



Estudio del regulón Fur en
Salmonella enterica serovar
Typhimurium

Tesis Doctoral

Laura Teixidó Devesa

Departament de Genètica i Microbiologia

Bellaterra, 2013



Estudio del regulón Fur en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Tesis Doctoral presentada por **Laura Teixidó Devesa** para optar al
Grado de **Doctor** por la **Universitat Autònoma de Barcelona**
Programa de doctorado en **Microbiología**

Con el visto bueno de los directores de Tesis Doctoral:

Dr. Jordi Barbé García

Dra. Susana Campoy Sánchez

Resumen

El hierro es un oligoelemento esencial para la supervivencia celular ya que es un cofactor de muchas enzimas y forma parte de la estructura de muchas proteínas. Es por este motivo que los microorganismos necesitan mecanismos eficientes para la captación de hierro cuándo carecen del mismo. Está ampliamente descrito que la captación de hierro es uno de los pasos clave en el desarrollo de un patógeno dentro de su huésped ¹. Pero, aunque el Fe es indispensable, su exceso en el citoplasma es tóxico para la célula ya que cataliza la reacción de Fenton con la consiguiente formación de radicales hidroxilo ^{2,3}.

Por todo ello la homeóstasis del Fe²⁺ se encuentra estrictamente controlada. La proteína Fur (*ferric uptake regulator*) es el principal regulador transcripcional implicado en la respuesta celular a la concentración de hierro, controlando tanto la inducción de sistemas de captación de Fe²⁺ de alta afinidad, como la expresión de proteínas para el almacenamiento y enzimas que utilizan hierro ⁴. Normalmente Fur, asociado al ión Fe²⁺, se une a una secuencia concreta denominada caja Fur presente en la región promotora de los genes que regula, bloqueando de esta manera su transcripción ⁵. Aunque también puede activar la expresión de diferentes genes de forma directa o indirecta ¹.

En el presente trabajo se estudia, mediante microarrays de DNA, el papel de la proteína Fur en el patógeno intracelular *S. enterica* serovar Typhimurium y la relación de este regulador con los mecanismos de virulencia de dicho microorganismo.

Summary

Iron is an essential trace element for the cell since it is a cofactor for many enzymes and is a part of the structure of many proteins. It is for this reason that the microorganisms need efficient mechanisms for iron uptake when lacking it. It is widely reported that iron uptake is one of the key steps in the development of a pathogen within its host ¹. Although Fe^{2+} is indispensable, its excess in the cytoplasm is toxic to the cell since it catalyzes the Fenton reaction leading to the formation of hydroxyl radicals ^{2,3}.

Therefore Fe^{2+} homeostasis is strictly controlled. Protein Fur (ferric uptake regulator) is the major transcriptional regulator involved in the cellular response to iron concentration, by controlling the induction of Fe^{2+} high affinity uptake systems and the protein expression of iron storing and utilizing enzymes ⁴. Normally, Fur, associated to the Fe^{2+} ion, binds to a specific sequence called Fur box present in the promoter region of genes the regulated genes, thus blocking its transcription ⁵. Fur also can activate the expression of different genes directly or indirectly ¹.

The role of the Fur protein in the intracellular pathogen *S. enterica* serovar Typhimurium and its relationship with the virulence mechanisms of this microorganism is studied in this work by DNA microarrays.

Índice

Resumen	iii
Summary	vii
I. Introducción	p. 3-51
1. Características del género <i>Salmonella</i>	3
1.1. Taxonomía	3
1.2. Hábitat	3
1.3. Fisiología	3
1.4. Genética	5
2. El ciclo infeccioso de <i>Salmonella</i> Typhimurium en ratón	6
2.1. Fase intestinal de la infección	8
2.1.1. Respuesta ácido tolerante	8
2.1.2. Adhesión y colonización del intestino delgado	8
2.1.3. Invasión de las células epiteliales	9
2.1.3.1. Composición de la isla de patogeneidad 1 (SPI1)	10
2.1.3.2. Regulación de la expresión de la SPI1	12
2.2. Fase sistémica de la infección	14
2.2.1. Supervivencia en las placas de Peyer	14
2.2.2. Supervivencia dentro de macrófago	14
2.2.3. Infección sistémica	16
3. Importancia del hierro para los microorganismos	17
3.1. Disponibilidad de hierro	18
3.2. El hierro y el estrés oxidativo	18
4. Fuentes de hierro para los microorganismos	19
4.1. El hierro y la relación huésped-patógeno	19
4.1.1. Sistemas de los organismos superiores para limitar la concentración de hierro	20
4.1.2. Estrategias de los microorganismos para la captación eficiente de hierro desde el huésped	21

5. Captación y destino intracelular del hierro en <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	23
5.1. Mecanismos para la captación de hierro	23
5.1.1. Captación de Fe²⁺	23
5.1.2. Utilización de sistemas de alta afinidad. Los sideróforos	25
5.1.2.1. Sideróforos utilizados por bacterias entéricas	26
5.1.2.2. Reconocimiento en la superficie celular y transporte a través de la membrana externa	29
5.1.2.3. Transporte a través del periplasma y la membrana citoplasmática	30
5.2. El destino intracelular del hierro	30
5.2.1. Metabolismo de los sideróforos	30
5.2.2. Almacenamiento de hierro	31
6. Mecanismos para el control de la homeóstasis del hierro	33
7. La proteína Fur (Ferric Uptake Regulator)	35
7.1. Características bioquímicas y estructurales de la proteína Fur	35
7.2. Mecanismos de acción de la proteína Fur	37
7.2.1. Represión génica e interacción con el DNA	37
7.2.2. Activación de la expresión génica	40
7.2.2.1. Regulación a través de RNAs pequeños. El sRNA RyhB de <i>E. coli</i>	40
7.2.2.2. Otros sRNA que controlan el metabolismo del hierro	42
7.2.2.3. Regulación positiva directa	43
7.2.3. Otros modelos de regulación	44
7.2.4. Control del consumo de hierro por Fur en <i>E. coli</i>	45
7.3. Mecanismos de regulación de Fur	46
7.3.1. Regulación a nivel transcripcional	46
7.3.1.1. Autorepresión	46
7.3.1.2. Moduladores de la transcripción	47
7.3.2. Regulación a nivel postranscripcional	48
7.4. Genes regulados por Fur	48
7.4.1. Sistemas de detección de genes controlados por Fur	48
7.4.2. El regulón Fur	48
7.4.2.1. Homeóstasis del hierro	49
7.4.2.2. Virulencia	50
7.4.2.3. Resistencia frente a la acidez	50
7.4.2.4. Respuesta al estrés oxidativo	51
7.4.2.5. Metabolismo energético	51

II. Objetivos	p. 55
<hr/>	
III. Material y Métodos	p. 59-79
<hr/>	
1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo	59
2. Manipulación de ácidos nucleicos	61
2.1. Métodos de transferencia de DNA plasmídico	66
3. Obtención de mutantes de <i>S. Typhimurium</i>	67
4. Análisis transcriptómico	68
4.1. Diseño del microarray “Salgenomics”	68
4.2. Diseño experimental	70
4.3. Obtención de los datos, normalización y análisis estadístico	73
5. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	74
6. Purificación de proteínas	75
7. Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)	77
8. Footprint con la proteína Fur	78
9. Transcripción <i>in vitro</i>	78
10. Métodos bioinformáticos	79

1. Estudio transcriptómico de la cepa <i>fur</i> y la cepa salvaje tratada con EDTA de <i>S. Typhimurium</i>	83
1.1. Efectos globales en la expresión génica debidos a la ausencia de <i>fur</i> o a la presencia del quelante EDTA	83
1.2. Efectos globales en la expresión génica debidos a la ausencia del complejo Fur-Fe²⁺	88
1.3. Composición del regulón Fur de <i>S. Typhimurium</i>	89
1.3.1. Genes pertenecientes al regulón Fur descritos con anterioridad	89
1.3.1.1. Genes asociados a la captación y la homeóstasis del hierro	89
1.3.1.2. Genes asociados a funciones distintas a la captación y metabolismo del hierro	92
1.3.2. Identificación de nuevos genes pertenecientes al regulón Fur de <i>S. Typhimurium</i>	93
2. Identificación de nuevos genes reprimidos por el complejo Fur-Fe²⁺	96
2.1. Control negativo de reguladores transcripcionales	99
2.2. Control negativo de proteínas de la envuelta y síntesis de pared	101
2.3. Control negativo de genes del metabolismo	103
3. Identificación de nuevos genes activados por el complejo Fur-Fe²⁺	105
3.1. Control positivo de reguladores transcripcionales	112
3.2. Control positivo de proteínas de la envuelta	114
3.3. Control positivo de genes asociados al metabolismo energético	115
3.3.1. Genes de respiración	115
3.3.2. Genes implicados en la síntesis y utilización de la coenzima B ₁₂	117
3.3.3. Control positivo indirecto a través de los sRNAs RfrA y RfrB de genes implicados en la síntesis y utilización de la coenzima B ₁₂	120
3.4. Control positivo de genes asociados a virulencia	124
3.4.1. Unión de Fur al promotor <i>PhlD</i>	127
3.4.2. Fur activa directamente la expresión de <i>hilD</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	129
3.4.3. Fur activa indirectamente la expresión de genes de las islas de patogenicidad 4 y 5	133

V. Conclusiones **p. 139**

VI. Bibliografía **p. 143-160**

VII. Anexo A: Procedimientos detallados **p. 163-183**

1. Composición y preparación de medios de cultivo	163
1.1. Luria-Bertani (LB)	163
1.2. Terrific Broth (TB)	163
1.3. Brain Heart Infusion (BHI)	163
1.4. Super Optimal Broth (SOB)	163
1.5. SOC	164
1.6. Placas verdes	164
2. Miniextracción de DNA plasmídico con LiCl	164
3. Maxiextracción de DNA plasmídico	166
4. Preparación de células competentes con CaCl₂	167
5. Preparación de células electrocompetentes	168
6. Transformación de células competentes por choque térmico	169
7. Transformación de células electrocompetentes	169
8. Obtención de mutantes de <i>S. Typhimurium</i> mediante el método de inactivación génica en un paso	170
8.1. Obtención del fragmento de DNA a transformar	170
8.2. Obtención de células electrocompetentes	171
8.3. Electroporación	172
8.4. Eliminación del plásmido pKOBEGA	172
8.5. Eliminación de la resistencia a antibiótico	172

9. Transducción generalizada con el fago P22_{int7HT}	173
9.1. Obtención del lisado	173
9.2. Aumento del título de un lisado	174
9.3. Infección de la cepa receptora	174
9.4. Selección de células no lisógenas	174
10. Microarrays de DNA	175
10.1. Preparación de la muestra	175
10.2. Extracción de RNA	175
10.3. Eliminación del DNA	176
10.4. Purificación y concentración del RNA	177
10.5. Obtención del cDNA	178
10.5.1. Retrotranscripción	178
10.5.2. Purificación del cDNA	178
10.5.3. Obtención del DNA genómico	179
10.5.3.1. Extracción de DNA genómico	179
10.5.3.2. Fragmentación de DNA genómico	180
10.5.4. Marcaje de las muestras de cDNA y gDNA	180
10.5.4.1. Amplificación y marcaje del cDNA y el gDNA	180
10.5.4.2. Purificación del DNA marcado	181
10.5.4.3. Marcaje con Fluoróforos	182
10.5.4.4. Purificación del DNA marcado fluorescentemente	182
10.6. Hibridación de los chips de DNA	182
10.6.1. Hibridación	182
10.6.2. Lavados	183

I.

Introducción

1. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Salmonella*

1.1. Taxonomía

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y a la clase γ -Proteobacteria. Se conocen tres especies: la recientemente aislada *Salmonella subterranea*⁶ *Salmonella bongori* (previamente conocida como subsp. V) y *Salmonella enterica*⁷⁻⁹. Esta última puede ser dividida en base a sus características bioquímicas (biotipo), diferencias observadas en los patrones de restricción (MLEE: *multilocus enzyme electrophoresis*), análisis filogenéticos utilizando las secuencias del rRNA 16S o mediante otras técnicas moleculares (AFLP: *amplified-fragment length polymorfism*) en seis subespecies: *enterica*, *salmae*, *arizonae*, *diarizonae*, *housteane* e *indica* (o subespecies I, II, IIIa, IIIb, IV y VI, respectivamente)¹⁰. Los miembros de *S. enterica* subsp. *enterica* cuentan con la mayoría de las serovariedades (o serotipos) de *Salmonella* que causan el 99% de las infecciones en humanos, como *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi, Paratyphi, Typhimurium y Enteritidis (también conocidas como *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente)¹¹.

1.2. Hábitat

Con la excepción de *S. subterranea* que tiene como hábitat principal los suelos ácidos⁶, la mayoría de especies de *Salmonella* son patógenos facultativos intracelulares que viven en el tracto intestinal de animales. *S. enterica* subsp. *enterica* habita en los animales de sangre caliente, mientras que otras subespecies de *S. enterica* y *S. bongori* son especies comensales de animales de sangre fría y raramente infectan a humanos¹¹. Las serovariedades de *S. enterica* subsp. *enterica* se pueden clasificar en aquellas que están adaptadas al huésped (normalmente infectan a un huésped pero son capaces de provocar enfermedad en otros), las que son huésped-restringidas (solo infectan a un huésped) y las generalistas (capaces de infectar varios animales, aunque el curso de la enfermedad puede diferir en los distintos organismos) (Tabla I.1). La infección de *Salmonella* en estos hospedadores a menudo conduce a una gastroenteritis, aunque para mantenerse en su hábitat la bacteria debe ser capaz de persistir o vivir comensalmente en al menos un porcentaje de individuos y ser eficientemente transmitida, normalmente de manera fecal-oral, de huésped a huésped. Esta vía requiere la diseminación la cual cosa comporta que *Salmonella* sobreviva también fuera de los animales. Es por ello que se pueden aislar células

de diferentes fuentes ambientales, normalmente de ambientes acuáticos y sedimentarios aunque también pueden encontrarse en el suelo ^{10, 11}. En el caso de infecciones en humanos lo más corriente es que sean debidas al consumo de aguas y alimentos contaminados por heces, así como también por el consumo de animales filtradores de aguas contaminadas y productos de origen animal como huevos y leche ¹¹.

Tabla I.1 Huéspedes de distintas serovars de *S. enterica* subsp. *enterica*

Clasificación	Serovar	Huésped natural	Huésped secundario
Huésped-restringidas	Typhi	Humano	Ninguno
	Paratyphi	Humano	Ninguno
	Sendai	Humano	Ninguno
	Abortusovis	Ovino	Ninguno
	Gallinarum	Aves de corral	Ninguno
	Typhisuis	Cerdo	Ninguno
	Abortusequi	Equino	Ninguno
Adaptadas al huésped	Cholerasuis	Cerdo	Humano
	Dublin	Bovino	Humano y ovino
Generalistas	Typhimurium	Humano, aves de corral, bovino y roedores	Ninguno
	Enteritidis	Humano, aves de corral y roedores	Cerdo y ovino

¹¹

Se pueden destacar dos casos en los que *Salmonella* se ha adaptado a un nicho particular para mantenerse en la población del huésped. La serovariedad Typhi es un patógeno humano que se transmite vía fecal-oral y su infección origina la fiebre entérica. La bacteria invade el epitelio intestinal y los macrófagos, donde se replica y puede diseminarse por todo el organismo. Un gran porcentaje de los pacientes no tratados que sobreviven superan completamente la infección pero el resto pueden convertirse en portadores asintomáticos por mucho tiempo ¹². En estos casos, la bacteria se replica en el hígado y es secretada al intestino a través de la vesícula biliar y después al exterior a través de las heces. De esta forma estos individuos se convierten en una fuente constante de bacterias infecciosas. Por otro lado, la serovariedad Enteritidis es generalista y compite con la serovariedad Typhimurium en ser la primera causa de infección en humanos. En pollos, causa una infección asintomática en el tracto reproductivo de las gallinas provocando una transmisión vertical en la cual la bacteria contamina los huevos que produce la gallina infectada ¹³.

1.3. Fisiología

Las salmonellas son bacilos anaerobios facultativos, mesófilos (temperatura óptima de crecimiento 37°C) y neutrófilos (pH óptimo 6.5-7.5). Son incapaces de desarrollar cápsula o esporas y generalmente están rodeadas por flagelos peritricos que les confieren movilidad ¹⁴. Son organismos quimiorganotrofos, con un metabolismo fermentativo u oxidativo. Pueden fermentar la glucosa a ácido fórmico, etanol, acetato o lactato y la cadena de transporte de electrones puede usar como aceptor terminal oxígeno, nitrato, fumarato, dimetil sulfóxido (DMSO) y N-óxido de trimetilamina (TMAO). Las características metabólicas que diferencian a *Salmonella* de otras bacterias entéricas son que ésta normalmente no es capaz de metabolizar ni la sacarosa ni la lactosa, puede hidrolizar el 4-metilumbelliferil caprilato (MUCAP) y produce sulfuro de hidrógeno ^{11, 14}.

1.4. Genética

Se ha descrito el genoma completo de la cepa tipo *S. Typhimurium* LT2 ¹⁵ y la cepa virulenta *S. Typhimurium* ATCC14028 ¹⁶, así como el de otras cepas de la serovariedad Typhi (Ty2 ¹⁷ y CT18 ¹⁸) (ver www.ncbi.nih.gov). Además también están siendo secuenciadas cepas representativas de otras serovariedades (ver <http://www.salmonella.org>). El genoma de la cepa *S. Typhimurium* LT2 consta de 4857 kb, con 4489 secuencias que pueden codificar proteínas y su DNA tiene un porcentaje de G+C del 53%. Además, presenta un plásmido de virulencia autotransmisible llamado pSLT, con un tamaño de aproximadamente 94 kb que presenta 108 secuencias codificantes ¹⁹. Este plásmido lo poseen también la mayoría de cepas no tifoideas de la subsp. *enterica* ²⁰.

El análisis genético de *S. Typhimurium* rivaliza con el de *Escherichia coli* en cuanto a la comprensión de la estructura celular bacteriana, la biología y la fisiología (ver <http://www.ecosal.org>), siendo fundamentalmente la patogenia lo que hace a *Salmonella* única respecto a *E. coli* K12.

2. El ciclo infeccioso de *Salmonella Typhimurium* en ratón

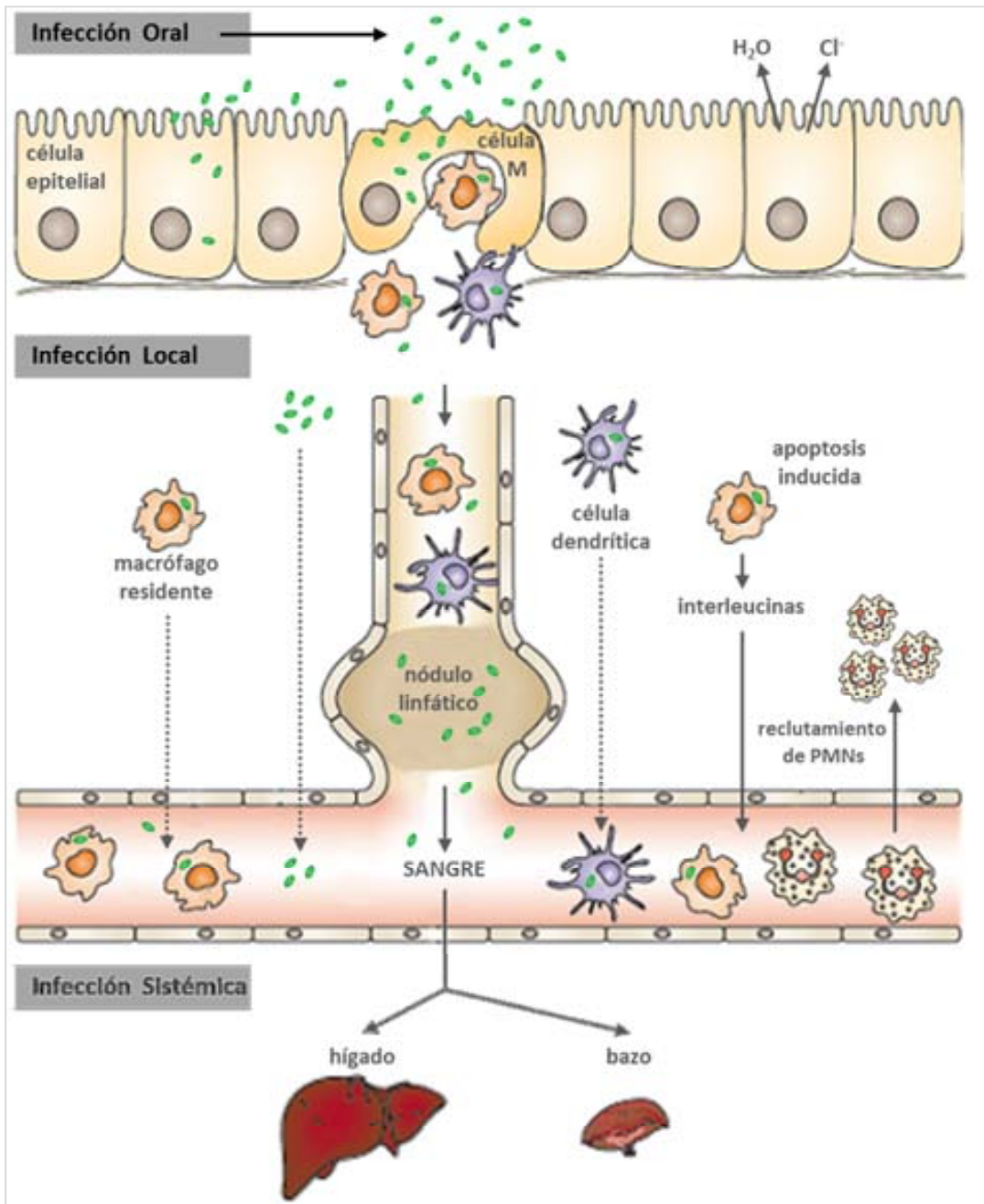


Figura I.1. Propagación de *S. enterica* en el ratón. *S. enterica* invade las células epiteliales y las células M y es fagocitada por macrófagos residentes y células dendríticas. En la submucosa la bacteria activa la muerte celular de los macrófagos, que da lugar a la producción de interleucinas que median el reclutamiento de fagocitos polimorfonucleares (PMN). La bacteria después alcanza los nódulos linfáticos mesentéricos y la sangre, antes de ser capturada por los fagocitos residentes del hígado y el bazo. Adaptado de ²¹.

Tabla I.2 Regulación de los factores de virulencia de *S. Typhimurium*

Ubicación	Genes de virulencia	Función	Condiciones ambientales	Proteínas reguladoras
Estómago	<i>atr</i>	Respuesta de tolerancia al ácido	pH ácido	Fur, RpoS
Intestino	fimbrias	Adhesión		FimZ, AgfD
	SPI1	Invasión, producción de quimiocina, migración de PMN, apoptosis	O ₂ , osmolaridad, pH, fase de crecimiento, cationes, niveles de P _i	EnvZ/OmpR, PhoPQ, PhoBR, CsrAB, SirA/BarA, HilA, HilC, HilD, InvF
	genes <i>svr</i> (SPI4)	Desconocida		HilA, SirA/BarA
	<i>sopB</i> , <i>pips</i> (SPI5)	Migración de PMN*		HilA, SirA/BarA
	<i>entF</i>	Captación de hierro	Limitación de hierro	Fur
Macrófago	<i>mgfCB</i> (SPI3)	Captación de Mg ²⁺	Nivel de catión	PhoPQ
	SPI2	Replicación dentro de macrófago	Niveles de cationes, niveles de P _i , osmolaridad	PhoPQ, SsrAB, EnvZ/OmpR
	Gifsy-2	Defensa contra macrófagos		
Hígado /Bazo	<i>pags</i> PmrA-dependientes	Resistencia a péptidos catiónicos y muerte por macrófagos y PMNs*	Niveles de cationes, pH	PhoPQ, PmrAB
	<i>spvABCD</i>	Replicación en tejidos extraintestinales	Anaerobiosis, fase de crecimiento, limitación de N, Pi, C y Fe, elevadas temperaturas, estrés SCFA*	RpoS, cAMP-CRP, Lpr, IHF, H-NS, SpvR
	<i>waaN</i>	Modificaciones del lípido A, promueve las citoquinas inflamatorias y respuestas inducibles por NO, induce la muerte del huésped		

*PMN: neutrófilos polimorfonucleares; SCFA: *short chain fatty acids*

Salmonella spp. puede causar una variedad de enfermedades dependiendo de la serovariedad y del huésped que van desde una gastroenteritis controlada a una infección sistémica potencialmente letal^{22, 23}. En terneros *S. Typhimurium* causa una diarrea inflamatoria que se estudia como modelo de la gastroenteritis provocada en humanos. Por otro lado también provoca una enfermedad sistémica en ratón que sirve como modelo de la fiebre tifoidea humana causada por la serovariedad Typhi. El modelo de infección murino y las técnicas genéticas sofisticadas disponibles para *S. Typhimurium* han permitido tener un amplio

conocimiento de la interacción entre este patógeno y el huésped (Figura I.1). La habilidad de *Salmonella* de superar las diversas condiciones ambientales y las defensas del huésped encontradas durante la infección para así causar una infección productiva requiere un gran número de factores de virulencia específicos así como la apropiada regulación de éstos (Tabla I.2).

2.1. Fase intestinal de la infección

2.1.1. Respuesta ácido tolerante

La primera barrera que se encuentra *Salmonella* dentro del huésped es el ambiente ácido del estómago²⁴. La serovariedad Typhimurium puede sobrevivir a un pH extremadamente bajo después de un crecimiento en condiciones medianamente ácidas (pH 4-5) gracias al proceso llamado respuesta de tolerancia al ácido (*acid tolerance response* o ATR)²⁵. Existen dos sistemas ATR: el que se da a lo largo de la fase exponencial que induce la expresión de más de 50 proteínas²⁶ y está controlado por varios reguladores incluyendo RpoS, Fur y PhoP/Q²⁶⁻²⁸; y un segundo sistema que se induce en fase estacionaria y está regulado por OmpR/EnvZ^{29,30}.

2.1.2. Adhesión y colonización del intestino delgado

Después de pasar a través del estómago, *Salmonella* coloniza el intestino delgado uniéndose al revestimiento intestinal, replicándose y evitando los mecanismos de “limpieza” del huésped. En estos procesos tienen un papel destacado las fimbrias²², sistemas de captación de hierro y otros nutrientes³¹ y la apoptosis inducida de los macrófagos activados^{32,33}.

La vía de entrada preferida para *S. Typhimurium* son las células M de las placas de Peyer, éstas son células epiteliales especializadas en el transporte de antígenos desde el lumen del intestino a la submucosa para presentarlos a las células residentes del sistema inmune (macrófagos y células dendríticas). El tropismo aparente hacia las células M, comparado con el de las células epiteliales sugiere que las fimbrias facilitan la unión de la bacteria a la superficie de éstas células. *S. Typhimurium* codifica 13 operones de fimbrias^{15,34-36}, entre ellos son de destacar: las fimbrias tipo 1 (*fimAICDHF*) que se unen a los residuos de manosa de las células del huésped y se cree que permiten la unión en diferentes hospedadores³⁷; las fimbrias Lpf (*long polar fimbriae*)³⁸ que posibilitan la unión a las células M

pero no a las células epiteliales del intestino delgado³⁹; las fimbrias Pef (*plasmid-encoded fimbriae*) codificadas en el plásmido de virulencia pSLT que permiten a *Salmonella* unirse al intestino delgado del ratón⁴⁰; y un cuarto operón *agf* (*aggregative fimbriae*) que produce fimbrias delgadas análogas a las fimbrias *curli* de *E. coli* que están implicadas en la formación de biofilm y la virulencia y promueven la autoagregación bacteriana⁴¹. Algunos datos sugieren que todos estos operones son funcionalmente redundantes ya que las fimbrias Lpf, Pef y Agf son capaces de compensarse entre ellas en el modelo murino de infección⁴². La presencia de este gran número de operones distintos sugiere que para la colonización de ciertos huéspedes se requiere un repertorio diferente de fimbrias¹¹.

Después de la colonización, la bacteria puede atravesar el epitelio intestinal para alcanzar las placas de Peyer, un tejido linfático especializado en mostrar antígenos intestinales y promover una respuesta inmunitaria⁴³⁻⁴⁵.

2.1.3. Invasión de las células epiteliales

Un paso crítico en el proceso infeccioso de *Salmonella* es su habilidad de atravesar la barrera epitelial del intestino²². La serovariedad Typhimurium puede acceder al tejido linfático adyacente vía células epiteliales fagocíticas (células M) o células no fagocíticas (enterocitos) del intestino delgado. Este proceso de invasión no es simplemente una mera consecuencia del contacto pasivo de la bacteria con las células epiteliales, sino que requiere de la participación activa de las células bacterianas con la expresión de numerosos genes de virulencia. La expresión de estos genes está regulada por varios reguladores transcripcionales y postranscripcionales que ejercen un intrincado control sobre la invasión. Además, un gran número de condiciones ambientales existentes en el tracto intestinal de mamíferos también inducen la invasión⁴⁶.

Normalmente *S. Typhimurium* invade las células no fagocíticas del intestino gracias a la estructura multiprotéica en forma de aguja del sistema de secreción tipo III (T3SS) codificado en la isla de patogenicidad 1 (SPI1)^{22, 47, 48}. Este atraviesa las membranas interna y externa⁴⁹ y es capaz de inyectar una serie de proteínas efectoras en el citosol de las células del huésped⁴⁹⁻⁵² (Tabla I.3). Una vez dentro de la célula eucariota, estas proteínas alteran la estructura citoesquelética e inducen la reorganización de los filamentos de actina alrededor de la bacteria. En este momento se forma una ondulación de la membrana eucariota (*ruffling*) que facilita la internalización del microorganismo⁵³ y promueve la posterior invasión

del epitelio intestinal. Además, la translocación de las proteínas efectoras, induce la proliferación de una serie de citoquinas proinflamatorias que causan la inflamación de la mucosa y la infiltración de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) en el lugar de la invasión. Se cree que esta respuesta inflamatoria contribuye a los síntomas de la gastroenteritis asociada a la infección por *Salmonella* en algunos huéspedes^{22, 45, 54, 55}.

S. Typhimurium también puede desencadenar una infección sistémica a través de una ruta alternativa que no requiere la colonización intestinal, la invasión de las células epiteliales o la localización en las placas de Peyer. En esta ruta independiente de la SPI1, los fagocitos que expresan CD18 transportan a la bacteria directamente del lumen intestinal hasta los lugares sistémicos a través del torrente sanguíneo⁵⁶.

2.1.3.1. Composición de la isla de patogenicidad 1 (SPI1)

La región de 40 Kb situada en el centrisoma 63, llamada isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1)²² (Figura I.2) está compuesta por dos elementos con funciones diferentes. Uno de ellos consiste en el pequeño clúster de genes *sitABCD* que codifica un sistema de captación de hierro y manganeso⁵⁷. El operón *sit* no parece estar involucrado en la invasión del epitelio intestinal, sino que por el contrario se induce en etapas posteriores del proceso infeccioso en el ratón⁵⁸ y después de la captación por macrófagos en un cultivo celular⁵⁹. Los otros 33 genes de la SPI1 se requieren para el ensamblaje y el funcionamiento del T3SS, así como para la expresión de varias proteínas efectoras. Algunas de las proteínas efectoras translocadas por el mismo T3SS de la SPI1 están situadas en otras partes del cromosoma como SopB de la SPI5, SopA, SopD y SopE (profago SopEφ) (Tabla I.3).

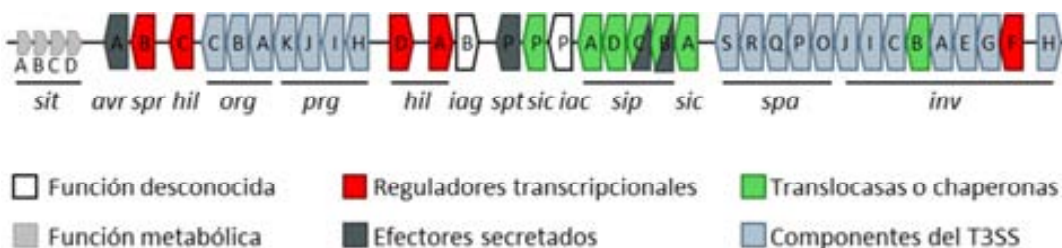


Figura I.2. Genes de la SPI1. Componentes del T3SS1 codificados en la SPI1 que incluyen subunidades del aparato de secreción tipo III, efectores secretados por el aparato, factores requeridos para la translocación eficiente y reguladores transcripcionales. También se representa la parte de la isla que codifica el transportador de hierro de alta afinidad (*sitABCD*).

Tabla I.3 Proteínas translocadas por los TTSS de la SPI1 y la SPI2 y su función

Efactor	Localización	Función	Efecto en la célula huésped
Proteínas translocadas por el TTSS1			
SopE	Profago SopEφ	Factor de intercambio de nucleótido	Reorganización del citoesqueleto que conduce a la captación de la bacteria
SopE2	Cromosoma	Igual que SopE	Igual que SopE
SopB	SPI5	Fosfatasa inositol-fosfato	Perdida de electrolitos
SptP	SPI1	Tirosina fosfatasa	Devuelve el citoesqueleto de actina al estado normal
SipA	SPI1	Unión/estabilización de la actina	Inhibición de la despolimerización de los filamentos de actina
SipB	SPI1	Componente del translocón	Inducción de la apoptosis de macrófagos, translocación de proteínas efectoras
SipCD	SPI1	Componentes del translocón	Translocación de proteínas efectoras
AvrA	SPI1	Proteasa, acetiltransferasa	Inhibe la inflamación, reprime la apoptosis y la inmunidad innata del epitelio
SspH1	Gifsy-3	Ubiquitinaligasa	Reprime las respuestas proinflamatorias
SopA	cromosoma	Ubiquitinaligasa	Interrumpe la integridad de la SCV*, induce la transmigración de PMNs*
SopD	cromosoma	Función desconocida	Induce la secreción de fluidos, contribuye a la virulencia y persistencia en ratón
Proteínas translocadas por el TTSS2			
SseB	SPI2	Translocador	Translocación de proteínas efectoras
SseC	SPI2	Inserción en la membrana de la célula diana, translocador	Translocación de proteínas efectoras
SseD	SPI2	Función desconocida	Translocación de proteínas efectoras
SseFG	SPI2	Función desconocida	Contribuye a la formación de Sifs, mantiene la posición perinuclear de la SCV*
SsaB	SPI2	Proteína efectora	Inhibición del tráfico intracelular, controla el orden de la exportación de proteínas a través del TTSS2
SpvBC	pSLT	ADP-ribosiltransferasa, fosfotreonina liasa	Requerida para la completa virulencia en ratón
SspH2	cromosoma	Inhibe la polimerización de la actina <i>in vitro</i>	Remodela la F-actina asociada a la SCV?
*SCV: <i>salmonella containing vacuole</i> ; PMN: neutrófilos polimorfonucleares			

2.1.3.2. Regulación de la expresión de la SPI1

Además de los componentes estructurales del T3SS y las proteínas efectoras codificadas en la SPI1, varios reguladores también forman parte de la isla. Estos reguladores transcripcionales activan la invasión y forman un circuito regulador complejo para el control de genes de dentro y fuera de la isla (Figura 1.3A). HilA juega un papel central en este control ya que activa los operones *inv/spa* y *prg* que codifican componentes del aparato de secreción^{22, 60}. Además, HilA es un activador del regulador transcripcional *invF* que, con la ayuda de la chaperona SicA, induce la expresión de las proteínas secretoras del operón *sip*. Aunque HilA es el regulador central de la invasión dentro de la SPI1, la expresión de *hilA* está controlada por dos reguladores adicionales de dentro de la SPI1 (HilC y HilD), y por otro regulador codificado fuera de la isla (RtsA). Los tres actúan uniéndose al promotor de *hilA* activando de esta manera su transcripción y además se regulan así mismos y entre ellos formando un complejo bucle de regulación⁶¹. HilC y HilD por su parte también son capaces de activar *invF* de una manera independiente de HilA⁶².

Otros reguladores globales de la célula también controlan la invasión, entre ellos el sistema de dos componentes BarA/SirA^{63, 64}. Una parte del control de la invasión a través de BarA/SirA se debe al sistema regulador *csr*. Este consiste en una proteína pequeña llamada CsrA que actúa a nivel postranscripcional uniéndose al RBS de los RNAs mensajeros que regula, alterando de esta forma su expresión⁶⁵. En el caso de la SPI1, CsrA activa su expresión pero la reduce cuando se sobreexpresa, sugiriendo que el nivel de esta proteína está fuertemente controlado *in vivo* para conseguir una invasión óptima⁶⁶. Éste sistema regulador consta además de dos moléculas de RNA, CsrB y CsrC, que se oponen a la acción de CsrA impidiendo su actividad. El regulador de dos componentes BarA/SirA controla la invasión, en parte activando la expresión de CsrB y CsrC y directamente actuando sobre *hilA* y *hilC*.^{66, 67} El regulador FliZ, implicado en la producción de flagelos, también induce la invasión a través de *hilA*^{68, 69}. Otra proteína que controla la expresión de SPI1 es H-NS. Esta proteína asociada a ácido nucléico se une a la región promotora de los genes *hilA*, *hilC*, *hilD* y *rtsA* disminuyendo su expresión^{70, 71}.

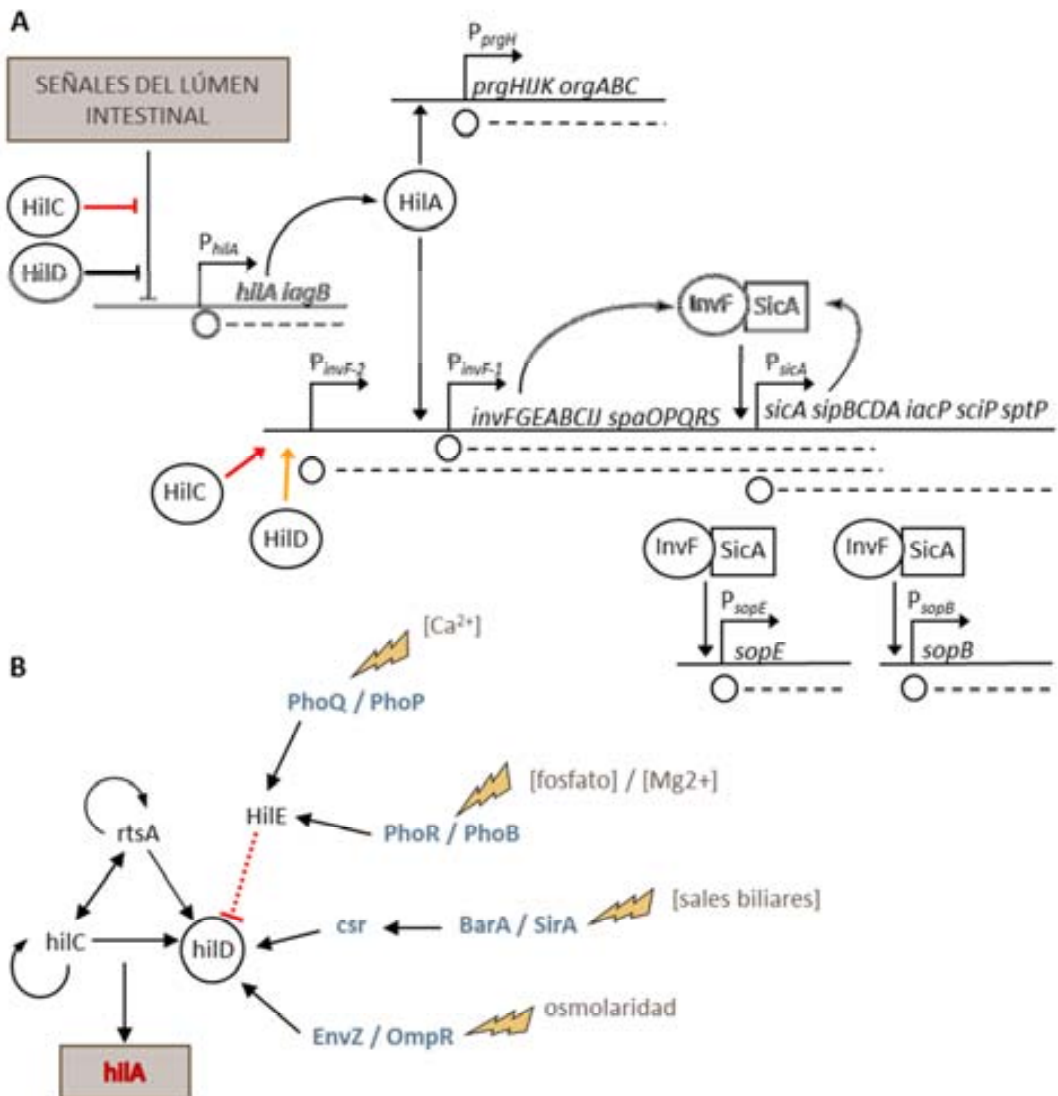


Figura 1.3. Regulación de la expresión de la isla SPI1. **A.** La regulación secuencial por factores codificados en la SPI1 desencadenan la expresión del T3SS1. Cuando las condiciones ambientales son favorables para la expresión de los genes de invasión, HilD desreprime el promotor de *hilA*. Los círculos seguidos de una línea discontinua indican los transcritos de mRNA, las flechas curvadas indican la traducción de una proteína. Las flechas rectas indican que la proteína HilA activa directamente la expresión de genes estructurales como los *prg* y otro gen regulador, *invF*. InvF, formando un complejo con SicA, activa directamente la expresión de varios efectores. HilD también contribuye directamente a la expresión de *invF* (flecha naranja). **B.** Factores ambientales y reguladores globales que controlan la expresión de *hilA*.

A parte de responder a esta complicada cascada de reguladores transcripcionales, la expresión de la SPI1 responde a una gran variedad de parámetros ambientales que conducen a la expresión del T3SS justo en el punto donde la infección es más productiva para la virulencia (Figura 1.3B). El lugar preferido para la invasión es el intestino delgado distal, el íleo⁷², por este motivo las células han adquirido la

capacidad de detectar las condiciones ambientales de esta zona y en consecuencia promover la expresión de los genes para la invasión. El lumen del intestino es anaeróbico, mientras que el borde en cepillo del intestino delgado es considerado microaerófilico, así pues la máxima expresión de los genes de la SPI1 se da en condiciones de bajo nivel de oxígeno⁷²⁻⁷⁴, así como el pH neutro induce la expresión de *hila*⁷³. Se ha descrito que las condiciones de osmolaridad y la concentración de sales biliares afectan a la producción del T3SS1 controlando la expresión del gen *hilD* a través de los sistemas reguladores de dos componentes EnvZ/OmpR y BarA/SirA, respectivamente^{67, 75, 76}. Además, se ha demostrado que las concentraciones de fosfato a través del sistema PhoR/B y las de Mg²⁺ y Ca²⁺, a través del sistema PhoP/Q, también están involucradas en la regulación de la SPI1^{77, 78}. En estos dos últimos casos los sistemas sensores controlan la expresión del represor de la SPI1, HilE, cuyo gen está codificado fuera de esta isla. Se ha sugerido que HilE ejerce su regulación negativa interaccionando directamente con HilD e impidiendo de esta forma que éste active al gen *hila*⁷⁹.

2.2. Fase sistémica de la infección

2.2.1. Supervivencia en las placas de Peyer

Una vez ha accedido al tejido linfático adyacente, *S. Typhimurium* continúa replicándose en las placas de Peyer, esta invasión origina la inflamación de las mismas y la destrucción de las células M⁴⁴. *Salmonella* se encuentra principalmente en las células dendríticas de las placas de Peyer^{80, 81} pero potencialmente puede interaccionar con cualquier tipo celular presente en éstas, como los macrófagos y los neutrófilos que están presentes después del inicio de la infección⁸². El T3SS de la SPI1 ya no se induce en este ambiente y el crecimiento intracelular subsiguiente no requiere este sistema.

2.2.2. Supervivencia dentro de macrófago

Un aspecto importante del crecimiento sistémico es la habilidad de *S. Typhimurium* para residir dentro de macrófago, lo que le permite evadir la respuesta inmune del huésped^{83, 84}. El papel de los neutrófilos en las infecciones de *Salmonella* es más controvertido⁸⁵ y varias líneas apoyan la evidencia de que el macrófago es el primer lugar de replicación durante la infección sistémica^{86, 87}. Durante el crecimiento dentro del macrófago la serovariedad *Typhimurium* se

replica dentro de una vacuola especializada llamada SCV (*salmonella containing vacuole*)⁸⁸.

En una situación normal, los fagocitos matan a las bacterias que han sido fagocitadas usando una batería de sustancias tóxicas. Los fagosomas se fusionan con los lisosomas que contienen enzimas hidrolíticas degradativas, péptidos antimicrobianos y oxidasas dependientes de NADPH que producen superóxido de oxígeno⁸⁹. Los macrófagos activados también producen óxido nítrico generado a partir de arginina y oxígeno a través de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS)⁹⁰. El óxido nítrico puede reaccionar con el superóxido y producir peroxinitrito que es extremadamente tóxico^{90, 91}. Además, en este proceso, se generan otras especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS)⁹¹. *S. Typhimurium* tiene la habilidad de prevenir la inducción y liberación de estas enzimas dentro de la SCV⁹²⁻⁹⁵. Normalmente impide la liberación de la oxidasa dependiente de NADPH bloqueando la fusión del fagosoma con el lisosoma^{95, 96}.

S. Typhimurium posee un segundo T3SS codificado en la SPI2 que es necesario para la translocación de proteínas efectoras desde las bacterias intracelulares a la célula huésped (Tabla I.3)⁹⁷. Aparte de codificar proteínas relacionadas con la reducción de tetrionato y otros genes con función desconocida, esta región de 40 Kb codifica 31 ORFs organizados en dos operones que codifican el aparato de secreción (genes *ssa*), el primero codifica proteínas efectoras y chaperonas (genes *sse* y *ssc*, respectivamente) y el segundo codifica el sistema regulador de dos componentes *SsrAB* (*secretion system regulator*)⁹⁷ (Figura I.4). La expresión de la SPI2 se induce durante el crecimiento dentro de macrófago⁹⁸, en esta situación *ssrAB* se autoinduce (pH < 6)^{99, 100} y además su expresión se activa por el sistema regulador de dos componentes *OmpR/EnvZ*^{100, 101}. Cuando la célula se encuentra a pH bajo (< 6) *ssrAB* se autoinduce y además la expresión se activa (Figura I.4). La función principal de la SPI2 es proteger al patógeno dentro de la SCV de los efectores de la inmunidad innata.

Otros loci también se requieren para la supervivencia y la proliferación dentro de macrófago, como el operón *spv* localizado en el plásmido de virulencia que es necesario para la infección sistémica¹⁰². El regulador transcripcional *SylA* también está implicado en la resistencia al estrés oxidativo, la supervivencia en macrófago y la virulencia en el modelo murino^{103, 104}. Para la resistencia al superóxido del fagocito también es necesaria la superóxido dismutasa periplasmática (*SodC*) que está codificada en el bacteriófago lisogénico *Gifsy-2*¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Un prerrequisito para la supervivencia y la replicación de *Salmonella* dentro de la SCV es la adaptación al

ambiente microbicida y pobre en nutrientes. La limitación de la concentración de purinas, pirimidinas, algunos aminoácidos y Mg^{2+} ¹⁰⁸ hace que un factor de virulencia importante para la supervivencia intracelular sea el sistema de transporte de Mg^{2+} altamente eficiente (MgtBC) codificado en la SPI3 ¹⁰⁹.

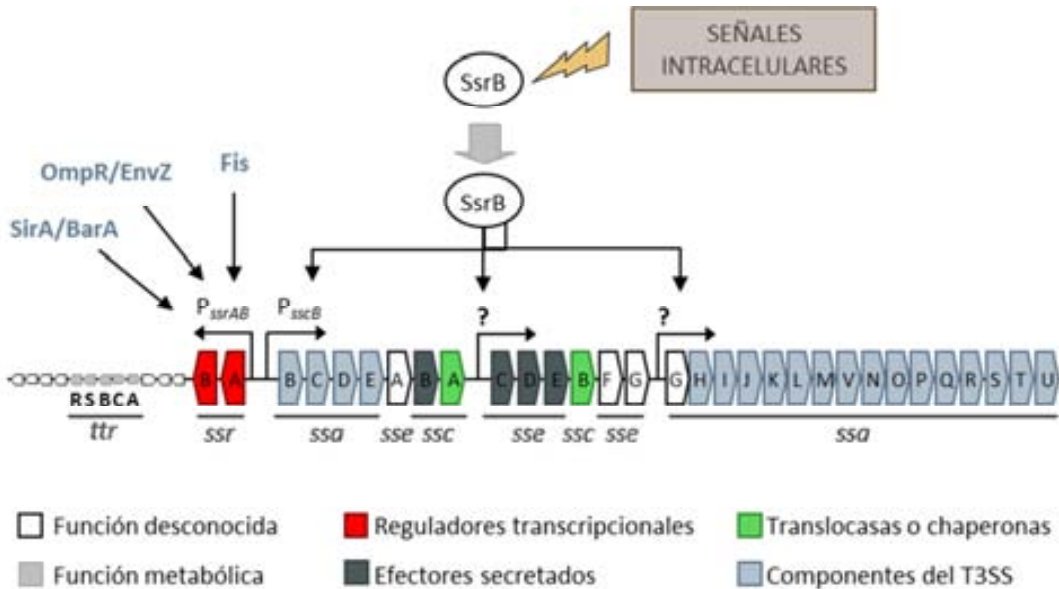


Figura I.4. Genes de la SPI2 y su regulación. Se representan los componentes del T3SS2 codificados en la SPI2 que incluyen subunidades del aparato de secreción tipo III, efectores secretados por el aparato, factores requeridos para la translocación eficiente y reguladores transcripcionales. También se representa la parte de la isla que codifica los genes cuyos productos participan en la reducción a tetratonato (*ttr*). Los promotores principales se representan por flechas, los promotores que no han sido definidos a nivel molecular se indican con un signo de interrogación.

2.2.3. Infección sistémica

Una vez en el interior de las células fagocíticas la bacteria puede (i) seguir en el interior del macrófago y acceder directamente al flujo sanguíneo llegando a hígado y bazo (infección sistémica) ^{14, 110}; (ii) sobrevivir dentro de macrófago y causar una apoptosis (infección local) ²¹; (iii) producir la apoptosis de macrófagos para llegar a los folículos linfáticos de las placas de Peyer ¹¹¹. En éste caso las células bacterianas siguen siendo fagocitadas y neutralizadas por macrófagos, mientras que células presentadoras de antígenos como las células dendríticas activan células B y T ²¹. Finalmente, las bacterias supervivientes salen de los nódulos linfáticos, atraviesan la lámina propia y, a través de vasos sanguíneos, se dispersan vía sistémica ^{14, 56, 110, 112}.

A su llegada a hígado y bazo, la bacteria continúa replicándose y colonizando el hospedador. Varios genes, cuyos productos alteran la estructura del lipopolisacárido (LPS) y promueven la resistencia a polimixina *in vitro*, parecen ayudar a *S. Typhimurium* a resistir a los péptidos catiónicos producidos por los PMN y los macrófagos en los lugares sistémicos^{113, 114}. Además se requieren genes del plásmido de virulencia para la replicación de la bacteria en estos tejidos¹⁰². Mientras prolifera, la bacteria produce lípido A, que a su vez induce citoquinas inflamatorias y respuestas al óxido nítrico que acaban con la muerte del huésped¹¹⁵. Durante la infección, *Salmonella* puede ser reintroducida al intestino delgado a través de la vesícula biliar y ser diseminada así al ambiente para llegar a nuevos hospedadores.

