *hbpA* expression showed that synthesis of *hbpA* mRNA is induced in the presence of DPD as determined by competitive RT-PCR using the *P. multocida recA* mRNA as a control (Fig. 4) (Cardenas *et al.*, 2001). Therefore, the effect of DPD on *hbpA* expression occurs at the transcriptional level. It is also conceivable that the half-life of the *hbpA* mRNA could be increased by DPD treatment, as has been described for other genes (Rosner *et al.*, 2002).

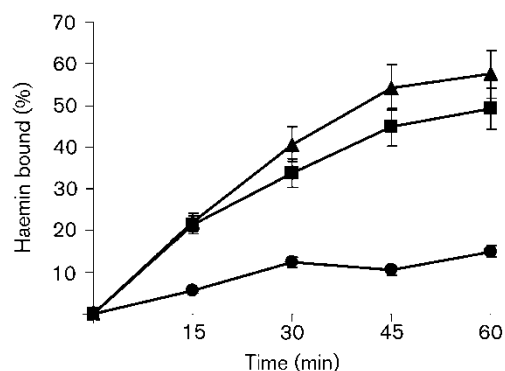


Fig. 3. Haemin binding to *E. coli* cells expressing either the whole HbpA protein (■) or its derivative truncated at the hexanucleotide AAAAAA located at nucleotide position 957 of the *hbpA* gene (▲). The percentage of haemin bound by *E. coli* BL21(λ DE3) cells carrying the pTE22-b expression vector alone is also shown as a control (●).

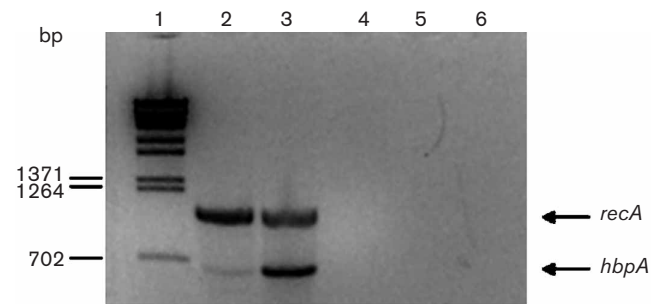


Fig. 4. Competitive RT-PCR analysis of *P. multocida hbpA* and *recA* gene expression in the absence (lane 2) or in the presence (lane 3) of 150 μ M DPD. Results obtained in PCR experiments without reverse transcriptase using RNA extractions from *P. multocida* cells grown in the same conditions are also shown as a control (lanes 4 and 5). The PCR mixture in the absence of RNA is presented as a control (lane 6). Lane 1 is λ -BstEII digested DNA used as the molecular size marker.

To establish which one of these two possibilities was responsible for the DPD-dependent induction of *hbpA* expression, a transcriptional fusion between the *hbpA* promoter region and the *lacZ* gene was constructed using the broad-host-range promoter-probe vector pHRP309 (Parales & Harwood, 1993). It can be seen that *hbpA* expression in *P. multocida* cells is increased not only by DPD, but also when other chelating agents such as EDTA or EGTA are used (Fig. 5). The results in Fig. 5 also indicate that addition of either Fe^{2+} or Mn^{2+} decreases expression of *hbpA* in DPD-treated *P. multocida* cells. However, the simultaneous presence of both cations recovers the basal expression of *hbpA*. In the same way, the addition of haemin decreases the basal level of *hbpA* promoter expression, as well as eliminates the stimulatory effect of the chelating agent (Fig. 5). The same results were obtained with the *fur* mutant (data not shown), confirming that the Fur protein does not participate in the control of *hbpA* gene expression. These findings also demonstrate that enhanced expression is not mediated by DPD, since other chelating agents also have the same effect. All of these data strongly suggest that the effect of DPD on *hbpA* expression is at the transcriptional level.

Results obtained with the *hbpA-lacZ* fusion were confirmed when the profile of the outer-membrane proteins was analysed (Fig. 6), since either the addition of both Fe^{2+} and Mn^{2+} or the addition of haemin abolished the production of the 60 and 40 kDa proteins in the DPD-treated cultures.

Analysis of the immunogenicity of the HbpA protein

Since HbpA is an outer-membrane protein inducible under iron- and haemin-starvation conditions, and these limitations are naturally found in the animal host, it was decided to study its antigenicity and its potential protective ability.

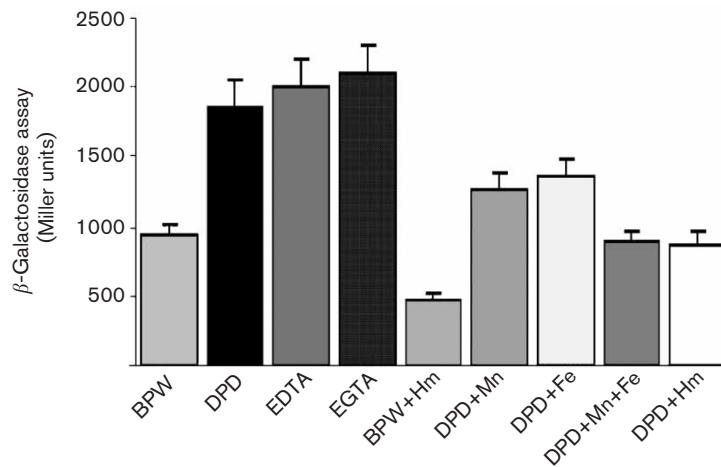


Fig. 5. Expression of the *hbpA-lacZ* fusion in wild-type cells of *P. multocida* growing under different conditions. Concentrations used for each compound were: DPD, 150 μ M; EDTA, 1 mM; EGTA, 5 mM; FeSO₄, 1 mM; MnCl₂, 1 mM; and haemin, 150 μ M.

Thus serum obtained from Swiss mice inoculated with *P. multocida* wild-type cells was used in Western blot analysis of *E. coli* cell extracts carrying plasmids pUA1035 and pUA1036 overexpressing the wild-type HbpA protein or its truncated 40 kDa derivative, respectively (Fig. 7a). The fact that in both cases there were immunoreactive bands

demonstrates that both proteins are immunogenic (Fig. 7b), as expected by their superficial localization. Nevertheless, when purified HbpA protein was inoculated into Swiss mice previous to a challenge treatment with wild-type *P. multocida* cells, no protective effect was obtained, contrary to what happens when a sample of whole outer-membrane proteins of this micro-organism is used in the immunization procedure (data not shown). This result suggests that either other haemin-binding proteins are present in *P. multocida* cells or blocking HbpA by antibodies is not sufficient to prevent the infective process of the mice cells. This is presumably because other iron receptors present in this bacterium are able to acquire the necessary amount of iron for survival (see below).

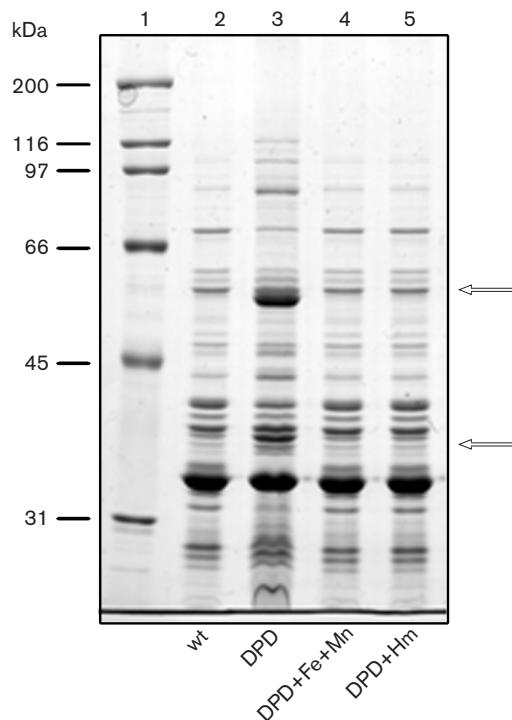


Fig. 6. SDS-PAGE profile of outer-membrane proteins from wild-type cells of *P. multocida* grown in the absence (lane 2) or in the presence of 150 μ M DPD (lane 3), DPD and Fe²⁺ (1 mM) and Mn²⁺ (1 mM) (lane 4) or DPD and haemin (150 μ M) (lane 5). White arrows indicate the 60 and 40 kDa proteins induced by DPD and repressed by either Fe²⁺, Mn²⁺ or haemin. The molecular mass markers and their values are shown in lane 1 and on the left side of the figure.