3. Importancia del hierro para los microorganismos

El hierro es un metal de transición que en condiciones fisiológicas existe en uno de los dos estados redox interconvertibles: la forma reducida ferrosa (Fe^{2+}) y la forma oxidada férrica (Fe^{3+}). También puede adoptar diferentes estados *spin* en ambas formas dependiendo del ligando. Así, es capaz de formar complejos con oxígeno, sulfuro y nitrógeno, y estos complejos fácilmente experimentan reacciones ácido-base y de transferencia de electrones. Estas propiedades hacen del hierro un componente prostético muy versátil para ser incorporado en las proteínas como biocatalizador o transportador de electrones. La función biológica del hierro depende completamente de su incorporación en las proteínas, ya sea como una especie mono o binuclear, o de forma más compleja formando parte de clústeres hierro-sulfuro o grupos hemo. Esta inserción en las proteínas permite que el ambiente local esté controlado y así el hierro puede adoptar el potencial redox (de -300 a +700 mV), la geometría y el estado de *spin* necesarios¹¹⁶.

De esta forma, el hierro se convierte en un micronutriente esencial para todos los microorganismos, con la excepción de algunos miembros de la familia *Lactobacillae*, dónde ha sido substituido por otros cationes divalentes como Mg^{2+} o Mn^{2+} ^{117, 118}. Este requerimiento viene dado por la gran variedad de procesos en los cuales las proteínas que contienen hierro participan. Por ejemplo, proteínas con grupos hemo desempeñan un papel fundamental en el transporte de electrones (citocromos), la activación del oxígeno (citocromo oxidasas) y en la reducción del peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (catalasas y peroxidasas). Así mismo, proteínas Fe-sulfuro participan en la biosíntesis de aminoácidos y pirimidinas

(glutamato sintetasa, dihidroorotato deshidrogenasa), en el ciclo del ácido tricarbónico (TCA) (aconitasa, succinato deshidrogenasa) y también en el transporte de electrones (ferredoxina). Igualmente, proteínas que contienen hierro en sus estructuras son necesarias para la síntesis de DNA (ribonucleótido reductasa), la protección frente radicales superóxido (superóxido dismutasa) y la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (3-deoxy-D-arabinoheptulosonic acido 7-fosfato sintasa) ¹⁴.

3.1. Disponibilidad del hierro

A pesar de ser el cuarto elemento más abundante de la Tierra y de necesitarse tan solo en concentraciones micromolares para el crecimiento bacteriano (de 10^{-6} a 10^{-8} M) ¹¹⁹, el hierro no está biológicamente disponible en la mayoría de ambientes ¹²⁰. En huéspedes animales el hierro se encuentra fuertemente unido a proteínas transportadoras como la transferrina y la lactoferrina. En otros ambientes, incluyendo los medios de cultivo de laboratorio, la disponibilidad de hierro se ve afectada por el pH y la concentración de oxígeno. El estado oxidado Fe^{3+} , presente en condiciones aeróbicas forma polímeros de oxi-hidróxido insolubles a pH neutro (10^{-18} M); por el contrario, el Fe^{2+} es relativamente soluble (0.1 M a pH 7) y la obtención de hierro es una tarea más fácil para las células creciendo en anaerobiosis ¹¹⁶.

3.2. El hierro y el estrés oxidativo

Además de la necesidad de mantener una concentración de hierro óptima que permita el crecimiento bacteriano es igualmente importante asegurar que el hierro intracelular se mantenga en concentraciones no tóxicas para la célula. Esto requiere que el hierro celular no interaccione con especies reactivas del oxígeno (EROs), que son producidas como consecuencia del metabolismo aeróbico ¹²¹. Los productos de la reducción del oxígeno, el superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), son solo medianamente reactivos fisiológicamente, pero el hierro puede interactuar con estas especies generando radicales hidroxilo (HO^\bullet) altamente reactivos y dañinos. Las reacciones clave de este proceso son:

- (i) Reducción del hierro

$$\text{O}_2^- + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$$
- (ii) Reacción de Fenton

$$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}^\bullet$$
- (iii) Reacción de Haber-Weiss, (i) + (ii), usando el Fe^{3+} como catalizador

$$\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$$

Estas EROs pueden dañar lípidos, proteínas y DNA por oxidación. En la reacción de Fenton se forma el radical hidroxilo, considerado como el más reactivo en los sistemas biológicos. Su interacción con los ácidos grasos polinsaturados que componen los fosfolípidos de las membranas da lugar a la formación de uniones inusuales entre ellos que producen una disminución de la fluidez de la membrana y llega incluso a causar la lisis de las células.

Así pues, con la aparición del oxígeno en la Tierra se hicieron patentes dos problemas: la producción de EROs y la disminución drástica en la disponibilidad de hierro debido a la baja solubilidad del Fe^{3+} . Se asume que la estricta regulación en la asimilación del hierro previene un exceso de hierro intracelular libre que podría provocar un estrés oxidativo. Además, todos los organismos han desarrollado maneras de protegerse frente las EROs, incluyendo tanto defensas específicas como respuestas globales que permiten a las células sobrevivir períodos de estrés oxidativo. Los dos tipos de protección están regulados y responden a los desafíos oxidativos que se encuentran las células en el ambiente¹²²⁻¹²⁴. Por todo ello, se cree que la estricta regulación del metabolismo del hierro junto con la regulación de las defensas frente el estrés oxidativo son un factor esencial para la vida en presencia de oxígeno.

4. Fuentes de hierro para los microorganismos

4.1. El hierro y la relación huésped-patógeno

Como se ha comentado anteriormente, el hierro es un micronutriente esencial para la vida, tanto para los microorganismos como para los organismos superiores, es por ello que cuando hablamos de microorganismos patógenos se ponen de manifiesto dos caras de la misma moneda y la batalla por el hierro se convierte en un proceso muy importante en las relaciones huésped-patógeno.

4.1.1. Sistemas de los organismos superiores para limitar la concentración de hierro

A lo largo de la evolución, los organismos superiores han desarrollado una serie de mecanismos para dificultar el crecimiento bacteriano. Estos mecanismos de defensa se basan en el sistema inmunitario y en la reducción de la disponibilidad de diversos nutrientes, entre ellos el hierro.

En los vertebrados superiores el hierro es asimilado desde la dieta por las células de la mucosa del yeyuno, pasa al torrente sanguíneo y de aquí es transportado mediante unas proteínas llamadas transferrinas (Tfs). Éstas son proteínas de unión a hierro ubicuas en los vertebrados que pueden ser de tres tipos según su localización: serotransferrina (suero); lactotransferrina (Lf) (fluidos extracelulares) y ovotransferrina (albumen del huevo). Todas ellas tienen una estructura similar, siendo glicoproteínas monoméricas de unos 80 kDa con dos lugares de unión de alta afinidad para el ion férrico ^{125, 126}. Una propiedad importante de las Tfs es que nunca se encuentran saturadas completamente, la cual cosa les otorga un papel de protección como quelantes permitiéndoles eliminar cualquier excedente de hierro que se pueda producir durante la infección y así asegurar la ausencia de hierro libre en circulación ¹²⁷.

El papel principal de las Tfs es aportar hierro a los diferentes tipos celulares para su posterior asimilación a las proteínas. Una vez dentro de la célula eucariota existe una proteína citoplasmática llamada ferritina que se encarga de almacenar hierro. Ésta tiene dos funciones principales, hacer de reservorio en casos de escasez de hierro y proteger a la célula de los efectos tóxicos debidos a la acumulación de este catión cuando está en exceso ¹²⁰.

En resumen, el 99.9% del hierro del organismo (aproximadamente 4 g) está localizado intracelularmente y por ello no está disponible. El hierro intracelular consiste en grupos hemo unidos a la hemoglobina (Hb) (2,67 g), la mioglobina (0,2 g), enzimas hemo (0,008 g), sales férricas insolubles almacenadas en la ferritina (1 g) y hierro unido lábilmente a proteínas (0,07 g) ¹²⁸. Extracelularmente, el plasma humano contiene transferrina, trazas de lactoferritina (de 0,3 a 0,7 mg/l) y algunas proteínas de unión a hemo o hemoglobina. En el plasma se encuentran pequeñas cantidades de Hb (de 5 a 50 mg/ml) debidas a la hemólisis de los glóbulos rojos. Esta Hb libre del plasma es capturada por una glicoproteína heterotetramérica llamada haptoglobina (Hp) que se encarga de transportar dímeros de Hb al hígado. Además el plasma contiene otras proteínas que unen hemo como son la albúmina, la hemopexina (HPX) y algunas lipoproteínas. También encontramos hierro en la superficie de las mucosas que proviene de células epiteliales muertas,

de los alimentos ingeridos y de la menstruación. De media perdemos entre 1 y 2 mg de hierro durante un día mientras que consumimos unos 18 mg, de los cuales solo de un 5 a un 10 % es absorbido ¹²⁹.

Que este proceso de “esconder” el hierro a los microorganismos infecciosos es de vital importancia en la defensa del huésped se ha demostrado por el hecho de que la virulencia de muchos patógenos (*Aeromonas* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp, enterobacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Salmonella* spp.; *Listeria* spp., *Neisseria* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp., y *Yersinia* spp. ²) se ve incrementada al aportar hierro al paciente o cuando existen patologías que producen hiperferremia.

A parte de todos los mecanismos comentados anteriormente, el huésped es capaz de reducir aún más la concentración de hierro extracelular durante un proceso infeccioso. Este fenómeno, conocido como hipoferremia de la infección, se realiza incrementando la síntesis de ferritina en el hígado y la liberación de lactoferrina por parte de los neutrófilos ¹³⁰. Las células del huésped, también responden directamente a los patógenos invasores alterando su estado interno de hierro. Los macrófagos, que son las células principales que secuestran bacterias invasoras como *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania* spp. y *S. Typhimurium*, producen proteínas clave que alteran su propio estado de hierro. Estas proteínas son las Nramp (*Natural resistance-associated macrophage protein*). La Nramp 1 actúa incrementando la captación de hierro por parte del macrófago desde las Tf's cuando éste ha sido activado por la invasión de un patógeno ¹³¹⁻¹³⁵. Este hierro adicional estimula la formación de especies reactivas del oxígeno, creando así un ambiente más hostil para el desarrollo de la bacteria invasora.

4.1.2. Estrategias de los microorganismos para la captación eficiente de hierro desde el huésped

En la otra cara de la moneda tenemos los microorganismos patógenos que, para multiplicarse dentro del huésped, han desarrollado mecanismos para adquirir hierro de las posibles fuentes disponibles (Figura I.5). Estos sistemas consisten básicamente en proteínas de la superficie celular que unen moléculas portadoras de hierro o grupos hemo. En bacterias grampositivas las proteínas de unión específicas están ancladas a la membrana citoplásmica, de aquí las moléculas son transportadas mediante permeasas de tipo ABC. En los organismos gramnegativos, el reconocimiento se lleva a cabo a través de receptores

específicos de la membrana externa desde donde el sustrato es transportado al citoplasma gracias a permeasas de tipo ABC situadas en el periplasma. Según cuál sea la fuente de hierro podemos distinguir dos tipos de mecanismos: directos, que requieren el contacto de la bacteria con la fuente de hierro exógena (normalmente Tf o hemoproteínas) e indirectos, que dependen de compuestos sintetizados y liberados al medio extracelular por parte de los propios microorganismos^{3, 120}.

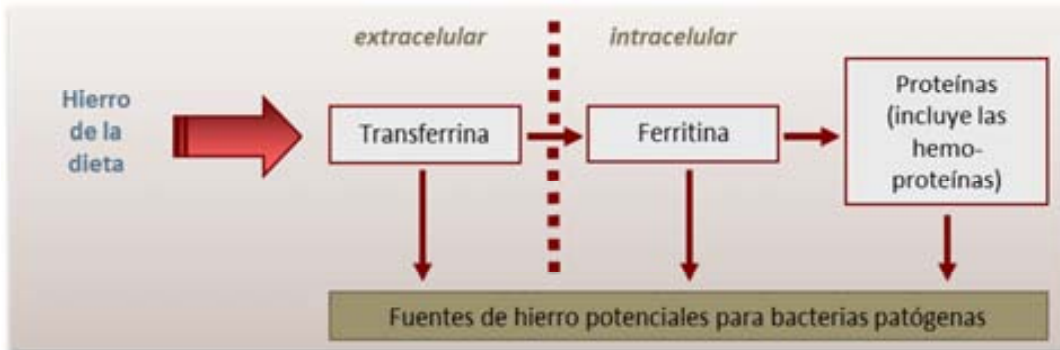


Figura I.5. Principales fuentes de hierro de los animales que pueden ser accesibles para un patógeno bacteriano³.

Como fuentes de hierro directas existen: (i) el Fe^{2+} que está presente en condiciones reductoras (anaerobiosis) o de bajo pH y puede difundir libremente a través de las porinas de la membrana externa de las bacterias gramnegativas y de aquí ser transportado al citoplasma gracias a transportadores específicos; (ii) la transferrina y la lactoferrina que, en situaciones de escasez de hierro, miembros de las familias *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae* pueden asimilar gracias a la producción de complejos proteicos de unión a transferrina (Tbp “Tf-binding protein”) y lactoferrina (Lbp)^{136, 137}; (iii) la ferritina, que aunque no existe ninguna evidencia de que se utilice como fuente de hierro para los microorganismos se ha descrito que la ferritina exógena es reducida por parte de *Listeria monocytogenes*¹³⁸ y que la adición de ferritina hace que cambie la expresión de varios genes en *Pasteurella multocida*¹³⁹, sugiriendo su posible vinculación como fuente donadora de hierro; y (iv) las hemoproteínas que pueden ser captadas por algunos microorganismos como *Haemophilus* spp., *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides* spp., *Legionella* spp., *Bartonella* spp. y algunas micobacterias, incapaces de sintetizar el grupo hemo o que lo requieren en elevadas cantidades para su crecimiento *in vitro*¹²⁰.

Por otro lado existen tres tipos de fuentes de hierro indirectas: (i) los sideróforos, que son unas pequeñas moléculas quelantes de hierro que en respuesta a una

deficiencia de hierro muchas bacterias, como también hongos y plantas monocotiledóneas, sintetizan y secretan al medio. Éstos ayudan a solubilizar el hierro previamente a su transporte ¹²⁸. El poder de unión de los sideróforos con este elemento (preferentemente con el Fe^{3+}) es suficientemente fuerte para secuestrar el hierro unido a moléculas como la ferritina, la Tf o la Lf pero no el de las hemoproteínas ³; (ii) los hemóforos que son proteínas extracelulares especializadas en adquirir hemo de distintas fuentes y transportarlo hasta un receptor de membrana externa específico tan solo descritos en bacterias grampositivas ¹²⁰; y (iii) las reductasas extracelulares y unidas a membrana que aunque ninguna ha sido clonada ni purificada ¹⁴⁰, varios estudios han puesto de manifiesto la existencia de actividad de reductasas extracelulares ¹⁴¹.

Además de estos mecanismos, algunos patógenos producen enzimas que incrementan la eficiencia de estos sistemas. Así, ciertos microorganismos como *Porphyromonas gingivalis* sintetizan proteasas que secretan al medio y degradan las proteínas transportadoras de hierro del huésped ¹⁴². Otras bacterias producen hemolisinas que son secretadas y lisan a los eritrocitos, liberando así su contenido celular muy rico en Hb ¹⁴³.

5. Captación y destino intracelular del hierro en *E. coli* y *Salmonella*

5.1. Mecanismos para la captación de hierro

5.1.1. Captación de Fe^{2+}

En *Salmonella*, las permeasas de metal tipo ABC y los transportadores Nramp-like como son el SitABC i el MntH, respectivamente ^{59, 144}, tienen especificidad para metales divalentes, particularmente para el Fe^{2+} y el Mn^{2+} , aunque están más involucrados en la captación del segundo que no en la del hierro ¹⁴⁵.

En *E. coli* K-12 se describió el primer sistema bacteriano para el transporte específico de Fe^{2+} y fue denominado Feo ¹⁴⁶. Éste sistema está compuesto por tres genes que forman un operón y codifican las proteínas FeoA (de 75 residuos e hidrofílica), FeoB (de 773 residuos con un dominio integrado a la membrana interna que actúa como permeasa) y FeoC (una proteína pequeña de 78 residuos e hidrofílica de función desconocida) ¹⁴⁵. El transporte de Fe^{2+} en *E. coli* se

controla por el regulador global Fnr en anaerobiosis y por el complejo Fur-Fe²⁺ 146 (Figura I.6).

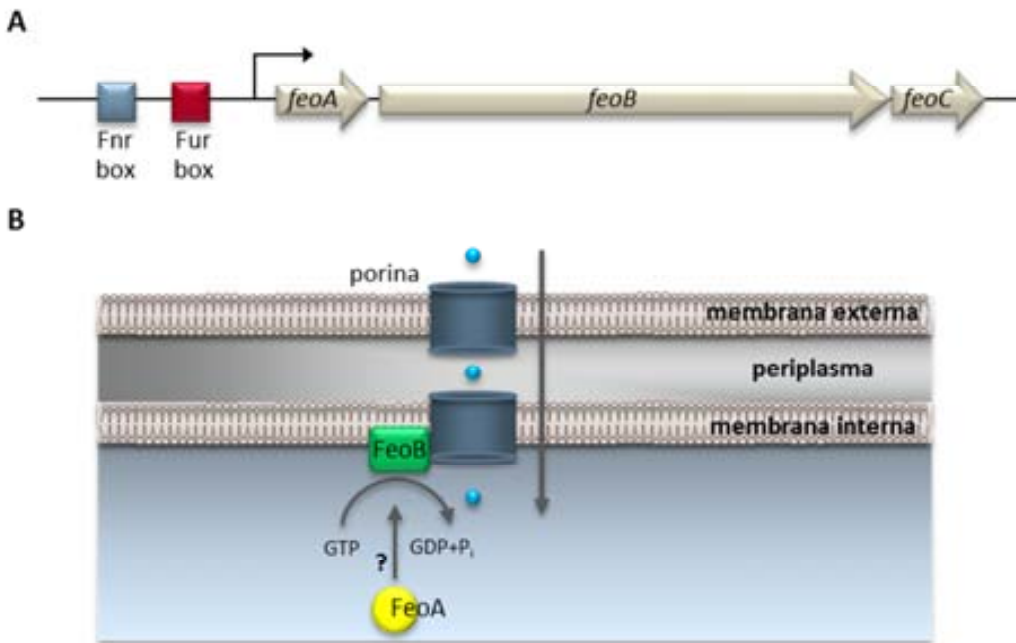


Figura I.6. A. Organización del operón *feoABC* en *E. coli*. B. Captación de Fe²⁺. Representación esquemática de la captación de Fe²⁺ (punto azul) mediante el sistema Feo de *E. coli*. El Fe²⁺ extracelular difunde hacia el periplasma vía las porinas de la membrana externa. Después es introducido a través de la membrana citoplasmática por FeoB, mediante un proceso de transporte activo. Se cree que FeoA es necesaria para activar la función GTPasa de FeoB. 145.

Supuestamente, el sistema Feo juega un papel importante en la captación de hierro bajo las condiciones de anaerobiosis o de microaerofilia que encontramos en el tracto gastrointestinal. Este hecho ha sido confirmado en muchas bacterias que colonizan ambientes de este tipo. Así, mutantes *feo* de *E. coli* y *Salmonella* pierden su habilidad para colonizar el intestino de ratón 147, 148 presuntamente a causa de su incapacidad para transportar el ion ferroso en este ambiente anaeróbico. Por otra parte, en la bacteria microaerofílica *Helicobacter pylori* el sistema Feo parece ser la principal ruta para el transporte de hierro y es esencial para la colonización de la mucosa gástrica 149. En *Shigella flexneri*, la inactivación del gen *feoB* en combinación con mutaciones en otros transportadores de hierro producen deficiencias en su capacidad de crecimiento 150. Finalmente, FeoB también es imprescindible para que *Legionella pneumophila* crezca intracelularmente 151 y para la virulencia de *Porphyromonas gingivalis* 152. Todos

estos datos claramente ponen de manifiesto el papel crucial de Feo en la colonización del intestino y en la virulencia ¹⁴⁵.

5.1.2. Utilización de sistemas de alta afinidad. Los sideróforos

Se han descrito más de 500 sideróforos distintos, producidos tanto por bacterias gramnegativas como grampositivas ¹¹⁶. A pesar del elevado número y variedad la mayoría de ellos poseen un esqueleto peptídico formado por varios aminoácidos no proteicos, incluyendo aminoácidos modificados y D-aminoácidos ¹¹⁶. Los grupos específicos de la molécula que unen hierro pueden ser clasificados según su naturaleza química en hidroxamatos (aerobactina y ferricromo), anillos catecol (enterobactina) e hidroxiaácidos (pioquelina), aunque algunos sideróforos contienen más de un tipo (micobactina) ¹⁵³ (Figura I.7).

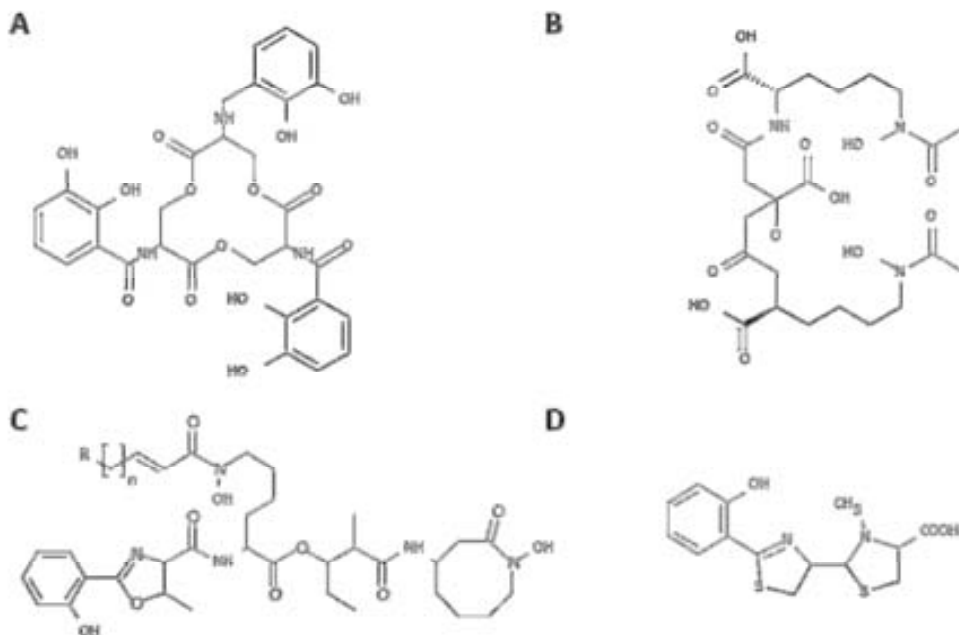


Figura I.7. Estructura de algunos sideróforos. A. Enterobactina. B. Aerobactina. C. Micobactina. D. Pioquelina

Cuando las células crecen en presencia de bajas concentraciones de hierro la biosíntesis de sideróforos se incrementa ^{116, 120}. Para evitar los posibles daños que el quelante podría producir en el citosol, justo después de su síntesis los sideróforos son secretados al exterior de forma activa por la célula a través de la membrana citoplasmática ¹²⁸. Una vez el sideróforo interacciona con hierro en el exterior forma el complejo Fe^{3+} -sideróforo que es reconocido en la superficie celular por receptores específicos de la membrana. La internalización es de todo

el complejo Fe^{3+} -sideróforo, aunque en algunos casos como en *Mycobacterium tuberculosis*, existe una transferencia del hierro entre distintos sideróforos antes de su llegada al citoplasma ¹¹⁶. Una vez en el interior, los complejos son disociados por reducción y tan pronto como el hierro es incorporado por el patógeno la concentración intracelular de éste se incrementa y en consecuencia se reprime la síntesis de los sideróforos ³ (Figura I.8).

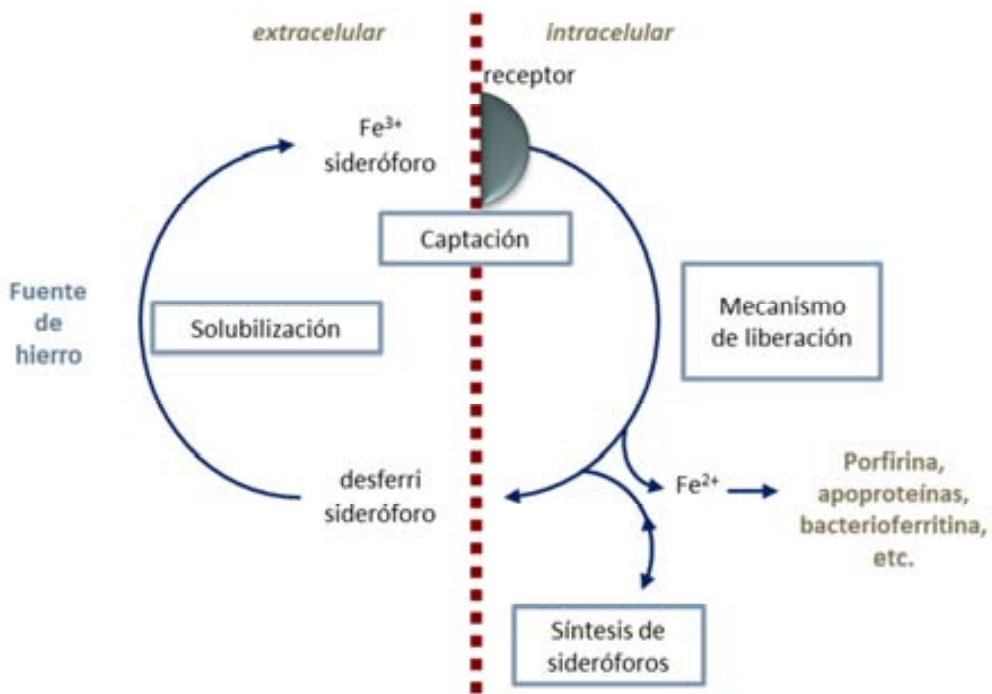


Figura I.8. Transporte mediante sideróforos. En respuesta a una deficiencia de hierro, la célula sintetiza sideróforos. Estos son secretados por el organismo al exterior y solubilizan el hierro de una gran variedad de fuentes. El complejo Fe^{3+} -sideróforo es transportado de nuevo al interior de la bacteria mediante un receptor de membrana. Aquí el hierro es reducido a Fe^{2+} que puede ser incorporado a diversas proteínas para que las funciones celulares continúen. El desferri-sideróforo es libre de recircular para la asimilación de más hierro. ³

5.1.2.1. Sideróforos utilizados por bacterias entéricas

La mayoría de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* sintetizan el sideróforo catecolado enterobactina (Ent), también llamada enteroquelina. Ésta se sintetiza a partir del ácido corísmico a través de una serie de reacciones que requieren 6 enzimas distintos. Los genes para la biosíntesis de Ent (*entA-F*), su transporte

(*fepA-G*) y la liberación del hierro del complejo Fe-Ent (*fep*) se encuentran organizados en seis operones que forman un clúster. La ruta de síntesis se divide en dos partes: la conversión de corismato a ácido dihidroxibenzoico (DHB), que requiere las enzimas EntC, EntB y EntA; y la síntesis de Ent a partir de DHB y serina, pasando por la síntesis de la molécula de dihidroxibenzoilserina (DSB), llevada a cabo por los productos génicos de *entD*, *entE*, *entF* y *entB/G*¹²⁸ (Figura I.9).

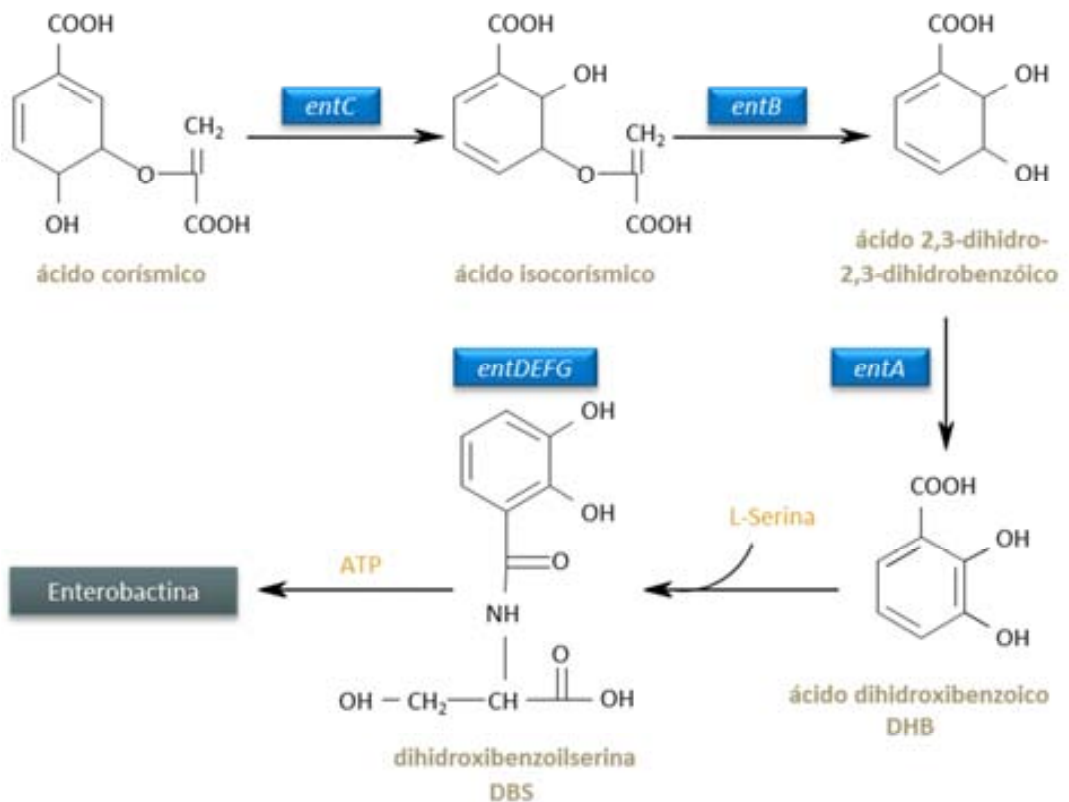


Figura I.9. Biosíntesis de enterobactina. Se indican los genes de los enzimas clave: isocorismato sintasa (*entC*), isocorismato piruvato-hidrolasa (*entB*), 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa (*entA*) y enterobactina sintetasa (*entDEFG*).¹²⁸.

A parte de la enterobactina, muchas cepas patógenas de *E. coli*, *S. flexneri* y *Klebsiella pneumoniae* producen un segundo sideróforo llamado aerobactina^{2, 154}. Ésta es una molécula del tipo hidroxamato que consiste en dos lisinas modificadas unidas al citrato por un enlace amida¹²⁸ (Figura I.7B). Su síntesis se lleva a cabo por los productos de 4 genes (*iucABCD*) que por otra parte no se encuentran en muchas cepas de *Salmonella* spp. En algunos casos la producción de los dos sideróforos (ent y aer) se explica por qué la primera se utiliza para la obtención de hierro a partir de la Tf mientras que la segunda permite la captación de hierro

preferentemente de la ferritina del interior de los macrófagos u otras células del hospedador ¹⁵⁵.

Descubierta por primera vez en *Salmonella* ¹⁵⁶, la salmoquelina (Figura I.10A) es una enterobactina C-glucosilada que también sintetizan algunas cepas de *E. coli* y *Klebsiella* ¹⁵⁷. La salmoquelina fue el primer sideróforo glucosilado descrito y esta modificación se ha interpretado como un mecanismo bacteriano de evasión de la proteína de mamíferos siderocalina (NGAL-lipocalina), que se une a sideróforos catecolados ¹⁵⁸. Los genes para la producción, liberación y transporte de la salmoquelina están localizados en el clúster *iroA* (Figura I.10B) que consiste en dos operones convergentes, *iroN* e *iroBCDE* ^{156, 159, 160}. *IroN* es el receptor de membrana externa, mientras que el segundo operón codifica la glucosiltransferasa (*IroB*), una proteína que exporta la salmoquelina al exterior (*IroC*), la esterasa que rompe la Fe^{3+} -salmoquelina para la liberación del hierro (*IroD*) y otra esterasa localizada en el periplasma que degrada la Fe^{3+} -salmoquelina cíclica a la forma lineal (*IroE*) ¹⁵⁷ (Figura I.10C).

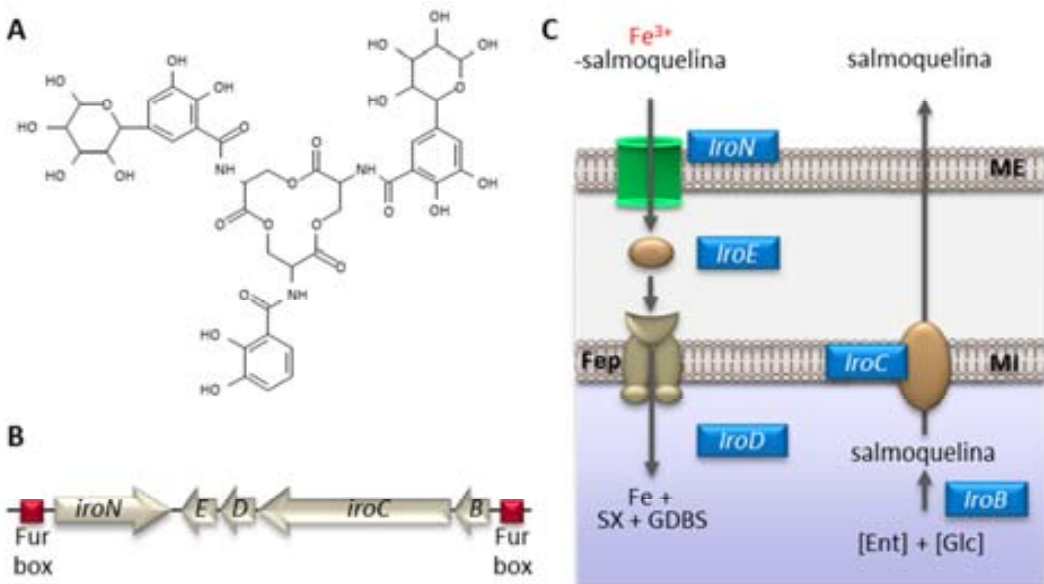


Figura I.10. Salmoquelina. A. Estructura de la salmoquelina S4. B. Clúster *iroA*. C. Modelo de síntesis y captación de la salmoquelina.

Además, como muchos otros microorganismos, *E. coli* y *S. Typhimurium* pueden utilizar sideróforos producidos por otras bacterias y hongos llamados xenosideróforos ¹⁶¹. Algunos ejemplos son el ferricromo, el coprógeno, el ácido rodotorúlico y la ferrioxamina ^{2, 162}. Finalmente, existen otras moléculas que no

pueden ser definidas como sideróforos pero son capaces de proveer hierro a la célula bacteriana, como el citrato, la DHB o la DSB ¹²⁸.

5.1.2.2. Reconocimiento en la superficie celular y transporte a través de la membrana externa

Las bacterias normalmente poseen múltiples receptores de membrana externa, cada uno con especificidad para diferentes Fe^{3+} -sideróforos. Por ejemplo, *E. coli* K-12 posee al menos 6 receptores (FhuE, FhuA, FecA, FepA, Fiu y Cir) que permiten la adquisición de 8 complejos Fe^{3+} -sideróforo distintos. Además *Salmonella* posee el receptor IronN, involucrado en el transporte de salmoquelina y otros sideróforos catecolados ¹⁵⁶ (Figura I.11).

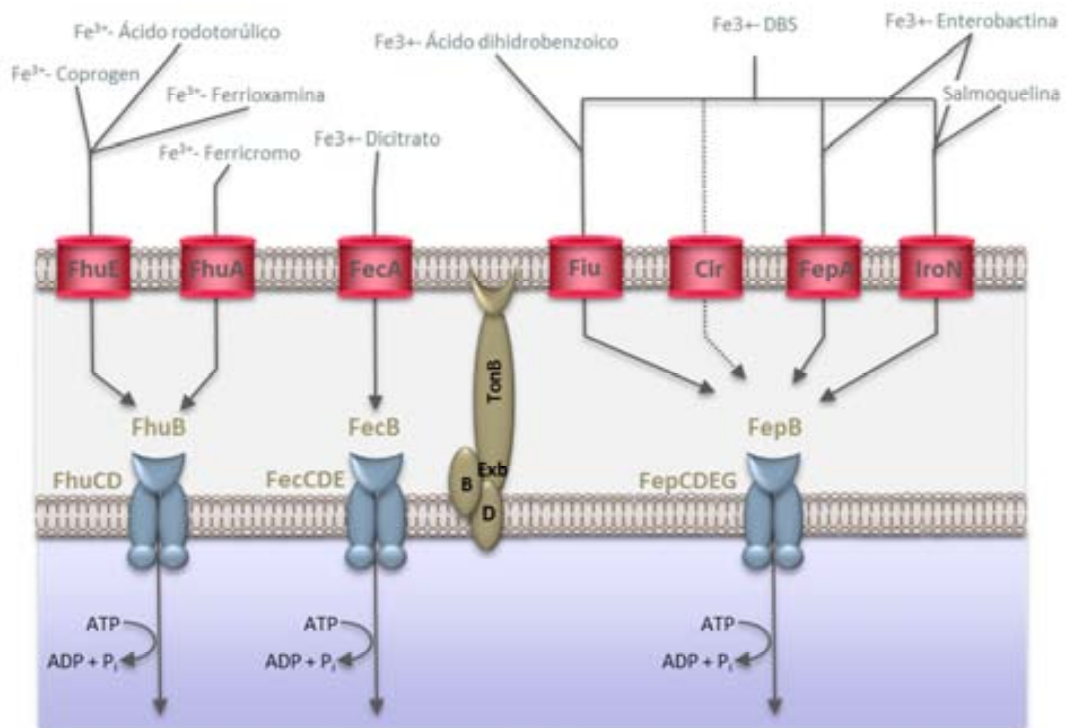


Figura I.11. Representación esquemática de los sistemas de captación de hierro mediante sideróforos en *E. coli* K-12. El complejo TonB-ExbB-ExbD interacciona con todos los receptores de membrana mostrados. Se incluye en la figura, el receptor de *S. enterica* IronN para la salmoquelina, a diferencia de *E. coli* esta especie no posee el receptor Fiu. ¹¹⁶.

Una vez reconocidos por los receptores, los sideróforos cargados con hierro deben ser transportados a través de la membrana externa hacia el espacio periplásmico. Este proceso requiere energía que se obtiene del gradiente electroquímico de la membrana citoplásmica y es transducida por el complejo

proteico TonB-ExbB-ExbD^{163, 164}. En *E. coli*, el proceso de transducción requiere un contacto directo entre la proteína periplasmática TonB y el receptor de membrana externa. Esta interacción se da a través de un segmento hidrofóbico de 7 aminoácidos llamado caja TonB que está situada en la parte N-terminal de los receptores de membrana dependientes de TonB¹⁶⁵. Ancladas en la membrana citoplasmática, ExbB y ExbD, utilizan el gradiente electroquímico de membrana para producir una forma activa de TonB que media un cambio conformacional del receptor unido a esta, permitiendo la translocación del Fe³⁺-sideróforo asociado hasta el periplasma¹⁶⁶⁻¹⁶⁹.

5.1.2.3. Transporte a través del periplasma y la membrana citoplasmática

El transporte de los Fe³⁺-sideróforos hacia el citoplasma de las bacterias gramnegativas se facilita gracias a un sistema de transporte dependiente de proteínas de unión periplasmáticas. Éstas actúan como intercambiadores, puesto que recogen el Fe³⁺-sideróforo liberado del receptor de membrana externa y lo envían a una permeasa de la membrana interna. Los complejos permeasa ABC están compuestos por cuatro módulos: 2 permeasas integrales de membrana que pueden ser dos subunidades independientes (ej. FepD y FepG), dos copias de la misma subunidad (ej. captación de hemo) o una subunidad grande (ej. FhuB); y dos módulos ABC con motivos de unión a ATP localizados en la superficie interna de la membrana citoplasmática, que generalmente están compuestos por dos subunidades idénticas¹¹⁶.

Cabe mencionar que los receptores de membrana externa tienen una mayor especificidad que las proteínas de unión dependientes de sistemas ABC, *E. coli* K-12 posee seis receptores de membrana externa para el hierro y solo tres sistemas tipo ABC asociados (Figura I.11).

5.2. El destino intracelular del hierro

5.2.1. Metabolismo de los sideróforos

Una vez dentro de la célula, el complejo Fe³⁺-sideróforo tiene que disociarse para liberar el hierro y éste ser usado en el metabolismo celular. El proceso por el cual se lleva a cabo no está demasiado claro y parece depender del tipo de sideróforo. Así pues, se ha sugerido que la enterobactina y el desferricromo actuarían una vez modificados a una forma menos activa, mientras que la aerobactina puede ser reutilizada hasta tres veces en algunas condiciones¹⁴.

Se han propuesto dos procesos para la liberación del hierro de los sideróforos. El primero implica la reducción del hierro asociado al sideróforo dando lugar a una disociación del hierro debido a la menor afinidad de los sideróforos por el hierro ferroso. Se han identificado varios enzimas intracelulares con actividad férrico-reductasa en bacterias (ej. enzima flavina-reductasa, sulfito-reductasa, flavo-hemoglobina), pero no existe ninguna evidencia que indique que estos enzimas tengan un papel importante en el metabolismo del hierro ¹⁷⁰. A parte de estos donadores de electrones intracelulares, existen reductasas específicas para sideróforos. Una férrico reductasa potencial de *E. coli* es la proteína FhuF, que posee un complejo hierro-sulfuro inusual que podría estar involucrado en la reducción del hierro ¹⁷¹. En estos casos, una vez descargado, el sideróforo vacío puede ser reciclado. El segundo mecanismo implica la hidrólisis del sideróforo por lo que éste no es reciclado como tal. La enzima mejor caracterizada con una función catalítica de los sideróforos es la esterasa de la enterobactina Fes de *E. coli*. El gen *fes* se sitúa en el clúster de genes *ent-fec*, involucrados en la síntesis, exportación y captación de la enterobactina ^{128, 172}. La esterasa hidroliza los enlaces éster de la FeEnt internalizada produciendo DBS, que como se ha citado anteriormente puede funcionar como sideróforo secundario ^{128, 173, 174}.

5.2.2. Almacenamiento de hierro

El hierro extracelular no es la única fuente de este elemento disponible para las bacterias sino que además éstas poseen reservas de hierro intracelular depositadas en proteínas de almacenamiento de hierro ¹⁷⁵. Estos “almacenes” de hierro pueden ser usados para promover el crecimiento cuando las fuentes de hierro externas son restringidas. Se han descrito tres tipos de proteínas que almacenan hierro en las bacterias: las ferritinas (también en eucariotas), las bacterioferritinas que contienen hemo (eubacterias) y las pequeñas proteínas Dps (solo en procariontes). Los tres tipos pueden encontrarse en una misma bacteria. A pesar de que estas tres proteínas forman parte de familias proteicas distintas y distantes desde el punto de vista evolutivo, retienen muchas similitudes funcionales y estructurales. Están compuestas de 24 (ferritinas y bacterioferritinas) o 12 (proteínas Dps) subunidades idénticas o similares que se ensamblan para formar un caparazón proteico más o menos esférico que envuelve la cavidad central que actúa de reservorio de hierro (Figura I.12). Las ferritinas y bacterioferritinas, de aproximadamente 500 kDa, pueden acomodar de 2.000 a 3.000 átomos de hierro, mientras que las proteínas Dps más pequeñas

(~250 kDa) tienen una capacidad de almacenamiento menor, de más o menos 500 átomos de hierro.

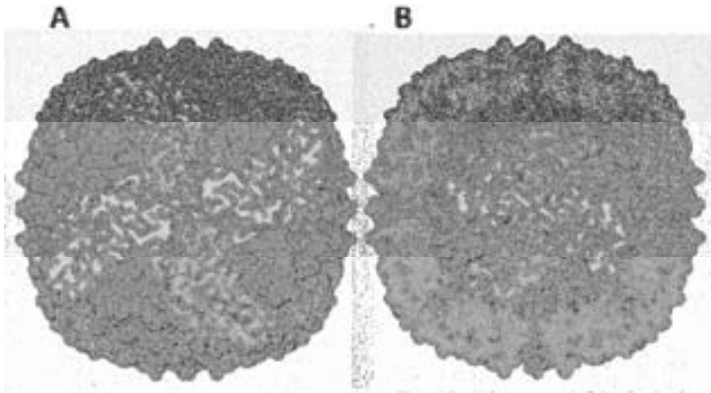


Figura I.12. Ferritina. Superficie externa (A) e interna (B) de la molécula de ferritina. Se muestra el agujero central donde el hierro es secuestrado. Imagen obtenida del Research Collaboratory for Structural Bioinformatics and Protein Data Bank ¹⁷⁶.

La primera proteína Dps fue descrita en *E. coli* como una proteína no específica de unión al DNA protegiéndolo del estrés redox ¹⁷⁷. Estudios más recientes demuestran que esta Dps también puede almacenar hierro, aunque su oxidante de elección es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) antes que el oxígeno ¹⁷⁸. Esto demuestra que el principal papel de la Dps en *E. coli* es proteger el DNA de la producción de radicales libres hidroxilo a partir de hierro ferroso y H_2O_2 ¹⁷⁸.

La ferritina A (FtnA) de *E. coli* tiene la función de acumular hierro durante el crecimiento post-exponencial en presencia de un exceso de hierro para usarlo como fuente intracelular de hierro cuando la concentración de éste sea deficiente. Aunque las bacterioferritinas (Bfr) son más comunes que las ferritinas en las bacterias, su papel fisiológico está menos claro. Todas las bacterioferritinas conocidas contienen normalmente 12 grupos hemo. La función de éstos no está muy clara, pero se sugiere que están involucrados en la liberación de hierro de la Bfr facilitando su reducción ¹⁷⁹. Muchos genes *bfr* están asociados con otro gen que codifica una ferredoxina llamada Bfd (“Bfr-associated-ferredoxin”). La Bfd de *E. coli* incrementa su concentración en condiciones de escasez de hierro e interacciona específicamente con la Bfr mediando la liberación de hierro de ésta

6. Mecanismos para el control de la homeóstasis del hierro

Como ya se ha visto hasta el momento, las bacterias poseen multitud de sistemas relacionados con la importación de hierro. Por otra parte, debido a la toxicidad que comportan elevadas concentraciones de hierro en el citoplasma celular y teniendo en cuenta que en bacterias no se han descrito bombas de excreción para este elemento ³, una forma de controlar su homeóstasis intracelular es la regulación de los mecanismos de captación a través de la membrana. Así pues, las bacterias regulan no solo la incorporación sino también el metabolismo del hierro en general, en respuesta a la disponibilidad de hierro en el medio extracelular.

Un mecanismo para el control de la homeóstasis del hierro es la presencia o ausencia de éste. El Fe^{3+} es tóxico para varias bacterias gramnegativas (*E. coli*, *S. enterica* y *K. pneumoniae*) debido a un proceso independiente de oxígeno. La presencia de elevadas concentraciones extracelulares de Fe^{3+} se detecta por un sistema sensor-regulador de dos componentes, PmrA/PmrB en *S. enterica*. El sensor de membrana histidina quinasa PmrB interacciona con el Fe^{3+} y fosforila el regulador PmrA, que induce genes involucrados en la modificación del lipopolisacárido ¹⁸². De esta forma *Salmonella* previene la actividad antimicrobiana del Fe^{3+} ¹⁸³. En mamíferos, la regulación del hierro se consigue a nivel postraduccional a través de las proteínas reguladoras del hierro (IRP1 e IRP2). En condiciones de hierro abundante, IRP1 funciona como una aconitasa (un enzima del ciclo TCA) citosólica que contiene un complejo [4Fe-4S]. Cuando los niveles de hierro son bajos ésta pierde el complejo hierro-sulfuro y ya no funciona como aconitasa. En su lugar, la apo-aconitasa actúa como una proteína de unión a mRNA que reconoce específicamente un elemento de hierro regulador IRE (*iron regulador element*) en el mRNA de los genes relevantes (ej. ferritina, receptor de transferrina). Su unión puede inhibir la traducción o estabilizar el mensajero, dependiendo de la posición del IRE en el transcrito. Hay evidencias de que algunas aconitasas bacterianas funcionan de una manera parecida. En un sistema *in vitro* en *E. coli*, la aconitasa A libre de [4Fe-4S] se une al transcrito de la aconitasa A y lo estabiliza, dando lugar a un incremento de su actividad ¹⁸⁴. Además se ha comprobado también la actividad reguladora de las aconitasas de *B. subtilis* y *Xanthomonas campestris* ^{185, 186}.

Otro mecanismo de regulación viene dado por la presencia de la fuente de hierro o hemo específica. Como se ha comentado con anterioridad, la mayoría de bacterias tienen varios sistemas para la captación de hierro tanto de fuentes endógenas como heterólogas. Sería malbaratar energía si se indujeran todos los sistemas de adquisición en respuesta a una limitación de hierro con independencia de la naturaleza de la fuente de hierro disponible. Varios sideróforos se unen a proteínas tipo AraC en el citoplasma y regulan positivamente los genes para su propia biosíntesis y captación. Otros sistemas son regulados por las concentraciones periplasmáticas o extracelulares de la fuente de hierro vía sistemas reguladores de dos componentes con un sensor unido a la membrana que interacciona con el sideróforo y fosforila la proteína reguladora¹⁸⁷. Un tercer mecanismo de regulación implica factores sigma específicos con funciones extracitoplasmáticas (ECF) que normalmente se encuentran asociados con factores antisigma unidos a membrana. Una señal extracitoplasmática libera al ECF de la inhibición por el antisigma de manera que puede haber transcripción de los operones diana¹⁸⁸.

Por último la homeóstasis del hierro puede ser controlada por diversos reguladores transcripcionales que, en la mayor parte de los procariontes, pertenecen a dos familias de proteínas represoras dependientes del hierro conocidas como Fur (*ferric uptake regulator*) y DtxR (*diphtheria toxin represor*). La familia de reguladores Fur está formada por un gran número de proteínas homólogas con actividad de unión a DNA implicadas en diversas funciones celulares. De acuerdo a su papel se han definido distintas subclases de proteínas que pueden agruparse en aquellas que responden a los niveles de ciertos metales en célula como hierro (Fur), manganeso (Mur), zinc (Zur) o níquel (Nur), y aquellas que responden a estímulos diferentes como la concentración de peróxidos (PerR) o la disponibilidad de hemo (Irr)¹⁸⁹. Entre las proteínas que responden a los niveles de metales en la célula, la subclase principal es Fur. Éste, del que hablaremos más extensamente en sucesivos apartados, es el regulador más destacado de la respuesta a los niveles de hierro en la mayoría de los microorganismos, tanto en bacterias grampositivas y gramnegativas, como en cianobacterias unicelulares y filamentosas.