DISCUSSION

The presence of haem-binding systems negatively regulated by both iron and haem has been reported for many Gram-negative bacteria (Stojiljkovic & Hantke, 1992; Letoffe *et al.*, 1994; Mills & Payne, 1995; Thompson *et al.*, 1999; Ochsner *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 2001). In all of these cases, the iron-dependent control is mediated through the Fur protein. In the present work, it has been clearly established that the *P. multocida hbpA* gene, encoding a haemin-binding protein, is regulated by iron, manganese and haemin through a Fur-independent mechanism. To our knowledge, this is the first report of iron-mediated regulation of haem receptors where Fur is not involved.

The existence of Fur-independent iron-regulatory mechanisms has been demonstrated in a few Gram-negative bacterial species. Thus 2-D gel electrophoresis analysis of a *Yersinia pestis fur* strain revealed the presence of several unidentified proteins, either iron-repressible or -inducible (Staggs *et al.*, 1994). Likewise, a catalase and an alkyl hydroperoxide reductase (encoded by the *katA* and *ahpC* genes, respectively) are negatively regulated by iron in *C. jejuni fur* cells through the PerR protein (van Vliet *et al.*, 1998, 2002). Moreover, the *ptxR* gene of *Pseudomonas aeruginosa*, which encodes a regulator of exotoxin A

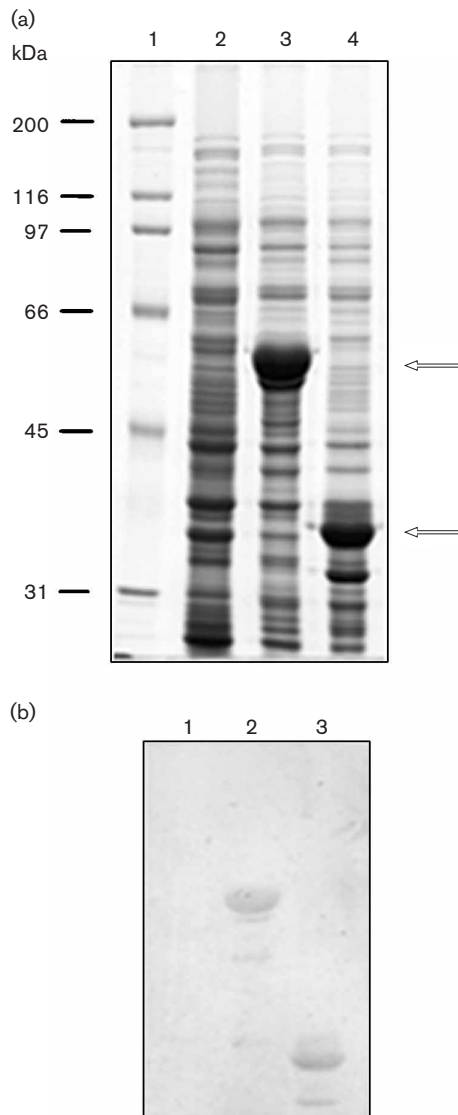


Fig. 7. (a) SDS-PAGE profile of crude extracts from *E. coli* BL21(Δ DE3) cells containing the pET22-b vector alone (lane 2) or overexpressing the wild-type HbpA protein (lane 3) or its derivative truncated at nucleotide position 957 (lane 4), which are indicated by white arrows. The molecular mass markers and their values are shown. (b) Immunoblot analysis with serum recovered from mice infected with *P. multocida* wild-type cells of crude extracts from *E. coli* cells containing the pET22-b vector alone (lane 1) or overexpressing the wild-type *hbpA* gene (lane 2) or its derivative truncated at nucleotide position 957 (lane 3).

production, seems to be under iron control through a *fur*-independent mechanism in cells growing under aerobic but not under microaerobic conditions (Vasil *et al.*, 1998). However, transcription of this *ptxR* gene requires the presence of an alternative sigma factor encoded by *pvdS*, which is directly regulated by Fur (Vasil *et al.*, 1998). In this way, it cannot be definitively confirmed that iron-mediated

control of *ptxR* is absolutely independent of the Fur protein. On the other hand, the iron regulation of the *Bradyrhizobium japonicum hemB* gene, whose product participates in the haem biosynthesis pathway, is not mediated by Fur, but rather by Irr (Hamza *et al.*, 2000). In fact, this is the only protein different from Fur for which a role in iron-regulated gene expression has been demonstrated. It must be noted that a TBLASTN search in the *P. multocida* genome sequence using the *B. japonicum* Irr protein as a query has not revealed the presence of any Irr-like protein. Therefore, an orthologue of this protein is not responsible for *hbpA* regulation in *P. multocida*.

Recently, a novel iron regulator, RirA, has been identified as controlling iron assimilatory gene function in *Rhizobium leguminosarum* (Todd *et al.*, 2002). No protein showing similarity to RirA has yet been identified in the genome of *P. multocida*.

An unexpected result obtained in this work is the negative effect that the presence of Mn^{2+} has on the transcription of the *P. multocida hbpA* gene. The importance of this cation in the virulence of *Salmonella typhimurium* has recently been demonstrated (Boyer *et al.*, 2002). This bacterial species has a Mn^{2+} -dependent gene network which is regulated by the product of the *mntR* gene (Patzner & Hantke, 2001). Nevertheless, a *mntR*-like gene does not seem to be present in *P. multocida*, as shown by TBLASTN analysis carried out by us. Therefore, the participation of Mn^{2+} in *P. multocida hbpA* control must be through an unknown regulatory protein different from MntR.

Furthermore, we have also found that a programmed translational frameshift modulates termination of *hbpA* mRNA translation *in vivo*. It has been proposed that these kinds of strategies are often used by pathogenic bacteria to allow escape from the host defence system (Dorman & Smith, 2001) or to adapt to variations in the supply and amount of various iron sources (Lewis *et al.*, 1997; Schryvers & Stojiljkovic, 1999). However, this seems unlikely to be the case with *P. multocida* HbpA, since both the wild-type and the truncated HbpA proteins bind haemin (Fig. 3) and are recognized by serum obtained from animals previously infected with this organism (Fig. 7b).

Moreover, it should be noted that use of the HbpA haemin-binding protein in immunization assays is not able to protect mice against a challenge with virulent *P. multocida* cells. These data are in agreement with the existence in *P. multocida* of several putative haem- or haemoglobin-binding proteins (May *et al.*, 2001). In accord with this prediction, PM0040, PM0236, PM0741, PM1081, PM1282 and PM1428 ORFs from *P. multocida* have been cloned in our laboratory, and, after overexpression in *E. coli*, we have found that all of them bind haem *in vitro* (unpublished observations). Finally, from the perspective of using iron-binding proteins for vaccination, our data on HbpA suggest that strategies other than the inoculation of a single type of protein should be used in those bacteria

which, like *P. multocida*, present more than one kind of receptor.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by grants BIO99-0779 and RTA03-065 of the Ministerio de Ciencia y Tecnología de España and 2001SGR-206 of the Comissionat per Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya. M. E. G. and A. B. were recipients of a predoctoral fellowship from the Direcció General d'Universitats de la Generalitat de Catalunya and R. M. was the recipient of a predoctoral fellowship from the AEI of the Ministerio Español de Asuntos Exteriores. We are deeply indebted to Joan Ruiz and Dra. Pilar Cortés for their excellent technical assistance and to our English-teaching university colleague, Mr Chuck Simmons, for his help in the language revision and correction of this article.

REFERENCES

- Baranov, P. V., Gesteland, R. F. & Atkins, J. F. (2002). Recoding: translational bifurcations in gene expression. *Gene* **286**, 187–201.
- Bosch, M., Tarragó, R., Garrido, E., Campoy, S., Fernández de Henestrosa, A. R., Pérez de Rozas, A. M., Badiola, I. & Barbé, J. (2001). Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol Lett* **203**, 35–40.
- Bosch, M., Garrido, E., Llagostera, M., Pérez de Rozas, A. M., Badiola, I. & Barbé, J. (2002a). *Pasteurella multocida* *exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiol Lett* **210**, 201–208.
- Bosch, M., Garrido, E., Llagostera, M., Pérez de Rozas, A. M., Badiola, I. & Barbé, J. (2002b). Characterization of the *Pasteurella multocida hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infect Immun* **70**, 5955–5964.
- Boyer, E., Bergevin, I., Malo, D., Gros, P. & Cellier, M. F. (2002). Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **70**, 6032–6042.
- Braun, V. (1995). Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev* **16**, 295–307.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martínez, L., Setlow, P. & Heimann, J. D. (1998). *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29**, 189–198.
- Cardenas, M., Fernández de Henestrosa, A. R., Campoy, S., Perez de Rozas, A., Barbé, J., Badiola, I. & Llagostera, M. (2001). Virulence of *Pasteurella multocida* *recA* mutants. *Vet Microbiol* **80**, 53–61.
- Chandler, M. & Fayet, O. (1993). Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Mol Microbiol* **7**, 497–503.
- Choi, K. K., Maheswaran, S. K., Felice, L. J. & Molitor, T. W. (1991). Relationship between the iron regulated outer membrane proteins of *in vivo* grown *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* **28**, 75–92.
- Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X. W., Finlay, D. R., Guiney, D. & Helinski, D. R. (1985). Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**, 149–153.
- Dorman, C. J. & Smith, S. G. (2001). Regulation of virulence gene expression in bacterial pathogenesis. In *Principles of Bacterial Pathogenesis*, pp. 75–132. Edited by E. A. Groisman. New York: Academic Press.
- Dubrac, S. & Touati, D. (2000). Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* **182**, 3802–3808.
- Escolar, L., Martín, J. P. & de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**, 6223–6229.
- Fernandez de Henestrosa, A. R., Badiola, I., Saco, M., Perez de Rozas, A. M., Campoy, S. & Barbé, J. (1997). Importance of the *galE* gene on the virulence of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol Lett* **154**, 311–316.
- Genco, C. A., Odusanya, B. M. & Brown, G. (1994). Binding and accumulation of hemin in *Porphyromonas gingivalis* are induced by hemin. *Infect Immun* **62**, 2885–2892.
- Hamza, I., Chauhan, S., Hassett, R. & O'Brian, M. R. (1998). The bacterial Irr protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability. *J Biol Chem* **273**, 21669–21674.
- Hamza, I., Hassett, R. & O'Brian, M. R. (1999). Identification of a functional *fur* gene in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **181**, 5843–5846.
- Hamza, I., Qi, Z., King, N. D. & O'Brian, M. R. (2000). Fur-independent regulation of iron metabolism by Irr in *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology* **146**, 669–676.
- Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 172–177.
- Henderson, D. P., Wyckoff, E. E., Rashidi, C. E., Verlei, H. & Oldham, A. L. (2001). Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. *J Bacteriol* **183**, 2715–2723.
- Jordan, A., Aragall, E., Gibert, I. & Barbé, J. (1996). Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* *nrdeF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol Microbiol* **19**, 777–790.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Letoffe, S., Ghigo, J. M. & Wandersman, C. (1994). Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9876–9880.
- Lewis, L. A., Gray, E., Wang, Y. P., Roe, B. A. & Dyer, D. W. (1997). Molecular characterization of *hpuAB*, the haemoglobin-haptoglobin utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **23**, 737–749.
- Lundrigan, M. D. & Kadner, R. J. (1986). Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB. *J Biol Chem* **261**, 10797–10801.
- May, B. J., Zhang, Q., Li, L. L., Paustian, M. L., Whittam, T. S. & Kapur, V. (2001). Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3460–3465.
- Miller, J. H. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mills, M. & Payne, S. M. (1995). Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **177**, 3004–3009.
- Ochsner, U. A., Johnson, Z. & Vasil, M. L. (2000). Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**, 185–198.
- Parales, R. E. & Harwood, C. S. (1993). Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for Gram-negative bacteria. *Gene* **133**, 23–30.
- Patzer, S. I. & Hantke, K. (2001). Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 4806–4813.

- Ratledge, C. & Dover, L. G. (2000).** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 881–941.
- Reed, L. J. & Muench, H. (1938).** A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* **27**, 493–497.
- Rosner, J. L., Dangi, B., Gronenborn, A. M. & Martín, R. G. (2002).** Posttranscriptional activation of the transcriptional activator rob by dipyrrolyl in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 1407–1416.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schryvers, A. & Stojiljkovic, I. (1999).** Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **32**, 1117–1123.
- Snipes, K. P., Hansen, L. M. & Hirsch, D. C. (1988).** Plasma and iron-regulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by *Pasteurella multocida*. *Am J Vet Res* **49**, 1336–1338.
- Staggs, T. M., Fetherston, J. D. & Perry, R. D. (1994).** Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis fur* mutation. *J Bacteriol* **176**, 7614–7624.
- Stojiljkovic, I. & Hantke, K. (1992).** Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J* **11**, 4359–4367.
- Stojiljkovic, I., Baumler, A. & Hantke, K. (1994).** Fur regulation in Gram-negative bacteria: identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J Mol Biol* **236**, 531–545.
- Tapias, A., Fernández, S., Alonso, J. C. & Barbé, J. (2002).** *Rhodobacter sphaeroides* LexA has dual activity: optimising and repressing *recA* gene transcription. *Nucleic Acids Res* **30**, 1539–1546.
- Thompson, J. M., Jones, H. A. & Perry, R. D. (1999).** Molecular characterization of the hemin uptake locus (*hmu*) from *Yersinia pestis* and analysis of *hmu* mutants for hemin and hemoprotein utilization. *Infect Immun* **67**, 3879–3892.
- Todd, J. D., Wexler, M., Sawers, G., Yeoman, K. H., Poole, P. S. & Johnston, A. W. B. (2002).** RirA, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* **148**, 4059–4071.
- van Vliet, A. H. M., Wooldridge, K. G. & Ketley, J. M. (1998).** Iron-responsive gene regulation in a *Campylobacter jejuni fur* mutant. *J Bacteriol* **180**, 5291–5298.
- van Vliet, A. H. M., Ketley, J. M., Park, S. F. & Penn, C. W. (2002).** The role of iron in *Campylobacter* gene regulation, metabolism and oxidative stress defense. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 173–186.
- Vasil, M. L., Ochsner, U. A., Johnson, Z., Colmer, J. A. & Hamood, A. N. (1998).** The Fur-regulated gene encoding the alternative sigma factor PvdS is required for iron-dependent expression of the LysR-type regulator PtxR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**, 6784–6788.

The high-affinity zinc-uptake system *znuACB* is under control of the iron-uptake regulator (*fur*) gene in the animal pathogen *Pasteurella multocida*

M. Elena Garrido ^a, Montserrat Bosch ^a, Ricardo Medina ^{a,1}, Montserrat Llagostera ^{a,b}, Ana M. Pérez de Rozas ^b, Ignacio Badiola ^{b,*}, Jordi Barbé ^{a,b,**}

^a Department of Genetics and Microbiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

^b Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (UAB-IRTA), Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

Received 6 December 2002; received in revised form 11 February 2003; accepted 11 February 2003

First published online 7 March 2003

Abstract

The *Pasteurella multocida znuACB* genes encoding a high-affinity zinc-uptake system have been identified and cloned. In contrast to what happens in *Escherichia coli*, *znuA* is not physically linked to *znuCB*. Through *lacZ* transcriptional fusions it has been demonstrated that zinc negatively regulates both *znuA* and *znuCB* operons. Nevertheless, and contrary to that determined so far for all other *znuACB* bacterial systems known, *P. multocida znuACB* genes are not under control of the *zur* gene, which is absent in this bacterial species, but rather are under its iron-uptake regulator (*fur*) gene. Furthermore, construction of defective mutants has demonstrated that *P. multocida znuA* and *znuCB* transcriptional units are required for virulence of this organism in a mouse model.