Por otro lado, la proteína DtxR se ha descrito en bacterias grampositivas con un alto contenido en GC aunque ha recibido distintos nombres en función del organismo donde se ha encontrado (IdeR en *Mycobacterium*^{190, 191} o SirR en *Staphylococcus*¹⁹²). DtxR, al igual que Fur, es un regulador de la respuesta al estrés férrico que interviene en el control de la expresión de la toxina de la difteria

(tox), de proteínas implicadas en la captura de hierro y de la hemoxigenasa (*hmuO*) en *Corynebacterium diphtheriae*^{193, 194}.

Fur y DtxR no son proteínas homólogas y a nivel de secuencia primaria no muestran similitudes¹⁹⁵. Sin embargo ambas desempeñan la misma función actuando como represores. La capacidad de interacción con el DNA se limita a cuando en su estructura contienen hierro, entonces reconocen secuencias palindrómicas situadas en la región promotora de los genes que regulan.

7. La proteína Fur (Ferric Uptake Regulator)

A finales de los años 70 se describió por primera vez la existencia de una cepa de *S. Typhimurium* portadora de una mutación que le permitía expresar de manera constitutiva genes cuya expresión estaba asociada únicamente al estrés férrico en la cepa salvaje. Esto sugería que la mutación afectaba a un gen responsable de la regulación de dichos genes en respuesta a los niveles de hierro extracelulares. A este gen se le denominó *fur* (*ferric uptake regulator*)¹⁹⁶. No fue hasta principios de los años 80 cuando finalmente se clonó e identificó el gen *fur* aislando mutantes de *E. coli* con un comportamiento similar^{4, 197, 198}.

Se han descrito homólogos de Fur en bacterias grampositivas como *B. subtilis*¹⁹⁹ y en bacterias gramnegativas que incluyen a varios patógenos humanos importantes como *Salmonella*¹⁹⁶, *Mycobacterium*²⁰⁰ o *Vibrio*²⁰¹ entre otros, e incluso en patógenos de plantas como *Erwinia chrysanthemi*²⁰². También se ha identificado en cianobacterias unicelulares y filamentosas como *Synechococcus*²⁰³ o *Anabaena* y en arqueobacterias como *Archaeoglobus fulgidus*²⁰⁴ o *Thermoplasma volcanium*²⁰⁵.

7.1. Características bioquímicas y estructurales de la proteína Fur

La proteína Fur de *E. coli* es un homodímero formado por dos subunidades de 17 kDa²⁰⁶. Descrita como un represor de los sistemas de transporte de hierro en respuesta a la concentración de este elemento^{197, 207, 208}, generalmente actúa a través de un sistema de regulación negativa por represión, reprimiendo la transcripción después de la interacción con su co-represor, el Fe²⁺.

Concretamente, Fur une un ion ferroso por subunidad aunque *in vitro*, la unión con otros cationes divalentes (Zn²⁺, Co²⁺ y Mn²⁺) puede inducir también la interacción de dicha proteína con el DNA. Del mismo modo también se ha sugerido que une hemo²⁰⁹, aunque la razón fisiológica de este hecho no está muy

clara. Por razones de conveniencia, la mayoría de estudios *in vitro* utilizan Mn^{2+} como co-represor, ya que a diferencia del Fe^{2+} , éste es mucho más estable en condiciones de aerobiosis¹⁸⁹. La comparación de las constantes de unión de cada metal con sus niveles intracelulares estimados sugiere que sólo el Fe^{2+} (y puede que el Mn^{2+}) está presente en un nivel suficiente *in vivo* para afectar la represión en el ambiente reductor del citosol^{210, 211}. La ocupación del sitio regulador de unión al metal altera la conformación de la proteína de manera que la afinidad de Fur por su sitio de unión en el DNA aumenta aproximadamente 10.000 veces²⁰⁹.

Así pues, la proteína Fur de *E. coli* contiene un sitio regulador para detectar Fe^{2+} y, como muchos miembros de la familia Fur, un ion Zn^{2+} estructural fuertemente unido, necesario para el plegamiento adecuado de la proteína^{212, 213}. El plegamiento de la proteína da lugar a dos dominios: el N-terminal de unión al DNA con un motivo *helix-turn-helix* y el dominio C-terminal rico en residuos de His, que facilita la interacción proteína-proteína indispensable para la dimerización²¹⁴. La publicación de la estructura cristalográfica de la proteína Fur de *P. aeruginosa* aportó la primera imagen detallada de los sitios de unión a metal²¹⁵ (Figura I.13), uno de ellos está localizado en el dominio de dimerización y el segundo conecta el dominio de unión al DNA con el dominio de dimerización.

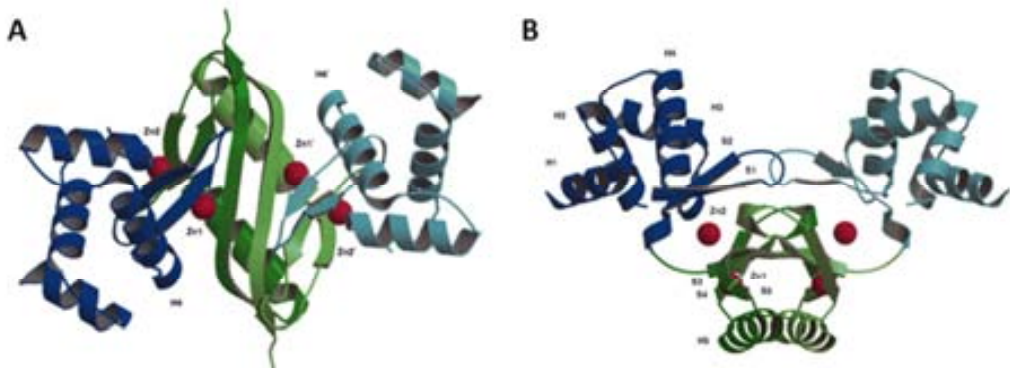


Figura I.13. Diagrama de la estructura cristalográfica del dímero de Fur de *P. aeruginosa* con los elementos secundarios anotados (A) y vista perpendicular de la misma (B). Los dominios de unión al DNA están representados en azul y el dominio de dimerización en verde.²¹⁵

Dado el papel crítico de Fur como sensor intracelular de los niveles de hierro, esta proteína es sorprendentemente tolerante a las mutaciones de sus ligandos a metal. Estudios de mutagénesis en los residuos Cys e His de la proteína Fur de *E. coli* demuestran que sólo 3 residuos son críticos para su función *in vivo*²¹⁶. Dos de ellos son los ligandos del Zn^{2+} estructural (C_{92} y C_{95}) y el tercero (H_{32}) corresponde a un ligando del segundo sitio. Para interpretar estos resultados es importante

tener en cuenta el papel biológico de Fur como regulador central en la homeóstasis del hierro. Si una mutación debilita, pero no elimina completamente la afinidad de Fur por el hierro, la célula mutante resultante simplemente acumulará niveles más altos de hierro intracelular¹⁸⁹.

7.2. Mecanismos de acción de la proteína Fur

La concentración de la proteína Fur en la célula es sorprendentemente alta respecto a la de otros reguladores génicos. La mayoría de los represores se caracterizan por ser poco abundantes, por ejemplo LacI con 10-20 moléculas/célula²¹⁷ o el represor Trp con 50-300 copias²¹⁸. En cambio, en *E. coli* existen 5.000 copias/célula de Fur durante la fase exponencial del crecimiento, llegando hasta las 10.000 copias durante la fase estacionaria²¹⁹. También se encuentran niveles similares de proteína Fur en *V. cholerae* (de 2500 a 7500 copias)²²⁰. La razón de estos niveles tan elevados es incierta, pero la tendencia de Fur a polimerizarse a lo largo del dúplex de DNA, la gran cantidad de genes que regula Fur (más de 90 en *E. coli*) o la posible función de tampón para el ion ferroso, hace pensar que la necesidad real de ésta proteína sea mayor.

7.2.1. Represión génica e interacción con el DNA

El modelo más habitual propone que la proteína Fur es un apo-represor que requiere la unión del ion metálico co-represor Fe^{2+} . El complejo Fur- Fe^{2+} en forma de dímero se une a determinadas regiones del DNA situadas en la región promotora denominadas cajas Fur (*iron box* o *Fur box*) que normalmente se encuentran entre las regiones -35 y -10 de los genes regulados por hierro. Cuando hay Fe^{2+} , Fur se une a dichas regiones de manera que impide el acceso físico de la RNA polimerasa y con ello la transcripción de los genes. Por el contrario, en condiciones de baja disponibilidad de hierro, Fur en forma de apo-proteína no es capaz de unirse a sus secuencias diana, permitiendo que la RNA polimerasa lleve a cabo la transcripción (Figura I.14).

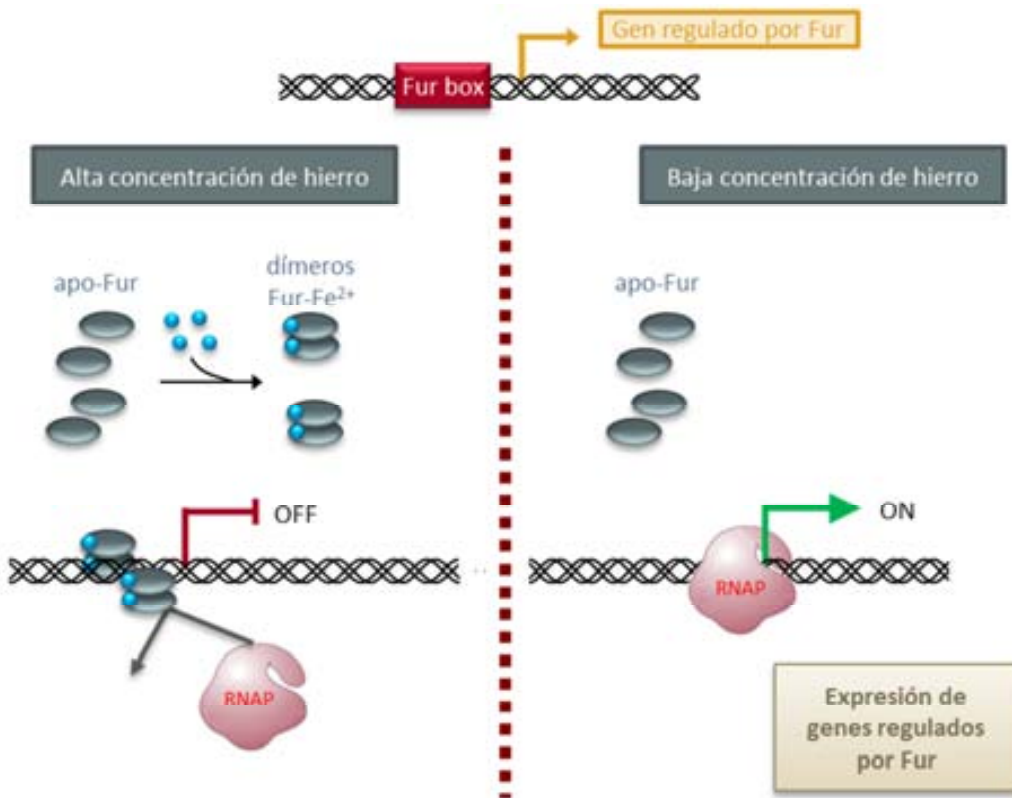


Figura I.14. Representación esquemática de la represión génica llevada a cabo por Fur. A medida que el hierro se encuentra disponible para la célula bacteriana, el cofactor Fe^{2+} se une a los monómeros apo-Fur y éstos nuevos monómeros Fur- Fe^{2+} dimerizan. Los dímeros Fur- Fe^{2+} reprimen la transcripción uniéndose a la caja Fur de los genes diana, bloqueando de esta forma la unión de la RNA polimerasa. Adaptado de ¹.

A pesar del gran número de estudios realizados para determinar la secuencia consenso de unión de la proteína Fur al DNA ²²¹⁻²²³, no puede definirse una secuencia universal reconocida por todas las proteínas Fur. No obstante, estos estudios han permitido extrapolar una secuencia que parece repetirse en la mayoría de los casos, definida como una secuencia palindrómica rica en A y T (Figura I.15).

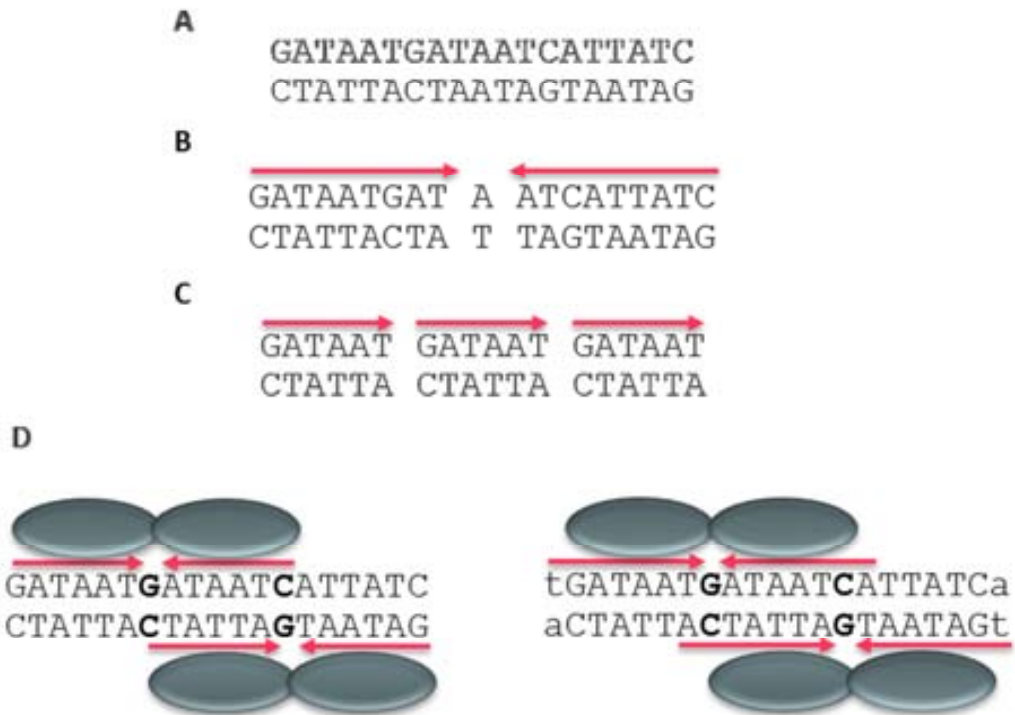


Figura I.15. Sitio de unión de Fur. **A.** Secuencia consenso de 19 pb del sitio de unión de Fur en *E. coli*. **B.** Modelo de unión clásico. Se muestra cada monómero uniéndose a una secuencia de 9 pb repetida e invertida (señalada con flechas), con un par de bases A:T en medio. **C.** Modelo hexamérico. La unidad de reconocimiento es la secuencia 5'-GATAAT-3'. No está claro como el Fur se une a esta secuencia, se ha sugerido que cada hexámero es reconocido por un solo dímero. **D.** Modelo de unión con dímeros solapados. Cada monómero se une a un hexámero invertido, se requerían dos dímeros para unirse a la secuencia consenso de 19 pb. Los pares de bases C:G espaciadores se han marcado en negrita. A la derecha se muestra el modelo 7-1-7 descrito para *B. subtilis*²²².

Ensayos de protección del DNA con la proteína Fur de *E. coli* frente a la digestión con la DNasa I definieron la caja Fur como una secuencia palindrómica de 19 pb: GATAATGAT (^A/_T) ATCATTATC (Figura I.15B)²²⁴. A parte de que no se encontró esta secuencia exacta en ningún sitio de unión a Fur (normalmente en *E. coli* coinciden sólo 11 de los 19 pb²²⁵), este modelo no explicaba por qué muchas veces Fur protegía una región más grande que la caja, como en el caso del promotor del operón *aer* para la síntesis de la aerobactina donde Fur se une a una región de hasta 100 pb²²⁶ y parece polimerizarse alrededor de la hélice de DNA²⁰⁶. Por ello este modelo fue revisado y se realizaron estudios más detallados usando oligonucleótidos sintéticos²²⁷. Los resultados obtenidos llevaron a la reinterpretación de la secuencia de la caja Fur como un mínimo de tres repeticiones del motivo NAT(^A/_T)AT, sin importar su orientación²²⁷ (Figura I.15C). Se describió que múltiples repeticiones (más de tres) del motivo hexanucleótido

permitían una mayor unión de Fur; así por ejemplo, en la región de unión de *P_{aer}* se identificaron 18 tándems ²²⁶. Pese a ello, esta interpretación de la región de interacción de Fur con el DNA no explicaba exactamente cómo los dímeros de dicha proteína se situaban individualmente en la doble hélice, ni cuántas repeticiones del motivo de 6 pb eran necesarias para unir un único dímero de Fur ²²¹. Nuevas propuestas revisadas justifican el solapamiento entre dímeros y explican su disposición a lo largo del DNA. Este nuevo modelo propone que la secuencia consenso se compone de motivos solapantes de 13 pb distribuidos como “6-1-6” en *E. coli* ^{223, 228} (Figura I.15D). De esta forma, se permite la unión de dos dímeros de Fur por caja situados en caras opuestas del DNA y desplazados aproximadamente media vuelta de hélice. Además, el solapamiento entre las secuencias de unión hace posible la adición de nuevos dímeros permitiendo la polimerización de la proteína Fur unida al DNA. Así se explica también la extensa protección frente a la DNAsa en los estudios de *footprinting* observados con el *P_{aer}* de *E. coli*.

Aunque la caja Fur de *E. coli* se usa como estándar para comparar las secuencias de unión de otras proteínas Fur no está claramente conservada en todos los organismos. Por ejemplo, en *B. subtilis*, la caja Fur es una secuencia invertida y repetida con una configuración “7-1-7” ²²². En *Y. pestis*, consiste de dos repeticiones invertidas, AATGATAAT, separadas por un único nucleótido ²²⁹. Una característica común entre las distintas cajas Fur es el elevado número de nucleótidos A/T relativo al de G/C, es por ello que, en *H. pylori*, con un genoma rico en A/T (aproximadamente el 60%) la definición de una caja Fur consenso es más complicada. Así, estudios basados en la alineación de varios genes regulados por Fur en esta bacteria definen la caja Fur como: NNNNNAATAATNNTNANN ²³⁰. Se cree que en este caso la unión de Fur no depende tanto de la secuencia de reconocimiento como de la conformación estructural global de la secuencia del promotor ¹.

7.2.2. Activación de la expresión génica

7.2.2.1. Regulación indirecta a través de RNAs pequeños. El sRNA RyhB de *E. coli*

El modelo anteriormente descrito explica la represión de los genes regulados por Fur cuando hay disponibilidad de hierro y justifica la activación de dichos genes en condiciones de deficiencia de hierro. Por el contrario, existen otros genes cuya

regulación por Fur parece ser positiva y no negativa, ya que su expresión se induce en abundancia de hierro^{5, 231, 232}. Este es el caso de ciertos genes de *E. coli* como las ferritinas (*ftnA* y *bfr*) y la superóxido dismutasa dependiente de hierro (*sodB*), entre otros^{232, 233}. Los estudios globales de transcriptómica y proteómica evidencian aún más la actuación de Fur como un regulador positivo. Así por ejemplo, análisis proteómicos de mutantes *fur* de *V. cholerae* han revelado numerosas proteínas que requieren Fur y hierro para su expresión²³⁴. En muchos casos se ha descrito que esta regulación positiva ejercida por Fur es indirecta y está mediatizada por la represión dependiente de Fur de un RNA pequeño antisentido (sRNA). Este actúa en *trans* a nivel postranscripcional, inhibiendo la traducción del mRNA de los genes que regula²³⁵.

En este sentido, el primer sRNA regulado por Fur y el mejor caracterizado es el RyhB de *E. coli* que tiene un tamaño de 90 nt y está controlado negativamente por Fur en presencia de hierro. Por el contrario, en condiciones de limitación de hierro o en un mutante *fur* defectivo, la expresión de *ryhB* se incrementa provocando una disminución de la traducción de sus mRNAs diana²³⁶. Los genes diana de RyhB incluyen aquellos previamente observados bajo el control positivo de Fur, como *acnA* (aconitasa A), *fumA* (fumarasa A), *sdhCDAB* (succinato deshidrogenasa), *bfr* (bacterioferritina) y *sodB* (FeSOD)²³⁶. Estudios posteriores han sugerido que la regulación positiva mediatizada por RyhB puede tener un papel más relevante y afectar a un gran número de genes no esenciales relacionados con el metabolismo del hierro²³⁶.

El mecanismo de acción de RyhB (Figura I.16) se basa en su emparejamiento con una secuencia cercana o en el mismo RBS de los mRNA que regula. La chaperona de RNA llamada Hfq facilita la formación del dúplex sRNA-mRNA, controlando el acceso del sRNA hacia las regiones de complementariedad en el mRNA diana²³⁷. A continuación, RyhB estimula activamente la degradación del complejo RyhB-mRNA gracias al reclutamiento de un complejo llamado degradosoma formado por la RNAsaE, una fosforilasa polinucleotídica, una enolasa y una helicasa de RNA²³⁸. La RNAsaE degrada simultáneamente ambos RNAs^{239, 240} y esta degradación acoplada sirve de mecanismo intrínseco para inactivar RyhB. De hecho, en condiciones de hierro abundante, cuando la expresión de RyhB disminuye, el nivel de sRNA desciende rápidamente. La destrucción de RyhB restaura la expresión de las proteínas que usan hierro, las cuales secuestran este elemento tan pronto esté disponible^{235, 239, 240}.

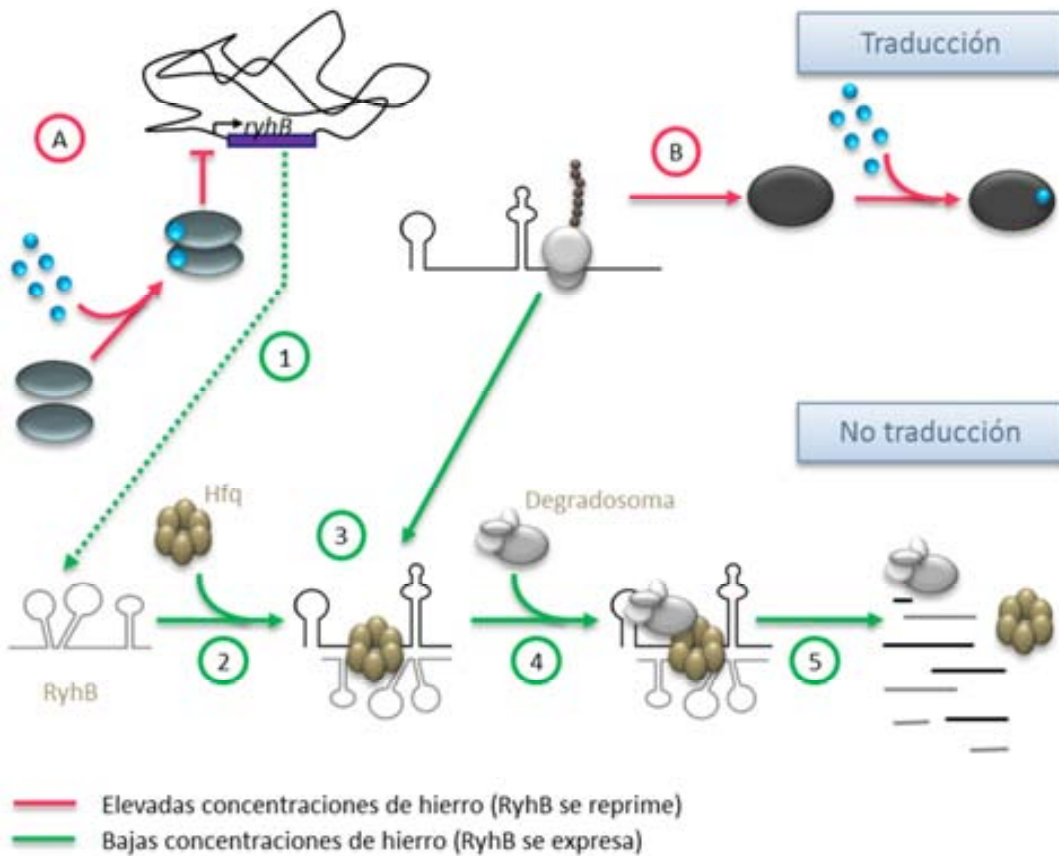


Figura I.16. Mecanismo de actuación de RyhB durante la escasez de hierro. A. En condiciones de hierro abundante, la proteína Fur activa reprime la transcripción de RyhB posibilitando B. la traducción de proteínas no esenciales que utilizan hierro es posible. Cuando el hierro escasea, (1) Fur se desactiva y *ryhB* se expresa rápidamente. (2) la chaperona Hfq estabiliza RyhB. (3) El sRNA RyhB se empareja con el mRNA diana y bloquea la traducción. (4) El degradosoma reconoce el complejo RyhB-mRNA y degrada ambos RNAs simultáneamente (5). Adaptado de Masse *et al.*, 2007.

7.2.2.2. Otros sRNAs que controlan el metabolismo del hierro

Como se ha comentado anteriormente, otros mecanismos similares de regulación a través de sRNAs se han descrito en diversas especies bacterianas después del descubrimiento de RyhB (Tabla I.4). La secuencia del RNA *ryhB*, como también la región *upstream* inmediata que incluye los sitios -35, -10 y la caja Fur, se encuentran altamente conservadas en *Salmonella* y *Klebsiella*, y en menor medida en *Y. pestis* y *V. cholerae*²³⁵. Otras secuencias que comparten con *ryhB* elementos del promotor y la región central conservada (nucleótidos 35-61) se han identificado en los genomas de *Yersinia* y *Salmonella*, sugiriendo que estas bacterias pueden codificar dos moléculas RyhB-like diferentes²³⁵. Este dato ha sido confirmado para *S. Typhimurium* ya que se ha comprobado que en esta

especie existen dos RNAs reguladores (RfrA y RfrB (*RNA for Fur response*)) asociados al hierro^{243, 244}. En el mismo estudio, Ellermeier *et al.* demostraron que estos dos sRNA son, conjuntamente, los responsables de la represión del gen *sodB* en una cepa *fur* deficiente.

En *P. aeruginosa* también se han identificado dos RNAs antisentido situados en tándem, PrrF1 y PrrF2, que si bien no son homólogos a nivel de secuencia con RyhB, sí lo son a nivel funcional y modulan genes relacionados con el metabolismo del hierro²⁴⁵. Asimismo, en *Neisseria meningitidis* se ha descrito la presencia de un sRNA antisentido denominado NrrF, homólogo a RyhB,²⁴⁶. En ésta bacteria, Fur activa indirectamente la transcripción de algunos genes como *sdhA* y *sdhC* a través de la represión de NrrF en abundancia de hierro.

Tabla I.4 Resumen de sRNAs y RNAs reguladores que controlan el metabolismo del hierro

Especie	RNA regulador	Diana	Referencia
<i>Vibrio anguillarum</i>	RNA α (650 nt)	Transporte de hierro	241
<i>Escherichia coli</i>	RyhB (90 nt)	Proteínas que usan hierro, hierro libre intracelular, adaptación a la escasez de hierro	235, 236, 242
<i>Salmonella typhimurium</i>	RfrA y RfrB	Regulación de <i>sodB</i>	243, 244
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PrrF1 y PrrF2 (110 nt)	Proteínas que usan hierro	245
<i>Neisseria meningitidis</i>	NrrF	Controla <i>sdh</i>	246
<i>Vibrio cholerae</i>	RyhB (200 nt)	Proteínas que usan hierro, formación de biofilm, quimiotaxis	247, 248
<i>Shigella flexneri</i>	RyhB	Proteínas que usan hierro, resistencia al ácido	249
<i>Synechocystis</i>	IsiR (177 nt)	Estabilidad de <i>isiA</i>	250
<i>Anabaena</i>	α - <i>furA</i> (2.2 kb)	Traducción de <i>furA</i>	251

7.2.2.3. Regulación positiva directa

En numerosas situaciones no se pueden explicar todos los genes activados por Fur solo vía sRNA. Por ejemplo, en *P. aeruginosa*, la presencia de los RNAs PrrF no es suficiente para explicar todos los casos de activación génica dependiente de hierro por Fur. Con respecto a esto, se ha demostrado que la regulación de la principal subunidad de la bacterioferritina (BfrB) no se altera al mutar uno o ambos antisentidos PrrF²⁴⁵. Esto puede deberse a que su regulación se lleve a cabo por otro antisentido PrrF no identificado, que Fur responda a la acción de una

proteína reguladora que desempeñe una función similar a los antisentido o porque existe realmente una activación directa por Fur.

La regulación a través de RyhB tampoco justifica todos los genes activados vía Fur en *Neisseria meningitidis*, por lo cual se supuso que existía otro mecanismo para la activación directa de estos genes^{252, 253}. Así, en este microorganismo se describió por primera vez el papel activador directo de Fur sobre la transcripción de algunos genes como *norB*, *pan1* y *nuoABCDE*²⁵³. En estos casos Fur-Fe²⁺ se une en la región *upstream* de los promotores y directamente activa su transcripción por la polimerasa *in vitro*. En semejanza, Fur cargado con hierro en *H. pylori* parece ser un activador de la transcripción del gen *nifS*²⁵⁴.

Un caso especial en *E. coli* es el del gen *ftnA*. Los resultados confirman que éste está inducido por hierro de una manera dependiente de Fur aunque, a diferencia de otros genes regulados positivamente por Fur-Fe²⁺, la expresión de *ftnA* es independiente de RyhB²³⁵. En su lugar la proteína histona-like H-NS es la que mediatiza la dependencia de Fur para la expresión de *ftnA* a través de un mecanismo de represión antagonizado por Fur. H-NS reprime directamente la transcripción de *ftnA* y esta represión se ve revertida por Fur. Cuando Fur ocupa los sitios de unión de H-NS en el promotor de *ftnA* desplaza H-NS y evita que se reprima la transcripción²⁵⁵. Así que en este caso Fur está actuando de activador pero no porque reclute la RNA polimerasa sino por un mecanismo de antirepresión.

7.2.3. Otros modelos de regulación

En todos estos casos la actividad de unión al DNA requiere hierro unido a la molécula pero en algunos sistemas las proteínas Fur pueden unirse también al DNA en ausencia del metal cofactor. Uno de los hallazgos más interesantes, que permanece sin explicación, es la observación de que mutantes Fur incapaces de unir hierro de *S. enterica* continúan ejerciendo su función en la respuesta ácido tolerante²⁶, rompiendo de esta forma el paradigma de la necesidad de hierro para la interacción de Fur con el DNA. Aunque en este sistema no se conocen qué genes son a los que se une Fur en ausencia de hierro, o cómo afecta a su regulación. Pero la evidencia de la unión de Fur en ausencia de hierro sí ha sido claramente documentada en *H. pylori*. En este organismo, la expresión de la ferritina es constitutiva en un mutante *fur*, se ha propuesto que Fur actúa de represor en ausencia de hierro unido y la desrepresión aparece cuando Fur une Fe²⁺²⁵⁶. Estudios de unión al DNA *in vitro* postulan la disminución, mediatizada por hierro, de la afinidad de unión al DNA en este sitio, pero no de los sitios

reprimidos en presencia de hierro ²⁵⁶. Un modelo similar ha sido propuesto para explicar la inducción de *sodB* mediada por hierro en este mismo microorganismo. Así, apo-Fur se une a la región promotora de *sodB*, aunque con baja afinidad y la unión se libera en presencia de manganeso ²⁵⁷. Las características estructurales que distinguen estos sitios de unión a Fur en ausencia o en presencia de su cofactor no han sido dilucidadas. Además la habilidad de Fur para unirse en distintos sitios en presencia o en ausencia de hierro también puede jugar un papel en la autorregulación del gen *fur* por un mecanismo de antirepresión en esta misma bacteria ²⁵⁸.

7.2.4. Control del consumo de hierro por Fur en *E. coli*

La observación de que Fur induce la expresión de genes que codifican proteínas que contienen hierro sugiere que la biosíntesis de algunas de estas proteínas se modula según la disponibilidad de hierro ^{235, 259}. La respuesta *iron-sparing* (que “ahorra” hierro) permite ajustar la producción de proteínas que requieren hierro cuando no existe suficiente cantidad de este elemento para combinarse con ellas (Figura I.17). Además la represión de procesos no esenciales que requieren hierro incrementa el suministro de hierro para otros procesos importantes para la supervivencia celular como por ejemplo la biosíntesis de DNA, permitiendo una utilización del hierro más eficaz. Pruebas que apoyan este mecanismo provienen de la observación de que el contenido de hierro de los mutantes *fur* de *E. coli* está reducido un 70% ²⁵⁹. Una parte (50%) de esta reducción se debe a la falta de proteínas de almacenamiento, pero la reducción del 20% residual se debe a los bajos niveles celulares de Fe-proteínas ²⁵⁹. La habilidad de *E. coli* de modular la expresión de Fe-proteínas en respuesta a la disponibilidad de hierro podría explicar cómo este microorganismo consigue y tolera una reducción de 10 veces el contenido de hierro celular durante el crecimiento en condiciones limitantes de hierro ²⁵⁹.

El descubrimiento de nuevas rutas *iron-sparing* controladas por sRNAs en otras bacterias gramnegativas (*Shigella* spp., *Vibrio* spp., y *Pseudomonas* ^{245, 247, 260}), además de la caracterización de un sistema funcionalmente similar en *B. subtilis* ²⁶¹, *Saccharomyces cerevisiae* ²⁶² y *C. diphtheriae* ²⁶³ confirman la importancia de este proceso para la adaptación frente la limitación de iones metálicos.

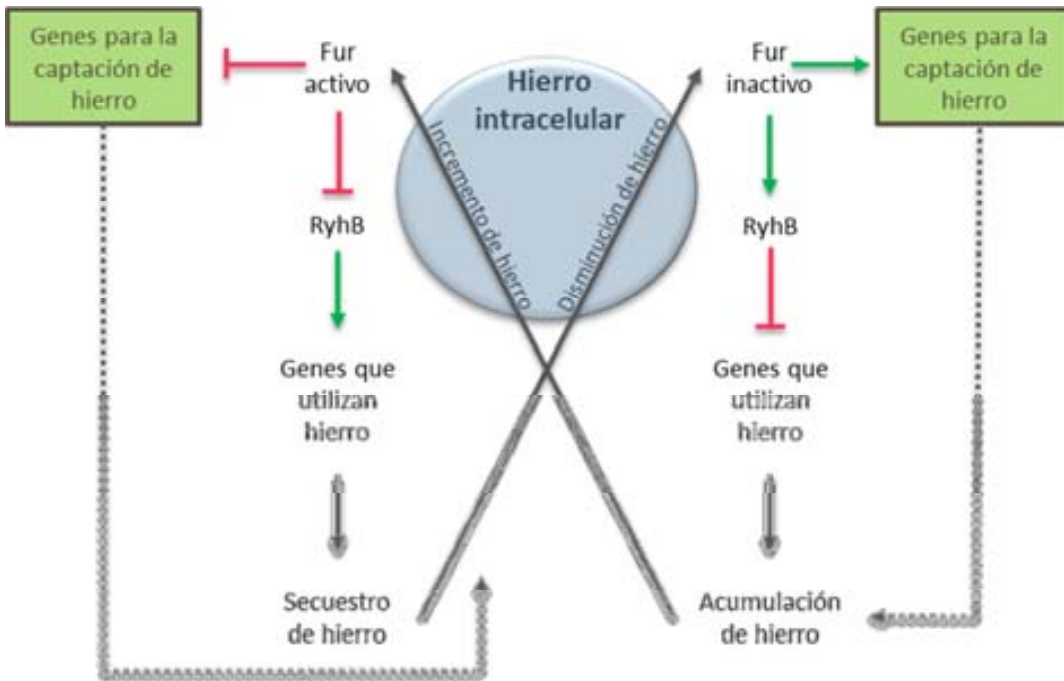


Figura I.17. Modelo de la interacción de Fur y RyhB para regular el balance de hierro. El balance entre las actividades de Fur y RyhB controla el nivel y la utilización del hierro intracelular. La expresión de RyhB regula el secuestro de hierro inhibiendo la síntesis de las proteínas no esenciales que utilizan este elemento. Cuando los niveles de hierro son suficientemente elevados se activa Fur y se reprime el gen *ryhB*. Esta represión permite la expresión de proteínas que requieren hierro que pueden volver a secuestrar dicho elemento. En este modelo, el sRNA RyhB incrementa los niveles de hierro incluso en ausencia de expresión de los genes para su captación. Fur también actúa directamente sobre la expresión de los genes para la adquisición de hierro, que regulan a su vez el nivel intracelular de este metal mediante su captación.²³⁶

7.3. Mecanismos de regulación de Fur

Como se ha comentado anteriormente, la proteína Fur es muy abundante en la célula. De hecho, incluso en abundancia de hierro los niveles de Fur son altos, y en condiciones de estrés férrico la concentración de Fur se mantiene o aumenta ligeramente²²⁰. Esto sugiere que la regulación de Fur es muy compleja y rigurosa.

7.3.1. Regulación a nivel transcripcional

7.3.1.1. Autorepresión

El gen *fur* de *E. coli* se encuentra *downstream* del operón bicistrónico *fldA-fur*. Esta ordenación la encontramos en otras bacterias como *K. pneumoniae*, *H. influenzae* y *Y. pestis*²¹⁹. El tipo de regulación más generalizado es el de una moderada autorrepresión del gen *fur*. En *E. coli* ésta se produce gracias a una caja

Fur situada en la región intergénica *fldA-fur*²⁶⁴, como también pasa en otros microorganismos como *N. meningitidis*²⁶⁵. Cabe destacar el modelo de autoregulación del gen *fur* propuesto en *H. pylori*, que se basa en la participación de tres regiones operadoras. La región III es el sitio anti-represor al que se une la apo-proteína induciendo su propia expresión, la región II es el sitio de represión clásica al que se une la holo-proteína reprimiendo su expresión y la región I es un operador bifuncional que puede actuar como sitio de represión o activación en función de los niveles de Fur en la célula. Se ha sugerido que la región I es la encargada de mantener la homeostasis de la proteína²⁵⁸.

Aunque el número de casos es menor, en algunos procariotas no se ha detectado actividad autorreguladora de la proteína Fur como por ejemplo en *Bartonella*²⁶⁶ o en *P. aeruginosa*²⁶⁷.

7.3.1.2. Moduladores de la transcripción

Además de la propia proteína Fur, hay otros moduladores de transcripción que regulan la expresión del gen *fur*. Este es el caso de los reguladores de respuesta al estrés oxidativo OxyR y SoxRS. En *E. coli*, OxyR es un regulador que se activa en respuesta al H₂O₂ y activa la expresión de Fur uniéndose a su propio promotor. Por otra parte, SoxR también se activa en respuesta al aumento de H₂O₂ y activa SoxS, que a su vez induce unas 10 veces la transcripción del operón *fldA-fur*²¹⁹. Esta regulación revela una conexión interesante entre el estrés redox y la homeóstasis del hierro. El incremento de los niveles de Fur durante el estrés redox incrementa la capacidad de unión de Fe²⁺ en el citosol, reprime el transporte de hierro e induce los sistemas de almacenamiento de hierro. Estos efectos reducen los niveles de hierro libres en el citosol durante el estrés oxidativo y ello a su vez permite contrarrestar la toxicidad inducida por este elemento.

En *E. coli*, también se ha descrito la activación de Fur mediante el complejo CAP-cAMP, donde CAP es la proteína activadora del catabolito o proteína receptora del cAMP, lo que sugiere un nexo entre la regulación de los niveles intracelulares de hierro y el estado metabólico de la célula²⁶⁴.

Por otra parte, se ha demostrado la participación de algunos homólogos de la familia Fur en la regulación del gen *fur*. Este es el caso de PerR, uno de los tres homólogos de Fur en *B. subtilis* implicado en la respuesta al estrés oxidativo, que reprime la expresión de Fur cuando se une al co-represor Mn²⁺²⁶⁸.

7.3.2. Regulación a nivel postranscripcional

En *E. coli* también se produce la regulación indirecta de Fur a nivel postranscripcional. En este organismo se ha detectado que la traducción del mRNA de *fur* está acoplada a la del transcrito *uof* (*upstream open reading frame*), situado delante del gen *fur*. Por otra parte, la traducción de *uof* está regulada negativamente por el RNA antisentido RyhB. En condiciones de estrés férrico, RyhB se expresa y reprime en *trans* la traducción del transcrito del gen *uof*, con lo que interfiere indirectamente en la expresión de *fur* asegurando su inhibición en deficiencia de hierro²⁶⁹.

7.4. Genes regulados por Fur

7.4.1. Sistemas de detección de genes regulados por Fur

Para identificar los genes cuya expresión está regulada por Fur se han utilizado diversas técnicas bioquímicas y genéticas. Una de las más habituales es la obtención de mutantes en los que se ha inactivado la expresión del gen *fur* para estudiar el fenotipo de la cepa mutante con respecto a la salvaje. Sin embargo, en ciertos organismos esto no ha sido posible ya que *fur* es un gen esencial para su supervivencia y los mutantes no son viables, como por ejemplo en *P. aeruginosa*²⁷⁰, *N. gonorrhoeae*²⁷¹ o *V. anguillarum*²⁷².

Los avances en el campo de la genómica así como la secuenciación completa de los genomas de diversos organismos ha permitido el desarrollo y la aplicación de los microarrays de DNA o RNA, una técnica muy potente para visualizar cambios globales en la expresión génica de un organismo ante distintas condiciones nutricionales y/o ambientales, o bien para comparar el perfil de expresión de cepas mutantes respecto a las salvajes. De esta forma se ha analizado la expresión diferencial del genoma en función de la disponibilidad de hierro y Fur en diversos microorganismos como *E. coli*²⁷³, *N. meningitidis*²⁵², *H. pylori*²⁵⁷, *Pasteurella multocida*¹³⁹, *Mycobacterium tuberculosis*¹⁹¹, *Pseudomonas aeruginosa*²⁷⁴ o *Synechocystis*²⁷⁵. Toda esta serie de trabajos han permitido identificar un extenso y variado grupo de genes cuya expresión depende de los niveles de hierro.

7.4.2. El regulón Fur

La proteína Fur es un regulador clave del metabolismo del hierro en procariotas⁵. Inicialmente, se supuso que su función fisiológica se limitaba a la regulación de

genes relacionados con la adquisición de hierro, pero estudios posteriores han determinado que el control de Fur se extiende a un gran número de genes en *E. coli* (*cyoA*, *flbB*, *fumC*, *gmpA*, *metH*, *nohB*, *nrdH*, *purR* y *sodA*) implicados en múltiples procesos celulares (respiración, quimiotaxis por flagelos, ciclo TCA, glicólisis, biosíntesis de metionina, encapsidación de DNA fágico, metabolismo purínico y resistencia al estrés redox)^{276, 277}. Así que Fur puede considerarse como un verdadero regulador global del metabolismo bacteriano.

7.4.2.1. Homeóstasis del hierro

Como ya se ha mencionado anteriormente, el grupo más importante de genes regulados por Fur, por ser el más numeroso y ampliamente extendido entre procariontes de distintos géneros es el que engloba a los genes relacionados con la adquisición de hierro, que incluye tanto a los sistemas de captura de hierro como a los de transporte, imprescindibles para la internalización del metal en la célula. El gran número de genes controlados por Fur no se limita a las bacterias gramnegativas sino que la captación de hierro también se regula por Fur en el organismo grampositivo *B. subtilis*. Análisis de *microarray* globales han permitido identificar 20 operones regulados por Fur, la mayoría involucrados en la adquisición de hierro²⁷⁸.

Innumerables estudios han demostrado que, como en *E. coli* y *B. subtilis*, Fur juega un papel esencial en los sistemas de adquisición de hierro y otros muchos procesos homeostáticos en un gran número de patógenos bacterianos. En *P. aeruginosa* Fur regula la producción de los sideróforos pioverdina y pioquelina²⁷⁹. En *S. aureus* un sistema de transporte de sideróforos y genes para la captación de ferricromo también están regulados por Fur^{280, 281}. A parte, también regula genes involucrados en la adquisición de hierro desde fuentes del huésped como el grupo hemo y la transferrina. La proteína Fur de *V. vulnificus* regula la utilización de hemo²⁸², mientras que *Haemophilus ducreyi* utiliza este metaloregulador para controlar la expresión de una proteína de unión a la hemoglobina²⁸³. La proteína Fur no solo juega un papel en la adquisición de hierro en patógenos animales sino que también es importante en patógenos de plantas como *Pseudomonas syringae* en la cual reprime la producción de sideróforos²⁸⁴ o en *Bradyrhizobium japonicum* donde controla *irr*, el regulador de la ruta biosintética de hemo^{285, 286}.

7.4.2.2. Virulencia

Fur está implicado en la expresión de factores de virulencia asociados con el éxito infectivo de numerosos patógenos. Para muchas bacterias patógenas, la deficiencia de hierro que se encuentran en el interior del huésped es interpretada como una señal de su entrada que desencadena la expresión de sideróforos y otros factores de patogenicidad como las toxinas tipo “Shiga” en *E. coli*, la endotoxina A en *P. aeruginosa*, la hemolisina en *V. cholerae*, o la toxina diftérica en *C. diphtheriae*^{221, 279, 287}. La acción de diversos factores de virulencia, como dichas toxinas, podría permitir el acceso a fuentes de hierro, como la ferritina o el grupo hemo de la hemoglobina, ubicadas en el interior de las células del huésped²²¹.

Así, el gen *iha* que codifica un regulador de la producción de adhesinas en *Y. pestis* o *E. coli* presenta una caja Fur, de forma que estas proteínas se sintetizan cuando hay escasez de hierro en el medio, como en el caso anterior, éste podría ser el mecanismo indicador de la entrada en el huésped.

La quimiotaxis, que parece jugar también un papel importante en la patogénesis de distintos microorganismos, también se encuentra regulada por Fur. Se ha destacado, por ejemplo, la presencia de cajas Fur en los promotores de genes implicados en todos los procesos de regulación y transducción de señal de quimiotaxis tanto en *E. coli* como en *V. cholerae* Schmitt²⁸⁸.

7.4.2.3. Resistencia frente a la acidez

La resistencia a pH ácido es un paso importante en la virulencia de determinados patógenos como *S. typhimurium* o *H. pylori*^{26, 289, 290}. Muchos sistemas de regulación global se ven implicados en la respuesta al estrés por pH ácido, como RpoS, OmpR, PhoP, y también Fur²⁹¹. La implicación de este último se ha demostrado tanto en *S. Typhimurium* como *H. pylori*^{26, 257, 290, 292}, comprobándose en el primero que su actuación es independiente de la presencia de hierro intracelular y que además, las dos funciones, la de regulador de la tolerancia a ácido y la relacionada con el transporte de hierro, pueden separarse funcionalmente²⁶.

7.4.2.4. Respuesta al estrés oxidativo

En este caso se ha descrito que la proteína Fur es capaz de interactuar con los promotores de diferentes genes implicados en la detoxificación de los derivados reactivos del oxígeno. La superóxido dismutasa dependiente de manganeso, codificada por el gen *sodA* de *S. Typhimurium*, *E. coli* o *P. aeruginosa*²⁹³ forma parte del regulón Fur, así como la superóxido dismutasa dependiente de hierro (SodB)^{232, 294, 295}, aunque en este caso su síntesis se ve incrementada en presencia de hierro. Por otra parte, los principales reguladores de la respuesta al estrés oxidativo en *E. coli*, OxyR y SoxRS, inducen la expresión de Fur con lo que se demuestra nuevamente el papel activo de Fur en la respuesta al estrés oxidativo^{219, 296}. En cualquier caso, el sentido biológico de esta activación se ha de buscar en la necesidad de evitar el daño que puedan causar los radicales libres generados cuando la concentración de hierro intracelular es elevada. También se ha demostrado la implicación de Fur en la defensa frente a las especies reactivas de nitrógeno en *E. coli*²⁹⁷.

7.4.5.5. Metabolismo energético

La inactivación del gen *fur* de *E. coli* lleva a la incapacidad de crecer en fuentes de carbono no fermentables¹⁴⁶, lo que sugiere un defecto en la respiración. Genes relacionados con el metabolismo intermediario como la aconitasa A (*acnA*), la fumarasa (*fumA*) y el operón succinato deshidrogenasa (*sdhCDAB*), entre otros, están regulados indirectamente por Fur a través del RNA antisentido RyhB²³⁵. Se especula que el control dependiente de Fur de los complejos respiratorios que contienen hierro representa un mecanismo homeostático por el cual la producción de esta serie de proteínas ricas en hierro se regula en función de la disponibilidad de dicho elemento (respuesta *iron-sparing*)²⁷³.

II.

Objetivos

El principal objetivo del presente trabajo ha sido tener una visión global del regulón Fur en el patógeno intracelular *S. enterica* serovar Typhimurium y la relación de este regulador con los mecanismos de virulencia de dicho microorganismo. Para conseguirlo se ha utilizado un microarray genómico que ha permitido la comparación de los patrones de expresión génica entre una cepa de *Salmonella enterica* salvaje con los de una cepa mutante deficiente en el gen *fur*, así como los de una cepa salvaje creciendo en condiciones de escasez de hierro.

Los objetivos parciales de la presente tesis doctoral han sido:

- Determinar la red de regulación génica dependiente de la proteína Fur
- Diferenciar dentro de la red génica aquellos genes regulados de manera directa o indirecta por Fur.
- Determinar la forma de regulación de Fur sobre la isla de patogeneidad 1 de *Salmonella* (SPI1)

III.

**Material
y
Métodos**

1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados y construidos en este estudio están listados en la Tabla III.1. Las cepas de *E. coli* y *S. Typhimurium* fueron crecidas en condiciones de aerobiosis en los medios (Anexo A.1): LB (Luria-Bertani), TB (Terrific Broth), BHI (Brain-Heart Infusion), SOB (Super Optimal Broth) o SOC a 20, 37, 30 o 43° C. Cuando fue necesario se añadieron en el medio de cultivo los antibióticos ampicilina (Amp), kanamicina (Km) o cloramfenicol (Cm) a las concentraciones finales de 50 o 100 ; 50 o 150; y 34 µg/ml para las cepas de *E. coli* y *S. Typhimurium*, respectivamente. Para los estudios en condiciones de escasez de hierro se añadió el quelante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) al LB a una concentración de 1,5 mM, 30 minutos antes de la inoculación de las células de *S. Typhimurium*.