© 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Zinc uptake; *znuACB* genes; *fur* regulation; *Pasteurella multocida*

1. Introduction

Iron and zinc are required by many bacterial proteins as either structural or catalytic cofactors [1]. Nevertheless, the intracellular concentration of both elements must be controlled because high levels may be dangerous for the bacterial cell. Moreover, free concentration of both elements in body fluids of mammals is very low in order to prevent bacterial cell proliferation. Iron uptake in bacteria is negatively regulated by the product of the *fur* gene, an approximately 17-kDa protein harbouring Fe²⁺-dependent DNA-binding activity [2]. For Fur-Fe²⁺ to bind DNA, the presence in the gene promoter of at least three contiguous NATA/TAT-like hexamers in either direct or inverse ori-

entation is required [2]. This motif, called the Fur box, is widespread in bacteria since it is present upstream of iron-regulated genes of bacterial species belonging to families as different as Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Neisseriaceae and Bacillaceae [1].

Escherichia coli cells present two independent systems to zinc uptake encoding *znuABC* and *pitA* genes, respectively [3,4]. The *pitA*-dependent one is a low-affinity constitutive system [3]. Moreover, *znuABC* genes encode a high-affinity inducible system negatively regulated by the product of the *zur* gene [4,5]. *E. coli znuA* and *znuCB* operons (encoding a periplasmic-binding protein, an ATPase and an integral-membrane protein, respectively) are divergently oriented, and their respective transcriptional starting points are separated by 24 bp [4]. The product of the *zur* gene, a 19-kDa-size protein, belongs to the Fur family of metalloregulatory proteins and, in the presence of Zn²⁺, forms a dimer which binds to a nearly perfect palindrome found in the intergenic region between the *znuA* and *znuCB* operons, repressing expression of both transcriptional units [4]. Similar *znuABC* systems seem to be present in other bacterial species such as *Bacillus subtilis*, *Staphylo-*

* Corresponding author. Tel.: +34 (93) 223 4709.

** Also corresponding author. Tel.: +34 (93) 581 1837.

E-mail addresses: ignacio.badiola@irta.es (I. Badiola), jordi.barbe@uab.es (J. Barbé).

¹ Present address: Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de las Villas, Carretera Camajuaní, km 5, Villa Clara, Cuba.

coccus aureus, *Neisseria gonorrhoeae* and all members of the *Enterobacteriaceae* family [1,5–7].

Pasteurella multocida is a Gram-negative bacterium belonging, as does *E. coli*, to the Gamma Class of the Proteobacteria, which is responsible for important economic losses because it is able to develop severe infectious processes in a wide variety of animals. The presence of a functional *fur* gene able to control iron uptake has already been reported in *P. multocida* [8]. However, in this organism nothing is known about the mechanisms of uptake of metals other than iron, as well as about the putative importance of them in the infective process. For this reason, in this work the *P. multocida znuABC* genes have been cloned, and their regulation as well as their role in virulence have been analysed.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Bacteria used are listed in Table 1. *E. coli* and *Salmonella typhimurium* strains were grown in LB medium [9]. *P. multocida* cultures were performed in either buffered peptone water (BPW) or brain-heart infusion (BHI) liquid media and on BHI or sheep-blood agar (SBA) plates. Antibiotic concentrations were as described [8]. For the Fur-titration assay (FURTA), 1 mM FeSO₄-supple-

mented-Lac EMBO agar plates [10] were used. In this assay, the presence of a Fur-binding sequence in a given DNA fragment may be determined because H1717 cells containing a plasmid carrying this fragment form red colonies when growing in Lac EMBO plates [10].

2.2. DNA methods, RNA techniques, genetic procedures and virulence assays

DNA methodology and sequencing were as described [8]. Oligonucleotide primers used are listed in Table 2. Total cellular-RNA extraction and reverse transcriptase (RT)-PCR analysis were as reported [11].

P. multocida mutants were obtained by insertional mutagenesis following the strategy previously described [8]. Briefly, an internal fragment of the gene to be inactivated was inserted into the pUA826 suicide plasmid, which is unable to replicate in host strains lacking the R6K-specified product of the *pir* gene. Afterwards, pUA826 derivatives harbouring these internal *P. multocida* gene fragments were introduced by triparental mating from *E. coli* MC1061 λ pir into *P. multocida* wild-type cells, and streptomycin-resistant exconjugants were selected. The presence of the desired mutation in these clones was confirmed by PCR analysis with appropriate primers (Table 2).

To obtain *znuA* and *znuCB-lacZ* fusions, DNA fragments containing the upstream region, as well as an encod-

Table 1
Bacterial strains and plasmids used in this work

	Relevant features	Source or reference
Organism		
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁺ /supE4 Δ lacUI69 (Φ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Clontech
MC1061 (λ pir)	hsdR mcrB araD139 Δ (araABC-leu)7679 Δ lacX74 gall galK rpsL thi lysogenized with λ pir bacteriophage	this laboratory
H1717	aroB flhF::lacMu53	[10]
<i>P. multocida</i>		
PM25	wild-type	this laboratory
PM1002	as PM25, but Rif ^r Spc ^r	this laboratory
PM1056	as PM1002, but <i>fur</i> defective	[8]
PM1081	as PM1002, but <i>znuC</i> ::pUA976	This work
PM1082	as PM1002, but <i>znuA</i> ::pUA977	this work
<i>S. typhimurium</i>		
UA1770	<i>S. typhimurium</i> ATCC 1428 but Rif ^r	this laboratory
UA1776	<i>S. typhimurium</i> ATCC 1428 but zur Ω Cm	this laboratory
UA1779	<i>S. typhimurium</i> ATCC 1428 but fur Ω Cm	this laboratory
Plasmids		
pGEM-T	PCR cloning vector, Ap ^r	Promega
pRK2013	rep (colE1), Mob ⁺ Tra ⁺ Km ^r	D.R. Helinski
pHRP309	a broad-host-range cloning vector for transcriptional- <i>lacZ</i> fusion constructions, Gm ^r Mob ⁺	C.S. Harwood
pUA826	Mob ⁺ , R6K replicon, Ap ^r , Str ^r , Spc ^r	[8]
pUA974	as pHRP309 but carrying the <i>P. multocida znuCB</i> operon	this work
pUA975	as pHRP309 but carrying the <i>P. multocida znuA</i> gene	this work
pUA976	as pUA826 but carrying a 409-bp internal fragment of the <i>P. multocida znuC</i> gene	this work
pUA977	as pUA826 but carrying a 453-bp internal fragment of the <i>P. multocida znuA</i> gene	this work
pUA978	as pHRP309 but carrying a fusion between the <i>P. multocida znuC</i> promoter and the <i>lacZ</i> gene	this work
pUA979	as pHRP309 but carrying a fusion between the <i>P. multocida znuA</i> promoter and the <i>lacZ</i> gene	this work
pUA928	as pHRP309 but carrying a fusion between the <i>S. typhimurium znuC</i> promoter and the <i>lacZ</i> gene	this laboratory

ing portion of the desired gene, were isolated by PCR amplification with primers indicated in Table 2. These fragments were directionally inserted upstream of the *lacZ* gene of the pHRP309 promoter–probe vector, which had been previously digested with *Bam*HI and *Sal*I. Since pHRP309 is stable in *P. multocida* cells [8], their derivatives carrying *lacZ* fusions were introduced into this organism by triparental mating as described [8].

Female Swiss mice (3–8 weeks old), obtained from Harlan Iberica, Inc. (Barcelona, Spain) and housed under specific-pathogen-free conditions, were used for virulence studies. The 50% lethal dose (LD₅₀) was determined in triplicate as reported earlier [8]. Basically, groups of three mice were intraperitoneally injected with 0.1 ml of serial 10-fold dilutions of bacteria in BPW. The number of surviving animals at 24 h, 48 h and 72 h post-inoculation was recorded and the value of the LD₅₀ was calculated as published [8].

3. Results and discussion

3.1. Isolation of *P. multocida znuA* and *znuCB* transcriptional units

To clone its *znuACB* genes, TBLASTN analyses were performed on the *P. multocida* sequence genome database [12] using their homologous genes from *E. coli* as a probe. Results obtained revealed the presence in the *P. multocida* genome of two independent open-reading frames (PM0926 and PM0242) whose encoded products showed a similarity of 66% and 73% to those of *E. coli znuA* and *znuC* genes, respectively. The deduced protein sequence of *P. multocida*

PM0926 included the extended region rich in histidine, aspartate and glutamate residues which has been proposed to bind Zn²⁺ or to deliver it to other proteins [13]. This region is just upstream of the HXW motif, which is found at position 200 in PM0926. Only unambiguous Zn²⁺-binding proteins contain the H-, D- and E-rich structure immediately above this HXW motif [13].

It is worth noting that contrary to what happens in *E. coli*, *znuA* and *znuC* are not physically linked in *P. multocida*, but rather they are separated by about 820 kb (Fig. 1A). Moreover, downstream of the *P. multocida znuC*, another open-reading frame (PM0241) showing a similarity of 69% to the *E. coli znuB* is present. As happens in *E. coli*, *P. multocida znuC* and *znuB* genes constitute a single transcriptional unit, as demonstrated when a RT-PCR analysis was carried out (Fig. 1B). *P. multocida znuA* and *znuCB* operons were cloned by PCR amplification using primers indicated in Fig. 1A, and amplicons obtained were cloned in pGEM-T, transformed into *E. coli* DH5 α and sequenced to confirm the presence of the desired gene.

3.2. Analysis of *znuA* and *znuCB* expression

Despite the presence of *znuA* and *znuCB* genes in *P. multocida*, we were unable to detect an orthologue of the *E. coli zur* gene in this organism when a TBLASTN analysis was performed using this gene as a probe. This fact could have two different explanations: (i) expression of *P. multocida znuACB* genes is constitutive, or (ii) *P. multocida znuACB* genes are under control of another gene different from *zur*. To test both possibilities, we decided to construct transcriptional fusions of *P. multocida*

Table 2
Primers used in this work

Primer	Sequence ^a	Position	Application
ZnuCrp	5'-GCTTTATGCTAGATTAATGC-3'	+1679 ^b	Lower primer to obtain a 1968-bp fragment containing the <i>P. multocida znuCB</i> gene
SalIznuC	5'-GTCGACACAACGAGAACG-3'	-289 ^b	Upper primer to obtain a 1968-bp fragment containing the <i>P. multocida znuC</i> gene. Also used as upper primer to obtain the promoter of the <i>znuC</i> gene
BamHIznuC	5'-GGATCCGATCGAATTGGG-3'	+114 ^b	Lower primer to obtain the promoter of the <i>znuC</i> gene
ZnuCintup	5'-GTCGGTCCTAATGGTGGCGG-3'	+124 ^b	Upper primer to obtain the 470-bp internal fragment of the <i>P. multocida znuC</i> gene. Also used to detect <i>znuCB</i> transcript
ZnuCintrp	5'-AGCCTTCATTGGTATCTGCC-3'	+593 ^b	Lower primer to obtain the 470-bp internal fragment of the <i>P. multocida znuC</i> gene
ZnuC2rp	5'-TTGAGATTGGAAATCTGACG-3'	+771 ^b	Lower primer used to confirm the disruption of the <i>P. multocida znuC</i> gene
ZnuBrp	5'-GCCATACCATAGGATGGCG-3'	+1020 ^b	Lower primer to detect the <i>znuCB</i> transcript by RT-PCR
ZnuArp	5'-AAAGGGCTTCCAACAGAAG-3'	+1153 ^c	Lower primer to obtain a 1396-bp fragment containing the <i>P. multocida znuA</i> gene
SalIznuA	5'-GTCGAGATGAACTGTGCC-3'	-243 ^c	Upper to obtain a 1396-bp fragment containing the <i>P. multocida znuA</i> gene. Also used to confirm the disruption of the <i>P. multocida znuA</i> gene and to obtain the promoter of the <i>znuA</i> gene
BamHIznuA	5'-GGATCCTTACCCCATCAG-3'	+140 ^c	Lower primer to obtain the promoter of the <i>znuA</i> gene
ZnuAintup	5'-CGGGGAAGACATTGATGC-3'	+244 ^c	Upper primer to obtain the 522-bp internal fragment of the <i>P. multocida znuA</i> gene
ZnuAintrp	5'-AACTGGTGCAGTTGCTG-3'	+765 ^c	Lower primer to obtain the 522-bp internal fragment of the <i>P. multocida znuA</i> gene
Aad	5'-CGGCGATCACCGCTTCCC-3'	+2 ^d	Primer to confirm the disruption of the <i>P. multocida znuC</i> and <i>znuA</i> genes by insertion of the pUA976 and pUA977 plasmids, respectively

^aWhen present, added restriction sites are shown in italics.

^bPosition of the 5'-end of the oligonucleotide with respect the translational starting point of the *P. multocida znuC* gene.

^cPosition of the 5'-end of the oligonucleotide with respect the translational starting point of the *P. multocida znuA* gene.

^dPosition of the 5'-end of the oligonucleotide with respect the translational starting point of the pUA976 *aad* gene.