Tabla III.1 Cepas y plásmidos utilizados

Nombre	Características	Referencia
Cepas de <i>S. typhimurium</i>		
ATCC 1408	Cepa de referencia	ATCC®
LB 5000		
LB 5000	LB 5000 que contiene el plásmido TS pKOBEGA; Amp ^R	
UA 1827	LB 5000 que contiene el plásmido TS pcp20; Amp ^R	
SV 5015	SL 1344 pero His ⁺	
UA 1779	ATCC 14028 $\Delta fur::cat$; Cam ^R	
UA 1875	SV 5015 que contiene el plásmido TS pKOBEGA; Amp ^R	
UA 1880	SV 5015 $\Delta fur::cat$; Cam ^R	
UA 1881	SV 5015 $\Delta rfrA::kan$; Kan ^R	
	SV 5015 $\Delta rfrA$	
UA 1882	SV 5015 $\Delta rfrB::kan$; Kan ^R	
	SV 5015 $\Delta rfrB$	
UA 1883	SV 5015 $\Delta rfrA::kan \Delta rfrB$; Kan ^R	
	SV 5015 $\Delta rfrA \Delta rfrB$	
UA 1884	SV 5015 $\Delta fur::cat \Delta rfrA::kan \Delta rfrB$; Cam ^R Kan ^R	
UA 1891	SV 5015 $\Delta hilD::kan$; Kan ^R	
UA 1892	SV 5015 $\Delta fur::cat \Delta hilD::kan$; Cam ^R Kan ^R	
UA 1888	SV 5015 $P_{hilD}::kan$; Kan ^R	
UA 1889	SV 5015 $P_{hilD^*}::kan$; Kan ^R	
UA 1890	SV 5015 $\Delta fur::cat P_{hilD}::kan$; Cam ^R Kan ^R	
	SV 5015 $\Delta fur::cat P_{hilD^*}::kan$; Cam ^R Kan ^R	
Cepas de <i>Escherichia coli</i>		
DH5- α	<i>supE4</i> $\Delta lacU169$ ($\phi 80 lacZ\Delta M15$) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Clontech
BL21(DE3)pLysE	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysE; Cam ^R	
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS; Cam ^R	Stratagene

continuación Tabla III.1

Nombre	Características	Referencia
Plásmidos		
pGEM [®] -T	Vector de clonación para PCR; Amp ^R	Promega
pET15b	Vector de expresión con cola de histidinas; Amp ^R	Novagen
pGEX-4T-1	Vector de expresión con GST; Amp ^R	GE Healthcare
pKOBEGA	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo</i> pSC101 oriTS; Amp ^R	
pKD4	<i>bla</i> FRT <i>kan</i> FRT PS1 PS2 oriR6K; Amp ^R , Kan ^R	
pCP20	<i>bla cat</i> <i>cl875λ</i> P _R <i>flp</i> pSC101 oriTS; Amp ^R , Cam ^R	
pGEM_P0031	pGEM-T con un fragmento de 305 pb del P ₀₀₃₁ (-265 a +40)	
pGEM_P0190	pGEM-T con un fragmento de 244 pb del P ₀₁₉₀ (-190 a +55)	
pGEM_P0363	pGEM-T con un fragmento de 370 pb del P ₀₃₆₃ (-299 a +71)	
pGEM_P0581	pGEM-T con un fragmento de 295 pb del P ₀₅₈₁ (-254 a +41)	
pGEM_P0820	pGEM-T con un fragmento de 302 pb del P _{moaA} (-249 a +53) (STM0820)	
pGEM_P1190	pGEM-T con un fragmento de 300 pb del P ₁₁₉₀ (-251 a +49)	
pGEM_P1192	pGEM-T con un fragmento de 305 pb del P _{pslX} (-250 a +55) (STM1192)	
pGEM_P1255	pGEM-T con un fragmento de 271 pb del P ₁₂₅₅ (-250 a +21)	
pGEM_P1303	pGEM-T con un fragmento de 296 pb del P _{astC} (-252 a +44) (STM1303)	
pGEM_P1584	pGEM-T con un fragmento de 303 pb del P _{ansP} (-255 a +48) (STM1584)	
pGEM_P1587	pGEM-T con un fragmento de 303 pb del P ₁₅₈₇ (-242 a +60)	
pGEM_P1588	pGEM-T con un fragmento de 246 pb del P ₁₅₈₈ (-207 a +39)	
pGEM_P1777	pGEM-T con un fragmento de 310 pb del P _{hemA} (-266 a +44) (STM1777)	
pGEM_P2086	pGEM-T con un fragmento de 403 pb del P _{rfbU} (-277 a +126) (STM2086)	
pGEM_P2097	pGEM-T con un fragmento de 427 pb del P _{rfbB} (-304 a +126) (STM2097)	
pGEM_P2196	pGEM-T con un fragmento de 300 pb del P ₂₁₉₆ (-248 a +52)	
pGEM_P2197	pGEM-T con un fragmento de 318 pb del P ₂₁₉₇ (-236 a +82)	
pGEM_P2374	pGEM-T con un fragmento de 226 pb del P ₂₃₇₄ (-193 a +33)	
pGEM_P2782	pGEM-T con un fragmento de 314 pb del P _{mig14} (-284 a +39) (STM2782)	
pGEM_P4535	pGEM-T con un fragmento de 203 pb del P ₄₅₃₅ (-147 a +56)	
pGEM_P0368	pGEM-T con un fragmento de 310 pb del P _{prpB} (-256 a +54) (STM0368)	
pGEM_P0732	pGEM-T con un fragmento de 309 pb del P _{sdhC} (-246 a +63) (STM0732)	
pGEM_P0740	pGEM-T con un fragmento de 318 pb del P _{cydA} (-191 a +127) (STM0740)	
pGEM_P0964	pGEM-T con un fragmento de 298 pb del P _{dmsA} (-249 a +49) (STM0964)	
pGEM_P1092	pGEM-T con un fragmento de 269 pb del P ₁₀₉₂ (-222 a +47)	
pGEM_P1143	pGEM-T con un fragmento de 282 pb del P _{csdB} (-236 a +46) (STM1143)	
pGEM_P1170	pGEM-T con un fragmento de 287 pb del P _{mviN} (-250 a +37) (STM1170)	
pGEM_P1499	pGEM-T con un fragmento de 303 pb del P ₁₄₉₉ (-253 a +50)	
pGEM_P1570	pGEM-T con un fragmento de 276 pb del P _{fdnG} (-248 a +28) (STM1570)	
pGEM_P1625	pGEM-T con un fragmento de 359 pb del P ₁₆₂₅ (-301 a +58)	
pGEM_P1671	pGEM-T con un fragmento de 287 pb del P ₁₆₇₁ (-254 a +33)	
pGEM_P1732	pGEM-T con un fragmento de 289 pb del P _{ompW} (-249 a +40) (STM1732)	
pGEM_P2035	pGEM-T con un fragmento de 299 pb del P _{cbiA} (-250 a +49) (STM2035)	
pGEM_P2036	pGEM-T con un fragmento de 306 pb del P _{pocR} (-212 a +94) (STM2036)	
pGEM_P2037	pGEM-T con un fragmento de 300 pb del P _{pduF} (-251 a +49) (STM2037)	
pGEM_P2038	pGEM-T con un fragmento de 301 pb del P _{pduA} (-251 a +50) (STM2038)	
pGEM_P2065	pGEM-T con un fragmento de 267 pb del P _{phsA} (-237 a +30) (STM2065)	
pGEM_P2186	pGEM-T con un fragmento de 318 pb del P ₂₁₈₆ (-268 a +58)	
pGEM_P2246	pGEM-T con un fragmento de 308 pb del P _{narp} (-255 a +53) (STM2246)	
pGEM_P2328	pGEM-T con un fragmento de 306 pb del P _{nuoA} (-256 a +50) (STM2328)	
pGEM_P2454	pGEM-T con un fragmento de 308 pb del P _{eutR} (-250 a +58) (STM2454)	
pGEM_P2470	pGEM-T con un fragmento de 312 pb del P _{eutS} (-271 a +41) (STM2470)	

continuación Tabla III.1

Nombre	Características	Referencia
pGEM_P2532	pGEM-T con un fragmento de 300 pb del P ₂₅₃₂ (-250 a +50)	
pGEM_P2759	pGEM-T con un fragmento de 318 pb del P ₂₇₅₉ (-270 a +48)	
pUA1111	pGEM-T con un fragmento de 337 pb del P _{hilD} (-282 a +55) (STM2875)	
pUA1112	pGEM-T con un fragmento de 337 pb del P _{hilD} * (-282 a +55) (STM2875) que contiene mutaciones en la caja Fur.	
pGEM_PhilA	pGEM-T con un fragmento de 382 pb del P _{hilA} (-291 a +91) (STM2876)	
pGEM_PhilC	pGEM-T con un fragmento de 343 pb del P _{hilC} (-291 a +52) (STM2867)	
pGEM_P2912	pGEM-T con un fragmento de 301 pb del P ₂₉₁₂ (-249 a +52)	
pGEM_P2944	pGEM-T con un fragmento de 276 pb del P ₂₉₄₄ (-247 a +50)	
pGEM_PcsrB	pGEM-T con un fragmento de 297 pb del P _{csrB} (-247 a +50)	
pGEM_P3150	pGEM-T con un fragmento de 299 pb del P _{hybO} (-250 a +50) (STM3150)	
pGEM_P3163	pGEM-T con un fragmento de 300 del P ₃₁₆₃ (-250 a +50)	
pGEM_P3190	pGEM-T con un fragmento de 301 pb del P ₃₁₉₀ (-51 a +250)	
pGEM_P3215	pGEM-T con un fragmento de 313 pb del P ₃₂₁₅ (-239 a +74)	
pGEM_P3217	pGEM-T con un fragmento de 302 pb del P _{aer} (-250 a +52) (STM3217)	
pGEM_P3500	pGEM-T con un fragmento de 302 pb del P _{pckA} (-252 a +50) (STM3500)	
pGEM_P3820	pGEM-T con un fragmento de 303 pb del P ₃₈₂₀ (-250 a +53)	
pGEM_P4037	pGEM-T con un fragmento de 289 pb del P _{fdoG} (-250 a +39) (STM4037))	
pGEM_P4257	pGEM-T con un fragmento de 241 pb del P _{siiA} (-240 a +37) (STM4257)	
pGEM_P4277	pGEM-T con un fragmento de 274 pb del P _{nrfA} (-231 a +43) (STM4277)	
pGEM_P4297	pGEM-T con un fragmento de 295 pb del P _{melR} (-245 a +50) (STM4297)	
pGEM_P4304	pGEM-T con un fragmento de 286 pb del P _{dcuR} (-236 a +50) (STM4304)	
pGEM_P4305	pGEM-T con un fragmento de 238 pb del P ₄₃₀₅ (-194 a +49)	
pGEM_P4343	pGEM-T con un fragmento de 295 pb del P _{fdra} (-259 a +36) (STM4343)	
pGEM_P4405	pGEM-T con un fragmento de 303 pb del P ₄₄₀₅ (-252 a +51)	
pGEM_Pfur	pGEM-T con un fragmento de 366 pb del P _{fur} (-296 a +70) (STM0693)	
pGEM_P0191	pGEM-T con un fragmento de 365 pb del P _{fhua} (-299 a +66) (STM0191)	
pGEM_P0364	pGEM-T con un fragmento de 229 pb del P _{foxA} (-188 a +41) (STM0364)	
pGEM_P1520	pGEM-T con un fragmento de pb del P _{marr} (a) (STM1520)	
pGEM_P0443	pGEM-T con un fragmento de pb del P _{cyoA} (a) (STM0443)	
pGEM®-T	Vector de clonación para PCR; Amp ^R	Promega

2. Manipulación de ácidos nucleicos

Las técnicas de biología molecular empleadas en este trabajo se realizaron siguiendo los protocolos ya descritos por Sambrook *et al.*²⁹⁸.

Las extracciones de DNA cromosómico se llevaron a cabo mediante el kit *Easy-DNATM* (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para las extracciones de DNA plasmídico se utilizaron: el kit *GeneJetTM Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) siguiendo las especificaciones del fabricante para extracciones a baja escala de vectores derivados de pGEM-T®; o mediante los procedimientos descritos en los anexos A.2 y A.3 en el caso de otros vectores des de cepas de *E.*

coli o *S. Typhimurium*, o de la necesidad de extraer DNA a mayor escala, respectivamente.

Para la purificación de DNA, en solución o a partir de geles de agarosa, se utilizó el kit comercial *illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), siguiendo las especificaciones del fabricante. Las enzimas de restricción (New England Biolabs y Roche) y la enzima T4 DNA ligasa (Promega) se emplearon según las indicaciones de la casa comercial. Para la cuantificación de ácidos nucleicos en solución se utilizaron los espectrofotómetros *GeneQuant™* (Amersham Biosciences) o *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific).

Para la amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR (Polimerase chain reaction) se utilizó el kit *Expand™ High Fidelity PCR System* (Roche), siguiendo las especificaciones del fabricante; los cuatro dNTPs (Thermo Scientific) se añadieron a una concentración final de 0,2 mM cada uno; los oligonucleótidos (Invitrogen) utilizados en cada caso (Tabla III.2) se añadieron a una concentración final de 500 nM; y cuando fue necesario se añadió BSA 0,5 mg·ml⁻¹ para estabilizar la reacción de la polimerasa.

Tabla III.2 Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia
Obtención de cepas mutantes	
rfrA_P1	AGGGCCCCGGAGCGTACTAAATGTACGTGAGGAGCACGAGCACTTCCCGGGGACAAAA TGACAAGTAAGCCAGGCTGAAACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
rfrA_P2	CACTATTTCACTCATTCCCTTATCTCCTGCAGGGTTAATTGTGTATTTACACTCGCTG AGAAAGAAAATTCCGTCAACCGCATGGGAATTAGCCATGGTCC
rfrB_P1	CGGCGCTGGAGATGACCCCGTATCACGCAAAATAGCGCGGCTGAAAAAAGACCATGA ATTGACATGGGATAGATAGCGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
rfrB_P2	GGAAAGTGAAGTTTGTGATGTCCATCACCTTTTAGCGTCGTGGATAAAAAGCGCATAA ATATCAGGGTTGCAATCATTAAATATGGGAATTAGCCATGGTCC
hilD_P1	CTCCGACTCCCGGAGAGTTATGAGATCATCCTTAGCTCGGCTCAGATAACGTTAAAG GAGCGCGTTTACAACATTATATCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
hilD_P2	TAGTTTTAAAATATTTTTTGAACATTGAATGAAGTAGGACGTGCTATCATAACCAC ATTTTAATGCTACAGCATTAAACACATATGAATATCCTCCTTAG
PhilD_P2	GCGATGTCGTCTCCTTCGATAGCAGCAGATTACCGCACAGGACACAGGGATTCCCTG ATGAAAATAGAATGAAAAGTGAGATGGGAATTAGCCATGGTCC
PhilD_P1	AGTAGTTTAAAGCCCAATGGGGATGATGGTTCTTTTAAATATGTGTTGAGACGCATTA TACAGAATAAAATTGATTTTTATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
PhilD*_P1	AGTAGTTTAAAGCCCAATGGGGATGATGGTTCTTTTAAATATGTGTTGAGACGCGCCG CACAGAACGGGCTGATCCCGCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

continuación Tabla III.2

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
Promotores			
PfhuA_up	CAATTAATCACGGTAATAGTGCC	PfhuA_dw	TGTGGCTACTACAACCTGCG
PfoxA_up	GCTGCGTGACGCGTCTCTTAC	PfoxA_dw	GCCATACGCGTTGTGCGCAAAC
PmarR_up	CAGTGTGCAAGTTAATATCC	PmarR_dw	AAATAGTTATTTAACAGGCG
P2197_up	ATATCAAGGCAACTCTCCATCG	P2197_dw	TGACGGCATTAAATAACGTTTCC
PheMA_up	ACAGGTGCCGTTTTATGG	PheMA_dw	TTACGCTTATCAGGCCTG
P4547_up	ACTCAGCAATATGAATGAAGGGC	P4547_dw	AAGGCCTTCTGTATAAGAGG
Pmig14_up	CATACGCGGATGTGCAGATC	Pmig14_dw	CCAGCGGGTTAATATACGC
P0363_up	GATGGTCGCGATATGGTG	P0363_dw	ATGAAGTCGCTGACGGAAAAG
P1588_up	TTCATCATTAGATCGCG	P1588_dw	GGTCAGGCTTATATGTTG
P0031_up	CATTGTAAGTGTGCGTGC	P0031_dw	AGGCCTTGCGCCATAATTC
P2374_up	CGTGAACCATTCTTTGCC	P2374_dw	TGCACGATGCCAGTCTTGG
P1255_up	GTCGGGTGGGAAGACGC	P1255_dw	TTGTTTCTCCCGGCGCAGC
P4535_up	CCTGACCTTGAACAGAAC	P4535_dw	TTTAAACTCCGCTGGCC
P1190_up	TTCCAGCAGCGCGGACGC	P1190_dw	TGAGCGGTACGAACCGGATC
PansP_up	CTGGCGTCTTATCTGGC	PansP_dw	TCGTTTCGCCGCATGTTG
P1587_up	CGTGTATAGCTGCTTACAC	P1587_dw	GAAGGTCAGAGGCAATAAG
P0190_up	ACGATCCGGCGAATACG	P0190_dw	CAGGACGTGACGGTTTC
PrfrB_up	CTGAAACGAGTGTGACTGC	PrfrB_dw	TTCAAGATTACCGGCGTAGG
PrfrU_up	CTGGATTAGCTAGATTTACG	PrfrU_dw	AGCGTGTACCTTGCTACAG
PcyoA_up	CCCCTTACAGACCTCATCC	PcyoA_dw	TTGCTCCAGTCCAATCTGTC
PmoaA_up	GTAAGAGTGTGATTTTACG	PmoaA_dw	AAACGCAAGTAGTAAAAC
PplsX_up	GACGCTCTGACCGCAGTCAC	PplsX_dw	CGGAAGGACCAAAATCGCCC
PastC_up	CCAGAATTATATTTGGCAAC	PastC_dw	ACCATCCATTATCAAAG
PmelR_up	TTGCACATGTGCGGGTTCG	PmelR_dw	ACCTTCATGGTGGCACGCG
PdcuS_up	AGTTTCATGGGGCGTTTG	PdcuS_dw	TAAAATGTGATACCGCATACG
P1625_up	GTTCCGCATAATGTCATGCC	P1625_dw	CAAATGTATGAAGGTGGCGC
P1671_up	GATTTATAATCTCACGGGC	P1671_dw	TACTGAGATTATTATGGC
P2912_up	TAATCCTGCGATATAACCG	P2912_dw	TAAACAGCGACATACGCTG
P3012_up	CAATGACGTTGATTCCACC	P3012_dw	GTGGCGACTGAAACACCG
P3163_up	GCCAACTGTAAGCAAATTGC	P3163_dw	TTTGATCGGAAGATCGAC
P3215_up	GTCGTCATTTTTGCCTTCG	P3215_dw	TCTCGATCTTTCAGCAACC
PompW_up	GAACCGATGCCTGCTGTTG	PompW_dw	CCCATGGGTATTTATGTTT
P2759_up	CGATCGCCCCGATGCTTTG	P2759_dw	GCCGTAGCGGGCGTGCAG
P3190_up	GGTAGGGCTTCCCCAATCG	P3190_dw	AATAAAGGTGGCGGCGCC
PfdnG_up	TAAAAAATTGTCTGCGGC	PfdnG_dw	AATAAACTGCCACTTATAGC

continuación Tabla III.2

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
PnuoA_up	GCGAATGCCAGTGATGAG	PnuoA_dw	CCCCCTGGTCTGAAGAGTC
PhybO_up	TCACGACGGTTAATGCCG	PhybO_dw	GAGAATCATTCCGGGATGG
PfdoG_up	AGCGCAGATCTTAAAGAAC	PfdoG_dw	CGTGAGGTTGTGAAATCAG
P2186_up	TCTTTATACCGTTGCGG	P2186_dw	AATGGCGTAAAACCAGGC
PcydA_up	ACGGCGTAATATATTTGCGG	PcydA_dw	AAAGGACGTATACCGTTTCC
PdmsA_up	ATATATCGGCTAATCCTCGC	PdmsA_dw	GACGGCTCACCTCGGCTG
PnrfA_up	AAAAGTGATCCGTGTCCGG	PnrfA_dw	TAAGGCTGAAGAAACGGC
PfrdA_up	GCCTATAATGGCAAGATC	PfrdA_dw	TTTGCGCAGGCGTATCGG
P1499_up	ACTAACGTCTGCGGCTAAC	P1499_dw	GAACGACACGCATAAAATTC
P2530_up	CCCGCCAGCGCCAGCATGA	P2530_dw	TTCGGCAAGCCAGTCGGCG
P4305_up	TTACTGACGTTTCAAGATCGC	P4305_dw	GCAGTGGTAGCAAAGGC
P3820_up	CATAACAGCCCAACGGTG	P3820_dw	GTTGGCTATCGTTCGTTTTG
PpckA_up	CTTTCTTACATGAATGCG	PpckA_dw	TTGATACCATAAGCCTTG
PprpB_up	ATTCATCTTTAAGGGGCG	PprpB_dw	ATTCTCTTTAGCGAGCGC
PpocR_up	ATGCGAACCAGATTCACAGC	PpocR_dw	TATTGACAACCACAACCGCC
PcbiA_up	AACCGCTTCCTGTGCCTGC	PcbiA_dw	TGCCACATTTGTGGTAGGG
PpduA_up	TGCGTCTTTGCCATATC	PpduA_dw	GCTGCGGTTAAGCCTTTG
PpduF_up	CGGTGCCTAAAAATCCG	PpduF_dw	TGATAAGTTGGCTTGTGC
PeutS_up	TTGCCCGGCACAAATTC	PeutS_dw	CACAAATCGAGTGATACGC
PeutR_up	CTTCGGGTAACGCTTCATG	PeutR_dw	AGAAAGCACCCAGGTAC
PphsA_up	CTGCAAAAAAGAACGACG	PphsA_dw	TACGTGTTATTGGAATTG
PcsgB_up	AGGTGCGCGATACTACTC	PcsgB_dw	GCGCACCCAGTATTGTCAAC
PmviN_up	TGGCGGTAGTAATTCATCG	PmviN_dw	CTTTTGTATTCCAGACCCTG
PsiiA_up	ACTCATCTTTGTTGTGGG	PsiiA_dw	CAACAAACTAGGCCACGG
PsopB_up	TAATGAGGAAACGCTTCTG	PsopB_dw	CGAATATTCTTCGTCACGG
PhilA_up	GCGCTGACTCTCTGCACC	PhilA_dw	TCTGAGCGTAGCAGGGAGCC
PhilC_up	TGCAGAAAATGCACCATGCC	PhilC_dw	GGTGATTATTGCTAATGGCC
PhilD_up	GCAGCAGATTACCGCACAGG	PhilD_dw	AGTTATCTGCGGCAGGACGC
PcsrB_up	AGCCTTTCCTGTAAACCC	PcsrB_dw	GTAATCGTTTGCCTAACAG
PhilD_-205_up	TGTATAATGCGTCTCAACAC	PhilD_-51_up	TCAGTAGGATACCAGTAAGG
PhilD_-158_dw	CCAATGGGGATGATGGTTC		
PhilD*_up	AGGGATTCTGATGAAAATAGAATGAAAAGTGAGAAGCGGGATCAGCCGTTCTGTGCG GCGCGTCTCAACACATATTAAGAACCATCATCCCCATTG		
PhilD*_dw	ACAATGGGGATGATGGTCTTTAATATGTGTTGAGACGCGCCGCACAGAACGGGCTGAT CCCGCTTCTCACTTTTCATTCTATTTTCATCAGGAATCCC		

continuación Tabla III.2

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
qRT-PCR			
hisG_RTup	CCGGGTCTGGTAATGGATGG	hisG_RTdw	TTCTGGTCGAGGTAGCGTTTGA
0363_RTup	GCGTTTGGCGAGCGTTATGG	0363_RTdw	GGACTGCTATGGCGAGAGGTGG TTTCA
cyoE_RTup	CCTGCTGGCTGGGGGTAATG	cyoE_RTdw	CAACGGCAAACGCAATGATGTA
cyoC_RTup	ACTGCCGTTTCGTTCTGGTTGA	cyoC_RTdw	CATGATGCGGGTACGGTTAGTG
cyoB_RTup	TAGCGGTGCCGGTATTGTTATC	cyoB_RTdw	CCATTTTTTCAGCCCTGCCTTAGT
cyoA_RTup	GTATAGCCCGAACTGGTCACACT	cyoA_RTdw	GGAGTTCATCACGGAGTTGGAG GTC
0581_RTup	CCATTTCCGCTCAGGTTATCG	0581_RTdw	TGCGTACGGCCATGCTTTTCTT
marA_RTup	AGACGCAACACTGATCGCTATTA	marA_RTdw	ATTGGTGATCCGGTATTTGTGT
marR_RTup	CATTCCGCTGGGTCGCTTGAT	marR_RTdw	GGTCTTGCCCTGGTCGTTGAT
1588_RTup	GCTCAAGAGTTAGGCGTCAGTA	1588_RTdw	TGGTAGATCTCAAAGCGGAATG
1774_RTup	TTGCGCTCTCCGTCAGTTTGTT	1774_RTdw	GGTGGCGAGTTTAATGATGATG
rfbK_RTup	GGCTGCGATCCTTAGTGTTGA	rfbK_RTdw	TTTCCCGATCCTCTTTGCTTAC
rfbX_RTup	AGAATGCAGAGCCAAAAACAAAAG	rfbX_RTdw	GACCAATTCGGCAAAAAGTA
rfbA_RTup	GATCATCAGTACGCCACAGGAC	rfbA_RTdw	TGATAAGCGAAGACGGTAGCAC
rfbB_RTup	CGCTGCCGTTATTTACTG	rfbB_RTdw	GATTTTTCTTCTCATTGTGTCC
4547_RTup	GGCCGATTGTCCTTACACTGTCT	4547_RTdw	TCTTGCTGATTCTGTTTTCCATTC C
cydA_RTup	TTACGGCCTGCTGCTGAAAC	cydA_RTdw	CCCACGGCTGACGACCATAC
cydB_RTup	TGGCGGGTATCGTAAGCGTAGG	cydB_RTdw	GAGCCGGAACCAACCACAGGAT
1671_RTup	CAGGTTATTCGGAAGGAGTTTG	1671_RTdw	GTAGGGAGGCCGTAGGTTTCTG A
cbiA_RTup	TGAACGCCCGATAACACAG	cbiA_RTdw	CTCCCCAGATACATCAGACCAC
pocR_RTup	CGGCAGCATCCCCAGCATAG	pocR_RTdw	AACGCGTGAATAGTCCATCTCT
pduF_RTup	TCTCTAAAGGCGCAATGTGGTG	pduF_RTdw	CCGGCAAACCTGGGCAATAATA
prgJ_RTup	ATAGGGCAGGCGGTCAATA	prgJ_RTdw	GAGCGTAATAGCGTTTCAAC
hilA_RTup	CTGCCGGTGACCATTACGAA	hilA_RTdw	TTTGTGTCCAGCGAAGTCC
hilD_RTup	GAGATACCGACGCAACGACT	hilD_RTdw	AAGCAGGAACAGCAGAAAAT
sipC_RTup	TGCGTTGTCGGTAGTATTT	sipC_RTdw	TGGTTCCGGCATTAGATTTA
2912_RTup	CGCATCGGGCCAAACAAAA	2912_RTdw	ATCGGGATGGCGCTGACTAAAC
csrB_RTup	GACGCTTCAGCAGGACACG	csrB_RTdw	CCAGACCCGCCGAACATC
3163_RTup	GCTGGATGCGCGGATTCTGG	3163_RTdw	CAACGGCGAGGTGCTGGTGAC
3215_RTup	TTTTTGGCCACGGGGAACCT	3215_RTdw	CTTTTAGCCGCGCCTGAATA
frdA_RTup	GCGTCGCTTCGGTGGTATGA	frdA_RTdw	GATGCCCGCTTGGTGTAT
sodB_RTup	AAGGCACGGCGTTTGAAGG	sodB_RTdw	GCGGTACCGGCATTTGAGG

continuación Tabla III.2

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
foxA_RTup	TAGCGCCGCCGTGTATCGTA	foxA_RTdw	ATGCCGGAGCCCAAAGTCAG
eutR_RTup	TACAGCGAATTTGCACCATCTT	eutR_RTdw	CGCGTCGCCGGAATACCA
eutE_RTup	TCCGGCGGCGAAAAAGGTCT	eutE_RTdw	CGGCAGGTCGGCGGTCTCAT
recA_RTup	TGGCTATCGACGAAAAACAACA	recA_RTdw	TTCCGCATCGATAAACGCACAG
Comprobación y Sobreexpresión de proteínas			
Fur_Ndel	CATATGACTGACAACAATACCGC	Fur_BamHI	GGATCCTTATTAGTCGCGTC ATCGTGC
rfrAext_up	TCAGTTTGTTCACGGCAAGC	rfrAext_dw	CGTAATCTTTCGGTTCAGCG
rfrBext_up	TGGGGTTTATGCAGCAGG	rfrBext_dw	CGTTAGCGGTTTATTTGCCG
M13FpUC	GTTTTCCAGTCACGAC	M13RpUC	CAGGAAACAGCTATGAC
T7-pro	TAATACGACTCACTATAGGG	T7-ter	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
P1	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	P2	CATATGAATATCCTCCTTAGT
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
C1	TTATACGCAAGGCGACAAGG	C2	GATCTTCCGTCACAGGTAGG

2.1. Métodos de transferencia de DNA plasmídico

La introducción de plásmidos en cepas de *E. coli* se realizó por transformación inducida en células tratadas con CaCl_2 o por electroporación. Por su parte, la introducción de plásmidos en las cepas de *S. Typhimurium* se realizó por electroporación. La transferencia de DNA desde una cepa de *E. coli* a una de *S. Typhimurium* se realizó añadiendo un paso intermedio de transformación sobre la cepa de *S. Typhimurium* LB5000, que carece del sistema de restricción pero que metila el DNA según el patrón de *S. enterica*.

El método de transformación inducida usando células competentes tratadas con CaCl_2 mediante choque térmico (Anexo A.6) se utilizó para transformar DNA plasmídico en células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysE y *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Stratagene) (Anexo A.4). El método de transformación por electroporación (Anexo A.7) se utilizó para transformar DNA plasmídico en células electrocompetentes (Anexo A.5) de *E. coli* o *S. Typhimurium*.

La confirmación de los clones transformantes en cada caso se llevó a cabo mediante: PCR (oligonucleótidos especificados en la tabla III.2) y/o mediante digestión con enzimas de restricción. En todos los casos las construcciones fueron confirmadas mediante la secuenciación que se realizó en el servicio de secuenciación de Macrogen (<http://dna.macrogen.com>).

3. Obtención de mutantes de *S. Typhimurium*

Para la obtención de mutantes de *S. Typhimurium* se utilizaron dos métodos: la inactivación génica mediada por la recombinasa Red del fago λ descrita por Datsenko *et al.* (One Step Inactivation)²⁹⁹ con algunas modificaciones (Anexo A.8); y la transferencia genética mediante transducción generalizada con el bacteriófago P22 $_{int-7}$ (HT) (Anexo A.9). Todos los mutantes obtenidos fueron confirmados por PCR (oligonucleótidos especificados en la tabla III.2) y secuenciación.

El mutante SV5015 $\Delta fur::cat$ fue construido mediante transducción, utilizando el bacteriófago P22 $_{int-7}$ (HT) y la cepa ATCC14028 $\Delta fur::cat$ como cepa donadora.

Las cepas *knockout* para los sRNAs, SV5015 $\Delta rfrA::kan$ y $\Delta rfrB::kan$, fueron construidas utilizando el método de Datsenko *et al.*²⁹⁹. La cassette de resistencia a kanamicina fue amplificada desde el plásmido pKD4 utilizando los oligonucleótidos de 100-nt que contenían una región de 80-nt homóloga al gen de interés (P1 $_{rfrA}$ /P2 $_{rfrA}$ y P1 $_{rfrB}$ /P2 $_{rfrB}$, Tabla III.2). Los productos de PCR fueron transformados a la cepa SV5015 que llevaba el plásmido pKOBEGA. La cassette de resistencia a Km se eliminó (Anexo A.8) transformando el plásmido pCP20 a cada cepa, obteniendo los mutantes simples SV5015 $\Delta rfrA$ y SV5015 $\Delta rfrB$. El doble mutante SV5015 $\Delta rfrA::kan \Delta rfrB$ se obtuvo mediante transducción, usando como donadora la cepa SV5015 $\Delta rfrA::kan$ y como receptora la cepa SV5015 $\Delta rfrB$. El triple mutante SV5015 $\Delta fur::cat \Delta rfr::kan \Delta rfrB$ se obtuvo por transducción a partir de un lisado de la cepa SV5015 $\Delta fur::cat$ e infectando con éste la cepa SV5015 $\Delta rfrA::kan \Delta rfrB$.

El mutante SV5015 $\Delta hild::kan$ se obtuvo utilizando el mismo procedimiento de inactivación génica en un paso con los oligonucleótidos adecuados (P1 $_{hild}$ y P2 $_{hild}$, Tabla III.2) y transformando el fragmento de la PCR en la cepa SV5015 pKOBEGA. El doble mutante SV5015 $\Delta fur::cat \Delta hild::kan$ se obtuvo por transducción del fragmento $\Delta hild::kan$ sobre la cepa SV5015 $\Delta fur::cat$.

Las cepas mutantes derivadas de *S. Typhimurium* SV5015 P $_{hild}::kan$ y P $_{hild}^*::kan$, que contienen la cassette Kan^R insertada en la zona promotora del gen *hild* (posición -192 respecto el codón de inicio de la transcripción de *hild*³⁰⁰), fueron construidas mediante el método de inactivación génica en un paso descrito anteriormente. Los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos adecuados (P $_{hild_P2}$, P $_{hild_P1}$ y P $_{hild^*_P1}$, Tabla III.2) desde el plásmido pKD4, se transformaron a la cepa SV5015 pKOBEGA. En ambos casos la orientación de la

transcripción del gen *kan* fue opuesta a la del gen *hilD*, para evitar interferencias en el promotor de este gen. Igualmente se comprobó que la expresión del gen *prgH* situado *downstream* de *hilD* no se afectaba por la presencia de la cassette Kan^R. Las construcciones P_{*hilD*}::*kan* y P_{*hilD**}::*kan* fueron transferidas a la cepa SV5015 *fur*::*cat* mediante transducción para obtener las cepas SV5015 Δ *fur*::*cat* P_{*hilD*}::*kan* y SV5015 *fur*::*cat* P_{*hilD**}::*kan*.

4. Análisis transcriptómico

4.1. Diseño del microarray “Salgenomics”

Para hacer los estudios de expresión génica se utilizaron chips de DNA o *microarrays*. Estos chips fueron diseñados dentro del marco del proyecto Patogenom, un consorcio español coordinado por el Dr. F. García-del Portillo (Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC, Madrid) y con la asistencia técnica e informática de las Unidades del CNB-CSIC de Genómica y Bioinformática y del Servei de Genòmica de la UAB. Los investigadores responsables que formaron el consorcio fueron: el Dr. Miguel Vicente (CNB-CSIC, Madrid); el Dr. Josep Casadesús (Universidad de Sevilla, Sevilla); el Dr. Antonio Juárez (Universitat de Barcelona, Barcelona); el Dr. Jordi Barbé (Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona); y el Dr. Iñigo Lasa (Universidad Pública de Navarra, Pamplona). Los *microarrays* Salgenomic (ver características depositadas en el Miami database [<http://www.ebi.ac.uk/miamexpress>] con el número de acceso A-MEXP-846) tienen representado todo el genoma de la cepa *S. Typhimurium* SV5015, una variante no auxótrofa para la histidina de la cepa SL1344, cuya secuencia está disponible en el Welcome Trust Sanger Institute (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Salmonella>). A partir de esta secuencia se crearon oligonucleótidos de 70-mer utilizando el sistema “OliGO” (<http://www.bioalma.com>), que posteriormente se inmovilizaron en los cristales (*slides*), en las correspondientes coordenadas (*spots*) del microarray. En la figura III.1 se representa un esquema del *slide*, que consta de 7.344 *spots* para cada una de las dos réplicas (cuadrícula o *grid*), por tanto cada *slide* presenta un total de 14.688 *spots*.

Los *spots* incluyen controles internos del array que son espacios vacíos (*empties*) y oligonucleótidos diseñados sobre genes de otras especies bacterianas o eucariotas. Si restamos todos estos controles quedan 6.976 *spots*, de los cuales la

mayoría están representados por duplicado y son oligonucleótidos correspondientes al genoma de la cepa *S. Typhimurium* SV5015.

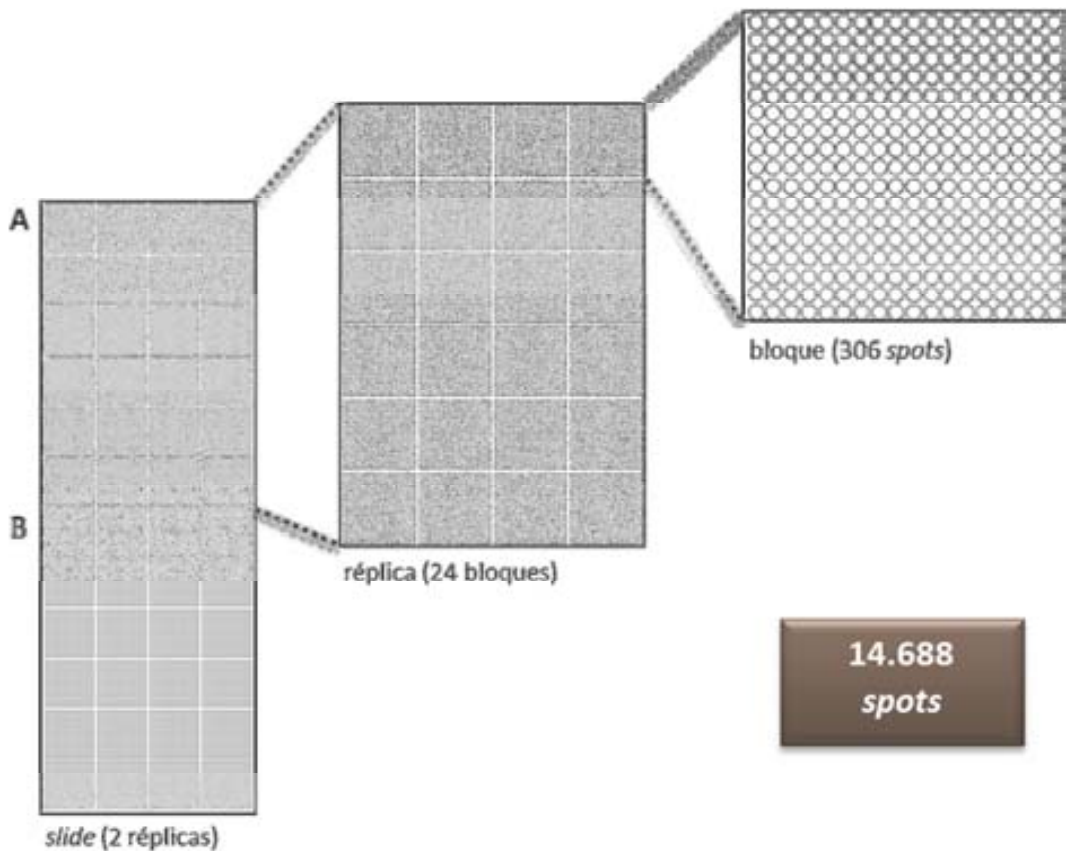


Figura III.1. Representación gráfica de un slide del microarray.

Utilizando el programa Glimmer 2.13³⁰¹ se predijeron 5.096 marcos de lectura abiertos (ORF: *open reading frame*) dentro de la secuencia del genoma de la SL1344. De estos, 4.274 son genes ortólogos a genes previamente anotados a la secuencia del genoma de la cepa de *S. Typhimurium* LT2¹⁵, que en el array conservaron la nomenclatura de ésta (STMXXXX) para evitar discrepancias (50 genes STM están representados más de 2 veces en el array y sirven de control interno). Los genes de la SL1344 que codifican para rRNAs se predijeron en base a los anotados en la LT2 y utilizando el algoritmo Smith-Waterman implementado en el pack informático FASTAv2.0 (programa SSEARCH)³⁰². La predicción de tRNAs se hizo con el programa tRNAscan-SE³⁰³. Un total de 21 rRNAs y 86 tRNAs fueron predichos en el genoma de la SL1344. En el *microarray* también están representados 96 genes que corresponden al plásmido de virulencia pSLT, anotados con este mismo nombre, pSLTXXX. Los 2.512 *spots* restantes se

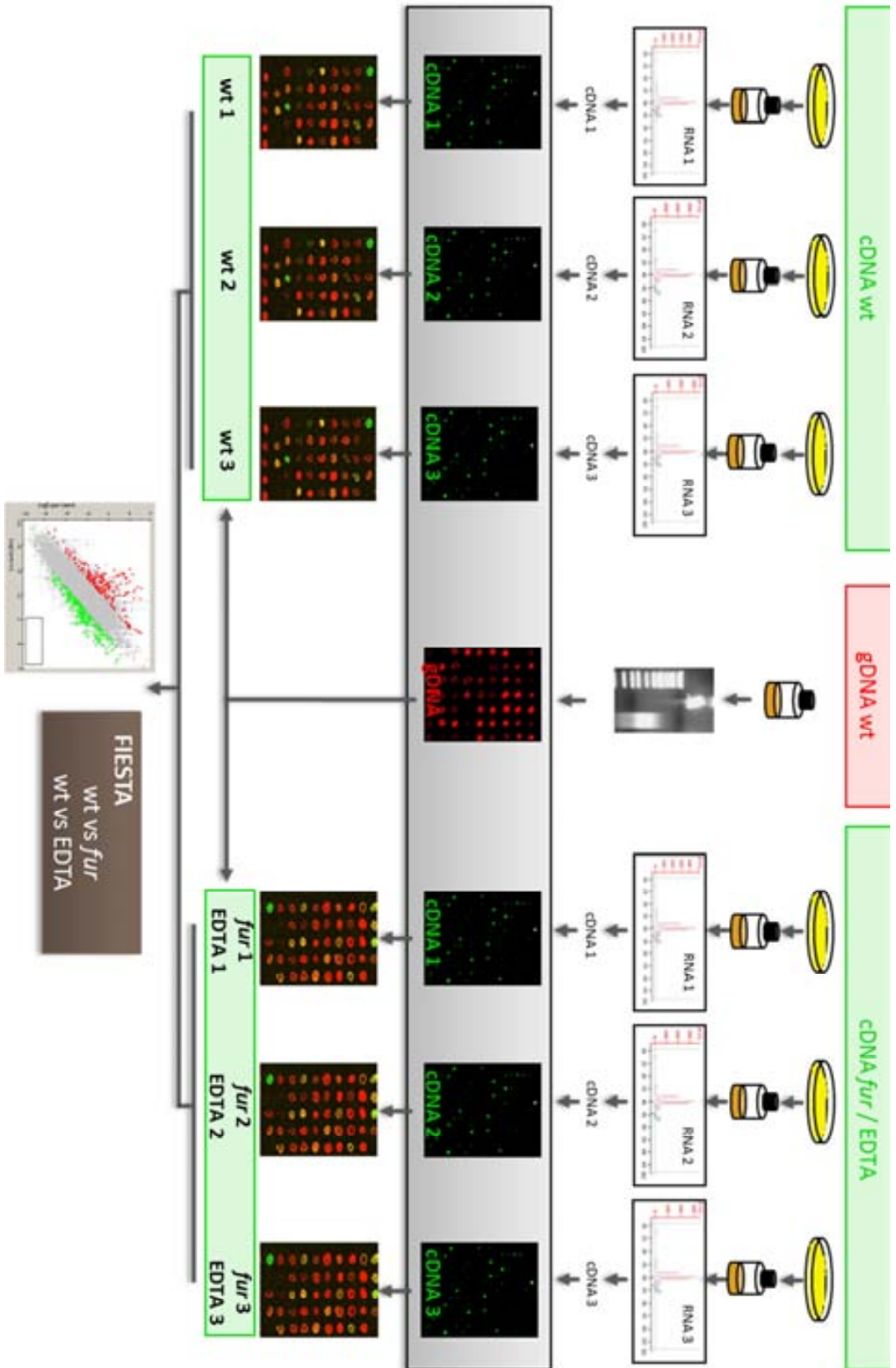
identificaron consecutivos a CNB1344-0001. Estos últimos incluyen, además de 1.690 regiones intergénicas (IGRs) no codificantes, dos tipos de secuencias codificantes: (i) 42 sRNAs (identificados utilizando el algoritmo Smith-Waterman en la base de datos del genoma de la LT2¹⁵) y (ii) 780 ORFs predichos en el genoma de la cepa SL1344 pero que no se encuentran en el genoma de la LT2.

4.2. Diseño experimental

La técnica de microarray genómico se basa en el análisis de la expresión génica de la célula a partir de la población de mRNA existente en un momento determinado. Normalmente se parte de dos muestras, una de referencia (que sería la cepa salvaje sin tratar) y una muestra problema a estudiar. Cada muestra se marca con un fluoróforo diferente y después se compara la señal que se obtiene de cada uno. El método utilizado en este estudio sigue una estrategia un poco distinta. Se hibridó la “muestra problema” como cDNA (DNA complementario) marcado con Cy5 juntamente con gDNA (DNA genómico) de la cepa salvaje marcado con Cy3, este último sirvió como referencia interna. Como ha sido descrito previamente³⁰⁴, este método permite hacer comparaciones transcriptómicas entre cepas y/o condiciones de crecimiento distintas.

En la figura III.2 se representa a modo de esquema el protocolo que seguido para obtener los datos de los *microarrays* genómicos. En el presente estudio se comparó el transcriptoma de la cepa SV5015 con el que presentaban la cepa SV5015 tratada con EDTA y la cepa deficiente para el gen *fur*. La primera fue la muestra de referencia y las otras dos fueron las muestras problema. Para aumentar la fiabilidad, los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, partiendo de tres muestras biológicas independientes para cada experimento.

Figura III.2. Esquema del procedimiento seguido en el marcaje del cDNA y del gDNA.



Los procedimientos detallados usados para el análisis transcriptómico se describen en el anexo A.10. El RNA total de las cepas de *S. Typhimurium* SV5015, SV5015 tratada con EDTA y SV5015 $\Delta fur::cat$ se obtuvo utilizando el kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para cada experimento fueron procesadas tres muestras biológicas independientes (RNA₁, RNA₂ y RNA₃). Los restos de DNA fueron eliminados tratando los 100 μ l de cada extracción de RNA con la DNasa del kit *Turbo DNA-free*TM (Ambion), dos tratamientos consecutivos con 4 μ l del enzima incubando durante 45 minutos a 37^o C. La ausencia de DNA después de este tratamiento fue confirmada mediante una PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para el gen *fhuA* de *S. Typhimurium* (Tabla III.2). La calidad de la muestra de RNA fue testada mediante un *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) y se procedió a la retrotranscripción (RT) de estos mediante la enzima *SuperScript III reverse Transcriptase* (Invitrogen), obteniendo los cDNAs correspondientes (cDNA₁, cDNA₂ y cDNA₃). Para obtener una máxima cantidad de cDNA y disminuir la variabilidad entre las diferentes réplicas biológicas, se hicieron 3 réplicas de cada reacción con cada RNA, las muestras fueron tratadas con RNasa H (Epicentre) y fueron purificadas y concentradas (juntando las 3 réplicas de cada cDNA) utilizando el kit *QIAquick PCR Purification* (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Por otro lado se hizo una extracción de DNA genómico de la cepa salvaje SV5015 (kit *Genomic DNA* [Quiagen]) y éste se fragmentó mediante un proceso de sonicación.

Después de la purificación del cDNA y el gDNA se procedió al marcaje de las muestras con los fluoróforos adecuados, utilizando el kit *BioPrime® Plus Array CGH Indirect Genomic Labeling System* (Invitrogen). Mediante el enzima exo-Klenow se amplificaron las muestras obteniendo DNA amino-modificado que se marcó posteriormente con los fluoróforos Cy3 y Cy5, obteniendo el **cDNA*** y el **gDNA***, respectivamente. Se estimó la cantidad de marcaje incorporado utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific), y se hizo una mezcla de los dos en una proporción 1:3 (**gDNA*:cDNA***). Antes de la hibridación los cristales se fijaron a 600 mJ y se incubaron 1 hora a 42^o C en la solución de prehibridación (SSC 6X, 0.5% SDS, 1% BSA). Después de secar la mezcla gDNA:cDNA en un *Speed-vac* se disolvió con la solución de hibridación (50% formamida; SSC 3X; 10% SDS; Denhardts 5X; 5% Dextransulfato), se desnaturalizó 5 minutos a 95^o C y se aplicó a cada *slide* del microarray, obteniendo 3 chips para cada muestra inicial de RNA. Se mantuvieron en una cámara de hibridación protegidos de la luz a 42^o C durante toda la noche. Se procedió al lavado de los microarrays, con 50 ml de cada solución en agitación y protegidos de la luz: tres

lavados de 5 minutos a 42° C con la solución 1 (SSPE 0.5X [stock SSPE 20X: 0.2 M tampón fosfato, pH 7.4; 2.98 M NaCl; 0.02 M EDTA], 0.1% tween 20); 3 lavados de 5 minutos a 37° C con la solución 2 (SSPE 0.5X); y dos lavados de 5 minutos a 37° C con la solución 3 (SSPE 0.1X). Después del lavado de los microchips, se procedió a la lectura de cada marca por separado, utilizando dos canales del escáner distintos, uno para cada fluoróforo. El láser verde (543 nm) excita a Cy3, mientras que es el láser rojo (633 nm) excita a Cy5. Las imágenes fueron captadas a una resolución de 10- μ m, y los datos numéricos de las intensidades de cada *spot* fueron determinadas utilizando el software QuantArray 3.0 (PerkinElmer, Wellesley, MA) o el genepix Pro 5.0 (Axon, Sunnyvale, CA).

4.3. Obtención de los datos, normalización y análisis estadístico

El software GenePix se utilizó para cuantificar las intensidades de los *spots* y del background. Los siguientes análisis se llevaron a cabo en R (<http://r.project.org>) utilizando los paquetes informáticos *limma*³⁰⁵ y *affy*³⁰⁶ del proyecto Bioconductor (<http://bioconductor.org>). Las intensidades de los *spots* fueron corregidas respecto al background utilizando la opción *normexp* de *limma* con una desviación de 50. Después, estas intensidades fueron convertidas a log (base 2). Para compensar las desviaciones entre las intensidades de los *spots* debidas a diferentes marcajes y/o a las eficiencias de detección en las réplicas de cada microarray, las intensidades corregidas se normalizaron utilizando la función “normaliza.quantiles” del paquete *affy*. El procedimiento descrito se realizó por separado en las intensidades de Cy3 (que provienen del cDNA) y Cy5 (que provienen del gDNA) y los valores normalizados obtenidos se nombraron “log-RNA-signal” y “log-Genomic-signal”, respectivamente. Los “log-Genomic-signal” sirvieron como una estimación de la cantidad de DNA presente en cada *spot* del *microarray*, y fueron utilizados para corregir las diferencias en los “log-RNA-signal” debidas a las diferencias en la cantidad de DNA. Por tanto el logRNAsignal final es:

$$\mathbf{log-RNA-signal}_f = \mathbf{logRNAsignal} - \mathbf{logGenomicSignal} = \mathbf{log}(\mathbf{RNAsignal/GenomicSignal})$$

El $\mathbf{log-RNA-signal}_f$ fue normalizado de nuevo y con el paquete *limma* se ajustó un modelo lineal para cada gen, que permitió estimar la expresión diferencial de éste entre la muestra de RNA salvaje y las muestras EDTA o *fur*. Con el análisis estadístico se trató cada *spot* del array como a un gen diferente, haciendo la comparativa entre *spots* de diferentes muestras biológicas pero en coordenadas

idénticas. Los cambios en la expresión de un gen concreto fueron determinados por el valor $\log\text{Ratio}(M)$ (M value), que representa el logaritmo en base 2 del ratio entre las dos muestras a comparar, el nivel de significación de estos valores se expresó con el parámetro adjusted p value. Los valores fueron considerados significativos cuando el $\log\text{Ratio}(M)$ fue ≤ -1 ó ≥ 1 y el adj. p value fue menor de 0,05. Se tuvo en cuenta que las dos réplicas de un gen concreto, posicionadas en coordenadas distintas, se comportasen igual. Para visualizar gráficamente el resultado de aplicar los distintos filtros estadísticos a los valores se utilizó el programa FIESTA (<http://bioinfogr.cnb.csic.es/tools/FIESTA>).