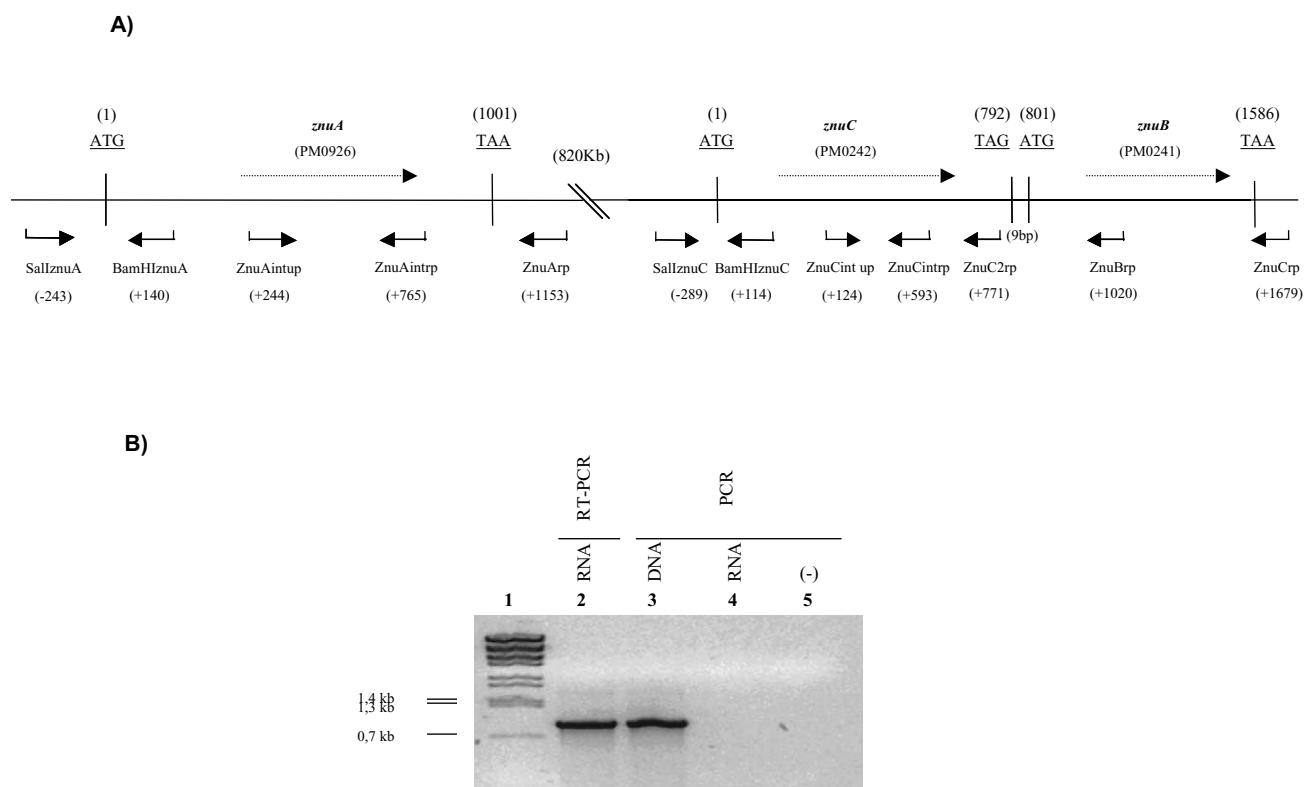


Fig. 1. A: Structural arrangement of *P. multocida* *znuA*, *znuB* and *znuC* genes. The translational starting and stop codons of each gene are underlined. The positions of all oligonucleotide primers used in this work are indicated by arrows. Numerical positions refer to either the *znuA* or the *znuC* translational starting codons. Dotted arrows indicate the transcriptional direction of each gene. B: RT-PCR analysis of transcripts of the *znuCB* operon in *P. multocida* cells using ZnuCintup and ZnuBrp primers in the presence of total RNA (lane 2). Results obtained when the PCR experiment is carried out with the same primers, but without RT, using either DNA (lane 3), RNA (lane 4) or lacking both DNA and RNA (lane 5) are shown as controls. Lane 1 is *Bst*EII digested- λ DNA used as molecular size marker.

znuA and *znuCB* genes with the *E. coli lacZ* gene to analyse their expression in different culture conditions. To carry out this study, promoters of *znuA* and *znuCB* were obtained with appropriate primers (Fig. 1A) and directionally inserted upstream of the *lacZ* gene of the pHRP309 plasmid. Afterwards, these pHRP309 derivatives containing the transcriptional fusions were introduced into *P. multocida* cells. Fig. 2A indicates how the expression of the *P. multocida znuCB* promoter is triggered in the presence of the chelating agent 2,2'-dipyridyl (DP). Moreover, and as expected, the addition of ZnCl₂ to the DP-treated cultures restored the transcriptional basal level of the *znuCB* promoter (Fig. 2A). Nevertheless, and surprisingly, addition of FeSO₄ gave rise to a decrease in the expression of the *znuCB* promoter in cells growing in the presence of DP. This effect of the Fe²⁺ led us to test if the *fur* gene had any effect in *znuC* expression. To do that, the pHRP309 plasmid derivative containing the *znuCB-lacZ* fusion was introduced into the *P. multocida fur* mutant PM1056 [8]. Data obtained analysing the basal expression of this fusion in this strain clearly indicate that the *znuCB* promoter is absolutely unregulated in *fur*-defective cells growing in the presence of Zn²⁺ (Fig. 2A). It must be noted that the behaviour of the *znuA-lacZ* transcriptional fusion was the same as that reported by the *znuCB-lacZ*

one (Fig. 2A). Moreover, and supporting the above data, the basal expression level of the *P. multocida znuCB-lacZ* fusion was the same in both *S. typhimurium* wild-type and *zur* cells, but it was dramatically increased in a *fur*-defective mutant of this bacterial species (Fig. 2B). In agreement with these results, plasmids harbouring either *znuA* or *znuCB* promoters were positive when analysed by the FURTA plate assay, which is used to identify *fur*-regulated promoters [10]. Differences existing between basal-level expression of *znuA-lacZ* and *znuCB-lacZ* fusions in both bacteria should be attributed to the fact that affinity of the *S. typhimurium* Fur protein by *P. multocida znuA* and *znuC* operators must be lower than that of the *P. multocida* Fur protein. In fact, G+C content of *S. typhimurium* and *P. multocida* chromosomes is significantly different: 50% and 40%, respectively. Then, and despite both organisms belonging to the same phylogenetic class, slight variations in the composition of gene-expression regulatory sequences must be expected.

It has been described that *E. coli* Fur protein can bind Zn²⁺ in vitro [14]. Nevertheless, it had so far not been demonstrated that this protein was able to directly regulate zinc uptake in bacteria. So, *E. coli* and *S. typhimurium fur* mutants did not present any alteration in the expression of the *znuACB* system [4,15]. Likewise, *B. subtilis* Fur

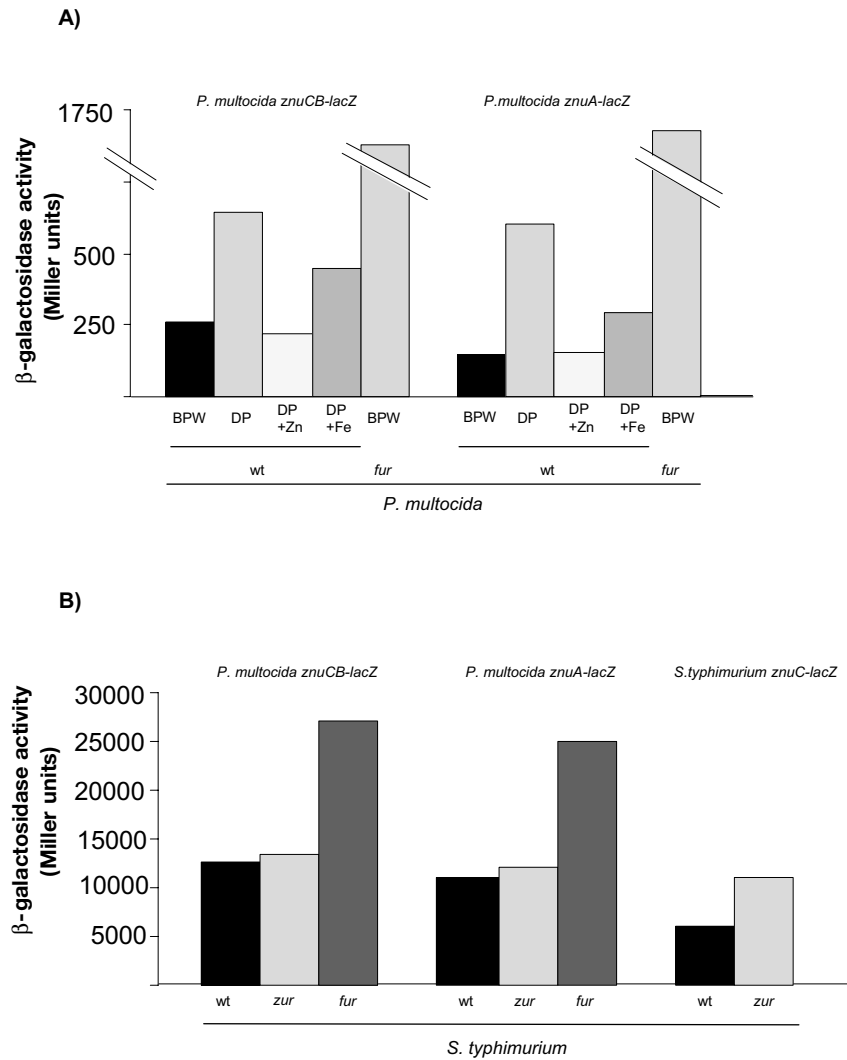


Fig. 2. A: Expression of *znuA*- and *znuCB*-lacZ fusions in both wild-type (wt) and *fur* strains of *P. multocida* growing in BPW in the absence or in the presence of DP alone or either with ZnCl₂ (1 mM) or FeSO₄ (1 mM). B: Expression of *znuA*- and *znuCB*-lacZ fusions of *P. multocida* in wild-type (wt), *zur* and *fur* strains of *S. typhimurium* growing in LB medium. The behaviour of a *S. typhimurium* *znuC*-lacZ fusion in both wild-type (wt) and *zur* strains of this organism is also shown as a control of the experiment. In all cases, β -Galactosidase activities are the means of three independent assays. Values were reproducible to within an error of $\pm 10\%$.