Para poder comparar los datos obtenidos en distintos arrays se utilizó la base de datos Matrix 2.5, creada con el programa informático Acces (Microsoft). Una vez introducidos los datos de cada experimento se pudieron consultar los genes que aumentan o disminuyen su patrón de expresión en un solo experimento; los genes coincidentes entre dos experimentos; y los genes no coincidentes, aplicando en cada caso los criterios de selección necesarios ($\log\text{Ratio}(M)$; adj. p value; locus; grupo).

5. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

El método de RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) se utilizó para cuantificar las variaciones en los niveles de expresión génica entre dos muestras mediante el análisis del RNA total. Sirvió también como método de validación de los resultados obtenidos en los *microarrays*.

El RNA total de las cepas de *S. Typhimurium* se obtuvo utilizando el mismo protocolo que el de extracción de RNA para los *microarrays*, con el kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega) (anexo A.10.2). Las muestras se trataron con DNasa (kit *Turbo DNA-freeTM* [Ambion]) (anexo A.10.3) y se purificaron para eliminar los restos de inhibidor de la DNasa con el protocolo de *clean-up* del kit *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) (anexo A.10.4). Se comprobó que no había restos de DNA cromosómico en las muestras de RNA mediante PCR y se visualizaron los RNAs mediante una electroforesis de agarosa para comprobar su integridad.

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron mediante el kit *LightCycler RNA Master SYBR Green I* (Roche), que permite la realización de las reacciones de RT y de PCR en un paso, y el aparato *LightCycler Instrument* (Roche). Los oligonucleótidos utilizados están listados en la Tabla III.2, todos ellos fueron diseñados mediante el programa *Primer Select* (DNA Star, Inc.) con una temperatura de hibridación de

57º C. Se monitorizó la fluorescencia de cada ciclo de amplificación a una longitud de onda de 521 nm para excitar el SYBR Green I incorporado en el dsDNA, y los datos obtenidos se analizaron mediante el *LightCycler Software* (Roche). Los genes de expresión constitutiva *hisG* o *recA* fueron utilizados para realizar una curva estándar con diversas concentraciones de cada RNA. A partir de esta curva estándar se calculó el valor de expresión de cada gen extrapolando en el *crossing point* (momento en que la reacción entra en la fase exponencial) de la curva y obteniendo la concentración de RNA inicial. Para comparar la expresión de un gen concreto en dos muestras biológicas distintas se calculó el factor de expresión como el ratio entre la expresión de un mismo gen en la muestra X e Y. Consideramos que la expresión de un gen aumenta cuando el factor de expresión es ≥ 2 y que disminuye cuando es $\leq 0,5$.

Los experimentos se repitieron un mínimo de dos veces, utilizando réplicas biológicas distintas.

6. Purificación de proteínas

El gen *fur* de *S. Typhimurium* se amplificó utilizando los oligonucleótidos *fur_NdeI* y *fur_BamHI* (Tabla III.2), que incorporan en su secuencia las dianas para los enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. El fragmento de PCR obtenido se clonó primero en el vector de clonación pGEM®-T, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se liberó el fragmento de DNA que contiene el gen *fur* mediante las enzimas de restricción apropiadas y se transfirió al vector de expresión pET15b (Novagen). Con éste vector se incorporó a la proteína nativa una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína, además de la diana para la proteasa Trombina. La correcta clonación en fase del gen *fur* en el vector recombinante fue confirmada por digestión, PCR y secuenciación utilizando los oligonucleótidos *T7_promoter* y *T7_terminator* (Tabla III.2). Este vector derivado (pET15b_ *fur*) se transformó a la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysE, de los clones obtenidos se realizó un *screening* para seleccionar aquel que sobreexpresaba una proteína de fusión de 19 kDa (17 kDa de la proteína Fur más 2 kDa de la cola de histidinas) tras la inducción del cultivo con IPTG.

Para purificar la proteína Fur se realizó una resiembra de un cultivo ON de la cepa BL21 pET15b_ *fur* (1/50) en 50 ml de LB y se incubó a 37º C hasta que llegó a una DO_{550} de 0,5. En este punto la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM permitió la inducción de la expresión de la proteína de fusión. Después de incubar

a 37° C durante 3 horas más se peletearon las células centrifugando 10 minutos a 8.300 g y se resuspendieron en 3 ml de tampón Wash-equilibration (50 mM tampón sodio-fosfato pH 7, 300 mM NaCl) que contenía el inhibidor de proteasas *Complete Mini protease inhibitor cocktail* (Roche). La suspensión celular se lisó mediante sonicación durante 6 minutos a 50 W utilizando el aparato Braun LabsonicU (Braun Biotech International), manteniendo durante todo el proceso la muestra en frío. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación durante 10 minutos a 12.000 g y el sobrenadante se mezcló con 1,5 ml de resina *BD Talon* (Clontech) previamente equilibrada con 10 volúmenes de tampón Wash-equilibration. La unión de la proteína de fusión con la resina se llevó a cabo durante 30 minutos en agitación leve y posteriormente la resina se lavó durante 10 minutos en agitación vigorosa dos veces. El primer lavado se hizo con tampón Wash-equilibration y el segundo con tampón Bis-Tris (10 mM tampón Bis-Tris/Borato pH 7,5, 10% glicerol (v/v), 1 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 100 μM MnCl₂). Para eluir la proteína se cortó con 25 U de la proteasa Trombina (Amersham Pharmacia Biotech), que libera la cola de 6-His que une la proteína con la resina, en 100 μl de tampón Bis-Tris durante 16 horas en agitación.

La actividad de la proteína Fur se confirmó mediante ensayos de movilidad electroforética utilizando como sonda los promotores de los genes *fhuA* y *foxA*, ya que la unión de Fur a estos está descrita³⁰⁷.

Para la visualización de las proteínas, estas se cargaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 o 15 %, para proteínas mayores o menores de 20 kDa, respectivamente. La electroforesis se llevó a cabo durante 90 minutos a 150 V en tampón TGS (Tris-Glicina-SDS, Pronadisa), y los geles se tiñeron con coomassie (0.1 % *coomassie blue*, 10 % ácido acético, 40 % metanol). Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford utilizando la BSA como patrón.

7. Ensayos de movilidad electroforética (EMSA)

Los ensayos de movilidad electroforética (EMSA) se llevaron a cabo para testar la capacidad de unión de la proteína Fur a un fragmento de DNA determinado. Se consideraron las zonas promotoras de cada gen como la región que se expande entre los nucleótidos -300 y +50 respecto el codón de inicio de traducción. Los oligonucleótidos diseñados para amplificar las distintas zonas promotoras están listados en la Tabla III.2, a partir de estos se obtuvieron los distintos fragmentos de DNA por PCR y se clonaron en el vector de clonación pGEM[®]-T. La presencia del promotor deseado fue confirmada mediante la secuenciación del plásmido utilizando los oligonucleótidos M13pUCF y M13pUCR del vector pGEM[®]-T (Tabla III.2). Las sondas de DNA para los EMSAs fueron obtenidas mediante una amplificación por PCR utilizando uno de los dos oligonucleótidos M13pUC marcado con digoxigenina (Dig) en su extremo 5', y la posterior purificación de la banda de PCR des de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1-2 %.

Los EMSAs con la proteína Fur purificada se llevaron a cabo utilizando el protocolo descrito previamente ²⁰⁶, pero con algunas modificaciones. En cada caso 100 ng de DNA-Dig se incubaron con concentraciones crecientes de proteína purificada (típicamente 0, 5, 25, 100 y 375 nM) en el tampón de unión (10 mM tampón Bis-Tris/Borato pH 7.5; 5 % (v/v) glicerol; 100 µg ml⁻¹ BSA; 1 mM MgCl₂; 40 mM KCl; 100 µM MnCl₂; y 0.2 mg ml⁻¹ DNA de esperma de salmón). Para determinar si la unión de Fur al DNA era dependiente de la concentración de cationes divalentes se incorporó en el tampón de unión el quelante EDTA a una concentración final de 1 mM. Para los ensayos de competitividad se añadió a la mezcla 200 veces más de DNA no marcado específico (del promotor que se está estudiando) o inespecífico (DNA que incluye el promotor del gen *recA*). Las mezclas de unión (20 µl) se incubaron durante 10 minutos a 37° C, y se cargaron en un gel PAGE no desnaturizante al 5.5 % [pre-run durante 10 minutos. a 150 V en 20 mM tampón Bis-Tris/borato pH 7.5 y 100 µM MnCl₂]. Los complejos DNA-proteína fueron separados primero a 100 V durante 30 minutos. y después a 150 V durante 3 horas más.

Después de la electroforesis, el DNA marcado fue transferido a una membrana de nylon Biodine B (Pall Gelman Laboratory) y fue detectado usando el anticuerpo *Anti-Digoxigenin Fab Fragments* marcado con fosfatasa alcalina y los sustratos NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride) y BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics).

8. Footprint con la proteína Fur

Los ensayos de footprint se utilizaron para visualizar la región de interacción de la proteína Fur con la zona promotora del gen *hilD*. Éstos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Alonso (CNB-CSIC Madrid).

Brevemente, 10 nM de un fragmento de DNA de 375 pb ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NcoI-HindII P}_{hilD}$) del plásmido que contiene el promotor del gen *hilD* (pUA1111), se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína Fur purificada (de 3 a 200 nM) durante 15 minutos a 37° C en el tampón de unión (50 mM Bis-Tris/borato pH 7.5, 5 % glicerol, 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂). La digestión con DNasa I se llevó a cabo añadiendo el enzima en el tampón de unión con CaCl₂ 5 mM durante 5 minutos a 37° C. La reacción se paró añadiendo EDTA 25 mM. Las muestras se precipitaron con etanol, se resuspendieron en 6 µl de tampón de carga y se fraccionaron en un gel dPAGE al 6 %³⁰⁸. Como marcador de peso molecular, se llevó a cabo una reacción de secuenciación G + A³⁰⁹ que se corrió en paralelo con las reacciones de footprint correspondientes.

9. Transcripción *in vitro*

Para comprobar si la proteína Fur tenía un efecto sobre la transcripción de *hilD* se llevaron a cabo ensayos de transcripción *in vitro* en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Alonso (CNB-CSIC, Madrid).

Los ensayos de transcripción *in vitro* se realizaron utilizando como DNA los vectores pUA1111 (pGEMT_P_{hilD}) o pUA1112 (pGEMT_P_{hilD}*) lineales, o el vector pGEM-T que sirvió de control negativo. Los DNAs (2 nM) se preincubaron con concentraciones crecientes de proteína Fur purificada (de 3 a 400 nM), durante 15 minutos a 37 °C en el tampón D (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 % glicerol, 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM espermidina, 10 mM DTT) en una reacción de 25 µl. Se añadieron una unidad del holoenzima RNAP Eσ⁷⁰ de *E. coli* (USB, Cleveland) y 0,5 mM de cada rNTP (con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-rUTP}$). Las reacciones se incubaron durante 60 minutos a 37 °C y se pararon añadiendo 15 µl de tampón de carga y calentando las muestras a 75 °C durante 10 minutos. Los transcritos generados se separaron en un gel dPAGE 6%³¹⁰.

10. Métodos bioinformáticos

Las secuencias de DNA utilizadas en este estudio para el diseño de oligonucleótidos se obtuvieron de la herramienta *Comprehensive Microbial Resource* (CMR) del *J. Craig Venter™ Institute* (JCVI) (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/ComrHomePage.cgi>), que muestra anotados los genes de la cepa *S. typhimurium* LT2. La comparación de secuencias de DNA entre esta cepa y la cepa SL1344, que está totalmente secuenciada y anotada (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/salmonella.html>), se realizó mediante la herramienta de BLAST del Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/salmonella>).

Se utilizó el paquete de programas *DNASar* (DNASar Inc.): el programa *PrimerSelect* para el diseño de oligonucleótidos para qRT-PCR; el programa *EditSeq* para la edición de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas; el programa *SeqMan* para el acoplamiento de diferentes secuencias con regiones de homología; y el programa *MapDraw* para la búsqueda de secuencias de enzimas de restricción.

Para el alineamiento de múltiples secuencias se utilizó el programa *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) del *European Bioinformatics Institute* (EBI).

Para la búsqueda *in silico* de cajas Fur se utilizó el programa Virtual Footprint (<http://prodoric.tu-bs.de/vfp/>) utilizando como matrices la caja Fur de *E. coli* K12 (8 y 18 mer) y la de *P. aeruginosa* PAO1³¹¹.

IV.

Resultados
y
Discusión

1. Estudio transcriptómico de la cepa *fur* y la cepa salvaje tratada con EDTA de *S. Typhimurium*

1.1. Efectos globales en la expresión génica debidos a la ausencia de *fur* o a la presencia del quelante EDTA

Los resultados obtenidos después del procesado de los arrays de la cepa *fur* (array Fur) y de la cepa salvaje crecida en presencia del quelante EDTA (array EDTA), se presentan en la Tabla IV.1. En dicha tabla se han considerado aquellos genes que modificaban de forma estadísticamente significativa (con un adj. *p* value menor de 0,05) su patrón de expresión respecto a la cepa salvaje, es decir, que presentaban un valor de expresión ($\log\text{Ratio}(M)$) menor de -1 o mayor de 1 (Figura IV.1).

Tabla IV.1 Número de genes que cambian su patrón de expresión en los arrays EDTA y Fur

Genes	EDTA		Fur	
	total	%	total	%
STM	1176	27.5 ^a	1043	21.2 ^a
pSLT	23	23.9 ^b	11	11.5 ^b
CNB	581	23.1 ^c	592	23.6 ^c
TOTAL	1780	25.8^d	1646	23.9^d

Porcentajes calculados respecto el total de cada tipo de gen: ^asobre 4.274 STM; ^bsobre 96 pSLT; ^csobre 2.512 CNB; ^dsobre 6.882 totales

Como puede observarse, sobre los 6.882 genes de *S. Typhimurium* representados en el array, un total de 1.646 se expresaron de manera diferencial en la cepa *fur* respecto a la cepa salvaje. De forma que la deficiencia en dicho gen altera la expresión del 24% de los genes representados en el array. Algo mayor es el número de genes que alteran su expresión cuando el cultivo se trata con un agente quelante como es el EDTA. En este caso 1.780 genes, que representan casi un 26% del total de genes presentes en el array. En ambos casos la mayor parte de genes que alteran su patrón de expresión pertenecen a las clases STM y CNB. Cabe mencionar que alrededor del 70% de los genes CNB que modificaron su expresión respecto a la cepa salvaje pertenecían a la categoría de IGR (regiones intergénicas).

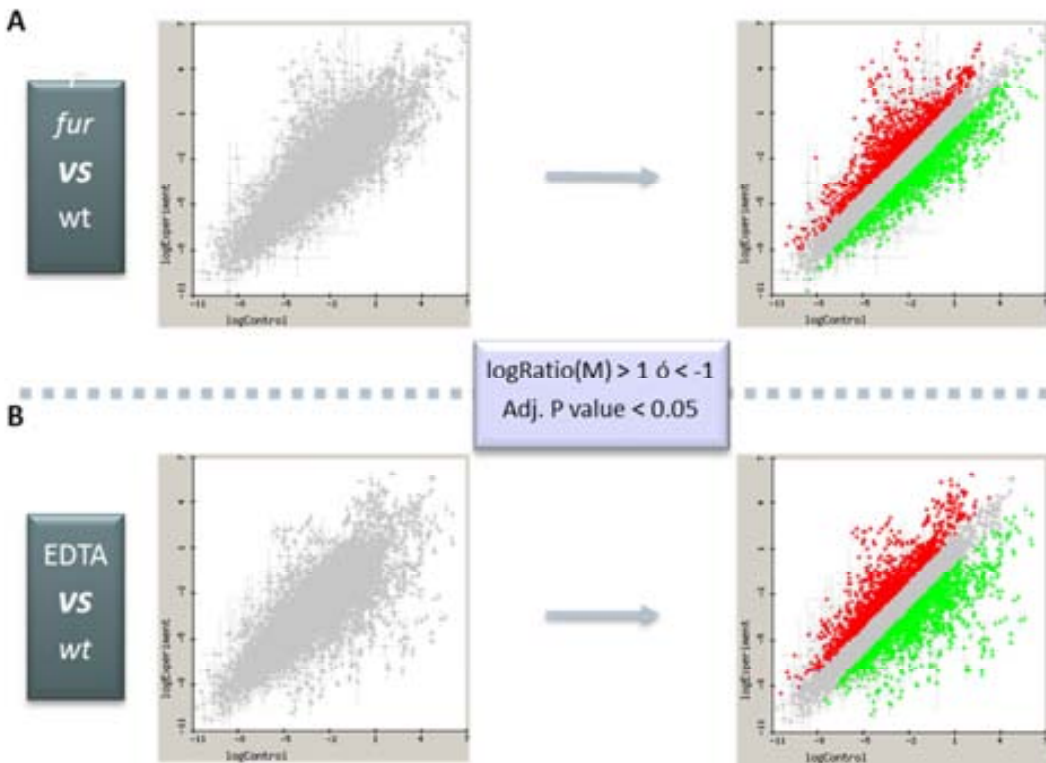


Figura IV.1. Visualización de los datos de los microarrays Fur (A) y EDTA (B) en el programa bioinformático FIESTA antes y después de aplicar los criterios de selección ($\log\text{Ratio}(M) > 1$ ó < -1 y $\text{adj. p value} < 0,05$). En rojo quedan representados los genes con un $\log\text{Ratio}(M)$ mayor de 1, en verde los genes con un $\log\text{Ratio}(M)$ menor de -1.

Estos resultados claramente indican que el transcriptoma de *S. Typhimurium* está estrechamente relacionado con las concentraciones de hierro extracelular y que es el regulador Fur quien de forma directa o indirecta se encarga de modular la expresión génica adaptándola a la concentración de hierro existente. Que el número de genes afectados por la presencia del quelante sea superior al detectado por la ausencia del regulador Fur no es sorprendente ya que, en el primer caso no sólo se está afectando a los genes relacionados con la concentración de hierro sino todos aquellos vinculados con algún catión divalente secuestrado por el quelante, como por ejemplo Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} .

Cuando se analizaron los resultados agrupando los genes según el valor de su $\log\text{Ratio}(M)$ se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla IV.2. En este caso, los datos se trataron separando aquellos genes con un valor de $\log\text{Ratio}(M)$ mayor de 1, que corresponden a genes que aumentan su expresión o están inducidos en el array, de aquellos que presentan un valor inferior a -1 y que por

tanto disminuyen su expresión o se encuentran reprimidos. Cabe aclarar que el incremento de la expresión de un gen detectado en el array de la cepa *fur* indica que la presencia del regulador tiene, de forma directa o indirecta, un efecto negativo sobre la expresión del gen en la cepa salvaje. Del mismo modo, aquellos genes con una expresión disminuida en ausencia de Fur son genes en los que el regulador ejerce un control positivo. Igual pasa en el caso del tratamiento con EDTA en el que es la disminución en la concentración de cationes divalentes la responsable de los cambios observados en la expresión génica.

Tabla IV.2 Número de genes que cambian su patrón de expresión según el valor de $\log\text{Ratio}(M)$ en los arrays EDTA y Fur

Genes	EDTA		Fur	
	$\log\text{Ratio}(M) > 1$	$\log\text{Ratio}(M) < -1$	$\log\text{Ratio}(M) > 1$	$\log\text{Ratio}(M) < -1$
STM	558	618	459	584
pSLT	10	13	8	3
CNB	362	219	266	326
TOTAL	930	850	733	913

De los 1.646 genes que cambiaron su patrón de expresión en la cepa *fur*, 733 (44%) lo hicieron incrementándola, mientras que los 913 restantes (56%) presentaron una expresión disminuida. Estas proporciones en el mutante *fur* se mantuvieron en las categorías de genes STM y CNB (56% y 55% genes reprimidos, respectivamente), siendo siempre un poco mayor el número de genes que disminuían su valor de expresión y por tanto sobre los que Fur tiene un efecto positivo en la cepa salvaje. Aproximadamente las mismas proporciones se observan en los datos obtenidos con el tratamiento con EDTA, corroborando así los resultados anteriores.

En conjunto, la distribución equitativa entre genes que incrementan y genes que disminuyen su expresión en los dos arrays indica que Fur tiene un efecto tanto positivo como negativo sobre la expresión génica de *S. Typhimurium*, igual que se ha descrito en *E. coli* y en otras especies bacterianas^{5, 229, 234}.

También se analizaron los datos obtenidos según los grupos funcionales (asignados para cada gen como *role category* en la base de datos Comprehensive Microbial Resource <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/ComrHomePage.cgi>). En la Figura IV.2 podemos observar el número de genes que pertenecen a cada uno de los 19 grupos funcionales existentes. De nuevo, los cambios en el perfil transcripcional de los genes de los diferentes grupos fueron similares en los dos arrays, tanto si incrementaban como si disminuían su expresión. Como era esperable dado el elevado número de proteínas de función desconocida en el

cromosoma de *S. Typhimurium*, el grupo mayoritario era el de genes sin función asignada (*no data*). También se observó un gran número de genes que forman parte de islas génicas (*islands*).

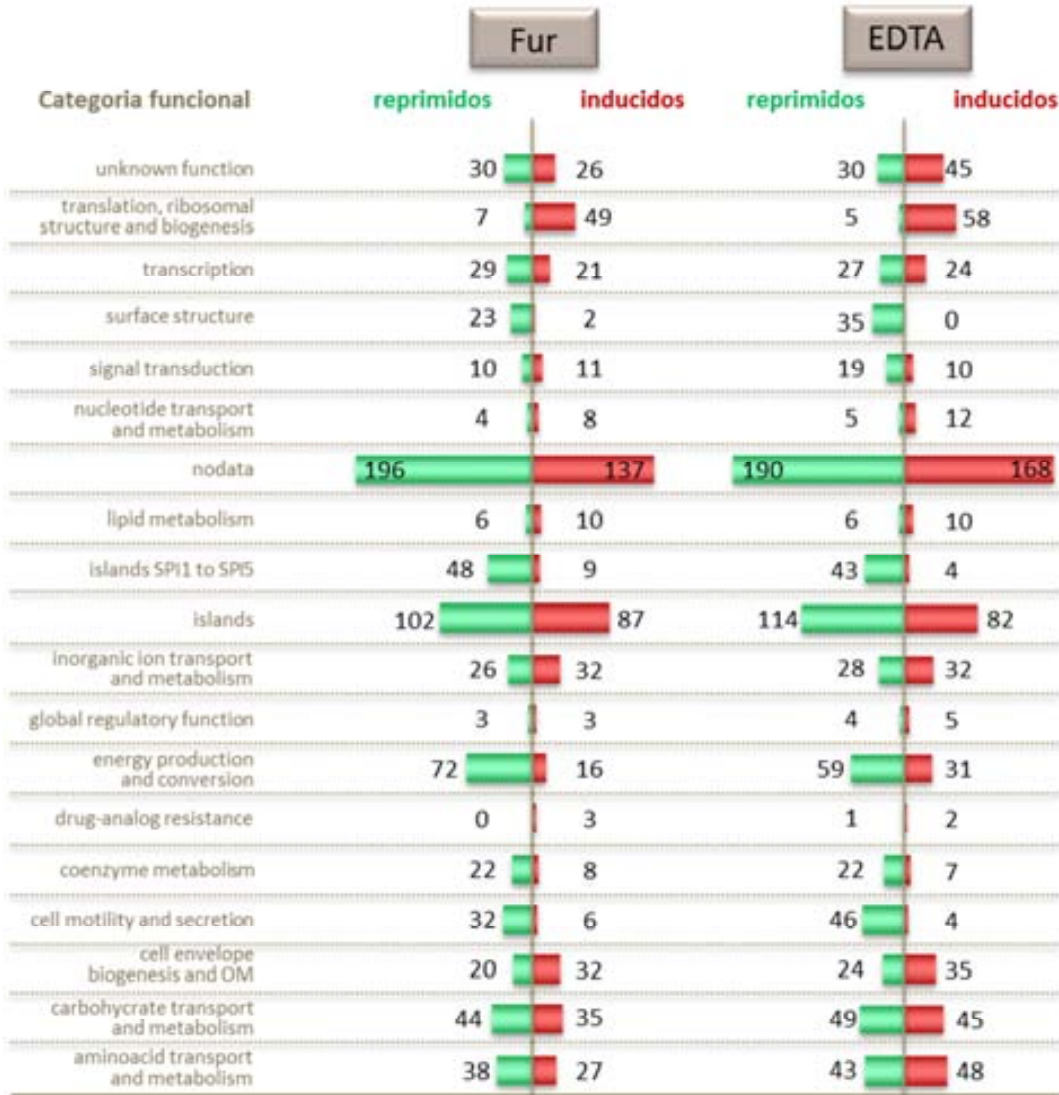


Figura IV.2. Representación gráfica del número de genes inducidos o reprimidos en los arrays *fur*-y EDTA, pertenecientes a cada una de las 19 categorías funcionales del CMR (Comprehensive Microbial Resource)

De los grupos funcionales que incrementaron su expresión en el array, tres destacan sobre los otros: los asociados a la biogénesis de la pared celular y a la membrana externa (*cell envelope biogenesis and OM*); los relacionados con el metabolismo y transporte de hierro (*inorganic ion transport and metabolism*) y los relacionados con transcripción, estructura ribosomal y biogénesis (*translation,*

ribosomal structure and biogenesis). En el primer grupo se engloban muchos genes pertenecientes al clúster *rfb*, relacionados con la síntesis del antígeno O del lipopolisacárido de membrana; el segundo grupo contiene toda una serie de genes relacionados con diferentes sistemas de captación de hierro; y el último grupo abarca una gran cantidad de genes que codifican para proteínas ribosomales. En el caso de los genes reprimidos destacaron los grupos de movilidad celular y secreción (*cell motility and secretion*) y de estructura de superficie (*surface structure*), de los que forman parte todos aquellos genes implicados en la quimiotaxis y en la síntesis de los flagelos; el grupo de producción y conversión de energía (*energy production and conversion*), al que pertenecen muchos genes del metabolismo anaeróbico de la célula; y el grupo de islas de patogenicidad SPI1-SPI5 (*island SPI1 to SPI5*), que agrupa los genes existentes en estas cinco islas de patogenicidad de *S. Typhimurium*. En resumen, el análisis de los datos según la agrupación funcional validó una vez más los datos obtenidos en los arrays ya que, dado que el regulador Fur se describió como el regulador principal de la homeóstasis de hierro en la célula^{196, 197}, cabía esperar que los genes afectados por su ausencia estuvieran relacionados con dicha función así como en la adaptación de las envueltas celulares a las concentraciones externas de los distintos cationes (en el caso de EDTA) o del hierro (en el caso de Fur). También se ha asociado el hierro con la estructuración de citocromos y otras proteínas en las que este catión actuaría como cofactor, así que su asociación a genes vinculados con la producción energética o con la biogénesis podría justificarse. Más sorprendentes eran las relaciones de Fur con otras funciones como aquellas asociadas a las islas de patogenicidad que indicaban que el hierro podía ser un marcador importante para la expresión de factores de virulencia codificados en las islas SPI1-5 o con la movilidad celular. Extendiendo el control ejercido por este regulador a otros ámbitos distintos de los relacionados con la homeostasis de hierro.

1.2. Efectos globales en la expresión génica debidos a la ausencia del complejo Fur-Fe²⁺

Como se ha citado en la introducción la interacción de Fur con el DNA, y por tanto su papel regulador es dependiente de la presencia de hierro en su estructura¹⁹⁷. Aunque se han propuesto algunos mecanismos de regulación de Fur en ausencia de su cofactor¹ en el presente trabajo se pretendió estudiar el regulón Fur en respuesta a la concentración de hierro. Por ello, de todos los datos obtenidos en los arrays se seleccionaron aquellos genes en que su expresión se modificaba tanto en el array de la cepa *fur* como en el de la cepa tratada con quelante, infiriendo que la coincidencia en los dos ensayos implica una relación entre el regulador Fur y la presencia de hierro.

La Figura IV.3 es una representación de los genes STM que coincidieron en términos de variación de su expresión génica (inducidos o reprimidos) en los dos estudios. En cada caso, el área del círculo muestra el número de genes totales mientras que la zona de solapamiento entre los círculos representa el número de genes coincidentes en cada situación. Se puede observar que el porcentaje de genes EDTA coincidentes es menor que en Fur, un 51 % frente a un 57 %, respectivamente. Se analizaron los genes discriminando aquellos que incrementaban su valor de expresión (inducidos) de los que lo disminuían (reprimidos) y se observó que el porcentaje de genes coincidentes es más elevado en el caso de los genes reprimidos. Así, un 57% y un 60% de los genes coinciden en presencia de EDTA y en la cepa *fur*, respectivamente.

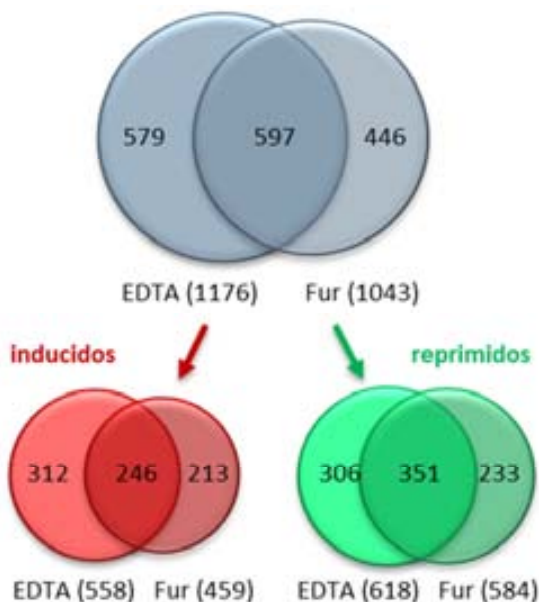


Figura IV.3. Representaciones gráficas en diagramas de Venn de los genes coincidentes en los arrays EDTA y Fur. En cada caso, el área de solapamiento indica el número de genes que se comportan del mismo modo. En la parte superior de la figura, el total de genes STM que cambian su valor de expresión en ambos arrays. En la parte inferior, los genes STM inducidos (rojo) o reprimidos (verde).

1.3. Composición del regulón Fur de *S. Typhimurium*

1.3.1. Genes pertenecientes al regulón Fur descritos con anterioridad

1.3.1.1. Genes asociados con la captación y homeostasis del hierro

Como se comentó en el apartado anterior, y como era de esperar, el análisis funcional de los genes que variaban su patrón de expresión en ambos arrays ponía de manifiesto que muchos de los genes estaban implicados con el transporte y captación de hierro. Así, no sólo el array quedó validado por los controles realizados (ver material y métodos) sino también por el hecho de que genes previamente descritos dentro del regulón Fur en *S. Typhimurium* o en bacterias filogenéticamente relacionadas como *E. coli*, presentaron el comportamiento esperado^{276, 288, 307}. En la Tabla IV.3 se listan dichos genes relacionados junto con sus niveles de expresión (logRatio(M)). Como puede observarse, en todos los casos se observa un incremento de la expresión respecto a la cepa salvaje tanto en la cepa crecida en presencia de quelante como en el mutante *fur*, con una única excepción, el gen *foxA*, que en ambos ensayos aunque presentaba un logRatio(M) mayor de 1, no superó los niveles establecidos en los criterios estadísticos. Sin embargo, sí que se observó el incremento de la expresión de dicho gen en los ensayos de qRT-PCR usados para la validación del ensayo.

Los genes que presentaron un mayor incremento de su expresión fueron aquellos relacionados con la síntesis de sideróforos como la enterobactina (*entA-F*) o la salmoquelina (*iroB-N*), cuya vinculación con Fur asegura que la célula no malgastará energía produciendo estas proteínas cuando la concentración de hierro es suficiente²⁷³. También se ven representados en esta tabla otros genes cuyos productos están asociados con la captación y el transporte de hierro como *fepABCDEG* (captación de Fe²⁺-Ent), *fhuACDB* (captación de hydroxamato-ferrico), *feoAB* (incorporación de ión ferroso), *fhuE* (captura de Fe²⁺-coprogen/ácido rodotorúlico), *fhuF* (captura de ferrioxamina B) y *cirA* (incorporación de hidroxibenzoato-ferrico). De igual manera, se observa la represión ejercida por Fur sobre los genes *tonB* y *exbBD*, requeridos para la transferencia dependiente de energía a través de la pared de los complejos Fe²⁺-sideróforo^{163, 164}. Así como el aumento en ausencia de Fur del gen *ydiE*, descrito como un factor de captación de hemina y regulador por Fur³⁰⁷.

Igualmente otros genes cuya vinculación con Fur se ha descrito con anterioridad también incrementan su expresión en ausencia de este regulador. Es el caso del operón *sufA-E* que funciona en el ensamblaje de complejos hierro-sulfuro durante la escasez de hierro y el estrés redox^{296, 312} y los genes *sitABCD* localizados dentro de la SPI1, que codifican un sistema de captación de hierro y manganeso⁵⁷.

Tabla IV.3

Genes implicados en el metabolismo del hierro controlados por Fur ya descrito

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³
<i>fhuA</i>	STM0191	outer membrane protein receptor / transporter for Fe-hydroxamate	+4,23 ^a	+5,1 ^a
<i>fhuC</i>	STM0192	ABC superfamily (atp_bind) / hydroxamate-dependent iron transport	+3,87 ^a	+5,05 ^a
<i>fhuD</i>	STM0193	ABC superfamily (bind_prot) / hydroxamate-dependent iron uptake	+2,43 ^a	+3,82 ^a
<i>fhuB</i> ↓	STM0194	ABC superfamily (membrane) / hydroxamate-dependent iron uptake	+1,57 ^b	+2,29 ^b
<i>foxA</i> ↓	STM0364	ferrioxamine receptor	NS	NS
<i>entD</i> ↑	STM0584	enterochelin synthetase, component D	+3,7 ^a	+4,16 ^a
<i>fepA</i>	STM0585	outer membrane porin, receptor for Fe-enterobactin	+5,82 ^b	+6,6 ^b
<i>Fes</i>	STM0586	enterochelin esterase. Fe-enterobactin utilization	+6,59 ^a	+8,3 ^a
<i>entF</i>	STM0588	enterobactin synthetase, component F	+4,43 ^a	+4,57 ^a
<i>fepE</i>	STM0589	Fe-enterobactin transporter	+3,61 ^a	+3,53 ^a
<i>fepC</i> ×	STM0590	ABC superfamily (atp_bind) / Fe-enterobactin transporter	+2,88 ^a	+2,95 ^a
<i>fepG</i>	STM0591	ABC superfamily (membrane) / Fe-enterobactin transporter	+2,42 ^a	+2,92 ^a
<i>fepD</i>	STM0592	ABC superfamily (membrane), Fe-enterobactin transporter	+1,72 ^a	+2,79 ^a
<i>ybdA</i> ↓	STM0593	putative POT family transport protein (<i>entS</i> enterobactin export)	+3,03 ^a	+4 ^a
<i>fepB</i> ↑	STM0594	ABC superfamily (peri_perm), Fe-enterobactin transporter	+2,84 ^a	+2,78 ^a
<i>entC</i>	STM0595	enterobactin biosynthesis	+5,12 ^a	+6,71 ^a
<i>entE</i>	STM0596	enterobactin biosynthesis	+4,34 ^b	+5,27 ^a
<i>entB</i>	STM0597	enterobactin biosynthesis	+6,24 ^a	+8,26 ^a
<i>entA</i>	STM0598	enterobactin biosynthesis	+4,55 ^a	+5,76 ^a
<i>ybdB</i> ↓	STM0599	hypotetical protein (enterobactin metabolism?)	+3,81 ^a	+5,2 ^a
<i>fhuE</i> ↑	STM1204	outer membrane receptor for Fe-hydroxamate transport	+1,34 ^a	+1,29 ^a
<i>ydiE</i> ↑	STM1346	putative hemin uptake factor	+2,13 ^a	+2,78 ^a

continuación Tabla IV.3

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³
<i>sufA</i>	STM1369	Fe-S formation	+3,73 ^a	+3,86 ^a
<i>sufB</i>	STM1370	putative ABC transporter / Fe-S formation	+4,22 ^a	+4,13 ^a
<i>sufC</i>	STM1371	putative ABC superfamily (atp_bind) / Fe-S formation	+5,22 ^a	+5 ^a
<i>sufD</i>	STM1372	Fe-S formation	+3,87 ^a	+4,42 ^a
<i>sufS</i>	STM1373	Fe-S formation	+3,52 ^a	+4 ^a
<i>ynhA</i> ↓	STM1374	putative SufE protein probably involved in Fe-S formation	+3,22 ^a	+3,42 ^a
<i>tonB</i> ↑	STM1737	energy transducer uptake of Fe and B ₁₂	+1,83 ^a	+2,91 ^a
<i>ftnB</i> ↓	STM1932	ferritin-like protein. Fe storage	NS	NS
<i>cirA</i> ↑	STM2199	outer membrane porin, receptor for colicin I, TonB-dependent	+2,83 ^b	+3,76 ^a
<i>iroB</i>	STM2773	putative glycosyl transferase, related to UDP-glucuronosyltransferase	+1,71 ^a	+6,56 ^a
<i>iroC</i>	STM2774	putative ATP binding cassette (ABC) transporte	+2,57 ^a	+7,08 ^a
<i>iroD</i>	STM2775	Similar to enterochelin esterase of E. coli	+2,63 ^a	+7,26 ^a
<i>iroE</i>	STM2776	putative hydrolase of the alpha/beta superfamily	+2,62 ^a	+7,45 ^a
<i>iroN</i> ↓	STM2777	TonB-dependent siderophore receptor protein	+2,74 ^b	+7,29 ^a
<i>sitA</i> ↓	STM2861	<i>Salmonella</i> iron transporter: fur regulated	+5,49 ^a	+4,78 ^a
<i>sitB</i> ↓	STM2862	<i>Salmonella</i> iron transporter: fur regulated	+4,3 ^a	+4,09 ^a
<i>sitC</i> ↓	STM2863	<i>Salmonella</i> iron transporter: fur regulated	+2,31 ^a	+1,68 ^a
<i>sitD</i> ↓	STM2864	<i>Salmonella</i> iron transporter: fur regulated	-1,35 ^a	-2,09 ^a
<i>exbD</i> ↓	STM3158	uptake of enterochelin tonB-dependent uptake of B ₁₂	NS	NS
<i>exbB</i>	STM3159	uptake of enterochelin tonB-dependent uptake of B ₁₂	+2,61 ^a	+2,78 ^a
<i>feoA</i> ↓	STM3505	Fe(II) iron transport protein A	+3,02 ^a	+3,4 ^a
<i>feoB</i> ↓	STM3506	Fe(II) iron transport protein B	+2,57 ^a	+3,06 ^a
<i>fhuF</i> ↑	STM4550	Fe-hydroxamate transport	+3,07 ^a	+3,76 ^a

¹La orientación génica y la organización transcripcional están indicadas por líneas verticales y recuadros, respectivamente

²Descripciones derivadas del Tigr

³El incremento (logRatio(M) >1) o la represión (logRatio(M) <-1) de los niveles de expresión causados por EDTA o Fur. **NS** son genes que no tienen un adj. p value significativo (<0,05). ^alas dos réplicas del array se comportan igual y el nivel de expresión es una media de los dos (n=2).

^bindica que los genes solo se afectan en una copia (n=1)

1.3.1.2. Genes asociados a funciones distintas a la captación y metabolismo del hierro

Se ha descrito que el regulador Fur controla, aparte de genes relacionados con el metabolismo del hierro, otros involucrados en funciones distintas^{276, 277, 313, 314}. En la Tabla IV.4 se muestran los valores de expresión obtenidos en los arrays de la cepa Fur defectiva y en presencia de EDTA para los genes que se ha descrito que pertenecen al regulón Fur pero cuya función es distinta a la captación y metabolismo del hierro.

Tabla IV.4 Genes controlados por Fur no involucrados en el metabolismo del hierro

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³
<i>gmpA</i> ↑	STM0772	phosphoglyceromutase 1	NS	+2,84 ^a
<i>sdhC</i> ↓	STM0732	succinate dehydrogenase, cytochrome b556	NS	-1,15 ^a
<i>sdhD</i> ↓	STM0733	succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit	NS	-1,45 ^a
<i>sdhA</i> ↓	STM0734	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	NS	-1,73 ^b
<i>sdhB</i> ↓	STM0735	succinate dehydrogenase, Fe-S protein	NS	-1,02 ^b
<i>sodB</i> ↑	STM1431	superoxide dismutase, iron	-1,45 ^a	-1,86 ^a
<i>fumA</i> ↓	STM1468	fumarase A (fumarate hydratase class I), aerobic	NS	-1,84 ^a
<i>fumC</i> ↓	STM1469	fumarase C (fumarate hydratase Class II)	NS	NS
<i>acnA</i> ↑	STM1712	aconitate hydratase 1	NS	NS
<i>nrdH</i> ↓	STM2805	glutaredoxin-like protein hydrogen donor	+6,62 ^a	+7,63 ^a
<i>nrdI</i> ↓	STM2806	stimulates ribonucleotide reduction	+5,5 ^a	+6,68 ^a
<i>nrdE</i> ↓	STM2807	ribonucleoside diphosphate reductase 2, alpha subunit	+3,59 ^a	+4,16 ^a
<i>nrdF</i> ↓	STM2808	ribonucleoside-diphosphate reductase 2, beta subunit	+3,17 ^a	+2,42 ^a
<i>sodA</i> ↓	STM4055	superoxide dismutase, manganese	+3,76 ^a	+1,9 ^a
<i>fumB</i> ↑	STM4300	fumarase B (fumarate hydratase class I), anaerobic	-3,61 ^a	-3,74 ^a

¹La orientación génica y la organización transcripcional están indicadas por líneas verticales y recuadros, respectivamente

²Descripciones derivadas del Tigr

³El incremento ($\log\text{Ratio}(M) > 1$) o la represión ($\log\text{Ratio}(M) < -1$) de los niveles de expresión causados por EDTA o Fur. **NS** son genes que no tienen un adj. p value significativo (< 0.05). ^alas dos réplicas del array se comportan igual y el nivel de expresión es una media de los dos ($n=2$).

^bindica que los genes solo se afectan en una copia ($n=1$)

Entre ellos destacar los genes que codifican las superóxido dismutasas SodA y SodB, regulados por Fur de manera negativa y positiva, respectivamente³¹⁵. El incremento de los niveles de expresión del operón *nrdHIEF*, que codifica una ribonucleótido reductasa no esencial, también concuerdan con la represión ejercida por el complejo Fur-Fe²⁺ sobre el gen *nrdH*, el primero de la unidad transcripcional, descrita recientemente^{314, 316}. Así como los niveles de

desregulación de los genes *fumAC*, *fumB* y *sdhCDAB*. Se sabe que la cepa *fur* de *E. coli* es incapaz de crecer en presencia de fumarato y succinato como únicas fuentes de carbono. Este fenotipo parece estar vinculado a la expresión de los genes *fumA* y *fumB* que codifican la fumarasa y por otro el operón *sdhCDAB* que codifica una succinato deshidrogenasa ¹⁴⁶. El gen *fumB* está controlado positivamente por la presencia de Fur y hierro ³¹⁷ y los genes *fumA* y *sdh* también pero indirectamente a través del sRNA RyhB ²³⁵, dicho patrón de expresión concuerda con los datos obtenidos en los dos arrays.

1.3.2. Identificación de nuevos genes pertenecientes al regulón Fur de *S. Typhimurium*

Uno de los objetivos principales del presente trabajo fue determinar la composición del regulón Fur de *S. Typhimurium* para identificar nuevos genes cuya expresión estuviera vinculada a la concentración de hierro a través del control por parte de dicho regulador transcripcional. Es evidente que el estudio del transcriptoma realizado permite diferenciar todos aquellos genes que de forma directa o indirecta están relacionados con la red de regulación de la proteína Fur. Sin embargo, en cualquier red génica es importante poder discernir sobre qué genes el regulador ejerce un efecto directo y establecer así los niveles de regulación dentro de la propia red. Para ello se utilizaron dos estrategias distintas, ambas basadas en la capacidad de Fur de interactuar con regiones promotoras de los genes que regula ²⁰⁶.

En primer lugar se definieron las unidades transcripcionales (UTs) que conformaban todos los genes que variaban su expresión en los ensayos transcriptómicos. Se consideraron como pertenecientes a una misma unidad transcripcional aquellos genes que no tuvieran regiones intergénicas mayores de 150 pb, que se transcribieran en la misma orientación que los genes adyacentes y que tuvieran el mismo patrón de expresión en los arrays ²²⁹. En los casos en que el patrón de expresión de posibles genes que podrían conformar una UT no fuera el mismo o los datos del array para alguno de los genes no fuera estadísticamente significativo, éste se confirmó mediante qRT-PCR, comparando el nivel de expresión del gen problema en la cepa *fur* respecto al de la cepa salvaje.

De todas las UTs definidas se buscó la región promotora, considerando ésta como los 300 pb anteriores al codón de inicio de la traducción del primer gen y los 50 pb posteriores al mismo y se realizaron EMSAs. A modo de control positivo de estos ensayos se utilizaron las regiones promotoras (P) de los genes *fhuA* y *foxA* (P_{fhuA} y P_{foxA} , respectivamente), ambos reprimidos directamente por Fur ³⁰⁷. Como era

esperable los EMSAs revelan que dichas regiones promotoras interaccionan con la caja Fur (Figura IV.4). Además puede observarse que la adición de concentraciones crecientes de proteína Fur provocan la aparición de diversas bandas de interacción características de proteínas que presentan interacción cooperativa, como es el caso de este regulador transcripcional.

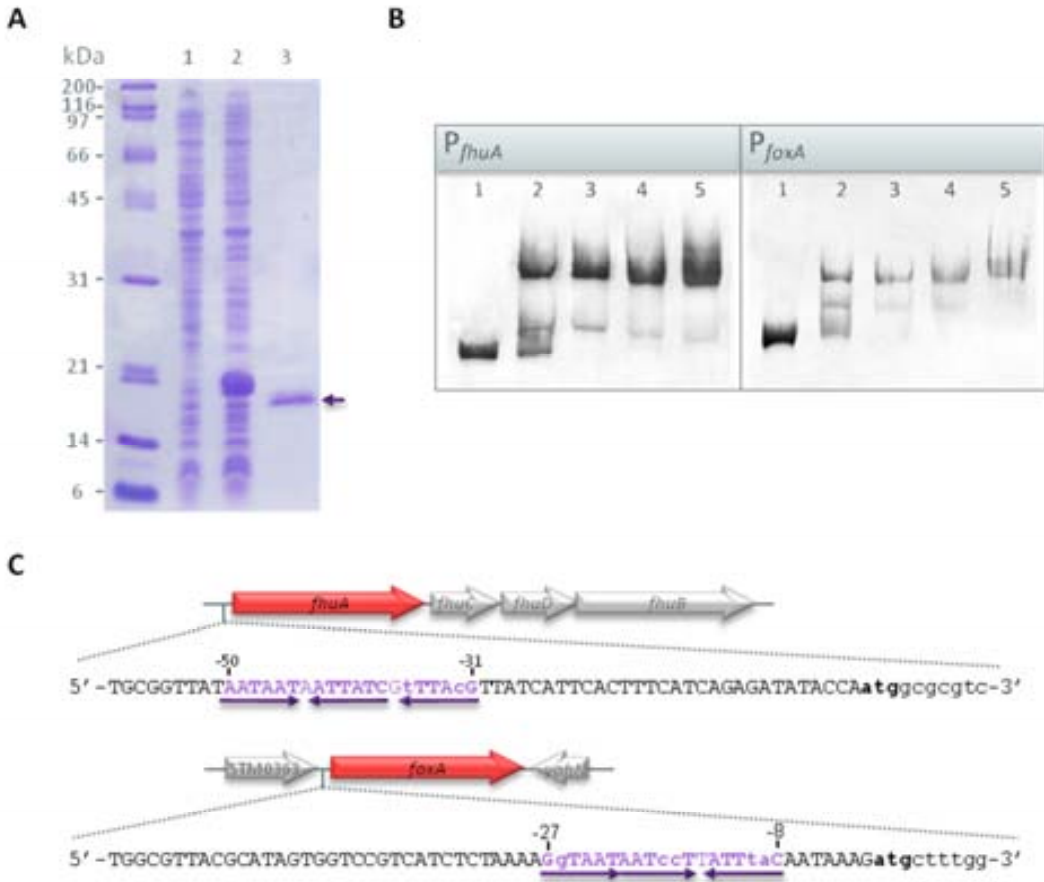


Figura IV.4. A. Gel SDS-PAGE, sobreexpresión y purificación de la proteína Fur. Los carriles 1 y 2 contienen extractos crudos de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS pET15_fur en ausencia y presencia de IPTG 10 mM, respectivamente. El carril 3 contiene la proteína Fur purificada, después de liberar la cola de histidinas cortando con la proteasa trombina. Los pesos moleculares del marcador de peso molecular Broad Range (Biorad) están indicados a la izquierda. **B. EMSAs con Fur y las regiones promotoras de los genes *fhuA* (P_{fhuA}) y *foxA* (P_{foxA}).** En cada caso: 20 nM de DNA marcado en presencia de concentraciones crecientes (5, 25, 100 y 375 nM, carriles 2-5) de proteína Fur. Se muestra la movilidad de los fragmentos de DNA en ausencia de proteína (carril 1). **C. Organización génica y zonas promotoras de los genes *fhuA* y *foxA*.** En cada caso está representado: en minúsculas y negrita el codón de inicio de la traducción; en morado la caja Fur identificada por el programa Virtual footprint, con las posiciones respecto al codón de inicio de la traducción indicadas. Las flechas muestran la organización de los hexámeros (NATWAT) y las letras minúsculas indican una diferencia en la secuencia consenso.

Posteriormente se realizó una búsqueda *in silico* de cajas de unión de la proteína Fur en su región promotora. Para ello se utilizó la herramienta bioinformática *Virtual Footprint* (<http://prodoric.tu-bs.de/vfp/>)³¹¹ usando como criterios de búsqueda los que se indican en detalle en el apartado de material y métodos. La búsqueda *in silico* identificó una posible caja Fur con 3 repeticiones del hexámero consenso (5'-NATWAT-3')²²¹ en P_{fhuA} en la posición de -50 a -30 respecto al codón de inicio de la traducción. El primer hexámero tiene una orientación 5' → 3' respecto al gen, mientras que el segundo y el tercero están en sentido inverso y cada repetición está separada por 1 pb (→1←1←). Las dos primeras son repeticiones perfectas de la secuencia consenso, mientras que la tercera varía solo en un nucleótido. En el caso de P_{foxA} se determinó la presencia de una posible caja Fur, entre las posiciones -27 y -8, compuesta por tres hexámeros orientados →→1←, variando en 4 nucleótidos de la secuencia consenso. En ambos casos los resultados de la búsqueda *in silico* se correlacionaban con los descritos para ambos promotores³⁰⁷

La confirmación mediante EMSAs de la presencia de regiones de interacción de la proteína Fur en las regiones promotoras de los genes que alteran su expresión en los ensayos transcriptómicos y la identificación de las cajas de unión *in silico*, permitió diferenciar de entre todos ellos aquellos sobre los que el regulador Fur tiene un efecto directo y por lo tanto aquellos situados en un primer nivel de control dentro de la red génica. Por otro lado, todas aquellas UTs en las que no se identificó una región de interacción, están, dentro de la red génica, como mínimo en un segundo nivel, es decir, su expresión varía porque Fur está regulando algún gen que a su vez regula dicha UT (segundo nivel) u otra que contiene un gen que de algún modo acaba relacionándose con la UT identificada (más de segundo nivel). Estas relaciones en cascada son las que finalmente conforman todo el regulón Fur y definen toda la respuesta que, de algún modo, se dispara en función de la concentración de hierro extracelular.