protein is not involved in the control of its zinc-uptake system [5]. However, it is worth noting that these three bacterial species, like many other bacterial species belonging either to Gram-positive or Gamma Proteobacteria domains, present both *fur* and *zur* genes [5–7]. On the other hand, and as revealed by the TBLASTN analysis carried out during this study in their genomic data bases (<http://igweb.integratedgenomics.com/GOLD/prokaryagenomes.html>), all members of the Pasteurellaceae family (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus actinomyces-temcomitans*, *Haemophilus ducreyi* and *Haemophilus influenzae*) whose genome has been or is being sequenced do not have an orthologue of the *zur* gene although they present both the *znuACB* system and the *fur* gene. Thus, it is likely to believe that the ancestor of the Pasteurellaceae family in a given moment of its evolutionary history lost the *zur* gene, whereas its *znuACB* system evolved to be

under *fur* control to achieve, in this way, a mechanism which enabled it to maintain zinc homeostasis.

3.3. Virulence power of *P. multocida* *znuA* and *znuCB* mutants

Few data exist about the importance of the zinc-uptake system in bacterial virulence. In fact, it has only been reported that *H. ducreyi* *znuA* and *S. typhimurium* *znuC* mutants are less virulent than their wild-type strains [15,16]. Because of this lack of information, we decided to construct *P. multocida* strains deficient in either *znuA* or *znuCB* genes to analyse their virulence. *P. multocida* *znuA* or *znuCB* mutants were obtained by the insertion in the wild-type strain of a pUA826 derivative containing either a 522-bp or a 470-bp size fragment corresponding to an internal region of *znuA* or *znuC* genes, respectively.

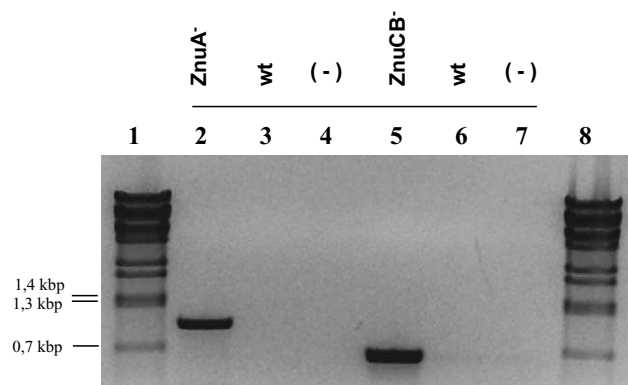


Fig. 3. PCR analysis of *P. multocida* mutants. Chromosomal DNA from *znuA* (lane 2) and *znuCB* (lane 5) mutants was subjected to PCR analysis with the Aad oligonucleotide (Table 2) as upper primer and SallZnuA and ZnuC2rp oligonucleotides (Table 2) as lower primers, respectively. The results of PCR reactions with chromosomal DNA from the wild-type strain (lanes 3 and 6) with these pair-primers, as well as those lacking DNA templates (lanes 4 and 7), are also shown as negative control. Lanes 1 and 8 are *BstEII* digested- λ DNA, which has been used as molecular size marker.

Inactivation of each one of these two transcriptional units was confirmed by PCR amplification of the junction segment of the vector with the chromosomal DNA using an internal primer for each gene and the Aad plasmid primer (Fig. 3). The stability of the integrated constructions for both mutants (*ZnuA*⁻ and *ZnuCB*⁻) was afterwards examined by serial transfers (1000-fold dilution) in BHI medium lacking antibiotics. After 10 sequential transfers, 100 colonies per mutant were analysed, and all of them retained both streptomycin resistance (determined as their growth ability in SBA plates containing streptomycin at 75 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and PCR profiles corresponding to the suicide plasmid insertion (data not shown), indicating that two mutants were stable in the absence of selective pressure.

Table 3
LD₅₀ of *P. multocida znuCB* and *znuA* mutants

Strain	Phenotype	LD ₅₀ (cfu/animal)
PM1002	wt	2
PM1081	<i>ZnuCB</i> ⁻	> 2.1 × 10 ³
PM1081/pUA974 (<i>znuCB</i>)	wt	2
PM1082	<i>ZnuA</i> ⁻	> 3.7 × 10 ³
PM1082/pUA975 (<i>znuA</i>)	wt	3

As expected, growth of *P. multocida ZnuA*⁻ and *ZnuCB*⁻ mutants was poor in BPW liquid medium in the presence of the DP-chelating agent, which was recovered when *ZnCl*₂ (500 μM) was added (Fig. 4). It must be noted that full recovery of wild-type cells grown in these same culture conditions was achieved at a lower concentration (100 μM). Additionally, the presence in *P. multocida ZnuA*⁻ and *ZnuCB*⁻ cells of a plasmid containing either the *znuA* or the *znuCB* wild-type genes suppresses the growth defects of these mutants (data not shown).

In agreement with their growth limitations under zinc-depletion conditions, Table 3 indicates that *P. multocida ZnuA*⁻ and *ZnuCB*⁻ cells present a loss of virulence as shown by its LD₅₀ increase by more than three orders of magnitude when intraperitoneally inoculated in Swiss mice. Moreover, the wild-type level of virulence is recovered in both *znuA*⁻, and *znuCB*⁻ defective cells carrying a plasmid containing its respective wild-type gene (Table 3).

In conclusion, data reported in this work demonstrate that the zinc-uptake *znuACB* system of *P. multocida* is under the control of the iron-regulatory Fur protein as well as that these genes are required for virulence of this bacterial species. This is the first description of a bacterial zinc-uptake system which is under the control of an iron-uptake regulator as is the *fur* gene.

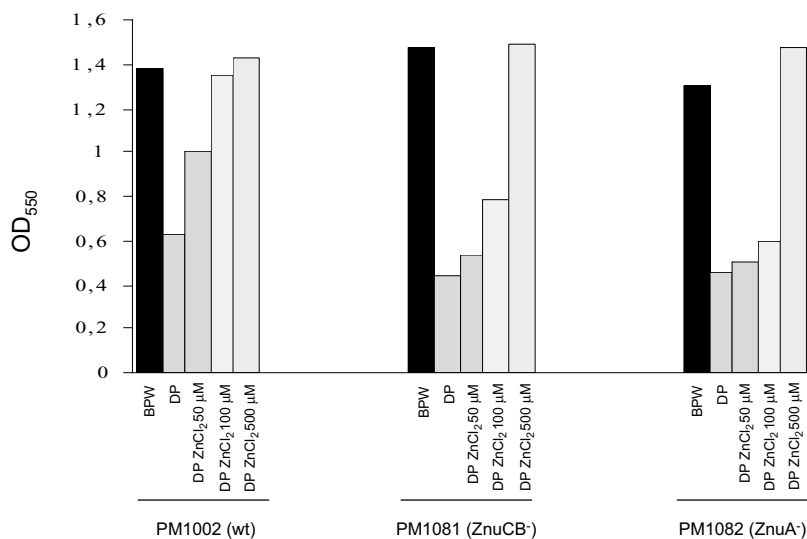


Fig. 4. Growth of wild-type (PM1002), *ZnuCB*⁻ (PM1081) and *ZnuA*⁻ (PM1082) strains of *P. multocida* in BPW medium in the absence or presence of DP alone or with several concentrations of *ZnCl*₂. OD₅₅₀ was measured after 14 h of culture at 37°C following specific treatment application. Values were reproducible to within an error of $\pm 10\%$.