Se identificaron un total de 70 UTs cuyo patrón de expresión estaba vinculado a la concentración de hierro y a la presencia del regulador transcripcional, éstas a su vez, se clasificaron en función de si incrementaban o disminuían su expresión.

2. Identificación de nuevos genes reprimidos por el complejo Fur-Fe²⁺

El estudio de transcriptómica permitió identificar un total de 70 genes que incrementaron su expresión en ausencia de Fur y en presencia de EDTA, que no se habían asociado con anterioridad al regulón Fur. En la Tabla IV.5 se representan estos genes que están formando un total de 22 UTs. Se observaron 62 genes que forman parte de 12 UTs policistrónicas distintas mientras que los 10 genes restantes se transcriben individualmente. A nivel funcional, dichos genes se agrupan en tres categorías mayoritarias: reguladores transcripcionales, proteínas de membrana y genes de metabolismo.

Tabla IV.5 Genes con un valor de expresión mayor de 1 en los arrays EDTA y Fur

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³	FI
↑	STM0031	putative transcription regulator	NS	+1,83 ^a	
<i>mrcB</i> ↓	STM0190	transpeptidase of penicillin-binding protein 1b (peptidoglycan synthetase)	+1,06 ^b	+1,33 ^a	
↓	STM0363	putative transcription regulator, AraC family	+1,46 ^a	+3,65 ^a	22,63
<i>cyoE</i> ↑	STM0439	protohaeme IX farnesyltransferase (haeme O biosynthesis)	+2,1 ^b	+2,22 ^a	3,29
<i>cyoD</i>	STM0440	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	+4,67 ^a	+3,84 ^a	
<i>cyoC</i>	STM0441	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III	NS	+5,18 ^b	3,52
<i>cyoB</i>	STM0442	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	+2,65 ^b	+1,62 ^a	3,42
<i>cyoA</i>	STM0443	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	+6,16 ^a	+4,42 ^a	3,66
↓	STM0581	putative regulatory protein	NS	+1,3 ^a	2,32
<i>moaA</i>	STM0802	molybdopterin biosynthesis, protein A	NS	+1,08 ^b	
<i>moaB</i>	STM0803	molybdopterin biosynthesis, protein B	+1,15 ^a	+1,95 ^a	
<i>moaC</i>	STM0804	molybdopterin biosynthesis, protein C	NS	1,76 ^a	
<i>moaD</i>	STM0805	molybdopterin biosynthesis protein	NS	+1,99 ^a	
<i>moaE</i> ↓	STM0806	molybdopterin converting factor, subunit 2	NS	+1,7 ^a	
<i>yceD</i> ↓	STM1190	putative metal-binding	+1,75 ^a	+1,8 ^a	
<i>plsX</i>	STM1192	putative fatty acid/phospholipid synthesis protein	+0,83 ^b	+1,14 ^b	
<i>fabH</i>	STM1193	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III acetylCoA ACP transacylase	+1,06 ^a	+1 ^a	
<i>fabD</i>	STM1194	malonyl-CoA-[acyl-carrier-protein] transacylase	+1,14 ^a	+1,2 ^a	
<i>fabG</i> ↓	STM1195	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	+1,19 ^a	+1,42 ^a	

continuación Tabla IV.5

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³	FI
	STM1255	putative ABC transporter periplasmic binding protein	+3,46 ^a	+2,63 ^a	
	STM1256	putative ABC transporter	+1,87 ^a	+1,57 ^a	
	STM1257	putative ABC transporter	+1,36 ^a	+1,54 ^a	
	STM1258	putative ATPase component of ABC-type transport system	+2,08 ^a	+1,53 ^b	
↓	STM1259	putative ATPase component of ABC-type transport system	+1,02 ^b	NS	
<i>astC</i>	STM1303	succinylornithine transaminase, also has acetylornithine transaminase activity	+2,23 ^a	+1,97 ^a	
<i>astA</i>	STM1304	arginine succinyltransferase	+2,53 ^a	+2,37 ^a	
<i>astD</i>	STM1305	succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase	+2,22 ^a	+2,21 ^a	
<i>astB</i>	STM1306	succinylarginine dihydrolase	+1,25 ^a	+1,39 ^a	
<i>astE</i> ↓	STM1307	succinylglutamate desuccinylase	1,37 ^b	NS	
<i>marB</i> ↑	STM1518	multiple antibiotic resistance protein	+1,43 ^b	+1,9 ^a	
<i>marA</i>	STM1519	transcriptional activator of defense systems (AraC/XylS family)	+1,9 ^a	+1,56 ^a	2,47
<i>marR</i> ↓	STM1520	transcriptional repressor of <i>marRAB</i> operon, multiple antibiotic	+1,13 ^b	NS	1,03
<i>ansP</i> ↓	STM1584	APC family, L-asparagine transport protein	+1,36 ^a	+2,31 ^a	
	STM1585	putative outer membrane lipoprotein	+2,87 ^a	+2,46 ^a	
	STM1586	putative periplasmic protein	+3,88 ^a	+5,16 ^a	
<i>yncD</i> ↓	STM1587	paral putative outer membrane receptor	+1,46 ^b	+1,82 ^b	
<i>yncC</i> ↑	STM1588	putative regulatory protein, gntR family	+1,18 ^b	+1,21 ^b	4,73
<i>ycaA</i> ↑	STM1773	putative transcriptional regulator	NS	NS	
<i>sirC</i>	STM1774	Regulation of invasion genes	+1,02 ^b	+1,32 ^b	3,11
<i>hemK</i>	STM1775	putative protoporphyrinogen oxidase	NS	NS	
<i>prfA</i>	STM1776	peptide chain release factor RF-1	NS	NS	
<i>hemaA</i> ↑	STM1777	glutamyl tRNA reductase	NS	NS	
<i>rfbP</i> ↑	STM2082	LPS side chain defect: bifunctional enzyme: undecaprenol-phosphate	+2,41 ^b	NS	
<i>rfbK</i>	STM2083	LPS side chain defect: phosphomannomutase	NS	+1,42 ^b	2,47
<i>rfbM</i>	STM2084	LPS side chain defect: mannose-1-phosphate guanylyltransferase	NS	NS	
<i>rfbN</i>	STM2085	LPS side chain defect: rhamnosyl transferase	+1,1 ^b	+1,75 ^b	
<i>rfbU</i>	STM2086	LPS side chain defect: mannosyl transferase	NS	NS	
<i>rfbV</i>	STM2087	LPS side chain defect: abequosyltransferase	NS	NS	
<i>rfbX</i>	STM2088	LPS side chain defect: putative O-antigen transferase	NS	NS	2,44
<i>rfbJ</i>	STM2089	LPS side chain defect: CDP-abequose synthase	+2,97 ^b	+1,57 ^b	
<i>rfbH</i>	STM2090	LPS side chain defect: CDP-6deoxy-D-xylo-4-hexulose-3-dehydrase	+2,39 ^a	+1,04 ^a	

continuación Tabla IV.5

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³	FI
<i>rfbG</i>	STM2091	LPS side chain defect: CDP glucose 4,6-dehydratase	+2,99 ^a	+1,02 ^b	
<i>rfbF</i>	STM2092	LPS side chain defect: glucose-1-phosphate cytidyltransferase	+3,12 ^a	+1,2 ^a	
<i>rfbI</i>	STM2093	LPS side chain defect: CDP-6-deoxy-delta3,4-glucoseen reductase	+1,47 ^a	+1,23 ^a	
<i>rfbC</i>	STM2094	dTDP-4,deoxyrhamnose 3,5 epimerase	+1,28 ^a	1,13 ^a	
<i>rfbA</i>	STM2095	dTDP-glucose pyrophosphorylase	+2,79 ^a	+1,82 ^a	2,05
<i>rfbD</i>	STM2096	TDP-rhamnose synthetase	+2,21 ^a	+2,09 ^a	
<i>rfbB</i>	STM2097	dTDP-glucose 4,6 dehydratase	+1,99 ^b	+1,75 ^b	2,59
	STM2197	putative phosphoserine phosphatase	+1,58 ^a	NS	
	STM2198	putative regulatory protein	+2,34 ^a	+4,05 ^a	
	STM2374	putative helix-turn-helix regulatory protein	+1,08 ^b	+2,23 ^b	
<i>Mig14</i>	STM2782	putative transcription activator	+1,86 ^a	+1,71 ^a	
	STM4535	putative PTS permease	+2,57 ^a	+2,22 ^a	
	STM4536	putative PTS permease	+2,42 ^a	+2,05 ^a	
	STM4537	putative PTS permease	+1,73 ^a	+2,2 ^a	
	STM4538	putative PTS permease	+1,47 ^a	+1,9 ^a	
	STM4539	putative glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	+1,76 ^b	+2,16 ^b	
	STM4540	putative glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	+1,29 ^b	+0,89 ^a	
<i>yjjQ</i>	STM4547	putative transcriptional regulator (LuxR/UhpA family)	NS	NS	15,58
<i>bglJ</i>	STM4548	transcriptional regulator (activator) of <i>bgl</i> operon (LuxR/UhpA)	+1,55 ^a	+2,07 ^a	

En rojo se representan los 22 genes cuya región promotora se probó mediante EMSA.

¹La orientación génica y la organización transcripcional están indicadas por líneas verticales y recuadros, respectivamente.

²Descripciones derivadas del Tigr.

³ El incremento (>1) o la represión (<-1) de los niveles de expresión (LogRatio(M)) causados por EDTA o Fur. **NS** son genes que no tienen un adj.p.value. ^alas dos réplicas del array se comportan igual (n=2) y el nivel de expresión es una media de los dos. ^bindica que los genes solo se afectan en una copia (n=1)

2.1. Control negativo de reguladores transcripcionales

Diez de los genes listados en la Tabla IV.5 son reguladores transcripcionales, de ellos, cuatro forman parte de UTs policistrónicas (*marR*, *sirC*, *STM2198* y *STM4548*) y el resto de UTs monocistrónicas. Estos últimos codifican la proteína Mig-14, regulador que contribuye a la virulencia de *Salmonella* en el modelo murino³¹⁸; proteínas asociadas a familias de proteínas reguladoras como AraC (*STM0363*) o GntR (*yncC*) y el resto se anotan como probables reguladores transcripcionales (*STM0031*, *STM0581* y *STM2374*). Los EMSAs realizados con las regiones promotoras de las distintas UTs, mostrados en la figura IV.5, ponen de manifiesto que, de todos ellos, la proteína Fur sólo interacciona directamente con el promotor del gen *STM0363* (P_{0363}). En este caso, el análisis bioinformático detectó una posible caja entre las regiones -97 y -77 respecto al codón de inicio de la traducción (Figura IV5). Esta caja está formada por 3 hexámeros separados por 1 y 2 pb el uno del otro, organizados de forma $\rightarrow 1 \leftarrow 2 \rightarrow$. El segundo y el tercer hexámero difieren en un nucleótido de la secuencia consenso, mientras que el primero coincide completamente.

Los análisis comparativos con las bases de datos existentes realizados con la proteína STM0363 determinan la existencia de un dominio de interacción con el DNA en el extremo C-terminal de ésta y la incluyen dentro de la familia de posibles activadores transcripcionales del tipo XylS/AraC. Sin embargo, no se conoce qué genes puede estar regulando esta proteína pero será de bien seguro el responsable de la activación de otro/s gen/es vinculados con el regulón Fur. En este caso, y dado que aparentemente se trata de un activador transcripcional, el/los gen/es que se encuentren bajo su control directo estarán formando parte de los genes que incrementan su expresión en ausencia de hierro o en la cepa Fur deficiente.

2.2. Control negativo de proteínas de la envuelta y la síntesis de pared

Un total de 33 genes pertenecientes a 9 UTs codifican proteínas asociadas a la envuelta celular o con funciones en la síntesis de la misma (Tabla IV.5).

De ellos, 13 genes se agrupan en tres operones, uno contiene los genes STM1255-59 y codifica un sistema de transporte de tipo ABC, otro está formado por los genes STM4535-40 y da lugar a una permeasa de tipo PTS (*PEP-dependent phosphotransferase system*), y el último (genes STM1586-5) son una proteína periplasmática y una lipoproteína. Otros tres genes codifican una posible proteína de unión a metal (*yceD*), una permeasa para el aminoácido L-asparagina (*ansP*)³¹⁹ y un receptor de membrana externa (STM1587), respectivamente.

Para identificar si su vinculación con Fur era directa o indirecta se realizaron EMSA usando como sondas las zonas promotoras de las distintas UTs identificadas (P_{1255} , P_{4535} , P_{yceD} , P_{ansP} , P_{1587-6}). Como puede observarse en la figura IV.6, de todas ellas, sólo el promotor P_{1587-6} sufrió un retraso electroforético en los ensayos de movilidad. La sonda P_{1587-6} usada en los EMSA corresponde a la región que separa dos genes (STM1587 y STM1586) que están dispuestos de manera divergente en el genoma y separados por 264 pb. Además el gen STM1586 forma unidad transcripcional con el gen anterior, STM1585. Así la zona P_{1587-6} en realidad ocupa la región promotora de dos UTs. El gen homólogo a STM1587 en *E. coli* es el *yncD* que codifica un receptor para el transporte de hierro dependiente de TonB³²⁰ y STM1585 se anota como una supuesta lipoproteína de membrana externa. También se ha descrito que, en *E. coli*, los homólogos a STM1587 y STM1586 están reprimidos por la proteína Fur²⁷³. En este caso el incremento de la expresión detectado en los ensayos transcriptómicos confirman para *S. Typhimurium* lo descrito en *E. coli* y además, los EMSA realizados sobre la región promotora de ambas UTs determinan que la regulación que Fur ejerce sobre ellas es directa. Estudios *in silico* de la región P_{1587-6} permitieron la identificación de una posible caja Fur entre las posiciones -169 y -150 respecto al inicio de traducción de este gen STM1587 formada por tres hexámeros organizados $\rightarrow\rightarrow 2\leftarrow$ que sólo discrepan en 2 nucleótidos de la caja consenso de *E. coli* (Figura IV.6).

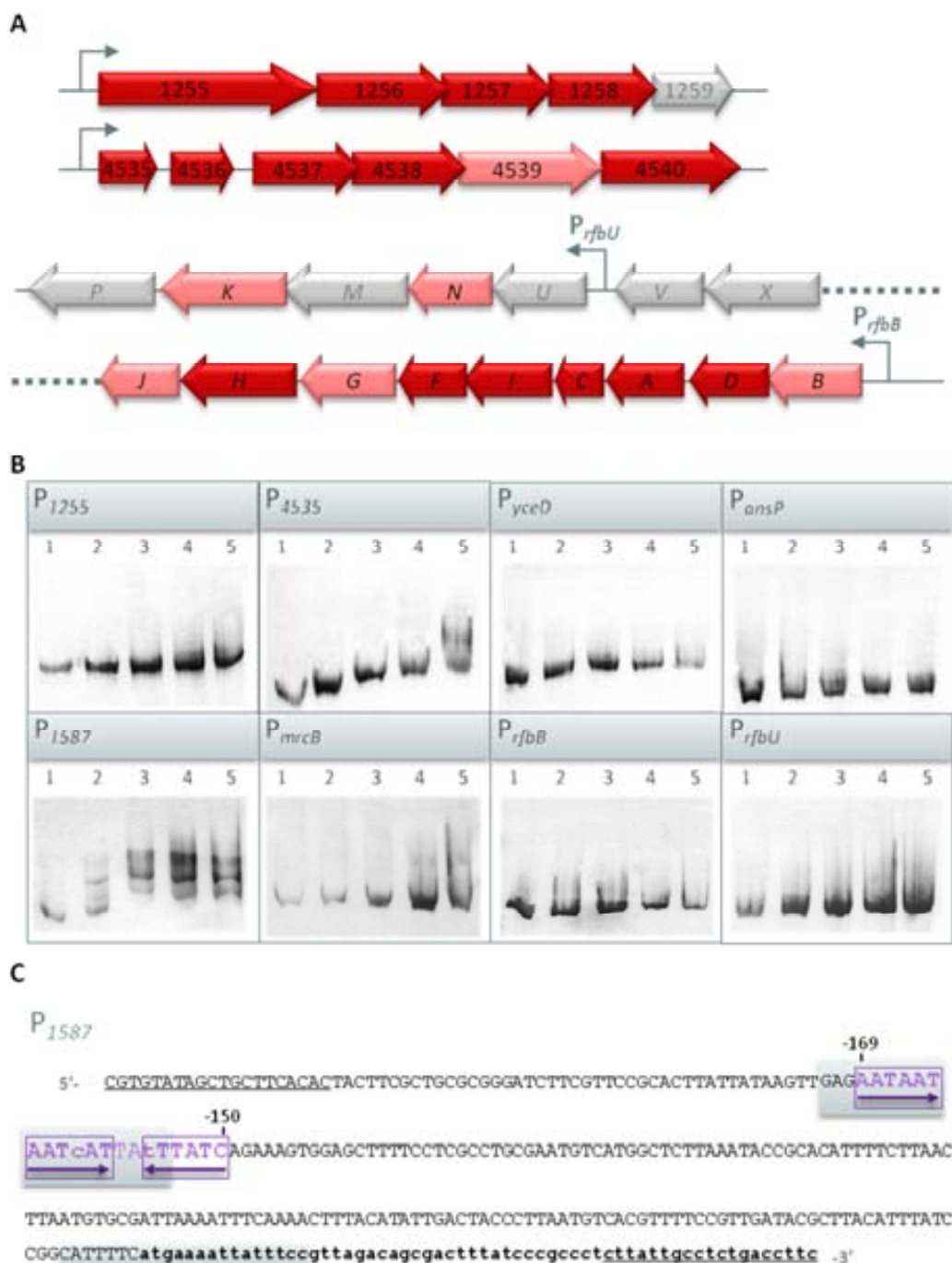


Figura IV.6. Proteínas de la envuelta y para la síntesis de la pared con un valor de expresión >1 en los arrays. A. Organización de las UTs policistrónicas mostrando el promotor mediante una flecha. En color rojo oscuro se indican los genes con las dos réplicas inducidas en el array Fur y en rojo claro cuándo sólo una de las réplicas se induce. **B.** EMSAs de cada promotor señalado utilizando concentraciones crecientes de proteína Fur (5, 25, 100 y 375 nM, carriles 2-5) o en ausencia de proteína (carril 1). **C.** Zona promotora del gen STM1587. Las secuencias subrayadas indican los oligonucleótidos utilizados para amplificar la sonda P_{1587} , en minúsculas y negrita se indica la región de codificación del gen STM1587. En gris se indica las cajas Fur identificadas con el programa Virtual footprint. En morado se indica la secuencia de la posible caja Fur y se enmarcan

los hexámeros que forman la secuencia de unión indicando en cada caso su orientación mediante una flecha. En minúsculas se representan los nt que varían de la secuencia consenso.

A parte de los anteriores, los estudios transcriptómicos también determinaron la asociación del regulón Fur con genes cuyos productos génicos están vinculados a la síntesis de la pared bacteriana. Éste es el caso del gen de una sintetasa del peptidoglicano (*mrcB*) y del grupo de genes *rfb* que consta de 16 genes involucrados en la síntesis y acoplamiento del antígeno O (AgO) del lipopolisacárido³²¹. La organización génica de los genes *rfb* se representa en la figura IV.6, los genes pertenecientes a este clúster pueden clasificarse según su función^{321, 322}. Así pues, existen genes relacionados con la biosíntesis de los azúcares TDP-Ramnosa, CDP-Abecucosa y GDP-Manosa (*rfbBDAC*, *rfbIFGHJ* y *rfbMK*, respectivamente); genes que codifican distintas transferasas, de la abecucosa (*rfbV*), de la manosa (*rfbU*), de la ramnosa (*rfbN*) y de la galactosa (*rfbP*) y finalmente el gen *rfbX* que codifica una proteína integral de membrana que está involucrada en el ensamblaje del AgO. Aunque la estructura de estos genes parece indicar que se transcriben todos como un único operón se han localizado dos posibles promotores, uno delante de *rfbB*, y otro en la región intergénica entre *rfbV* y *rfbU*. Por ello se eligieron estos dos promotores (P_{rfbB} y P_{rfbU}) para realizar los EMSAs con la proteína Fur.

En ningún caso, ni usando el promotor del gen *mrcB* o los descritos para el clúster *rfb* se observó interacción con la proteína Fur, así que este regulador, pese a modular la expresión de dichos genes, no está actuando directamente en *S. Typhimurium* sobre el control transcripcional de los genes *rfb* ni del gen *mrcB* (Figura IV.6).

2.3. Control negativo de genes del metabolismo

Por último, en la tabla IV.5 también aparecen algunos genes que tienen funciones metabólicas. Concretamente se puede observar que los genes de aerobiosis *cyoA-E*, que codifican la citocromo *c* oxidasa, ven incrementada su expresión en el mutante *fur* y en presencia de EDTA. Estos resultados se contraponen con los resultados reportados en otros trabajos realizados en *E. coli* en los que se describe que dichos genes son activados por la proteína Fur^{236, 273}. Por este motivo, se confirmaron los datos del array Fur mediante ensayos de qRT-PCR y, como se observa (Tabla IV.5), los resultados obtenidos corroboran los observados en el del array (Figura IV.7). Demostrando inequívocamente que, a diferencia de lo descrito en *E. coli*, Fur ejerce un control negativo los genes *cyoA-E* en *S. Typhimurium*.

Además, los EMSA usando la región promotora del gen *cyoA* (P_{cyoA}) revelaron que la relación de dicho promotor con Fur es indirecta ya que no se observó ningún cambio en la movilidad electroforética del promotor (Figura IV.7).

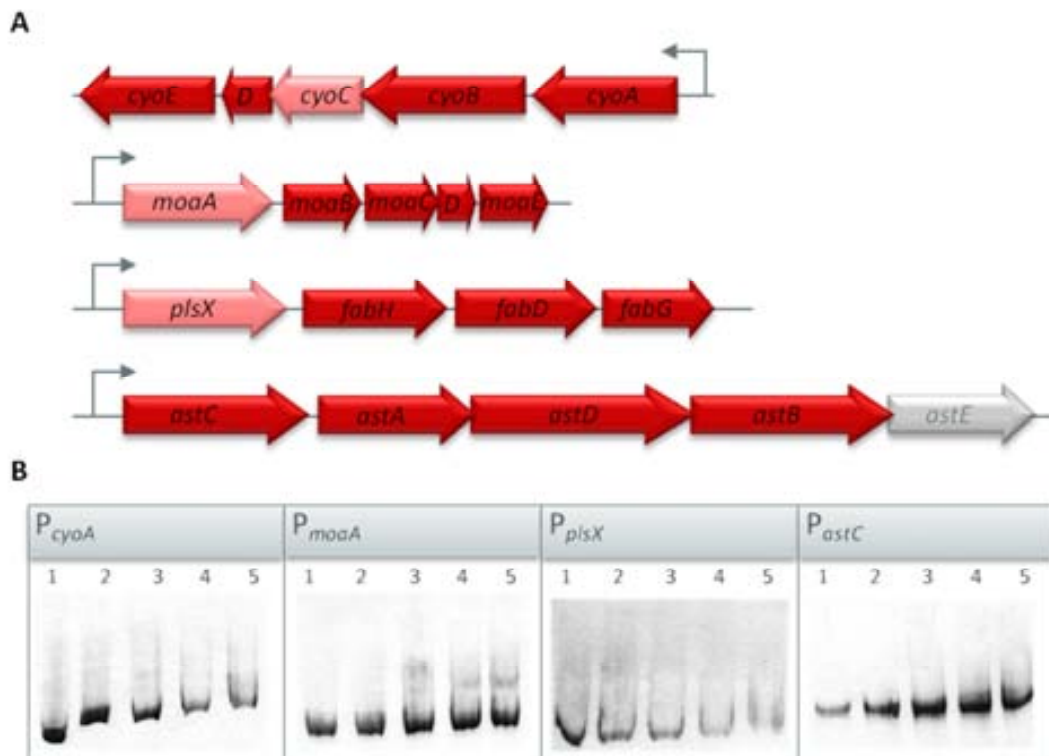


Figura IV.7. Genes del metabolismo con un valor de expresión >1 en los arrays. A. Organización de las UTs policistrónicas mostrando el promotor mediante una flecha. En color rojo oscuro se indican los genes con las dos réplicas inducidas en el array Fur y en rojo claro cuándo sólo una de las réplicas se induce. **B.** EMSAs de cada promotor señalado utilizando concentraciones crecientes de proteína Fur (5, 25, 100 y 375 nM, carriles 2-5) o en ausencia de proteína (carril 1).

Los genes *moaA-E*, vinculados con el metabolismo del molibdeno, también ven incrementada su expresión en un mutante Fur defectivo o en condiciones de escasez de hierro como puede observarse en la tabla IV.5. Sin embargo, como muestran los EMSA (Figura IV.7), el vínculo con la proteína Fur es indirecto. La relación del regulón Fur con el molibdeno no es sorprendente, este elemento es un oligoelemento esencial para *S. enterica* ya que forma parte de enzimas importantes para la respiración anaeróbica¹²⁸. El metabolismo del molibdeno es estrictamente dependiente del metabolismo del hierro a distintos niveles, ya que la biosíntesis del cofactor Fe-Mo se basa en la síntesis de complejos Fe-sulfuro³²³, por lo tanto su asociación con el regulón Fur hace evidente la relación entre el metabolismo de ambos elementos.

Finalmente destacar que también ven modificada su expresión los genes *plsX-fab* y *ast*, que codifican enzimas implicados en la biosíntesis de ácidos grasos³²⁴ y la arginina succiniltransferasa³²⁵, respectivamente. Los estudios EMSA realizados utilizando como sonda P_{plsX} y P_{astC} fueron también negativos, denotando la implicación indirecta de Fur en el cambio observado a nivel transcripcional (Figura IV.7).

3. Identificación de nuevos genes activados por el complejo Fur-Fe²⁺

En la tabla IV.6 se listan los 190 genes que presentan un valor LogRatio(M) menor de -1 en el array y por tanto aquellos en los que el complejo Fur-Fe²⁺ ejerce un efecto positivo sobre su expresión.

Como se ha citado anteriormente, muchos trabajos demuestran que Fur puede tener un efecto activador directo sobre algunos genes en numerosas especies bacterianas como *N. meningitidis*, *H. pylori* y *E. coli*^{253, 256, 273}. En este trabajo de Tesis Doctoral se decidió determinar si en el regulón Fur de *S. Typhimurium* también existían genes que tuvieran una regulación similar. Por ello, siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado en el caso de los genes regulados negativamente, se determinó si el regulador transcripcional se unía directamente a los promotores de los genes que regula positivamente.

De la misma manera que con los genes inducidos en el array, se clasificaron los genes en función de las categorías funcionales asociadas con su anotación. En este caso los genes se agruparon básicamente en cuatro tipologías funcionales distintas: reguladores transcripcionales, proteínas de la envuelta, genes asociados con el metabolismo energético y genes asociados a virulencia.

Tabla IV.6 Genes con un valor de expresión menor de -1 en los arrays EDTA y Fur

Gen	Código ID	Descripción	EDTA	Fur	FI
<i>prpB</i>	STM0368	putative carboxyphosphoenolpyruvate mutase	NS	-1,6 ^b	
<i>prpC</i>	STM0369	putative citrate synthase	-1,4 ^b	-2,34 ^a	
<i>prpD</i>	STM0370	putative protein in propionate catabolism	-1,22 ^a	NS	
<i>prpE</i> ↓	STM0371	putative acetyl-CoA synthetase, propionate catabolism operon	-1,08 ^a	-1,19 ^a	
<i>cydA</i> ↓	STM0740	cytochrome d terminal oxidase, polypeptide subunit I	-2,57 ^a	-3,16 ^a	0,24
<i>cydB</i> ↓	STM0741	cytochrome d terminal oxidase polypeptide subunit II	-1,84 ^a	-2,13 ^a	0,45
<i>dmsA</i>	STM0964	anaerobic dimethyl sulfoxide reductase, subunit A	-4,81 ^a	-4,97 ^a	
<i>dmsB</i>	STM0965	anaerobic dimethyl sulfoxide reductase, subunit B	-5,4 ^a	-4,99 ^a	
<i>dmsC</i> ↓	STM0966	anaerobic dimethyl sulfoxide reductase, subunit C	-5,62 ^a	-4,65 ^a	
<i>pipC</i> ↑	STM1090	Pathogenicity island encoded protein: homologous to ipgE	-3,13 ^a	-2,41 ^a	
<i>sopB</i>	STM1091	Salmonella outer protein: homologous to ipgD	-5,24 ^a	-2,82 ^a	
<i>csgB</i>	STM1143	minor curlin subunit precursor, nucleator for assembly	NS	-1,44 ^b	
<i>csgA</i>	STM1144	curlin major subunit, coiled surface structures cryptic	-0,97 ^b	-1,79 ^a	
<i>csgC</i> ↓	STM1145	putative curli production protein	-1,61 ^a	-1,33 ^a	
<i>mviN</i> ↓	STM1170	putative virulence factor	-4,13 ^a	-2,23 ^a	
<i>ynfI</i> ↑	STM1495	putative component of anaerobic dehydrogenases	NS	-0,71 ^b	
	STM1496	putative dimethylsulfoxide reductase	-1,32 ^a	-1,32 ^a	
	STM1497	putative dimethyl sulphoxide reductase	-5,28 ^a	-5,3 ^a	
	STM1498	putative dimethyl sulphoxide reductase	-2,55 ^a	-2,53 ^a	
	STM1499	putative dimethyl sulphoxide reductase, chain A1	-2,45 ^a	-3,09 ^a	
<i>fdnI</i> ↑	STM1568	formate dehydrogenase-N, cytochrome B556(Fdn) gamma subunit, nitrate-inducible	NS	-2,17 ^a	
<i>fdnH</i>	STM1569	formate dehydrogenase-N, Fe-S beta subunit, nitrate-inducible	-3,37 ^a	-3,97 ^a	
<i>fdnG</i>	STM1570	putative molybdopterin oxidoreductases	-4,42 ^a	-4,02 ^a	
<i>ydjI</i> ↓	STM1625	putative transcriptional regulators, LysR family	-4,87 ^a	-1,55 ^a	
	STM1671	putative bacterial regulatory helix-turn-helix proteins, araC family	NS	-1,92 ^b	0,28
<i>ompW</i> ↑	STM1732	outer membrane protein W colicin S4 receptor	-3 ^a	-2,65 ^a	
<i>cobT</i> ↑	STM2016	nicotinate-nucleotide dimethylbenzimidazole-P phosphoribosyl transferase	-1,97 ^a	-3,82 ^a	
<i>cobS</i>	STM2017	cobalamin 5-phosphate synthase	-1,76 ^a	-1,23 ^a	
<i>cobU</i>	STM2018	bifunctional: cobinamide kinase cobinamide phosphate guanylyltransferase	-2,03 ^a	-1,88 ^a	
<i>cbiP</i>	STM2019	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,1 ^a	-1,76 ^a	
<i>cbiO</i>	STM2020	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-1,85 ^a	-1,87 ^a	
<i>cboQ</i>	STM2021	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-1,67 ^a	-2,27 ^a	
<i>cbiN</i>	STM2022	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,01 ^a	-2,08 ^a	

continuación Tabla IV.6

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³	FI
<i>cbiM</i> ↑	STM2023	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-3,03 ^b	-1,22 ^b	
<i>cbiL</i>	STM2024	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,34 ^b	-2,36 ^a	
<i>cbiK</i>	STM2025	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,38 ^a	-2,33 ^a	
<i>cbiJ</i>	STM2026	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,53 ^a	-2,26 ^a	
<i>cbiH</i>	STM2027	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,2 ^a	-1,85 ^a	
<i>cbiG</i>	STM2028	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,8 ^a	-2,4 ^a	
<i>cbiF</i>	STM2029	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,16 ^a	-1,93 ^a	
<i>cbiT</i>	STM2030	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-1,67 ^b	NS	
<i>cbiE</i>	STM2031	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,73 ^a	-3,56 ^b	
<i>cbiD</i>	STM2032	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,41 ^a	-2,27 ^a	
<i>cbiC</i>	STM2033	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,92 ^a	-1,61 ^a	
<i>cbiB</i>	STM2034	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-3,13 ^a	-2,92 ^a	
<i>cbiA</i>	STM2035	synthesis of vitamin B12 adenosyl cobalamide precursor	-2,58 ^a	NS	0,68
<i>pocR</i> ↑	STM2036	Propanediol utilization: transcriptional regulation, AraC family	NS	-1,52 ^a	0,55
<i>pduF</i> ↑	STM2037	Propanediol utilization: propanediol diffusion facilitator	NS	NS	0,16
<i>pduA</i>	STM2038	Propanediol utilization: polyhedral bodies	-1,61 ^b	-1,45 ^b	
<i>pduB</i>	STM2039	Propanediol utilization: polyhedral bodies	-2,68 ^a	-1,91 ^a	
<i>pduC</i>	STM2040	Propanediol utilization: dehydratase, large subunit	-2,5 ^a	-3,09 ^a	
<i>pduD</i>	STM2041	Propanediol utilization: dehydratase, medium subunit	NS	NS	
<i>pduE</i>	STM2042	Propanediol utilization: dehydratase, small subunit	-1,41 ^b	-2,49 ^b	
<i>pduG</i>	STM2043	Propanediol utilization: diol dehydratase reactivation	NS	-1,95 ^a	
<i>pduH</i>	STM2044	Propanediol utilization: diol dehydratase reactivation	NS	NS	
<i>pduJ</i>	STM2045	Propanediol utilization: polyhedral bodies	-1,91 ^a	-1,14 ^b	
<i>pduK</i>	STM2046	Propanediol utilization: polyhedral bodies	-1,55 ^b	-1,56 ^b	
<i>pduL</i>	STM2047	Propanediol utilization	-1,53 ^b	NS	
<i>pduM</i>	STM2048	Propanediol utilization	-1,04 ^a	-1,16 ^b	
<i>pduN</i>	STM2049	Propanediol utilization: polyhedral bodies	-1,43 ^b	NS	
<i>pduO</i>	STM2050	Propanediol utilization: B12 related	-1,35 ^b	-1,09 ^a	
<i>pduP</i>	STM2051	Propanediol utilization: CoA-dependent propionaldehyde dehydrogenase	-1,42 ^b	NS	
<i>pduQ</i>	STM2052	Propanediol utilization: propanol dehydrogenase	-1,28 ^a	-0,73 ^b	
<i>pduS</i> ↓	STM2053	Propanediol utilization: polyhedral bodies	NS	NS	

continuación Tabla IV.6

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³	FI
<i>pduT</i>	STM2054	Propanediol utilization: polyhedral bodies	NS	NS	
<i>pduU</i>	STM2055	Propanediol utilization: polyhedral bodies	NS	NS	
<i>pduV</i>	STM2056	Propanediol utilization	NS	NS	
<i>pduW</i>	STM2057	Propanediol utilization: propionate kinase	NS	NS	
<i>pduX</i>	STM2058	Propanediol utilization	+1,38 ^a	NS	
<i>phsC</i>	STM2063	Hydrogen sulfide production: membrane anchoring protein	-2,07 ^b	-1,87 ^a	
<i>phsB</i>	STM2064	Hydrogen sulfide production: iron- sulfur subunit electron	-2,68 ^a	-2,97 ^a	
<i>phsA</i>	STM2065	Hydrogen sulfide production: membrane anchoring protein	-2,6 ^a	-2,82 ^a	
	STM2186	putative NADPH-dependent glutamate synthase beta chain or	-2,25 ^a	-2,75 ^a	
<i>yeiA</i>	STM2187	putative dihydropyrimidine dehydrogenase	-1,51 ^a	-2,3 ^a	
<i>nuoN</i>	STM2316	NADH dehydrogenase I chain N	NS	-1,47 ^a	
<i>nuoM</i>	STM2317	NADH dehydrogenase I chain M	NS	-1,93 ^a	
<i>nuoL</i>	STM2318	NADH dehydrogenase I chain L	NS	-1,74 ^a	
<i>nuoK</i>	STM2319	NADH dehydrogenase I chain K	NS	-1,59 ^a	
<i>nuoJ</i>	STM2320	NADH dehydrogenase I chain J	NS	-1,88 ^a	
<i>nuoI</i>	STM2321	NADH dehydrogenase I chain I	NS	-2,03 ^a	
<i>nuoH</i>	STM2322	NADH dehydrogenase I chain H	NS	-2,49 ^a	
<i>nuoG</i>	STM2323	NADH dehydrogenase I chain G	NS	-1,81 ^a	
<i>nuoF</i>	STM2324	NADH dehydrogenase I chain F	NS	-1,55 ^a	
<i>nuoE</i>	STM2325	NADH dehydrogenase I chain E	NS	-1,62 ^a	
<i>nuoC</i>	STM2326	NADH dehydrogenase I chain C,D	NS	NS	
<i>nuoB</i>	STM2327	NADH dehydrogenase I chain B	NS	-1 ^a	
<i>nuoA</i>	STM2328	NADH dehydrogenase I chain A	NS	-1,25 ^a	
<i>eutR</i>	STM2454	putative regulator ethanolamine operon (AraC/XylS family)	-1,59 ^b	-1,23 ^a	
<i>eutK</i>	STM2455	putative carboxysome structural protein, ethanolamine utilization	NS	NS	
<i>eutL</i>	STM2456	putative carboxysome structural protein, ethanolamine utilization	-1,57 ^a	-1,17 ^a	
<i>eutC</i>	STM2457	ethanolamine ammonia-lyase, light chain	-1,82 ^a	-1,81 ^a	
<i>eutB</i>	STM2458	ethanolamine ammonia-lyase, heavy chain	-2,06 ^a	-1,66 ^a	
<i>eutA</i>	STM2459	CPPZ-55 prophage chaperonin in ethanolamine utilization	-1,41 ^a	-1,51 ^b	
<i>eutH</i>	STM2460	putative transport protein, ethanolamine utilization	-1,87 ^a	-1,44 ^a	
<i>eutG</i>	STM2461	paral putative transport protein in ethanolamine utilization	-2,2 ^a	-1,71 ^a	
<i>eutJ</i>	STM2462	paral putative heatshock protein (Hsp70)	-2,59 ^a	-2,03 ^a	
<i>eutE</i>	STM2463	putative aldehyde oxidoreductase in ethanolamine utilization	-2,79 ^a	-2,06 ^a	
<i>eutN</i>	STM2464	putative detox protein in ethanolamine utilization	-2,72 ^a	-1,97 ^a	
<i>eutM</i>	STM2465	putative detox protein in ethanolamine utilization	-2,91 ^a	-1,88 ^a	

continuación Tabla IV.6

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³	FI
<i>eutD</i> ↑	STM2466	putative phosphotransacetylase in ethanolamine utilization	-2,63 ^a	-1,75 ^b	
<i>eutT</i> ↓	STM2467	putative cobalamin adenosyltransferase, ethanolamine utilization	-2,4 ^a	-0,99 ^b	
<i>eutQ</i> ↑	STM2468	putative ethanolamine utilization protein	-3,01 ^a	-1,59 ^a	
<i>eutP</i> ↓	STM2469	putative ethanolamine utilization protein	-2,11 ^a	-2,25 ^b	
<i>euts</i> ↓	STM2470	putative carboxysome structural protein, ethanol utilization	-0,8 ^b	-1,5 ^a	
↑	STM2528	putative dimethylsulfoxide reductase	-1,97 ^a	-1,49 ^a	
↑	STM2529	putative anaerobic dimethylsulfoxide reductase	-1,87 ^a	-1,3 ^a	
↑	STM2530	putative anaerobic dimethylsulfoxide reductase	-2,59 ^a	-3,02 ^a	
↓	STM2759	putative dipeptide/oligopeptide/nickel ABC-type transport systems, periplasmic component	NS	-1,56 ^a	
<i>avrA</i> ↑	STM2865	putative inner membrane protein	-1,3 ^a	-1,98 ^a	
<i>sprB</i> ↓	STM2866	transcriptional regulator	-3,84 ^a	-2,92 ^a	
<i>hilC</i> ↓	STM2867	bacterial regulatory helix-turn-helix proteins, araC family	-6,36 ^a	-2,72 ^a	
<i>orgC</i> ↓	STM2868	putative cytoplasmic protein	-2,87 ^a	-3,01 ^a	
<i>orgB</i> ↓	STM2869	putative inner membrane protein	-2,66 ^a	-2,26 ^a	
<i>orgA</i> ↓	STM2870	putative flagellar biosynthesis/type III secretory pathway protein	-6,73 ^a	-3,92 ^a	
<i>prgK</i> ↓	STM2871	cell invasion protein lipoprotein, may link inner	-7,99 ^a	-3,82 ^a	
<i>prgJ</i> ↓	STM2872	cell invasion protein cytoplasmic	-7,7 ^a	-3,73 ^b	0,22
<i>prgI</i> ↓	STM2873	cell invasion protein cytoplasmic	-4,78 ^a	-3,83 ^b	
<i>prgH</i> ↓	STM2874	cell invasion protein	-8,69 ^a	-3,73 ^a	
<i>hilD</i> ↓	STM2875	regulatory helix-turn-helix proteins, araC family	-2,76 ^a	-2,42 ^b	
<i>hilA</i> ↓	STM2876	invasion genes transcription activator	-5,58 ^a	-3,05 ^a	0,53
<i>iagB</i> ↓	STM2877	cell invasion protein	-4,45 ^b	-3,13 ^a	
<i>sptP</i> ↑	STM2878	protein tyrosine phosphate	-2,57 ^a	-2,71 ^a	
<i>sicP</i> ↓	STM2879	chaperone, related to virulence	-7,21 ^a	-3,78 ^a	
<i>iacP</i> ↓	STM2881	putative acyl carrier protein	-5,16 ^a	-3,64 ^a	
<i>sipA</i> ↓	STM2882	cell invasion protein	-6 ^a	-4,11 ^a	
<i>sipD</i> ↓	STM2883	cell invasion protein	-9,55 ^a	-4,22 ^a	
<i>sipC</i> ↓	STM2884	cell invasion protein	-9,05 ^a	-4,08 ^a	0,19
<i>sipB</i> ↓	STM2885	cell invasion protein	-7,78 ^a	-3,82 ^a	
<i>sicA</i> ↓	STM2886	surface presentation of antigens secretory proteins	-7,72 ^a	-3,61 ^a	
<i>spaS</i> ↓	STM2887	surface presentation of antigens secretory proteins	-4,01 ^a	-3,42 ^a	
<i>spaR</i> ↓	STM2888	surface presentation of antigens secretory proteins	NS	NS	
<i>spaQ</i> ↓	STM2889	surface presentation of antigens secretory proteins	-3,54 ^a	-3,35 ^a	
<i>spaP</i> ↓	STM2890	surface presentation of antigens secretory proteins	-4,97 ^a	-4,42 ^a	
<i>spaO</i> ↓	STM2891	surface presentation of antigens secretory proteins	-4,88 ^a	-3,13 ^a	
<i>spaN</i> ↓	STM2892	surface presentation of antigens secretory proteins	-9,2 ^a	-4,13 ^a	

continuación Tabla IV.6

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³	FI
<i>spaM</i> ↑	STM2893	surface presentation of antigens secretory proteins	-9,85 ^a	-4,91 ^a	
<i>invC</i>	STM2894	surface presentation of antigens secretory proteins	-7,8 ^a	-4,68 ^a	
<i>invB</i>	STM2895	surface presentation of antigens secretory proteins	-8,7 ^a	-4,43 ^a	
<i>invA</i>	STM2896	invasion protein	-5,14 ^a	-3,85 ^a	
<i>invE</i>	STM2897	invasion protein	-3,66 ^b	-3,14 ^a	
<i>invG</i>	STM2898	invasion protein outer membrane	-5 ^a	-3,13 ^a	
<i>invF</i>	STM2899	invasion protein	-6,84 ^a	-4 ^a	
<i>invH</i> ↓	STM2900	invasion protein	-2,35 ^a	-2,39 ^a	
	STM2912	putative transcriptional regulators, LysR family	-0,99 ^a	-1,46 ^b	0,47
<i>csrB</i> ↑	STM2966	Regulatory sRNA	NS	-2,38 ^a	
	STM3012	putative transcriptional regulator	-1,13 ^b	-1,08 ^b	0,39
<i>hybG</i> ↑	STM3143	hydrogenase-2 operon protein	-1,3 ^a	-1,64 ^a	
<i>hybF</i>	STM3144	putative hydrogenase expression/formation protein	-2,4 ^a	-1,97 ^a	
<i>hybE</i>	STM3145	putative hydrogenase	-3,36 ^a	-2,07 ^a	
<i>hybD</i>	STM3146	putative processing element for hydrogenase-2	-3,15 ^a	-2,31 ^a	
<i>hybC</i>	STM3147	hydrogenase-2, large subunit	-3,09 ^a	-2,47 ^a	
<i>hybB</i>	STM3148	putative cytochrome Ni/Fe component of hydrogenase-2	-3,33 ^a	-3,08 ^a	
<i>hybA</i>	STM3149	function unknown, intially thought to be hydrogenase-2	-2,87 ^a	-2,22 ^a	
<i>hybO</i>	STM3150	putative Ni/Fe hydrogenases, small subunit	-3,2 ^a	-2,69 ^a	
<i>yqhC</i> ↑	STM3163	putative transcriptional regulator (AraC/XylS family)	-1,23 ^a	-1,03 ^a	0,48
<i>ygiE</i> ↓	STM3190	putative divalent heavy-metal cations transporter	-1,24 ^a	-1,68 ^a	
<i>yqjI</i> ↓	STM3215	putative transcriptional regulator	-5,32 ^a	-1,97 ^a	0,17
<i>pckA</i> ↓	STM3500	phosphoenolpyruvate carboxykinase	-2,27 ^a	-1,74 ^a	
	STM3820	putative cytochrome c peroxidase	-3,11 ^a	-2,97 ^a	
<i>fdhE</i> ↑	STM4034	putative formate dehydrogenase formation protein ? Mn ₂ fn	-1,03 ^b	-1,25 ^a	
<i>fdol</i>	STM4035	formate dehydrogenase, cytochrome B556 (FDO) subunit	NS	-2,33 ^a	
<i>fdoH</i>	STM4036	formate dehydrogenase-O, Fe-S subunit	NS	-2,32 ^a	
<i>fdoG</i>	STM4037	formate dehydrogenase	-1,45 ^b	-2,86 ^b	
<i>siiA</i>	STM4257	putative inner membrane or exported	-	-1,58 ^a	
<i>siiB</i>	STM4258	putative methyl-accepting chemotaxis protein	-1,76 ^a	-3,54 ^a	
<i>siiC</i>	STM4259	putative ABC exporter outer membrane component homolog	-4,74 ^a	-3,05 ^a	
<i>siiD</i>	STM4260	membrane permease, predicted cation efflux pump	-5,54 ^a	-2,33 ^a	
<i>siiE</i>	STM4261	putative inner membrane protein	-1,91 ^a	NS	
<i>siiF</i> ↓	STM4262	putative ABC-type bacteriocin/lantibiotic exporter, contain an N-terminal	NS	NS	

continuación Tabla IV.6

Gen ¹	Código ID	Descripción ²	EDTA ³	Fur ³	FI
<i>nrfA</i>	STM4277	nitrite reductase periplasmic cytochrome c(552)	-1,84 ^b	-1,25 ^b	
<i>nrfB</i>	STM4278	formate-dependent nitrite reductase a penta-haeme cytochrome c	-3,24 ^a	-1,75 ^b	
<i>nrfC</i>	STM4279	putative nitrite reductase formate-dependent, Fe-S centers	-3,29 ^a	-1,66 ^b	
<i>nrfD</i>	STM4280	putative nitrate reductase, formate dependent	-2,7 ^a	-1,71 ^a	
<i>nrfE</i>	STM4281	formate-dependent nitrite reductase involved in attachment of	-1,69 ^b	-1,72 ^b	
<i>nrfG</i>	STM4282	part of formate-dependent nitrite reductase complex involved	-1,11 ^b	-1,06 ^b	
<i>melR</i>	STM4297	Regulator of melibiose operon (AraC/XylS family)	+1,25 ^b	-2,33 ^a	
<i>melA</i>	STM4298	alpha-galactosidase	-2,97 ^a	-3,53 ^a	
<i>melB</i>	STM4299	GPH family, melibiose permease II	-3,36 ^a	-1,28 ^b	
<i>dcuR</i>	STM4303	response regulator in two-component regulatory system with	-2,13 ^a	NS	
<i>dcuS</i>	STM4304	sensory histidine kinase in two-component regulatory system	-1,22 ^b	-3,07 ^b	
	STM4305	putative anaerobic dimethyl sulfoxide reductase, subunit A	-2,58 ^a	-2,84 ^b	
	STM4306	putative anaerobic dimethyl sulfoxide reductase, subunit B	-3,31 ^a	-2,13 ^a	
	STM4307	putative anaerobic dimethyl sulfoxide reductase, subunit C	-3,15 ^a	-2,34 ^b	
	STM4308	putative component of anaerobic dehydrogenases	NS	-	
<i>Bcl</i>	STM4339	outer membrane lipoprotein (lipocalin)	NS	-1,23 ^a	
<i>frdD</i>	STM4340	fumarate reductase, anaerobic, membrane anchor polypeptide	-1,98 ^a	-3,04 ^a	
<i>frdC</i>	STM4341	fumarate reductase, anaerobic, membrane anchor polypeptide	-1,99 ^b	-2,18 ^a	
<i>frdB</i>	STM4342	fumarate reductase, anaerobic, Fe-S protein subunit	-2,39 ^a	-3,21 ^a	
<i>frdA</i>	STM4343	fumarate reductase, anaerobic, flavoprotein subunit	-1,93 ^a	-2,79 ^a	0,53

En rojo se representan los genes cuya región promotora se probó mediante EMSA.

¹La orientación génica y la organización transcripcional están indicadas por líneas verticales y recuadros, respectivamente.

²Descripciones derivadas del CMR.

³El incremento (>1) o la represión (<-1) de los niveles de expresión causados por EDTA o Fur. NS son genes que no tienen un adj.p.value ^alas dos réplicas del array se comportan igual y el nivel de expresión es una media de los dos. ^bindica que los genes

3.1. Control positivo de reguladores transcripcionales

En la tabla IV.6 aparecen reguladores transcripcionales conocidos que alteran su patrón de expresión, concretamente se observa *melR* y *dcuR*. Estos genes codifican, respectivamente, el activador transcripcional MelR, que forma parte del operón *mel* para la utilización de la melobiosa como fuente de carbono³²⁶, y el regulador DcuR que forma parte, junto al sensor DcuS, de un sistema de dos componentes. Los EMSAs realizados con las regiones promotoras de ambos genes fueron negativos, así que su vinculación a Fur es indirecta.

Otros seis genes anotados como posibles reguladores transcripcionales organizados en unidades monocistrónicas son: STM1625, STM1671, STM2912, STM3012, STM3163 y STM3215. De todos ellos, únicamente el promotor del gen STM3215 (P_{3215}) varió su movilidad electroforética en los EMSA realizados (Figura IV.8). Estudios *in silico* del P_{3215} identificaron una región de unión de Fur localizada en la posición -188 a -166 respecto al codón de inicio de traducción y formada por cuatro repeticiones hexaméricas orientadas $\rightarrow\rightarrow\rightarrow-1\leftarrow$, que difieren en 4 nt de la secuencia consenso de *E. coli*.

Pese a ello, no se conoce por el momento el regulón relacionado a estos posibles reguladores transcripcionales. En este caso sería necesario poder extender estudios transcriptómicos de mutantes de dichos genes para observar las variaciones en la transcripción de los genes por ellos controlados. De esa forma se podría ordenar la red génica disparada por Fur y asociada a la presencia o ausencia de hierro.

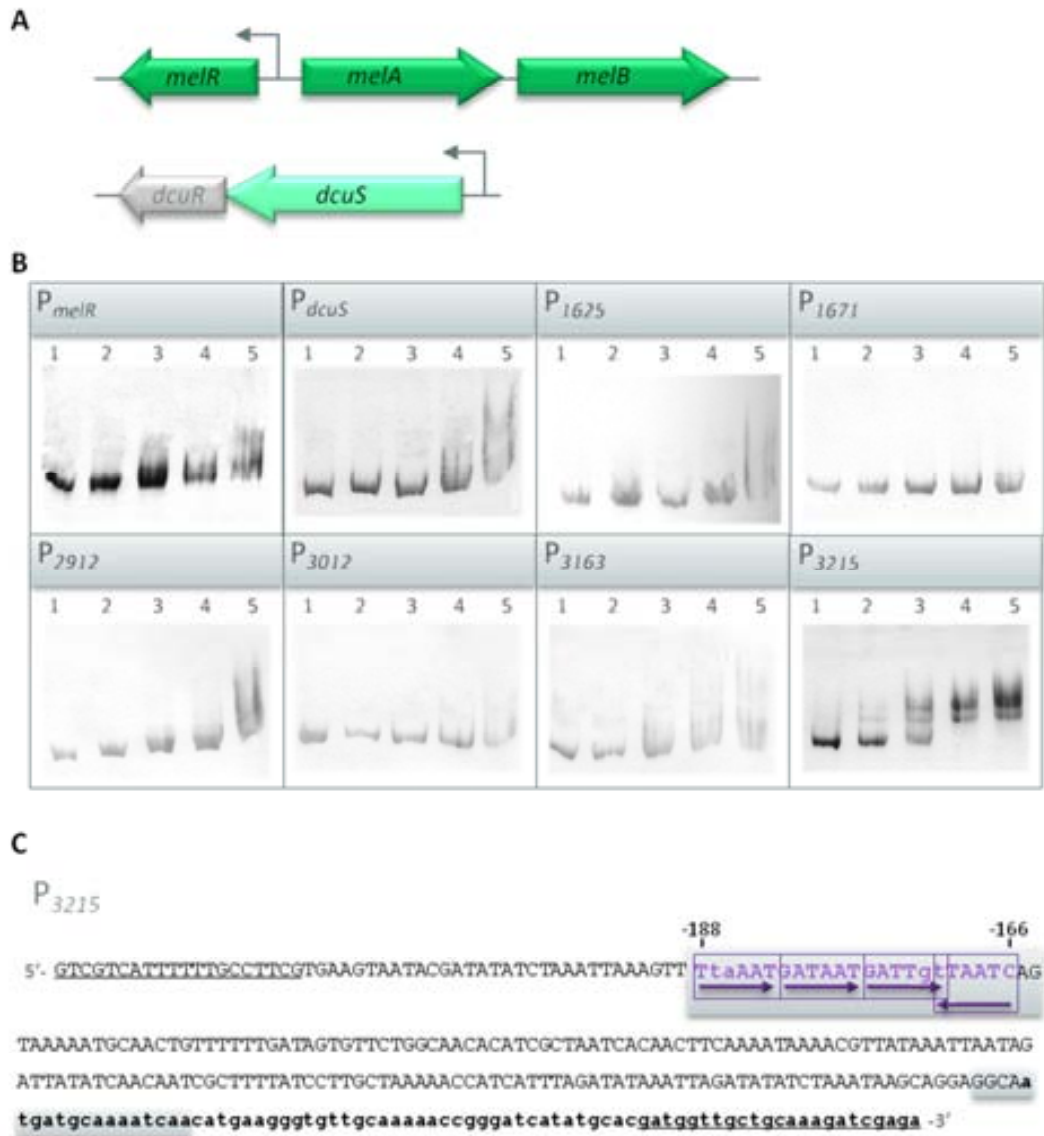


Figura IV.8. Reguladores transcripcionales con un valor de expresión <-1 en los arrays. A. Organización de las UTs policistrónicas mostrando el promotor mediante una flecha. En verde oscuro se indican los genes con las dos réplicas inducidas en el array Fur y en verde claro cuándo sólo una de las réplicas se induce. **B.** EMSAs de cada promotor señalado utilizando concentraciones crecientes de proteína Fur (5, 25, 100 y 375 nM, carriles 2-5) o en ausencia de proteína (carril 1). **C.** Zona promotora del gen STM3215. Las secuencias subrayadas indican los oligonucleótidos utilizados para amplificar la sonda P₃₂₁₅, en minúsculas y negrita se indica la región de codificación del gen STM3215. En gris se indica las cajas Fur identificadas con el programa Virtual footprint. En morado se indica la secuencia de la posible caja Fur y se enmarcan los hexámeros que forman la secuencia de unión indicando en cada caso su orientación mediante una flecha. En minúsculas se representan los nt que varían de la secuencia consenso.

3.2. Control positivo de proteínas de la envuelta

Como puede observarse en la tabla IV.6, tres genes, *ompW*, *STM2759* y *STM3190*, que codifican proteínas de membrana disminuyeron su expresión en los ensayos transcriptómicos realizados. Los ensayos EMSA con los promotores P_{ompW} , P_{2759} y P_{3190} determinaron que no existía ninguna relación directa con el regulador Fur (Figura IV.9), y que por tanto son genes regulados de forma indirecta.

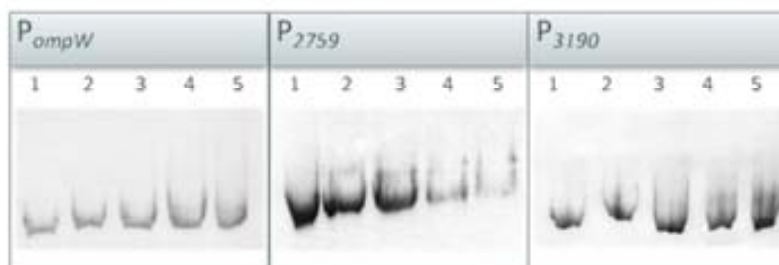


Figura IV.9. Proteínas de la envuelta con un valor de expresión <-1 en los arrays. EMSAs de cada promotor señalado utilizando concentraciones crecientes de proteína Fur (5, 25, 100 y 375 nM, carriles 2-5) o en ausencia de proteína (carril 1).

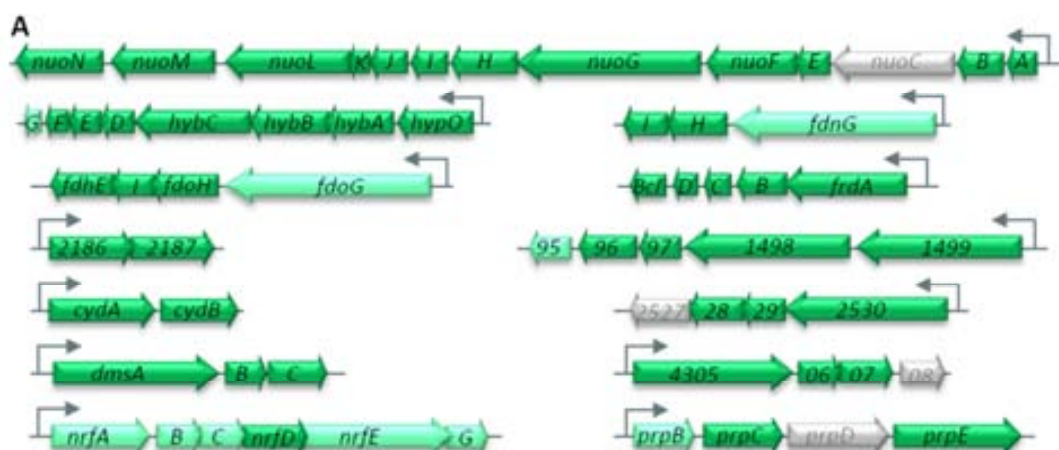
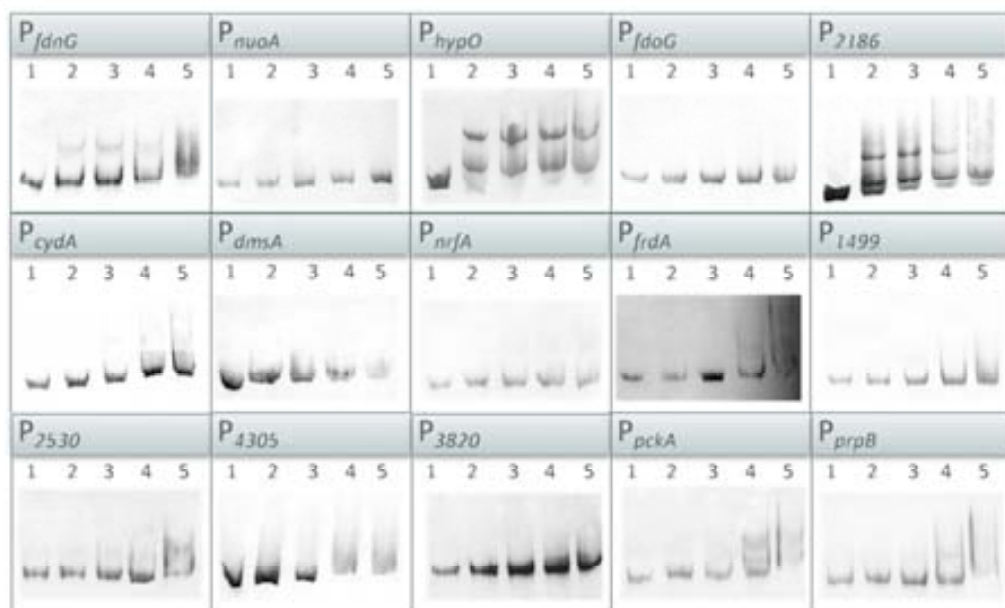
El gen *ompW* fue caracterizado por primera vez en *E. coli* como un receptor para la colicina S4³²⁷. En *S. enterica* la porina OmpW parece mediar el flujo del compuesto tóxico metil-viológeno³²⁸, un compuesto tóxico de dipiridilo con capacidad de generar aniones superóxido. Otro de los genes regulado positivamente por Fur es el *STM2759* anotado como un posible componente periplásmico de un sistema de transporte tipo ABC. Los componentes periplasmáticos de los sistemas de transporte de tipo ABC normalmente son quinasas encargadas de transmitir energía al sistema de transporte para la translocación del compuesto asociado a dicho transportador. Sin embargo en este caso se desconocen tanto las características del transportador así como su función. Y, finalmente, también disminuye su expresión en los estudios de transcriptómica el gen *STM3190*, homólogo al gen *zupT* de *E. coli*, que ha sido descrito como un transportador de iones metálicos de amplio espectro ya que puede captar diversos cationes divalentes como el Zn^{2+} , el Fe^{2+} , el Co^{2+} y posiblemente el Mn^{2+} ³²⁹.

3.3. Control positivo de genes asociados al metabolismo energético

3.3.1. Genes de respiración

En la tabla IV.6 se observa la presencia importante de genes relacionados con la respiración. Así, aparecen distintas deshidrogenasas (DH) como la formato DH_N (*fdnGHI*), la NADH DH I (*nuoA-N*), la hidrogenasa 2 (*hybOABCDEFG*), la formato DH_O (*fdoGHI*), y una probable hidroxipirimidina-DH (STM2186-87). Del mismo modo se observan distintas reductasas terminales: la quinol oxidasa *bo*₃ (*cydAB*), la dimetil sulfóxido (DMSO) reductasa (*dmsABC*), la nitrito reductasa (*nrfABCDEFG*), la fumarato reductasa (*frdABCD*), otras unidades transcripcionales que codifican probables DMSO reductasas (STM1499-95, STM2528-30, STM4305-08) y una hipotética citocromo c peroxidasa (STM3820). Los resultados de los EMSAs realizados demostraron la interacción directa de Fur en el los promotores P_{hypO} y P₂₁₈₆ (Figura IV.10). La identificación *in silico* de la caja Fur en P_{hypO} la sitúa en la región -103 a -78 respecto al inicio de traducción y está formada por 4 repeticiones del hexámero consenso, todos orientados de forma directa (←2←←←). Ésta se encuentra en la posición -186 a -162 en P₂₁₈₆ y en este caso está compuesta por cuatro repeticiones hexaméricas siguiendo un patrón ←→1←←.

Dentro del regulón Fur de *S. Typhimurium* también aparecen genes implicados en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) controlados positivamente por Fur aunque de forma indirecta⁵, como es el caso del gen *pckA* (Figura IV.10). *S. enterica*, como otras bacterias entéricas, están expuestas a altos niveles de propionato en el tracto digestivo humano. El propionato es un ácido graso de cadena corta (SCFA) producto de la fermentación y la mejor estrategia de defensa de las bacterias frente a estos compuestos es catabolizarlos eficientemente³³⁰. *S. enterica* convierte el propionato a piruvato a través del ciclo del ácido 2-metilisocitrato, la mayor parte de estos enzimas están codificados por el operón *prpBCDE*³³¹.

**B****C**

P_{hypO}

5'- **tcaccgacggttaaatgccgtgagaagtgatgagagtattatctccagtc**atTTTATAGTTATTCGGTTACGAAGACCTGG
 CTTTTATTTTGCACGTGTTTCGCGAAGAAGTTATTCGCGATCGGTACGCC ⁻⁷³ **ATTAcC** **AcTTT** **TTATG** **TTATG** ⁻¹⁰³ TGC

GCCATAACTTTCGACGGAAACAGTAAAAAGGGAAGAGGCGATAGTGTAAATTAATTAAGCAAGATAAATACCCCTGTTGG
 Atcaaccttcgagtgatgataaccggccataaagaagcgaaccgccatcccggaaatgattctc-3'

P₂₁₈₆

5'- **ctttataccgggttcgggttttttatttactggaatgattattatcttctttttatCGTTAATCTATTATTATCCCT**
 TT ⁻¹⁸⁶ **AaAATTGAgAAT** **gTTATTATTATG** ⁻¹⁶² ATATAAGGAACAAATGCTGTTTTGCATCTGGTTTCATTTTTTTTGTA
 ATTCTTTCACAGAAATACCCCTTCCTTCAATGCTTAGGCTGGCGGTAGATTTTAGATCATTAATAACCGGTTATTTGCGTTTCGC
 CTTAATTTATCAAGCATTAAAGGAAGATTATatgccgcaacaaaattatctggatgaactcacgcctggttttacgccatt-3'

Figura IV.10. Genes de respiración con un valor de expresión <-1 en los arrays. A. Organización de las UTs policistrónicas mostrando el promotor mediante una flecha. En verde oscuro se indican los genes con las dos réplicas inducidas en el array Fur y en verde claro cuándo sólo una de las réplicas se induce. **B.** EMSAs de cada promotor señalado utilizando concentraciones crecientes de proteína Fur (5, 25, 100 y 375 nM, carriles 2-5) o en ausencia de proteína (carril 1). **C.** Zona promotora de los genes *hypO* y *STM2186*. Las secuencias subrayadas indican los oligonucleótidos utilizados para amplificar la sonda de cada promotor (P_{hypO} y P_{2186}), en minúsculas y negrita se indica la región de codificación de cada gen. En gris se indican las cajas Fur identificadas con el programa Virtual footprint. En morado se indica la secuencia de la posible caja Fur y se enmarcan los hexámeros que forman la secuencia de unión indicando en cada caso su orientación mediante una flecha. En minúsculas se representan los nt que varían de la secuencia consenso.

La vinculación de Fur con la expresión de todos estos genes relacionados con el metabolismo energético no es de extrañar ya que la mayoría de estos complejos respiratorios contienen hierro en sus moléculas. Por ello, se puede especular que Fur está interviniendo de nuevo en la homeóstasis del hierro a través del control sobre la síntesis de proteínas que requieren este catión como cofactor²⁷³.

3.3.2. Genes implicados en la síntesis y utilización de coenzima B₁₂

De entre los genes controlados positivamente por el regulador Fur destacan aquellos implicados en la síntesis y utilización de la desoxiadenosilcobalamina (Ado-B₁₂ o Ado-CBL) (Tabla IV.6). Dichos genes están representados en los clústeres *cbi-cob* (STM2016-35), *pdu* (STM2037-58) y *etu* (STM2474-70) (Figura IV.11). En todos los casos los análisis de movilidad electroforética demostraron que la regulación de Fur sobre estos distintos operones era indirecta (Figura IV.11)

A diferencia de *E. coli*, *S. Typhimurium* puede sintetizar *de novo* la coenzima B₁₂. Esta síntesis sólo es posible en condiciones de anaerobiosis y requiere el operón de genes llamado *cbi-cob* (STM2016-35). Éste mide unas 17 Kb y contiene 20 genes pertenecientes a dos grupos: genes *cbi*, involucrados en la síntesis del anillo de corrina (*cbiABCDEFGHIJKLMNQOP*) y genes *cob* para el ensamblaje del centro nucleotídico (*cobUST*)³³². Este operón presenta un control propio mediado por la proteína PocR, codificada por el gen *pocR* que se encuentra entre los operones *cbi-cob* y *pdu* como una UT independiente. PocR actúa como activador del sistema, uniéndose a su mismo promotor y delante del gen *cbiA*, en el promotor del operón *cbi*; además también tiene una función activadora sobre los promotores de los genes *pduF* y *pduA*, el grupo de genes adyacentes al operón *cob*³³². Como muestran los resultados del array, el gen *pocR* también forma parte del regulón Fur ya que ve disminuida su expresión en ausencia de hierro o del

complejo Fur-Fe²⁺. Así que el control positivo por parte de Fur sobre el gen *pocR* podría justificar la relación entre Fur y el operón *cbi-cob*, aunque los ensayos EMSA realizados demostraron que la regulación es indirecta. En conjunto, todos estos resultados parecen indicar que el operón *cbi-cob* podría encontrarse en un tercer nivel de regulación ya que Fur regularía a algún regulador que a su vez modularía la transcripción de *pocR*, cuyo producto génico activaría la expresión del operón de síntesis de cobalamina.

Además de los genes requeridos para la síntesis de B₁₂, el análisis con los microarrays permitió establecer la regulación de Fur sobre dos grupos de genes más, los *pdu* y los *eut*, implicados en la utilización de propanediol y etanolamina, respectivamente. En ambos casos estos genes también están asociados a la producción de coenzima B₁₂, ya que necesitan de ésta para su función.

La utilización del propanediol requiere de la expresión de los genes del operón *pdu* que permiten la conversión de propanediol a propionil-CoA. Este grupo de genes, localizados adyacentes al operón *cbi-cob*, engloba 22 genes controlados también por el activador transcripcional PocR. Los resultados del array demuestran que la mayoría de ellos (14 genes) disminuyen su expresión en ausencia de Fur y en presencia de quelante y las pruebas de movilidad electroforética de las dos regiones promotoras (P_{pduF} y P_{pduA}) indican que la regulación mediada por Fur es indirecta (Figura IV.11). El propanediol es un subproducto del catabolismo de la ramnosa, un derivado de la celulosa y la fucosa. Ambos azúcares se encuentran en el tracto gastrointestinal de mamíferos habitualmente asociados a la superficie de las células epiteliales del intestino³³³⁻

Figura IV.11. Genes implicados en la síntesis y utilización de la coenzima B₁₂ con un valor de expresión <-1 en los arrays. **A.** Organización de las UTs policistrónicas mostrando el promotor mediante una flecha. En color verde oscuro se indican los genes con las dos réplicas reprimidas en el array Fur y en verde claro cuándo solo una de las réplicas se induce. **B.** EMSAs de cada promotor señalado utilizando concentraciones crecientes de proteína Fur (5, 25, 100 y 375 nM, carriles 2-5) o en ausencia de proteína (carril 1).

Por otro lado, el uso de la etanolamina como fuente de carbono y nitrógeno depende de los 17 genes *eut*. La etanolamina es un componente fosfolipídico de la membrana de las células eucariotas y procariotas y una fuente de carbono y nitrógeno importante para *Salmonella* durante la infección³³⁶. En la tabla IV.6 se observa que la ausencia de Fur y la presencia de quelante producen una reducción en la expresión de los genes *eut*, aunque los ensayos EMSA realizados indican que la vinculación con Fur parece ser indirecta (Figura IV.11). El operón *eut* presenta un regulador propio, EutR, encargado de incrementar la expresión de los genes implicados en el catabolismo de la etanolamina en presencia de este compuesto y vitamina B₁₂. Igualmente, la expresión del gen *eutR* está vinculada al regulón Fur según los datos transcriptómicos obtenidos en este trabajo, pero del mismo modo que el caso anterior, los estudios de movilidad electroforética realizados con la región promotora P_{eutR} descartaron el control directo por parte de Fur de este regulador transcripcional.

Finalmente, destacar el operón *phsABC* que codifica la tiosulfito reductasa encargada de reducir el tiosulfato a sulfito e hidrógeno sulfato. Igual que los anteriores este operón presenta una disminución de su expresión en ausencia de Fur o en presencia del quelante. Además los EMSA realizados también denotan que la relación de Fur con este operón es indirecta dado que no se observa ningún cambio en la movilidad del promotor P_{phsA} en presencia del regulador transcripcional (Figura IV.11).

La tiosulfito reductasa codificada en este operón es esencial para el metabolismo del tetrionato, el aceptor final de electrones cuando la etanolamina y el propanediol son usados como fuentes de carbono y energía en condiciones anaeróbicas.

3.3.3. Control positivo indirecto a través de los sRNA RfrA y RfrB de genes implicados en la síntesis y utilización de coenzima B₁₂

Como se puede observar hasta el momento, algunos genes pertenecientes al regulón Fur son activados directamente por este regulador transcripcional. De todos modos, la mayoría de los genes controlados positivamente por Fur presentan una regulación indirecta. Como se ha comentado en el apartado introductorio, la activación de la expresión génica promovida por Fur ha sido descrita en *E. coli* mayoritariamente como un proceso indirecto a través de un sRNA regulador llamado RyhB²³⁵. En concordancia con nuestros resultados Massé

*et al.*²³⁶ identificó los genes *nuo*, *fdo*, *cyd* y *frd* como genes activados por Fur de manera indirecta a través de RyhB.

En *Salmonella* han sido descritos dos sRNA homólogos a RyhB de *E. coli*, denominados RfrA y RfrB (*RNA for Fur response*)²⁴³. El primero es el gen parálogo al *ryhB* de *E. coli* K1-2, mientras que el ortólogo, *rfrB*, no se encuentra en el genoma de *E. coli* K-12 (Figura IV.12). Aunque no era el objetivo principal de este trabajo se quiso estudiar la vinculación de estos dos sRNA en la regulación de los genes para la síntesis y el metabolismo de la cobalamina por su novedad y por ser específicos de *Salmonella* y no de *E. coli*. Para ello se construyeron varias cepas de *Salmonella* deficientes en cada uno de ellos o en ambos (Figura IV.12).

El gen *sodB* codifica la superóxido dismutasa B cuya regulación por los sRNAs está claramente definida²⁴³. Por este motivo se utilizó este gen como control positivo en estos ensayos, estudiando su nivel de expresión en los distintos entornos genéticos que se pretendían comparar. En concordancia con lo descrito con anterioridad^{235, 315}, en la figura IV.12, se observa que la delección del gen *fur* provoca una disminución considerable de la expresión del gen *sodB*. Del mismo modo, los resultados obtenidos en estos ensayos de RT-PCR cuantitativa a tiempo real también confirman los resultados obtenidos en los arrays (Tabla IV.4). Para maximizar las diferencias en el patrón de regulación en los distintos entornos genéticos, los valores de transcripción se compararon con los observados en la cepa *fur* deficiente, donde el nivel de expresión de *sodB* es el más bajo. Como se observa en la figura IV.12, la delección de ambos sRNAs en la cepa *fur* permite la inducción de la expresión del gen *sodB*, demostrando así que Fur está controlando la expresión de este gen a través de los sRNAs *rfrA* y *rfrB*. Además, los resultados obtenidos concluyen, tal y como fue descrito en el trabajo de Ellermeier *et al.*²⁴³, que en *Salmonella* estos sRNAs actúan en conjunción, ya que la deficiencia de sólo uno de ellos no afecta a la expresión del gen *sodB* en un mutante *fur*.

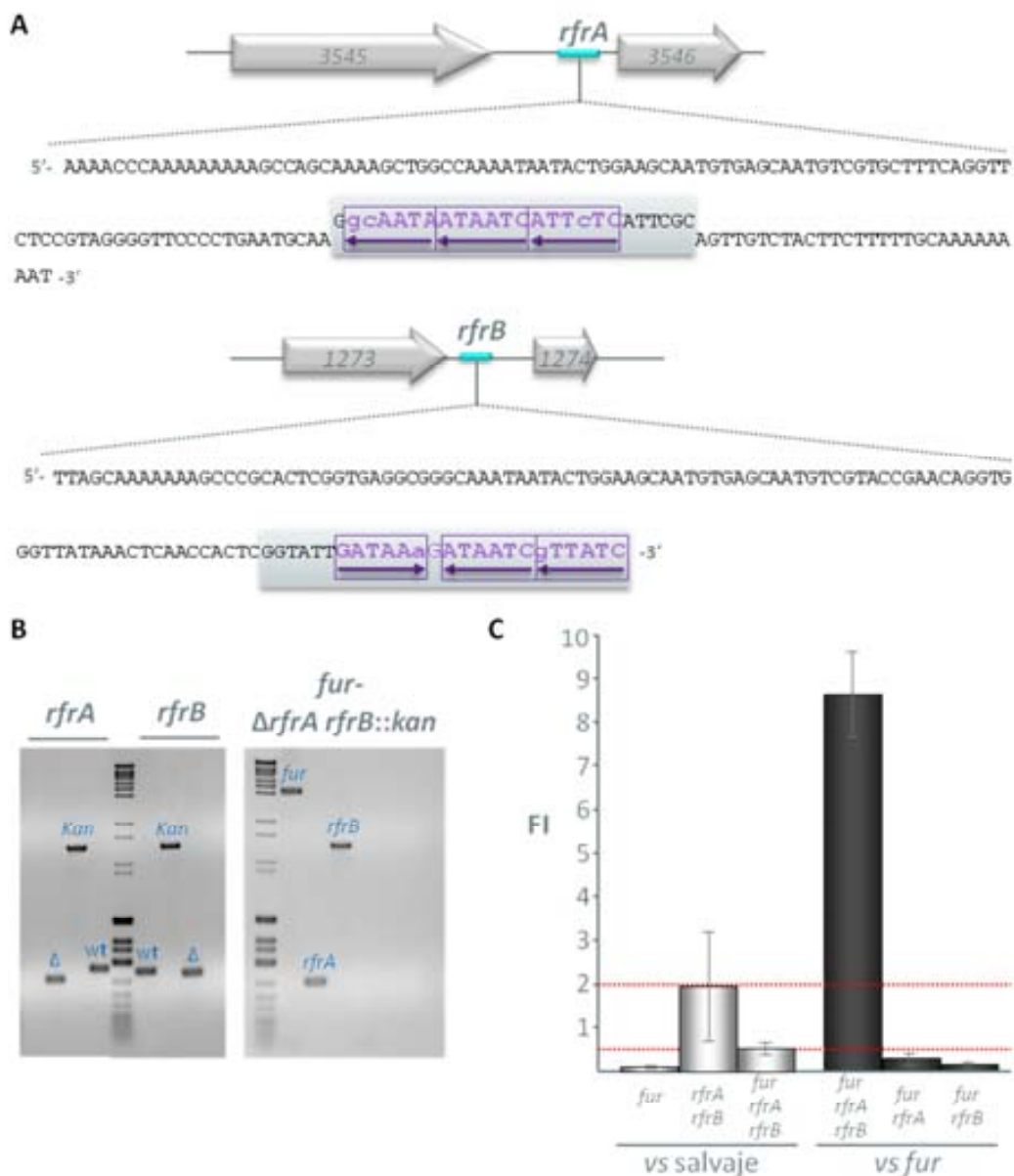


Figura IV.12. sRNAs RfrA y RfrB. A. Posición de los sRNAs en el genoma de *S. Typhimurium* y su secuencia. En gris se indica la caja Fur identificada con el programa Virtual footprint, en morado la secuencia de la posible caja Fur y enmarcados los hexámeros que forman la secuencia de unión indicando en cada caso su orientación mediante una flecha. En minúsculas se representan los nt que varían de la secuencia consenso. **B. Construcción de diversas cepas mutantes de *S. Typhimurium*.** En el gel de la izquierda se muestran los fragmentos de DNA de las cepas mutantes individuales para los dos sRNAs, sin (Δ) y con la cassette de kanamicina (*Kan*) comparando el tamaño con el de la cepa salvaje (wt). En el gel de la derecha se muestra la amplificación de los genes *fur*, *rfrA* y *rfrB* en el triple mutante *fur* Δ *rfrA* *rfrB*::*kan*. **C. Ensayos de qRT-PCR del gen *sodB*.** Se compara el factor de inducción (FI) de dicho gen en diferentes cepas mutantes en un entorno salvaje (gris claro) y en un entorno *fur*- (gris oscuro). Las líneas rojas indican cuando se considera un factor de inducción positivo (>2) y cuando negativo (<0,5). Se indica la desviación estándar de cada experimento realizado un mínimo de 3 veces.

Así pues, siguiendo como patrón de referencia el comportamiento del gen *sodB*, se analizó mediante qRT-PCR qué cambios había en el patrón de expresión de los genes *pocR*, *cbiA*, *pduB*, *eutR* y *eutE* en una cepa *fur rfrA rfrB*. Como puede observarse en la figura IV.13 los resultados obtenidos confirmaron que los genes *pocR*, *cbiA* y *pduB* están controlados por los sRNAs en *Salmonella* ya que en un mutante *fur* cuando se eliminan los sRNAs aumenta la expresión de dichos genes. Por el contrario los genes para la utilización de la etanolamina (*eutR* y *eutE*) mostraron unos niveles de expresión constitutiva cuando se comparó la expresión en la cepa *fur* respecto la cepa *fur rfrA rfrB* (Figura IV.13). Estos resultados permiten concluir que la síntesis y la utilización de la cobalamina y el propanediol están controlados por los dos sRNAs en *Salmonella*, mientras que los genes *eut* están controlados por Fur de una manera indirecta mediante un mecanismo distinto ya que no se observó ni unión de éste en ninguno de los promotores probados ni una vinculación de los sRNAs en su regulación.

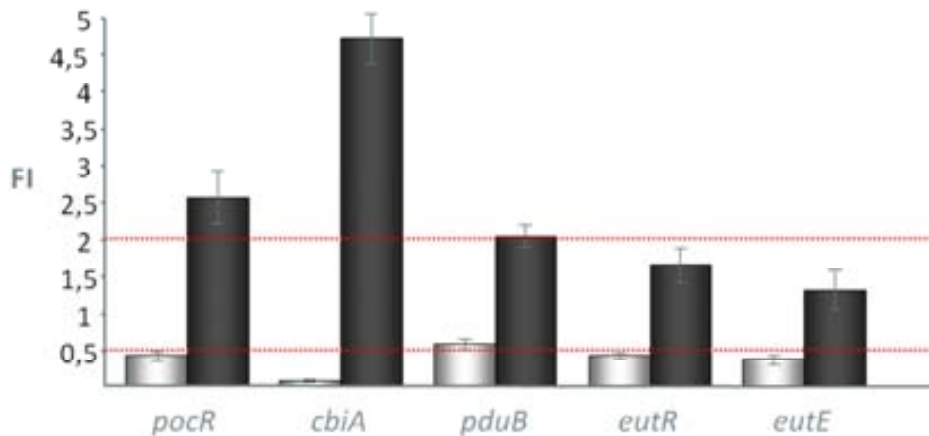


Figura IV.13. Ensayos qRT-PCR de distintos genes para la síntesis y utilización de la cobalamina. Se compara el factor de inducción (FI) de los genes *pocR*, *cbiA*, *pduB*, *eutR* y *eutE* en un entorno *fur*- (gris claro) y en un entorno *fur*- *rfrA*- *rfrB*- (gris oscuro). Las líneas rojas indican cuando se considera un factor de inducción positivo (>2) y cuando negativo (<0,5). Se indica la desviación estándar de cada experimento realizado un mínimo de 3 veces.

Estudios paralelos a este trabajo utilizando la cepa mutante *fur rfrA rfrB* permitieron la publicación de un artículo (anexo B.1³³⁷) en el cual se describe que Fur controla también de manera indirecta a través de los sRNAs los principales reguladores de la respiración anaeróbica de nitratos NarP y NarL.

3.4. Control positivo de genes asociados a virulencia

La vinculación de Fur con la patogenia ha sido ampliamente descrita. No sólo por qué se haya relacionado a Fur con la regulación de numerosos genes de virulencia¹ sino también porqué cepas deficientes en el gen *fur* de diferentes especies bacterianas ven disminuido su potencial de colonización y virulencia en sus respectivos modelos animales^{280, 284, 338-341}. Así sucede con mutantes *fur* de *S. Typhimurium* cuando son administrados oralmente en ratón, aunque se comportan del mismo modo que la cepa salvaje cuando la vía de administración es intraperitoneal^{342, 343}. Este efecto ha sido atribuido en la bibliografía a la mayor sensibilidad de la cepa *fur* al pH ácido, la cual dificulta su paso por el estómago. Sin embargo, la administración previa de bicarbonato, que tampona el pH del estómago, no supone el restablecimiento total de la virulencia de la cepa salvaje, así que otros factores parecen ser necesarios para explicar este fenómeno. De hecho, se ha demostrado que los mutantes *fur* parecen tener una menor capacidad de invasión de las células epiteliales³⁴².

El estudio transcriptómico realizado permitió determinar que la mayoría de los genes asociados a la virulencia que están regulados por Fur y la presencia de hierro están relacionados con procesos de adherencia e invasión de las células epiteliales del intestino. De hecho, no sólo genes de virulencia, también aquellos implicados en la degradación de azúcares presentes en el intestino y sobre las células epiteliales como se ha descrito en el apartado anterior. Esto concuerda con el hecho que la alteración del proceso infectivo de los mutantes defectivos en Fur parece estar relacionada con los primeros pasos del proceso infectivo, pero no con lo que pasa una vez se ha superado la barrera epitelial.

Como puede observarse en la Tabla IV.6 incrementan su expresión en presencia de Fur y hierro los genes del operón *csgBAC* (también denominado *agf* de “thin aggregative fibers” en *Salmonella* spp.). Este operón codifica las fimbrias tipo *curli* implicadas en el proceso de adhesión del patógeno a su huésped ya que interaccionan con matrices proteicas como la fibronectina, la laminina y el plasminógeno, y por tanto son muy importantes para iniciar la adherencia y la colonización de los tejidos³⁴⁴. También se encuentra regulado positivamente el gen *mviN*, que fue descrito por primera vez en *Salmonella* como un factor de virulencia esencial en el modelo murino³⁴⁵. Ni el promotor del operón *csgBAC* ni el del gen *mviN* dieron positivos en los EMSAs realizados en presencia de concentraciones crecientes de la proteína Fur (Figura IV.14) y por tanto se debe

inferir que el efecto positivo sobre su transcripción por parte del regulador Fur es indirecto.

El control de la expresión del gen *mviN* de *Salmonella* no se había asociado con anterioridad ni al regulón Fur ni a la concentración de hierro aunque sí que se ha descrito que el gen homólogo a *mviN* en *Burkholderia pseudomallei* ve afectada su expresión en función de la concentración de hierro en el medio. Aunque en este trabajo no describen si la modulación de su expresión debida a hierro esta vehiculada por Fur³⁴⁶. Los resultados obtenidos demuestran que en el caso de *Salmonella*, la relación con hierro está asociada al regulón Fur, aunque dicha relación es indirecta ya que Fur no parece unirse a la región promotora.

En referencia al operón *cgsBAC*, destacar que su regulación por parte de Fur, aunque indirecta, está en consonancia con el hecho de que dentro de este regulón también se encuentren genes que forman parte de islas de patogenicidad que también están asociados con procesos de colonización (como es el caso de SPI1 o SPI4)⁵⁸. Apuntando el hecho de que quizá la concentración de hierro mediante el complejo Fur-Fe²⁺ pueda ser una buena señal para el inicio de los procesos de colonización del epitelio intestinal.

Cómo se acaba de comentar, de los genes que disminuyen su expresión en los arrays y que están asociados a la virulencia de *Salmonella* destacan una gran cantidad de genes que forman parte o controlan diversas islas de patogenicidad. De este modo, el T3SS codificado por la SPI1, así como proteínas efectoras secretadas por éste (codificadas en genes que están localizados en SPI1 cómo *sipABCD*, *sptP* y *avrA*, o en otras partes del cromosoma cómo *sopA*, *sopD* y *sopE*) y el RNA regulador CsrB; el T1SS y la proteína SiiE de la SPI4; y los genes *sopB* y *pipC* codificados en la SPI5 disminuyen su patrón de expresión en un mutante *fur* (Tabla IV.6).

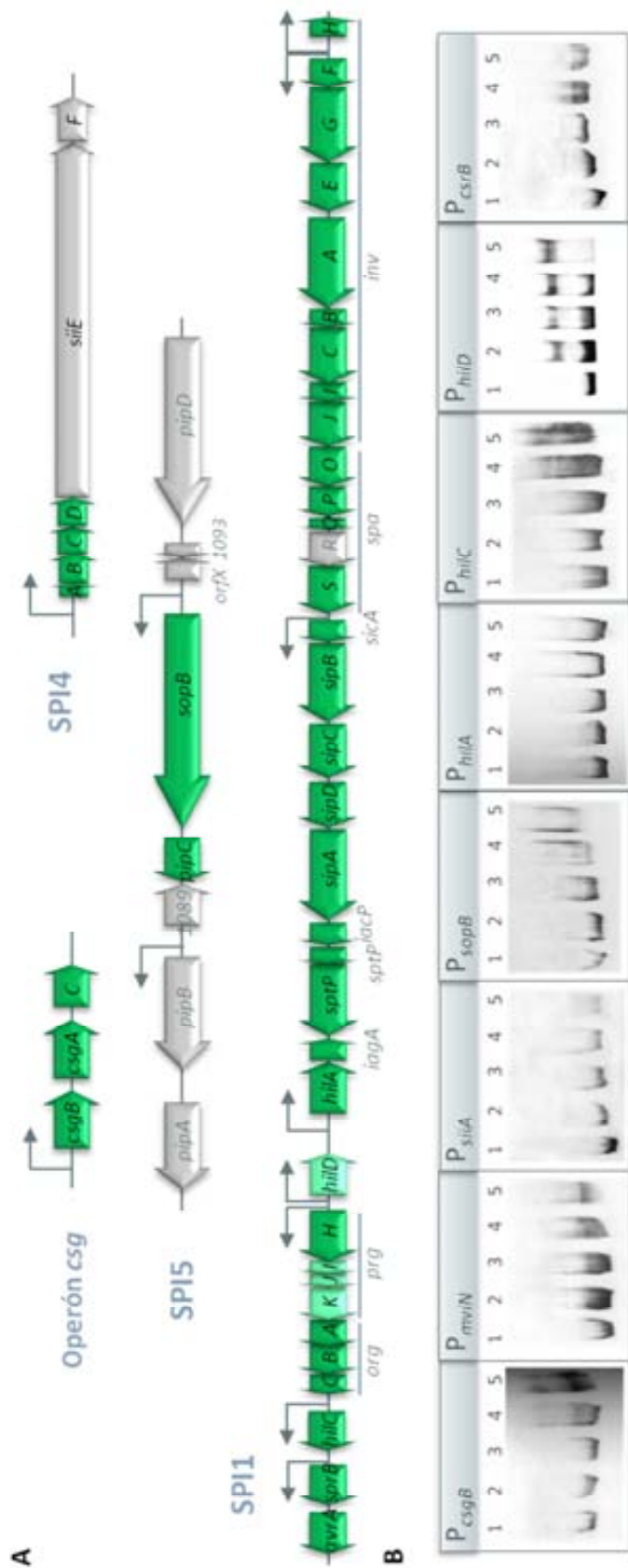


Figura IV.14. Genes asociados a virulencia con un valor de expresión <-1 en los arrays. A. Organización de las UTs policistrónicas mostrando el promotor mediante una flecha. En color verde oscuro se indican los genes con las dos réplicas reprimidas en el array Fur y en verde claro cuándo solo una de las réplicas se induce. **B.** EMSAs de cada promotor señalado utilizando concentraciones crecientes de proteína Fur (5, 25, 100 y 375 nM, carriles 2-5) o en ausencia de proteína (carril 1). **C.** Zona promotora del gen *hilD*. Las secuencias subrayadas indican las zonas promotoras -35, -10 y el inicio de transcripción (+1). En minúsculas se indica la región de codificación del gen *hilD*. En azul y gris se indican las cajas Fur identificadas con el programa Virtual footprint (caja A y B, respectivamente). En verde se indica la zona de unión de HilD y HilC.

Los análisis de movilidad electroforética realizados con las diferentes regiones promotoras de los genes reguladores de la SPI1 (*hilA*, *hilC* y *hilD*), del RNA *csrB*, de *siiA* de la SPI4 y del gen *sopB* de la SPI5 demuestran que Fur sólo se une a la región promotora del gen *hilD* (Figura IV.14). Se realizó una búsqueda *in silico* de posibles cajas Fur en la región de P_{hilD} que se expande de la posición -247 a la +90 respecto al codón de inicio de la transcripción (+1)³⁰⁰. En concordancia, se predijeron dos cajas Fur (Figura IV.14): la CajaA, en la posición -191 a -163, corresponde a una región rica en AT (contenido dG + dC inferior al 15 %, respecto al 50 % del total del genoma) y está localizada 100 pb *upstream* de los sitios de unión de HilD y HilC; y la CajaB, en la posición -48 a -30 (contenido dG + dC de aproximadamente un 30%), que se solapa con el elemento -35 de P_{hilD} y está situada 30 pb *downstream* de los sitios de unión de HilD y HilC³⁰⁰ (Figura IV.14).

3.4.1. Unión de Fur al promotor *PhilD*

Para saber cuál de las dos cajas, o si ambas unían Fur se realizaron deleciones del promotor P_{hilD} , generando los fragmentos FrgB, FrgC y FrgD (Figura IV.15). Como podemos observar en la figura IV.15, sólo el FrgD (que abarca el intervalo -247 a -123) es capaz de unir Fur, mientras que cuando se utiliza el FrgB (-170 a +90) o el FrgC (-16 a +90) no se observa unión. Así pues, es evidente que Fur interacciona con la región comprendida entre -247 y -123 que contiene la CajaA (-191 a -163), así como Fur-Mn²⁺ no interacciona con la región central del promotor de *hilD* (-91 a -57) que contiene los sitios de unión de HilD y HilC^{70, 300}.

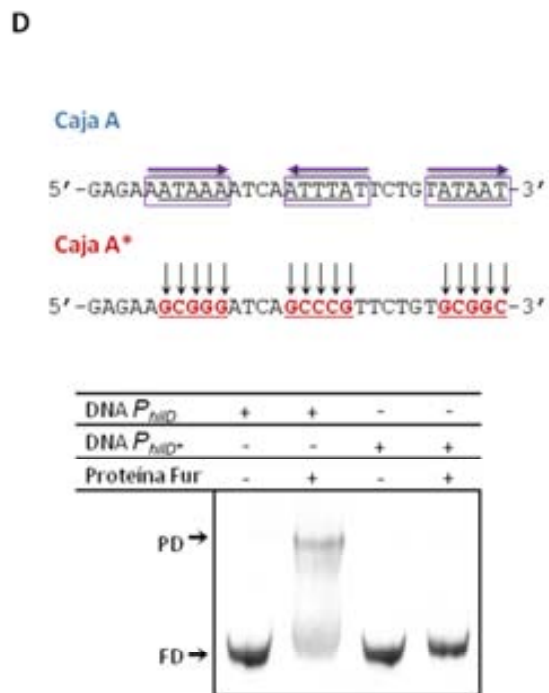
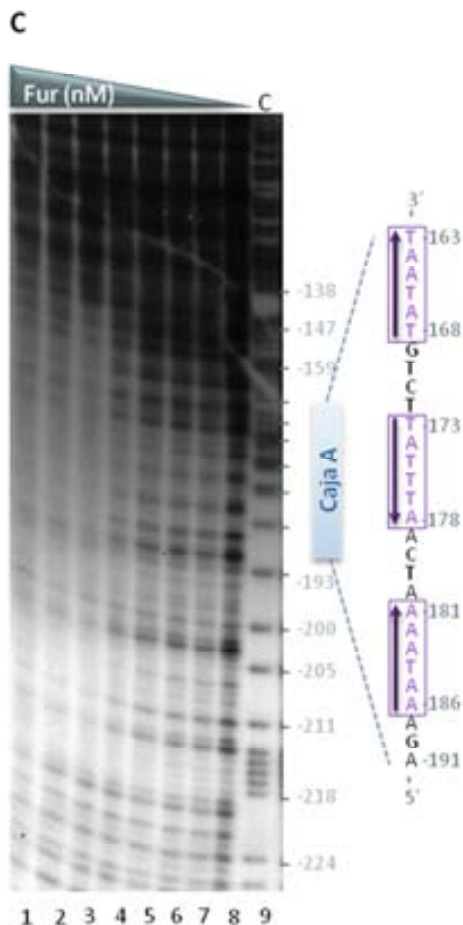
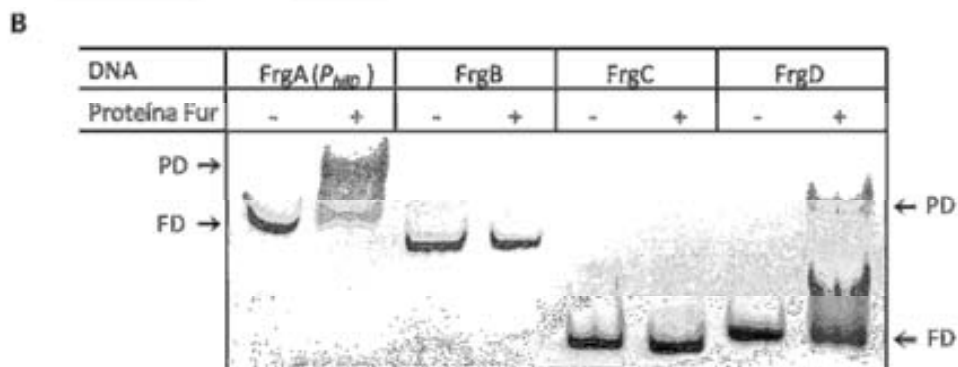
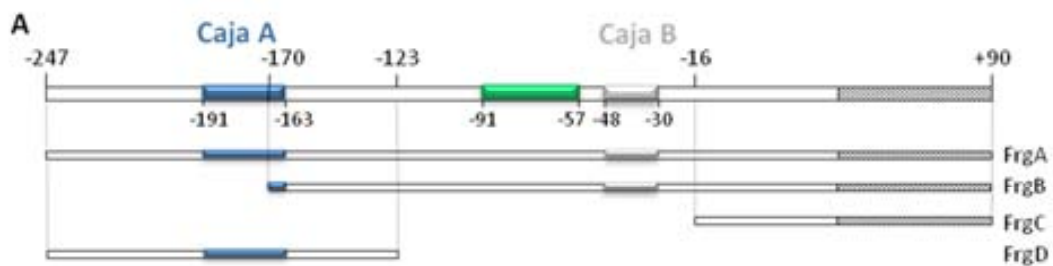


Figura IV.15. Unión de Fur al promotor P_{hilD} . **A. Diagrama de la región P_{hilD} .** Las cajas Fur A y B están marcadas en azul y gris respectivamente. La región de unión de HilD y HilC se muestra en verde. Todas las posiciones indicadas se refieren al inicio de la transcripción +1 del gen *hilD*. La región de codificación de *hilD* se señala mediante rayas. **B.** Experimentos EMSA utilizando los fragmentos de DNA FrgA (P_{hilD}), FrgB, FrgC y FrgD del promotor de *hilD* en ausencia (-) o presencia (+) de 50 nM de proteína Fur. **C.** Ensayo de Footprint de P_{hilD} utilizando concentraciones crecientes de Fur (1,5-100 nM). Las posiciones están relacionadas con el sitio de inicio de la transcripción. Los tres hexámeros de la CajaA están enmarcados y orientados mediante una flecha. **D.** Secuencia de la CajaA salvaje y la CajaA* mutada. Los 3 hexámeros de la caja Fur y su orientación también están indicados. Se muestra el EMSA utilizando las sondas de DNA P_{hilD} o P_{hilD}^* en presencia o ausencia de 50 nM de proteína Fur.

Para determinar mejor la especificidad del sitio de unión de Fur a P_{hilD} se realizaron ensayos de footprinting. A bajas concentraciones de Fur (0,5 dímeros Fur/ P_{hilD} DNA), sólo la región de -189 a -170, que contiene la CajaA, se protegió del ataque de la DNasa I (Figura IV.15, carril 4). La CajaA contiene tres copias de la secuencia hexamérica consenso, separadas cada una por 4-pb. Dos hexámeros (I y III) están orientados en directo y el otro (II) en inverso ($\rightarrow 4 \leftarrow 4 \rightarrow$), formando una caja Fur típica²²¹.

Finalmente, para demostrar la implicación del operador rico en AT (CajaA) en el reconocimiento de Fur a P_{hilD} se obtuvo una sonda de DNA con la CajaA mutada (P_{hilD}^*) que se utilizó en estudios EMSA (Figura IV.15). Como era predecible, Fur reconoce y se une específicamente al DNA que contiene la CajaA intacta, pero no se puede unir a P_{hilD}^* que contiene mutaciones en la región de la CajaA (Caja A*) (Figura IV.15).

3.4.2. Fur activa directamente la expresión de *hilD* *in vivo* e *in vitro*

Los estudios EMSA realizados en este trabajo y expuestos anteriormente confirmaron la unión de la proteína Fur con P_{hilD} . Un estudio paralelo demostró que Fur activa la expresión de la SPI1 aumentando la cantidad de proteína HilD mediante la utilización de fusiones génicas transcripcionales y traduccionales^{243, 347}. Además, estudios recientes han descrito que Fur puede modular la expresión de *hilA* controlando negativamente los niveles del regulador global H-NS³⁴⁸. En presencia de Fur-Fe²⁺ la expresión de *hns* se reprime y la disminución de la concentración de H-NS reduce por tanto la represión que ejercía sobre el promotor de *hilA* permitiendo de esta forma un aumento en la expresión de este gen^{348, 349}. Sin embargo, el mecanismo de activación de la expresión de *hilD*

mediada por Fur continuaba siendo desconocido. Los resultados obtenidos aquí expuestos fueron publicados en el artículo del anexo B.2 de este trabajo ³⁵⁰.