Acknowledgements

This work was funded by grants BIO99-0779 and RTA03-065 of the Ministerio de Ciencia y Tecnología de España and 2001SGR-206 of the Comissionat per Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya. M.E.G. and R.M. were recipients of a predoctoral fellowship from the Direcció General d'Universitats de la Generalitat de Catalunya and from the AECI of the Ministerio Español de Asuntos Exteriores, respectively. We are deeply indebted to Joan Ruiz and Dr. Pilar Cortés for their excellent technical assistance and to our English-teaching university colleague, Mr. Chuck Simmons, for his help in the language revision and correction of this article.

References

- [1] Ratledge, C. and Dover, L.G. (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 881–941.
- [2] Escolar, L., Martín, J.P. and de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181, 6223–6229.
- [3] Beard, S.J., Hashim, R., Wu, G., Binet, M.R.B., Hughes, M.N. and Poole, R.K. (2000) Evidence for the transport of zinc(II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 184, 231–235.
- [4] Patzer, S.I. and Hantke, K. (2000) The Zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 24321–24332.
- [5] Gaballa, A. and Helmann, J.D. (1998) Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180, 5815–5821.
- [6] Lindsay, J.A. and Foster, S.J. (2001) *zur*: a Zn⁽²⁺⁾-responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 147, 1259–1266.
- [7] Chen, C.Y. and Morse, S.A. (2001) Identification and characterization of a high-affinity zinc uptake system in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 67–71.
- [8] Bosch, M., Tarragó, R., Garrido, M.E., Campoy, S., Fernández de Henestrosa, A.R., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I. and Barbé, J. (2001) Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 35–40.
- [9] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- [10] Stojilykovic, I., Baumbler, A. and Hantke, K. (1994) Fur regulation in Gram-negative bacteria: identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J. Mol. Biol.* 236, 531–545.
- [11] Bosch, M., Garrido, M.E., Llagostera, M., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I. and Barbé, J. (2002) *Pasteurella multocida exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 201–208.
- [12] May, B.J., Zhang, Q., Li, L.L., Paustian, M.L., Whittam, T.S. and Kapur, V. (2001) Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida* Pm70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 238–243.
- [13] Hantke, K. (2001) Bacterial zinc transporters and regulators. *Bio-Metals* 14, 239–249.
- [14] Althaus, E.W., Outten, C.E., Olson, K.E., Cao, H. and O'Halloran, T.V. (1999) The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* 38, 6559–6569.
- [15] Campoy, S., Jara, M., Busquets, N., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I. and Barbé, J. (2002) Role of the high-affinity zinc uptake *znuACB* system in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* virulence. *Infect. Immun.* 70, 4721–4725.
- [16] Lewis, D.A., Klesney-Tait, J., Lumbley, S.R., Ward, C.K., Latimer, J.L., Ison, C.A. and Hansen, J.E. (1999) Identification of the *znuA*-encoded periplasmic zinc transport of *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* 67, 5060–5068.

7. AGRADECIMIENTOS

Llegado este punto, me gustaría empezar diciendo que necesitaría un libro entero para expresar todos mis agradecimientos a montones de personas que de una u otra forma han colaborado en este trabajo ya sea directamente o bien ayudándome personalmente. A pesar de ello, procuraré ser breve, así que lamento mucho no nombraros a todos.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Jordi Barbé y a la Dra. Montserrat Llagostera, por haberme dado la oportunidad de entrar a formar parte de su grupo, por la confianza depositada en mí desde el principio y a lo largo de estos años, por compartir todo su conocimiento conmigo y ayudarme en todo momento.

También me gustaría agradecer al Dr. Ignacio Badiola por todo lo aprendido en Westerns y animales, a Anna Pérez y Montserrat Saco por su colaboración con los animales.

En cuanto al grupo de personas que hemos formado y formamos parte de los laboratorios 1 y 2, me gustaría agradecer enormemente a los que ya no están ya que ayudaron todos ellos a mi formación. Del lab.1, Raül, Toni, Alfonso, Àngels, Mar... Del lab.2, a Maribel, José Antonio, René, Xavi, Ángel, Ricardo (ya sabes que esta tesis también es un poco tuya) a José (jamás pensé que te iba a echar tanto de menos), a mi querida Mirle (te admiro en muchísimos aspectos) a mis “mamis” Montse R. y Lorena, que me enseñaron a dar mis primeros pasitos, inculcándome orden y pulcritud, se que os tengo un poco abandonadas pero no os olvido ni os olvidaré nunca, os quiero un montón. A Mónica, la última en abandonar el barco. Y muy especialmente a mi queridísima Montse Bosch, ya sabes que todo el mérito es tuyo, no sabes cuanto te he echado de menos, a mi también me encantaría volver a trabajar contigo.

En fin... la situación ahora es otra, no queda nadie de los que empezaron conmigo en el lab.2. Ha tocado espabilarse y ayudar en lo posible a los demás, primero con cierto temor y luego con mayor seguridad y aprender también de los nuevos fichajes, es lo bueno de este mundillo. Gracias a todos por ser tan estupendos y hacer que el día a día en el lab.2 sea tan llevadero. A Susana Escribano por su espontaneidad, a

Vanessa por su sinceridad y paciencia conmigo, a Pilar por hacerme participe de sus conocimientos y por su profesionalidad, a Jesús por su ironía y buen humor, a Gerard A. por sus críticas constructivas y por hacer el cerro de la muerte conmigo y a mi niña, mis ojos y la niña de mis ojos, Anna Bigas, por todo su cariño y ayuda. Hubiera sido mucho más difícil sin ti.

Gracias a los del lab.1: Gerard Mazón, por esos partidos distendidos de tenis, a ver cuando volvemos a jugar, a Susana Campoy, gracias por resolver tantas dudas durante todos estos años, a Núria Busquets, por tantos buenos momentos compartidos, cursos, piscinas...a Jordi Cunyé, por cuidar los intereses de mi marido y por ese humor tan sarcástico que tanto nos gusta, a Marc, por organizar esas salidas estupendas, a la niña Noelia, por disfrutar tanto de las cosas y contagiar ese entusiasmo, a Anna Hervás, por su buen rollo y a Sonia, por su sencillez y simpatía. A Joan, por currarte tanto las cenas y compartir tan buenas charlas conmigo. Y como no, a Isabel, desde que estás tú todo es un poquito más fácil.

Y por último, aunque no menos importante, a toda mi familia. A mis padres, que son los que se han esforzado de verdad y muchísimo para que tanto mis hermanos como yo hayamos podido alcanzar siempre nuestros objetivos, siempre bajo su protección y con todas las facilidades del mundo a pesar de lo difícil de la situación en muchísimas ocasiones. A mi hermano Juanmi, con quien he podido compartir tantas horas de estudio y que tanto ánimo me ha dado siempre. A mi hermano Jordi, por su valentía, su carisma y su cariño, seguro que tú también encontraras tu sitio en este mundo de locos. Nunca imaginé que os fuera a echar tantísimo de menos a los cuatro. Quiero agradecer también a mi cuñada Odda, por su espontaneidad y su buen humor que tanto se contagia, y también muy especialmente a mi sobrinito Marc, que a pesar de no saber decir nada todavía, consigue arrancarme mil sonrisas aunque haya tenido el peor de los días. Por supuesto, quiero dar las gracias también a mi otra familia, que me han acogido siempre como la niña que no han tenido, a Dori y a Manuel, por darme siempre todos los caprichos y quererme tanto, a mis cuñados, Vicente, Santi y Oriol, por cuidar de mi como si fuera una Zúñiga más, me siento muy protegida sabiendo que estáis ahí. Y como no, a mi marido, una de las mejores personas que hay en este mundo, muchas gracias por mimarme, consentirme tanto,

cuidar de mi y quererme cada día más. Aunque tu frase es: “Nadie dijo que fuera fácil” y es cierto, contigo todo es mucho más fácil; sin ti, nada tiene ningún sentido.