Para determinar si Fur incrementaba la utilización de P_{hilD} *in vivo* se ensayó el nivel de transcripción basal del gen *hilD* en diferentes cepas mutantes de *S. Typhimurium*. Las regiones promotoras salvaje P_{hilD} y su variante P_{hilD}^* , cada una con una cassette Kan^R *upstream*, se integraron en su loci nativo, dando lugar a las cepa salvaje $P_{hilD}::Kan$ y la cepa mutante $P_{hilD}^*::Kan$, respectivamente. Cabe destacar que las mutaciones en la CajaA* (P_{hilD}^* , Figura IV.15) están localizadas *upstream* de las regiones de unión de HilD, HilC, RtsA y de la RNA polimerasa (RNAP) ^{70, 300}. Además la presencia de la cassette Kan^R delante de la CajaA no modificó la expresión de *hilD*, ya que el nivel de transcripción de este gen fue similar al obtenido usando la cepa SV5015 salvaje (Figura IV.16A). Los niveles de mRNA *hilD* fueron analizados mediante qRT-PCR y normalizados respecto el gen *recA* que no está asociado con el regulón Fur ³⁵¹. Como control, se determinó en las mismas condiciones de cultivo, la expresión del gen *foxA* que es reprimido por Fur ³⁰⁷. No hubo ninguna evidencia de que la mutación P_{hilD}^* afectara a la expresión de *foxA*, pero en ausencia de Fur o en presencia de EDTA la expresión de este gen se vio incrementada (Figura IV.16A). En condiciones de saturación de hierro el nivel de mRNA de *hilD* fue 10 veces mayor que en condiciones de escasez de hierro (Figura IV.16A). El hecho de que el nivel de expresión de *hilD* en las cepas, $P_{hilD}^*::Kan$ y *fur* fueran muy similares sugiere que la inactivación de la CajaA no tiene ningún efecto sobre la expresión basal de este gen.

En condiciones de saturación de hierro la expresión de *hilD* en el mutante $P_{hilD}^*::Kan$ fue similar al observado en condiciones de baja concentración de hierro (Figura IV.16A), sugiriendo que la activación de P_{hilD} no se da a través de un mecanismo de des-represión transcripcional. Además, en la misma cepa mutante los niveles de *hilD* fueron similares a aquellos medidos en el mutante $P_{hilD}::Kan$ *fur* (Figura IV.16A), lo que implica que una secuencia de la CajaA salvaje en *cis* es necesaria para incrementar la acumulación del mRNA *hilD*.

Sin embargo, en el estudio realizado por Ellermeier *et al.* ²⁴³ no se observó ninguna disminución en la expresión de *hilD* en ausencia de ambas proteínas, HilD y Fur, mediante fusiones transcripcionales. Estos resultados se confirman con los obtenidos por experimentos de qRT-PCR utilizando la cepa *fur hilD* en la cual, como era de esperar, la expresión de *hilD* se incrementó con un factor de $1,2 \pm 0,18$ respecto a la cepa salvaje. A pesar de que la ausencia de Fur o la disminución en la concentración de hierro resultó en una clara reducción en la expresión de *hilD* (Figura IV.16A), las dos proteínas, Fur y HilD, parecen ser necesarias para la

completa expresión del gen *hilD in vivo*. Esta respuesta tan compleja puede explicarse por el hecho de que, solamente cuando la proteína HilD alcanza un nivel significativo es capaz de activar la expresión de *hilA* y más allá inducir su propia expresión³⁵².

Finalmente para acabar de confirmar que la presencia de Fur es suficiente para activar la utilización de P_{hilD} , fueron llevados a cabo estudios de transcripción *in vitro* con el DNA de P_{hilD} o de P_{hilD^*} linearizados con *HindIII* y la RNAP de *E. coli* (Figura IV.16B). Se obtuvo una única banda de transcrito utilizando el DNA linearizado, indicando que *hilD* se expresa a partir de un único promotor (Figura IV.16B, carril 1). La longitud de este transcrito está totalmente de acuerdo con los transcritos iniciados en P_{hilD} determinados por *primer extension*³⁰⁰, confirmando que el transcrito de 116 nt corresponde al transcrito genuino desde P_{hilD} . Los transcritos con pesos moleculares menores fueron atribuidos a sitios de pausa de la RNAP ya que no se predijo ninguna secuencia promotora obvia en las regiones *upstream*.

En presencia de Mn^{2+} y en ausencia de Fur los niveles basales de los transcritos de 116 nt provenientes de P_{hilD} y P_{hilD^*} fueron similares (37 ± 3 AU (arbitrary units)), sugiriendo que las mutaciones en la CajaA no afectaban la utilización de P_{hilD^*} . En presencia de Mn^{2+} , la utilización de P_{hilD} o la acumulación de transcritos de 116 nt, incrementó con el aumento de concentración de proteína Fur, alcanzando un punto óptimo cuando fueron añadidos aproximadamente 2.5 dímeros Fur/molécula de DNA (123 ± 5 AU). Niveles similares de utilización de P_{hilD} se observaron cuando se usó como molde DNA superenrollado (P_{hilDSc}), descartando así cualquier requerimiento topológico para la activación de su transcripción. A concentraciones de Fur- Mn^{2+} por debajo de la saturación la utilización de P_{hilD} incrementó más de 3 veces sobre el control sin Fur- Mn^{2+} , mientras que la adición de Fur- Mn^{2+} no produjo un aumento de los niveles de transcripción de un promotor no relacionado (P_v) (27 ± 5 AU) (Figura. IV.16B).

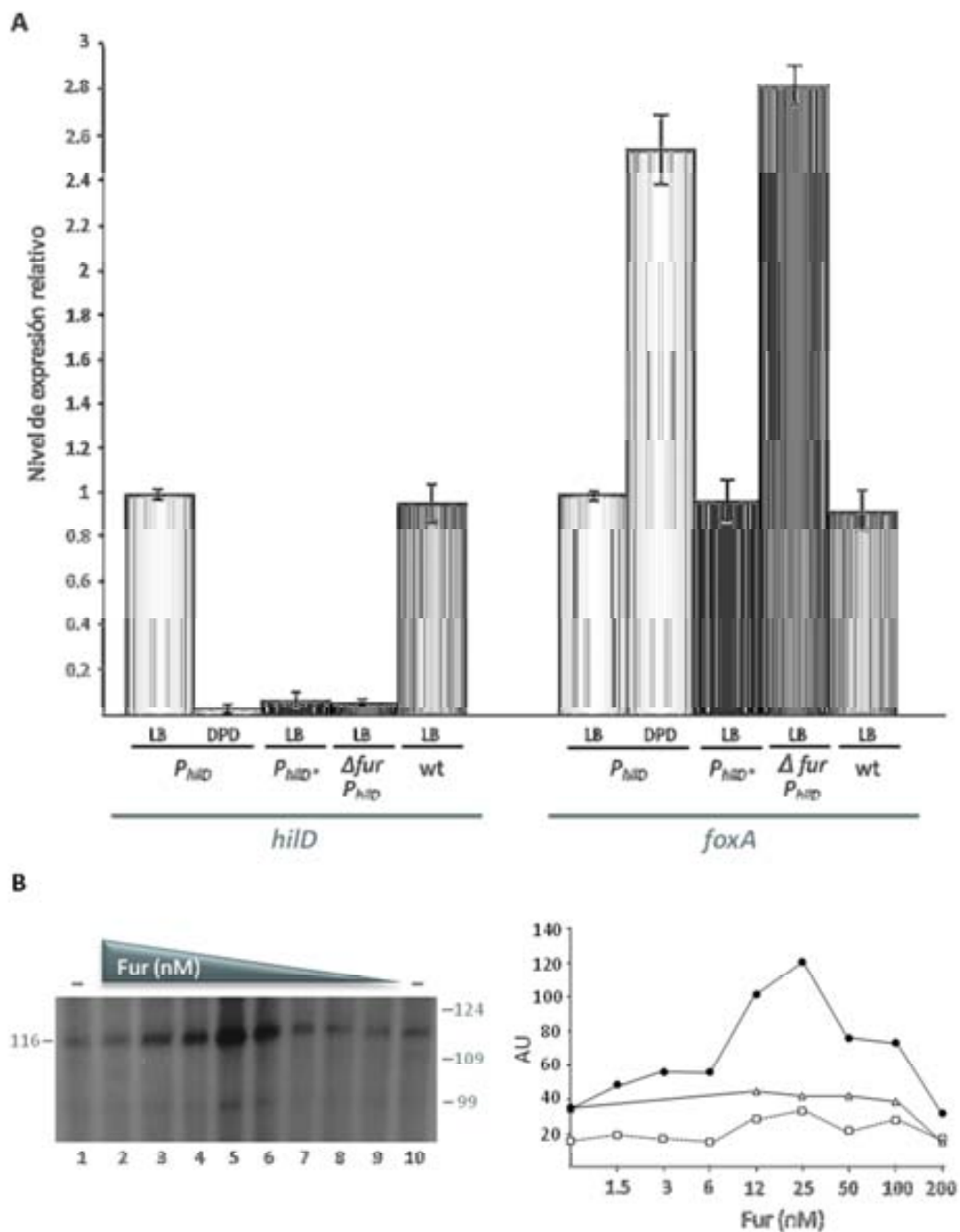


Figura IV.16. Activación de la expresión de *hilD* in vitro e in vivo. A. Niveles relativos de mRNA de *hilD* en diversas cepas bacterianas y concentraciones de hierro. Estos niveles se estimaron mediante qRT-PCR en las cepas P_{hilD} , P_{hilD}^* , $\Delta fur P_{hilD}$ o salvaje (wt) crecidas en concentraciones de hierro altas (LB) o bajas (DPD). Para demostrar que la utilización de P_{hilD} no se ve afectada por la cassette *kanR* se muestra el nivel de *hilD* en la cepa salvaje. Como control se muestra el nivel de expresión de *foxA* que está reprimido por Fur en todos los entornos genéticos. Para cada condición el nivel de expresión relativa fue calculado como el ratio entre la concentración relativa de cada mRNA con respecto a la obtenida en la cepa isogénica P_{hilD} . Se muestra la desviación estándar de

tres experimentos independientes. **B.** Transcripción *in vitro* de *PhilD* en ausencia (-) o presencia de concentraciones crecientes de proteína Fur (1,5-200 nM). En la grafica se muestra la síntesis relativa de mRNA desde *PhilD* (círculos rellenos) y *PhilD** (triángulos vacíos) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de Fur. También se representan las unidades arbitrarias (AU) del vector pGEMT (cuadrados vacíos) como control no específico

La utilización de P_{hilD*} no se vio incrementada a concentraciones iguales o incluso más altas de Fur-Mn²⁺ que aquellas requeridas para activar este promotor. Como puede observarse en la figura IV.16B, el complejo Fur-Mn²⁺ interactuó con la CajaA, sugiriendo que la proteína facilita la utilización de la región P_{hilD} por parte de la RNAP *in vitro*. Por tanto se puede concluir que Fur-Mn²⁺ actúa como un activador transcripcional de la expresión de *hilD* en *S. Typhimurium*. Sin embargo, en presencia de aproximadamente 20 dímeros Fur/molécula de DNA, no se observó dicha activación del promotor P_{hilD} , al igual que tampoco fue observada en P_{hilD*} ni en P_v (Figura IV.16B). Fue descartada la posibilidad de que alguna RNasa contaminante o algún otro efecto no específico fueran responsables de la reducción de la síntesis de RNA a concentraciones constantes de Mn²⁺ y mayores de Fur, por ello se hipotetizó que el complejo Fur-Mn²⁺ evita la activación de P_{hilD} debido a su unión cooperativa. Así pues, la unión de la proteína a lo largo de la región promotora está interfiriendo en la interacción de la RNAP con P_{hilD} en lugar de estimularla, devolviendo la expresión de *hilD* a sus niveles basales.

3.4.3. Fur activa indirectamente la expresión de genes de las islas de patogenicidad 4 y 5

HilD es uno de los reguladores principales de la SPI1 y que justifica la disminución de la expresión de todos los genes de la isla y de algunos de otros genes situados fuera de la misma, por el efecto cascada mediado por el control sobre otros reguladores transcripcionales ejercido por HilD.

El gen *sopB* (también conocido como *sigD*) se encuentra dentro de otra isla de patogenicidad, la SPI5, que contiene 4 genes más (Figura IV.14) que contribuyen a la enteropatogénesis de *Salmonella*³⁵³. La isla puede dividirse en dos regiones, el extremo *serT* que codifica para los genes *pipAB*, y el otro extremo que incluye el gen *sopB*. La proteína efectora SopB es translocada por el T3SS1³⁵⁴ gracias a la asistencia de la chaperona PipC codificada en la misma SPI5³⁵⁵, y su regulación se coordina con la expresión de los genes de la SPI1³⁵⁶. SopB ha sido caracterizada como una inositol polifosfato fosfatasa que provoca la secreción de fluidos en el lumen intestinal³⁵⁷ y que juega un papel importante en la invasión^{358, 359}. Por el

contrario, la expresión de *pipB* y *pipA* está relacionada con la expresión de la isla de patogeneidad SPI2³⁶⁰. Los EMSAs realizados con la proteína Fur y P_{sopB} (Figura IV.14) dieron resultados negativos. Así pues, se puede atribuir la disminución de la expresión de éstos genes en la cepa *fur* o en presencia de EDTA a un control indirecto de la proteína Fur a través de la regulación de *hild* y por tanto de la SPI1. La SPI4 es otra isla de patogeneidad implicada en la unión a las células epiteliales y que contribuye a la enteropatogénesis en el modelo murino³⁶¹. Está constituida por 6 genes: los *siiCDF* codifican componentes de un sistema de secreción tipo 1; el gen *siiE* codifica una proteína de secreción; y los genes *siiAB* con función desconocida³⁶². El T1SS es el responsable de secretar la proteína SiiE que se asocia a la membrana externa y funciona como adhesina cuando está en contacto con las células epiteliales^{53, 362}. Se ha demostrado que la regulación de la SPI4 se solapa con la de la SPI1³⁶¹. La proteína reguladora de la SPI1, HilA, se une a la región 5' *upstream* de *siiA* y es requerida para la expresión de la SPI4³⁶³. Más adelante se sugirió que HilA promovía la expresión de esta isla actuando de antagonista al silenciamiento por la proteína H-NS³⁶⁴. Fur, junto con el hierro, están regulando la expresión de los genes de la SPI4, pero parece ser que este efecto no es directo ya que Fur no se une a P_{siiA} (Figura IV.14) y, como sucede con los genes de la SPI5 puede ser debido a un efecto indirecto a través de la disminución de la expresión de SPI1 en estas mismas condiciones.

Se ha podido observar que el regulón Fur de *S. Typhimurium* es muy extenso y abarca desde la captación y utilización de hierro hasta la regulación de funciones vitales para la célula bacteriana como el metabolismo o la virulencia. La proteína Fur ejerce el control sobre todas estas funciones a distintos niveles y con estrategias diferentes en cada caso.

Por un lado existen genes que están regulados en un primer nivel, es decir que Fur actúa uniéndose directamente sobre su promotor, y otros que lo están a un segundo nivel a través de los sRNA rfrA y B o a través de reguladores controlados directamente por Fur. Además los mecanismos de control de Fur pueden ser tanto de represión como de activación.

El papel de Fur como represor de la expresión de algunos genes es el más conocido y estudiado, aunque aún aparecen trabajos donde se revelan nuevos genes controlados por este modulador en distintas especies bacterianas. En este estudio, aparte de confirmar el control que ejerce Fur sobre todos los genes relacionados con la captación y utilización del hierro, se ha demostrado que Fur controla directamente dos nuevas proteínas codificadas en los genes STM0363 (regulado transcripcional) y STM1587 (receptor de membrana externa), y que de algún modo también controla genes importantes para la síntesis del LPS.

En cambio, el papel de Fur como activador es más controvertido. Muchos estudios de expresión génica global han dejado claro que Fur controla positivamente, de alguna manera muchos genes. El sistema de control indirecto mediante sRNAs es el más aceptado y globalizado en muchas especies bacterianas, pero también es verdad que cada vez más aparecen nuevos mecanismos para explicar el control positivo que ejerce Fur. En este trabajo se demuestra que Fur de *S. Typhimurium* puede actuar como activador de la expresión génica uniéndose directamente a la zona promotora de los genes que regula, así como ocurre en algunas especies como *Neisseria*.

Además se ha evidenciado una función de Fur como sensor de posición en el huésped gracias a su capacidad de unirse a hierro y a su poder de discriminación entre el estado de oxidación de éste elemento. Así pues, el control de Fur sobre genes tanto de virulencia como del metabolismo anaeróbico, estaría indicando a la célula bacteriana su posición dentro del organismo y por tanto permitiría adecuar la expresión de ciertos genes en el momento en que los precisa.

V.

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. El regulón Fur de *S. Typhimurium* está compuesto por 1646 genes de los cuales 733 están regulados negativamente y 913 están bajo un control positivo.
2. En el presente trabajo se han identificado 62 nuevos genes que se encuentran controlados negativamente por el complejo Fur-Fe²⁺. Entre éstos se encuentran reguladores transcripcionales, genes cuyos productos están implicados en la síntesis de pared, codificantes de proteínas de la envuelta y genes metabólicos.
3. Los datos obtenidos en este trabajo han permitido identificar 190 nuevos genes regulados positivamente por el complejo Fur-Fe²⁺ cuyos productos comprenden reguladores transcripcionales, proteínas de la envuelta, proteínas implicadas en el metabolismo energético y del metabolismo del coenzima B₁₂, y proteínas necesarias para la virulencia de *S. Typhimurium*.
4. El complejo Fur-Mn²⁺ puede actuar como represor o como activador transcripcional. De los nuevos genes identificados que están regulados negativamente se une a la región promotora de STM0363 y STM1587. De los nuevos genes regulados positivamente se une a la región promotora de STM3215, *hypO*, STM2186 y *hilD*.
5. Los sRNAs RfrA y RfrB de *S. Typhimurium* actúan conjuntamente para regular, mediante un mecanismo indirecto, algunos genes activados por el regulador Fur. Entre ellos destacan los genes *pocR*, *cbiA* y *pduB* implicados en la síntesis y la utilización de la cobalamina.
6. El complejo Fur-Mn²⁺ activa directamente la transcripción de *hilD*, el principal regulador de la isla de patogeneicidad 1 de *Salmonella* (SPI1).
7. Fur, conjuntamente con el Fe²⁺ es un regulador transcripcional global y además ejerce un papel como sensor de anaerobiosis y localizador de la célula bacteriana dentro del huésped.

VI.

Bibliografía

1. **Carpenter, B.M., Whitmire, J.M. & Merrell, D.S.** This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis. *Infect Immun* **77**, 2590-601 (2009).
2. **Bullen, J. & Griffiths, E.** Iron and Infection: Molecular, Physiological and Clinical Aspects (John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1999).
3. **Ratledge, C. & Dover, L.G.** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 881-941 (2000).
4. **Hantke, K.** Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **197**, 337-41 (1984).
5. **Hantke, K.** Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 172-7 (2001).
6. **Shelobolina, E.S., Sullivan, S.A., O'Neill, K.R., Nevin, K.P. & Lovley, D.R.** Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2959-65 (2004).
7. **Crosa, J.H., Brenner, D.J., Ewing, W.H. & Falkow, S.** Molecular relationships among the Salmonelleae. *J Bacteriol* **115**, 307-15 (1973).
8. **Euzeby, J.P.** Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an opinion. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**, 927-30 (1999).
9. **Perez Luz, S., Rodriguez-Valera, F., Lan, R. & Reeves, P.R.** Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. *J Bacteriol* **180**, 2144-51 (1998).
10. **Su, L.H. & Chiu, C.H.** *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J* **30**, 210-9 (2007).
11. **Ellermeier, C.D. & Schlauch, J.** in *The Prokaryotes* (ed. Dworkin, M.) 123-158 (Springer Science, 2006).
12. **Parry, C.M., Hien, T.T., Dougan, G., White, N.J. & Farrar, J.J.** Typhoid fever. *N Engl J Med* **347**, 1770-82 (2002).
13. **Guard-Petter, J.** The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ Microbiol* **3**, 421-30 (2001).
14. **Neidhardt, F.C., Editor in chief.** *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington, DC., 1996).
15. **McClelland, M. et al.** Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852-6 (2001).
16. **Jarvik, T., Smillie, C., Groisman, E.A. & Ochman, H.** Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. *J Bacteriol* **192**, 560-7 (2010).
17. **Deng, W. et al.** Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol* **185**, 2330-7 (2003).
18. **Parkhill, J. et al.** Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848-52 (2001).
19. **Ahmer, B.M., Tran, M. & Heffron, F.** The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J Bacteriol* **181**, 1364-8 (1999).
20. **Guiney, D.G. et al.** Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella* serovars. *Clin Infect Dis* **21 Suppl 2**, S146-51 (1995).
21. **Mastroeni, P., Grant, A., Restif, O. & Maskell, D.** A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nat Rev Microbiol* **7**, 73-80 (2009).
22. **Darwin, K.H. & Miller, V.L.** Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* **12**, 405-28 (1999).

23. **Schechter, L.M. & Lee, C.A.** *Salmonella* invasion of non-phagocytic cells. *Subcell Biochem* **33**, 289-320 (2000).
24. **Foster, J.W. & Hall, H.K.** Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**, 771-8 (1990).
25. **Audia, J.P., Webb, C.C. & Foster, J.W.** Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**, 97-106 (2001).
26. **Hall, H.K. & Foster, J.W.** The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol* **178**, 5683-91 (1996).
27. **Lee, I.S., Lin, J., Hall, H.K., Bearson, B. & Foster, J.W.** The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **17**, 155-67 (1995).
28. **Bearson, B.L., Wilson, L. & Foster, J.W.** A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol* **180**, 2409-17 (1998).
29. **Bang, I.S., Kim, B.H., Foster, J.W. & Park, Y.K.** OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **182**, 2245-52 (2000).
30. **Bang, I.S., Audia, J.P., Park, Y.K. & Foster, J.W.** Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. *Mol Microbiol* **44**, 1235-50 (2002).
31. **Slauch, J., Taylor, R. & Maloy, S.** Survival in a cruel world: how *Vibrio cholerae* and *Salmonella* respond to an unwilling host. *Genes Dev* **11**, 1761-74 (1997).
32. **Chen, L.M., Kaniga, K. & Galan, J.E.** *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* **21**, 1101-15 (1996).
33. **Monack, D.M., Raupach, B., Hromockyj, A.E. & Falkow, S.** *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9833-8 (1996).
34. **Townsend, S.M. et al.** *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* **69**, 2894-901 (2001).
35. **Edwards, R.A., Olsen, G.J. & Maloy, S.R.** Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends Microbiol* **10**, 94-9 (2002).
36. **Humphries, A.D. et al.** The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Mol Microbiol* **48**, 1357-76 (2003).
37. **Baumler, A.J. et al.** Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *J Bacteriol* **179**, 317-22 (1997).
38. **Baumler, A.J. & Heffron, F.** Identification and sequence analysis of IpfABCDE, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**, 2087-97 (1995).
39. **Baumler, A.J., Tsolis, R.M. & Heffron, F.** Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**, 1862-5 (1996).
40. **Baumler, A.J. et al.** The pef fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun* **64**, 61-8 (1996).
41. **Romling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D. & Normark, S.** Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* **180**, 722-31 (1998).
42. **van der Velden, A.W., Baumler, A.J., Tsolis, R.M. & Heffron, F.** Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* **66**, 2803-8 (1998).

43. **Carter, P.B. & Collins, F.M.** The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med* **139**, 1189-203 (1974).
44. **Jones, B.D., Ghorri, N. & Falkow, S.** *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* **180**, 15-23 (1994).
45. **Wallis, T.S. & Galyov, E.E.** Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol* **36**, 997-1005 (2000).
46. **Altier, C.** Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* **43 Spec No**, 85-92 (2005).
47. **Galan, J.E.** Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol* **2**, 46-50 (1999).
48. **Loistroh, C.P. & Lee, C.A.** The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* **3**, 1281-91 (2001).
49. **Kubori, T. et al.** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**, 602-5 (1998).
50. **Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I. & Galan, J.E.** Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10225-30 (2000).
51. **Kimbrough, T.G. & Miller, S.I.** Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11008-13 (2000).
52. **Kimbrough, T.G. & Miller, S.I.** Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella typhimurium*. *Microbes Infect* **4**, 75-82 (2002).
53. **Galan, J.E.** *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 53-86 (2001).
54. **Hobbie, S., Chen, L.M., Davis, R.J. & Galan, J.E.** Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* **159**, 5550-9 (1997).
55. **Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R. & Galan, J.E.** *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**, 815-26 (1998).
56. **Vazquez-Torres, A. et al.** Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**, 804-8 (1999).
57. **Zhou, D., Hardt, W.D. & Galan, J.E.** *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* **67**, 1974-81 (1999).
58. **Janakiraman, A. & Slauch, J.M.** The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **35**, 1146-55 (2000).
59. **Zaharik, M.L. et al.** The *Salmonella enterica* serovar typhimurium divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model. *Infect Immun* **72**, 5522-5 (2004).
60. **Bajaj, V., Hwang, C. & Lee, C.A.** HilA is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* **18**, 715-27 (1995).
61. **Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R. & Slauch, J.M.** HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator hilA in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **57**, 691-705 (2005).
62. **Schechter, L.M. & Lee, C.A.** AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium* hilA promoter. *Mol Microbiol* **40**, 1289-99 (2001).
63. **Johnston, C., Pegues, D.A., Hueck, C.J., Lee, A. & Miller, S.I.** Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol Microbiol* **22**, 715-27 (1996).

64. **Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A.I., Burnham, K.D. & Maurer, R.** Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol* **35**, 635-46 (2000).
65. **Romeo, T.** Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* **29**, 1321-30 (1998).
66. **Altier, C., Suyemoto, M. & Lawhon, S.D.** Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by CsrA. *Infect Immun* **68**, 6790-7 (2000).
67. **Teplitski, M., Goodier, R.I. & Ahmer, B.M.** Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* **185**, 7257-65 (2003).
68. **Lucas, R.L. et al.** Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **182**, 1872-82 (2000).
69. **Iyoda, S., Kamidoi, T., Hirose, K., Kutsukake, K. & Watanabe, H.** A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* **30**, 81-90 (2001).
70. **Olekhovich, I.N. & Kadner, R.J.** Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *J Bacteriol* **189**, 6882-90 (2007).
71. **Navarre, W.W. et al.** Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**, 236-8 (2006).
72. **Jones, B.D. & Falkow, S.** Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect Immun* **62**, 3745-52 (1994).
73. **Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C. & Lee, C.A.** Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**, 703-14 (1996).
74. **Russell, D.A., Dooley, J.S. & Haylock, R.W.** The steady-state *orgA* specific mRNA levels in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are repressed by oxygen during logarithmic growth phase but not early-stationary phase. *FEMS Microbiol Lett* **236**, 65-72 (2004).
75. **Lucas, R.L. & Lee, C.A.** Roles of HilC and HilD in regulation of *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **183**, 2733-45 (2001).
76. **Prouty, A.M. & Gunn, J.S.** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect Immun* **68**, 6763-9 (2000).
77. **Jones, B.D.** *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* **43 Spec No**, 110-7 (2005).
78. **Pegues, D.A., Hantman, M.J., Behlau, I. & Miller, S.I.** PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Mol Microbiol* **17**, 169-81 (1995).
79. **Baxter, M.A., Fahlen, T.F., Wilson, R.L. & Jones, B.D.** HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* **71**, 1295-305 (2003).
80. **Hopkins, S.A. & Kraehenbuhl, J.P.** Dendritic cells of the murine Peyer's patches colocalize with *Salmonella typhimurium* avirulent mutants in the subepithelial dome. *Adv Exp Med Biol* **417**, 105-9 (1997).
81. **Hopkins, S.A., Niedergang, F., Cortesy-Theulaz, I.E. & Kraehenbuhl, J.P.** A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol* **2**, 59-68 (2000).
82. **Monack, D.M. et al.** *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J Exp Med* **192**, 249-58 (2000).
83. **Collins, F.M.** Immunity to enteric infection in mice. *Infect Immun* **1**, 243-50 (1970).
84. **Carrol, M.E., Jackett, P.S., Aber, V.R. & Lowrie, D.B.** Phagolysosome formation, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and the fate of *Salmonella typhimurium* within mouse peritoneal macrophages. *J Gen Microbiol* **110**, 421-9 (1979).

85. **Cheminay, C., Chakravorty, D. & Hensel, M.** Role of neutrophils in murine salmonellosis. *Infect Immun* **72**, 468-77 (2004).
86. **Richter-Dahlfors, A., Buchan, A.M. & Finlay, B.B.** Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* **186**, 569-80 (1997).
87. **Salcedo, S.P., Noursadeghi, M., Cohen, J. & Holden, D.W.** Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. *Cell Microbiol* **3**, 587-97 (2001).
88. **Holden, D.W.** Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic* **3**, 161-9 (2002).
89. **Clark, R.A.** Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* **179 Suppl 2**, S309-17 (1999).
90. **Miller, R.A. & Britigan, B.E.** Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev* **10**, 1-18 (1997).
91. **Storz, G. & Imlay, J.A.** Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**, 188-94 (1999).
92. **Ernst, R.K., Guina, T. & Miller, S.I.** How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. *J Infect Dis* **179 Suppl 2**, S326-30 (1999).
93. **Uchiya, K. et al.** A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* **18**, 3924-33 (1999).
94. **Vazquez-Torres, A. et al.** *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **287**, 1655-8 (2000).
95. **Gallois, A., Klein, J.R., Allen, L.A., Jones, B.D. & Nauseef, W.M.** *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane. *J Immunol* **166**, 5741-8 (2001).
96. **Vazquez-Torres, A. & Fang, F.C.** *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes Infect* **3**, 1313-20 (2001).
97. **Hensel, M.** *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **36**, 1015-23 (2000).
98. **Valdivia, R.H. & Falkow, S.** Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* **277**, 2007-11 (1997).
99. **Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S. & Hensel, M.** Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* **31**, 1759-73 (1999).
100. **Feng, X., Oropeza, R. & Kenney, L.J.** Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **48**, 1131-43 (2003).
101. **Lee, A.K., Detweiler, C.S. & Falkow, S.** OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* **182**, 771-81 (2000).
102. **Guiney, D.G., Libby, S., Fang, F.C., Krause, M. & Fierer, J.** Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in *Salmonella*. *Trends Microbiol* **3**, 275-9 (1995).
103. **Buchmeier, N. et al.** SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella typhimurium*, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. *Infect Immun* **65**, 3725-30 (1997).
104. **Watson, P.R. et al.** Differential regulation of enteric and systemic salmonellosis by SlyA. *Infect Immun* **67**, 4950-4 (1999).
105. **Ho, T.D. et al.** Identification of GtgE, a novel virulence factor encoded on the Gifsy-2 bacteriophage of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**, 5234-9 (2002).
106. **Uzzau, S., Bossi, L. & Figueroa-Bossi, N.** Differential accumulation of *Salmonella*[Cu, Zn] superoxide dismutases SodCI and SodCII in intracellular bacteria: correlation with their relative contribution to pathogenicity. *Mol Microbiol* **46**, 147-56 (2002).
107. **Krishnakumar, R., Craig, M., Imlay, J.A. & Schlauch, J.M.** Differences in enzymatic properties allow SodCI but not SodCII to contribute to virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain 14028. *J Bacteriol* **186**, 5230-8 (2004).

108. **Mastroeni, P.E.i.c.** *Salmonella* Infections. Clinical, Immunological and Molecular Aspects (Cambridge University Press, 2006).
109. **Blanc-Potard, A.B. & Groisman, E.A.** The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* **16**, 5376-85 (1997).
110. **Hook, E.W.** in Principles and practice of infectious diseases (eds. Mandell, G.L., Douglas, R.G. & Bennet, J.E.) (John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1990).
111. **Tam, M.A., Rydstrom, A., Sundquist, M. & Wick, M.J.** Early cellular responses to *Salmonella* infection: dendritic cells, monocytes, and more. *Immunol Rev* **225**, 140-62 (2008).
112. **Dunlap, N.E., Benjamin, W.H., Jr., McCall, R.D., Jr., Tilden, A.B. & Briles, D.E.** A 'safe-site' for *Salmonella typhimurium* is within splenic cells during the early phase of infection in mice. *Microb Pathog* **10**, 297-310 (1991).
113. **Guo, L. et al.** Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science* **276**, 250-3 (1997).
114. **Groisman, E.A. & Aspedon, A.** The genetic basis of microbial resistance to antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol* **78**, 205-15 (1997).
115. **Khan, S.A. et al.** A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Mol Microbiol* **29**, 571-9 (1998).
116. **Andrews, S.C., Robinson, A.K. & Rodriguez-Quinones, F.** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215-37 (2003).
117. **Archibald, F.S. & Fridovich, I.** Oxygen radicals, oxygen toxicity and the life of microorganisms. *Acta Med Port* **4**, 101-12 (1983).
118. **Weinberg, E.D.** The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspect Biol Med* **40**, 578-83 (1997).
119. **Pradel, E., Guiso, N., Menozzi, F.D. & Loch, C.** *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect Immun* **68**, 1919-27 (2000).
120. **Wandersman, C. & Delepelaire, P.** Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**, 611-47 (2004).
121. **Fridovich, I.** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**, 97-112 (1995).
122. **Compan, I. & Touati, D.** Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **175**, 1687-96 (1993).
123. **Greenberg, J.T. & Dimple, B.** A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *J Bacteriol* **171**, 3933-9 (1989).
124. **Christman, M.F., Morgan, R.W., Jacobson, F.S. & Ames, B.N.** Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**, 753-62 (1985).
125. **Aisen, P.** Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Met Ions Biol Syst* **35**, 585-631 (1998).
126. **Sharma, A.K., Paramasivam, M., Srinivasan, A., Yadav, M.P. & Singh, T.P.** Three-dimensional structure of mare diferric lactoferrin at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* **289**, 303-17 (1999).
127. **Crichton, R.R. & Ward, R.J.** Iron homeostasis. *Met Ions Biol Syst* **35**, 633-65 (1998).
128. **Earhart, C.F.** in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology (ed. Neidhardt, F.C.) 1075-1090 (ASM Press, Washington, DC., 1996).
129. **Stojiljkovic, I. & Perkins-Balding, D.** Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA Cell Biol* **21**, 281-95 (2002).
130. **Otto, B.R., Verweij-van Vught, A.M. & MacLaren, D.M.** Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit Rev Microbiol* **18**, 217-33 (1992).
131. **Buschman, E., Vidal, S. & Skamene, E.** Nonspecific resistance to *Mycobacteria*: the role of the Nrap1 gene. *Behring Inst Mitt*, 51-7 (1997).

132. **Cellier, M., Belouchi, A. & Gros, P.** Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp. *Trends Genet* **12**, 201-4 (1996).
133. **Kuhn, D.E., Baker, B.D., Lafuse, W.P. & Zwilling, B.S.** Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169. *J Leukoc Biol* **66**, 113-9 (1999).
134. **Skamene, E., Schurr, E. & Gros, P.** Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med* **49**, 275-87 (1998).
135. **Zwilling, B.S., Kuhn, D.E., Wikoff, L., Brown, D. & Lafuse, W.** Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect Immun* **67**, 1386-92 (1999).
136. **Fuller, C.A., Yu, R., Irwin, S.W. & Schryvers, A.B.** Biochemical evidence for a conserved interaction between bacterial transferrin binding protein A and transferrin binding protein B. *Microb Pathog* **24**, 75-87 (1998).
137. **Morton, D.J. & Williams, P.** Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins. *FEMS Microbiol Lett* **53**, 123-7 (1989).
138. **Deneer, H.G., Healey, V. & Boychuk, I.** Reduction of exogenous ferric iron by a surface-associated ferric reductase of *Listeria spp.* *Microbiology* **141** (Pt 8), 1985-92 (1995).
139. **Paustian, M.L., May, B.J., Cao, D., Boley, D. & Kapur, V.** Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources. *J Bacteriol* **184**, 6714-20 (2002).
140. **Newman, D.K. & Kolter, R.** A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature* **405**, 94-7 (2000).
141. **Schroder, I., Johnson, E. & de Vries, S.** Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 427-47 (2003).
142. **NM, O.B.-S., Veith, P.D., Dashper, S.G. & Reynolds, E.C.** Porphyromonas gingivalis gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. *Curr Protein Pept Sci* **4**, 409-26 (2003).
143. **Genco, C.A. & Dixon, D.W.** Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* **39**, 1-11 (2001).
144. **Kehres, D.G., Janakiraman, A., Slauch, J.M. & Maguire, M.E.** SitABCD is the alkaline Mn(2+) transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**, 3159-66 (2002).
145. **Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J. & Andrews, S.C.** Feo-transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **19**, 143-57 (2006).
146. **Hantke, K.** Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: fur not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet* **210**, 135-9 (1987).
147. **Stojiljkovic, I., Cobeljic, M. & Hantke, K.** *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol Lett* **108**, 111-5 (1993).
148. **Tsolis, R.M., Baumler, A.J., Heffron, F. & Stojiljkovic, I.** Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun* **64**, 4549-56 (1996).
149. **Velayudhan, J. et al.** Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol Microbiol* **37**, 274-86 (2000).
150. **Runyen-Janecky, L.J., Reeves, S.A., Gonzales, E.G. & Payne, S.M.** Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, luc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition *in vitro* and in cultured cells. *Infect Immun* **71**, 1919-28 (2003).
151. **Robey, M. & Cianciotto, N.P.** *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect Immun* **70**, 5659-69 (2002).
152. **Dashper, S.G. et al.** A novel *Porphyromonas gingivalis* FeoB plays a role in manganese accumulation. *J Biol Chem* **280**, 28095-102 (2005).
153. **Crosa, J.H. & Walsh, C.T.** Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 223-49 (2002).

154. **Wooldridge, K.G. & Williams, P.H.** Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**, 325-48 (1993).
155. **Brock, J.H., Williams, P.H., Liceaga, J. & Wooldridge, K.G.** Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infect Immun* **59**, 3185-90 (1991).
156. **Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. & Winkelmann, G.** Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3677-82 (2003).
157. **Muller, S.I., Valdebenito, M. & Hantke, K.** Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. *Biometals* **22**, 691-5 (2009).
158. **Goetz, D.H. et al.** The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* **10**, 1033-43 (2002).
159. **Baumler, A.J. et al.** Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Gene* **183**, 207-13 (1996).
160. **Baumler, A.J. et al.** IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **180**, 1446-53 (1998).
161. **Matzanke, B.F. et al.** Iron uptake and intracellular metal transfer in mycobacteria mediated by xenosiderophores. *Biometals* **10**, 193-203 (1997).
162. **Nelson, M., Carrano, C.J. & Szaniszlo, P.J.** Identification of the ferrioxamine B receptor, FoxB, in *Escherichia coli* K12. *Biometals* **5**, 37-46 (1992).
163. **Larsen, R.A., Thomas, M.G., Wood, G.E. & Postle, K.** Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation (Δ V17) by a missense mutation in ExbB. *Mol Microbiol* **13**, 627-40 (1994).
164. **Higgs, P.I., Myers, P.S. & Postle, K.** Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J Bacteriol* **180**, 6031-8 (1998).
165. **Postle, K.** TonB protein and energy transduction between membranes. *J Bioenerg Biomembr* **25**, 591-601 (1993).
166. **Reynolds, P.R., Mottur, G.P. & Bradbeer, C.** Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*. Some observations on the roles of the gene products of BtuC and TonB. *J Biol Chem* **255**, 4313-9 (1980).
167. **Wooldridge, K.G., Morrissey, J.A. & Williams, P.H.** Transport of ferric-aerobactin into the periplasm and cytoplasm of *Escherichia coli* K12: role of envelope-associated proteins and effect of endogenous siderophores. *J Gen Microbiol* **138**, 597-603 (1992).
168. **Larsen, R.A., Thomas, M.G. & Postle, K.** Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol Microbiol* **31**, 1809-24 (1999).
169. **Letain, T.E. & Postle, K.** TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **24**, 271-83 (1997).
170. **Fontecave, M., Coves, J. & Pierre, J.L.** Ferric reductases or flavin reductases? *Biometals* **7**, 3-8 (1994).
171. **Muller, K., Matzanke, B.F., Schunemann, V., Trautwein, A.X. & Hantke, K.** FhuF, an iron-regulated protein of *Escherichia coli* with a new type of [2Fe-2S] center. *Eur J Biochem* **258**, 1001-8 (1998).
172. **Brickman, T.J. & McIntosh, M.A.** Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J Biol Chem* **267**, 12350-5 (1992).
173. **Heidinger, S., Braun, V., Pecoraro, V.L. & Raymond, K.N.** Iron supply to *Escherichia coli* by synthetic analogs of enterochelin. *J Bacteriol* **153**, 109-15 (1983).

174. **Venuti, M.C., Rastetter, W.H. & Neilands, J.B.** 1,3,5-Tris(N,N',N''-2,3-dihydroxybenzoyl)amino-methylbenzene, a synthetic iron chelator related to enterobactin. *J Med Chem* **22**, 123-4 (1979).
175. **Andrews, S.C.** Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol* **40**, 281-351 (1998).
176. **Berman, H.M. et al.** The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-42 (2000).
177. **Almiron, M., Link, A.J., Furlong, D. & Kolter, R.** A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**, 2646-54 (1992).
178. **Zhao, G. et al.** 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**, 27689-96 (2002).
179. **Andrews, S.C. et al.** Site-directed replacement of the coaxial heme ligands of bacterioferritin generates heme-free variants. *J Biol Chem* **270**, 23268-74 (1995).
180. **Quail, M.A. et al.** Spectroscopic and voltammetric characterisation of the bacterioferritin-associated ferredoxin of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 635-42 (1996).
181. **Garg, R.P., Vargo, C.J., Cui, X. & Kurtz, D.M., Jr.** A [2Fe-2S] protein encoded by an open reading frame upstream of the *Escherichia coli* bacterioferritin gene. *Biochemistry* **35**, 6297-301 (1996).
182. **Kox, L.F., Wosten, M.M. & Groisman, E.A.** A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *EMBO J* **19**, 1861-72 (2000).
183. **Chamngopol, S., Dodson, W., Cromie, M.J., Harris, Z.L. & Groisman, E.A.** Fe(III)-mediated cellular toxicity. *Mol Microbiol* **45**, 711-9 (2002).
184. **Tang, Y. & Guest, J.R.** Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases. *Microbiology* **145 (Pt 11)**, 3069-79 (1999).
185. **Alen, C. & Sonenshein, A.L.** *Bacillus subtilis* aconitase is an RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10412-7 (1999).
186. **Wilson, T.J. et al.** The *rpfA* gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an aconitase. *Mol Microbiol* **28**, 961-70 (1998).
187. **Crosa, J.H.** Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 319-36 (1997).
188. **Helmann, J.D.** The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**, 47-110 (2002).
189. **Lee, J.W. & Helmann, J.D.** Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**, 485-99 (2007).
190. **Dussurget, O., Rodriguez, M. & Smith, I.** An *ideR* mutant of *Mycobacterium smegmatis* has derepressed siderophore production and an altered oxidative-stress response. *Mol Microbiol* **22**, 535-44 (1996).
191. **Rodriguez, G.M., Voskuil, M.I., Gold, B., Schoolnik, G.K. & Smith, I.** *ideR*, An essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect Immun* **70**, 3371-81 (2002).
192. **Hill, P.J. et al.** SirR, a novel iron-dependent repressor in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66**, 4123-9 (1998).
193. **Schmitt, M.P.** Transcription of the *Corynebacterium diphtheriae hmuO* gene is regulated by iron and heme. *Infect Immun* **65**, 4634-41 (1997).
194. **Schmitt, M.P., Talley, B.G. & Holmes, R.K.** Characterization of lipoprotein IRP1 from *Corynebacterium diphtheriae*, which is regulated by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and iron. *Infect Immun* **65**, 5364-7 (1997).
195. **Qiu, X., Pohl, E., Holmes, R.K. & Hol, W.G.** High-resolution structure of the diphtheria toxin repressor complexed with cobalt and manganese reveals an SH3-like third domain

- and suggests a possible role of phosphate as co-corepressor. *Biochemistry* **35**, 12292-302 (1996).
196. **Ernst, J.F., Bennett, R.L. & Rothfield, L.I.** Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **135**, 928-34 (1978).
197. **Hantke, K.** Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* **182**, 288-92 (1981).
198. **Bagg, A. & Neilands, J.B.** Mapping of a mutation affecting regulation of iron uptake systems in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **161**, 450-3 (1985).
199. **Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. & Helmann, J.D.** *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29**, 189-98 (1998).
200. **Milano, A., Forti, F., Sala, C., Riccardi, G. & Ghisotti, D.** Transcriptional regulation of *furA* and *katG* upon oxidative stress in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **183**, 6801-6 (2001).
201. **Litwin, C.M., Boyko, S.A. & Calderwood, S.B.** Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae fur* gene. *J Bacteriol* **174**, 1897-903 (1992).
202. **Franza, T., Sauvage, C. & Expert, D.** Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 119-28 (1999).
203. **Ghassemian, M. & Straus, N.A.** Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7942. *Microbiology* **142** (Pt 6), 1469-76 (1996).
204. **Klenk, H.P. et al.** The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**, 364-70 (1997).
205. **Kawashima, T. et al.** Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14257-62 (2000).
206. **de Lorenzo, V., Giovannini, F., Herrero, M. & Neilands, J.B.** 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**, 875-84 (1988).
207. **Bagg, A. & Neilands, J.B.** Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* **51**, 509-18 (1987).
208. **Bagg, A. & Neilands, J.B.** 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* **26**, 5471-7 (1987).
209. **Smith, A., Hooper, N.I., Shipulina, N. & Morgan, W.T.** Heme binding by a bacterial repressor protein, the gene product of the ferric uptake regulation (*fur*) gene of *Escherichia coli*. *J Protein Chem* **15**, 575-83 (1996).
210. **Keyer, K. & Imlay, J.A.** Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13635-40 (1996).
211. **Mills, S.A. & Marletta, M.A.** Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the ferric uptake regulator from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**, 13553-9 (2005).
212. **Jacquamet, L. et al.** X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 2564-71 (1998).
213. **Althaus, E.W., Outten, C.E., Olson, K.E., Cao, H. & O'Halloran, T.V.** The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **38**, 6559-69 (1999).
214. **Stojiljkovic, I. & Hantke, K.** Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet* **247**, 199-205 (1995).
215. **Pohl, E. et al.** Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**, 903-15 (2003).
216. **Coy, M., Doyle, C., Besser, J. & Neilands, J.B.** Site-directed mutagenesis of the ferric uptake regulation gene of *Escherichia coli*. *Biometals* **7**, 292-8 (1994).

217. **Gilbert, W. & Muller-Hill, B.** Isolation of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**, 1891-8 (1966).
218. **Kelley, R.L. & Yanofsky, C.** Trp aporepressor production is controlled by autogenous regulation and inefficient translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 3120-4 (1982).
219. **Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D. & Storz, G.** OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* **181**, 4639-43 (1999).
220. **Watnick, P.I., Eto, T., Takahashi, H. & Calderwood, S.B.** Purification of *Vibrio cholerae fur* and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Bacteriol* **179**, 243-7 (1997).
221. **Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V.** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**, 6223-9 (1999).
222. **Baichoo, N. & Helmann, J.D.** Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**, 5826-32 (2002).
223. **Lavrrar, J.L. & McIntosh, M.A.** Architecture of a fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* **185**, 2194-202 (2003).
224. **de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M. & Neilands, J.B.** Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J Bacteriol* **169**, 2624-30 (1987).
225. **Newman, D.L. & Shapiro, J.A.** Differential *fiu-lacZ* fusion regulation linked to *Escherichia coli* colony development. *Mol Microbiol* **33**, 18-32 (1999).
226. **Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V.** Evidence of an unusually long operator for the fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 24709-14 (2000).
227. **Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V.** Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* **283**, 537-47 (1998).
228. **Lavrrar, J.L., Christoffersen, C.A. & McIntosh, M.A.** Fur-DNA interactions at the bidirectional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **322**, 983-95 (2002).
229. **Gao, H. et al.** The iron-responsive Fur regulon in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **190**, 3063-75 (2008).
230. **Merrell, D.S. et al.** Growth phase-dependent response of *Helicobacter pylori* to iron starvation. *Infect Immun* **71**, 6510-25 (2003).
231. **Gruer, M.J. & Guest, J.R.** Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology* **140** (Pt 10), 2531-41 (1994).
232. **Dubrac, S. & Touati, D.** Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* **182**, 3802-8 (2000).
233. **Dubrac, S. & Touati, D.** Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**, 147-56 (2002).
234. **Litwin, C.M. & Calderwood, S.B.** Analysis of the complexity of gene regulation by fur in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **176**, 240-8 (1994).
235. **Masse, E. & Gottesman, S.** A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4620-5 (2002).
236. **Masse, E., Vanderpool, C.K. & Gottesman, S.** Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 6962-71 (2005).
237. **Geissmann, T.A. & Touati, D.** Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23**, 396-405 (2004).
238. **Masse, E. & Arguin, M.** Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem Sci* **30**, 462-8 (2005).
239. **Masse, E., Escorcía, F.E. & Gottesman, S.** Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **17**, 2374-83 (2003).

240. **Moll, I., Afonyushkin, T., Vytvytska, O., Kaberdin, V.R. & Blasi, U.** Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA* **9**, 1308-14 (2003).
241. **Chen, Q. & Crosa, J.H.** Antisense RNA, fur, iron, and the regulation of iron transport genes in *Vibrio anguillarum*. *J Biol Chem* **271**, 18885-91 (1996).
242. **Jacques, J.F. et al.** RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**, 1181-90 (2006).
243. **Ellermeier, J.R. & Slauch, J.M.** Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J Bacteriol* **190**, 476-86 (2008).
244. **Sittka, A. et al.** Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* **4**, e1000163 (2008).
245. **Wilderman, P.J. et al.** Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9792-7 (2004).
246. **Mellin, J.R., Goswami, S., Grogan, S., Tjaden, B. & Genco, C.A.** A novel fur- and iron-regulated small RNA, NrrF, is required for indirect fur-mediated regulation of the *sdhA* and *sdhC* genes in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **189**, 3686-94 (2007).
247. **Mey, A.R., Craig, S.A. & Payne, S.M.** Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of ryhB in biofilm formation. *Infect Immun* **73**, 5706-19 (2005).
248. **Davis, B.M., Quinones, M., Pratt, J., Ding, Y. & Waldor, M.K.** Characterization of the small untranslated RNA RyhB and its regulon in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **187**, 4005-14 (2005).
249. **Oglesby, A.G., Murphy, E.R., Iyer, V.R. & Payne, S.M.** Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and ydeP. *Mol Microbiol* **58**, 1354-67 (2005).
250. **Duhring, U., Axmann, I.M., Hess, W.R. & Wilde, A.** An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7054-8 (2006).
251. **Hernandez, J.A. et al.** Identification of a furA cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC 7120. *J Mol Biol* **355**, 325-34 (2006).
252. **Grifantini, R. et al.** Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9542-7 (2003).
253. **Delany, I., Rappuoli, R. & Scarlato, V.** Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **52**, 1081-90 (2004).
254. **Alamuri, P., Mehta, N., Burk, A. & Maier, R.J.** Regulation of the *Helicobacter pylori* Fe-S cluster synthesis protein NifS by iron, oxidative stress conditions, and fur. *J Bacteriol* **188**, 5325-30 (2006).
255. **Nandal, A. et al.** Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe(2+)-Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent. *Mol Microbiol* **75**, 637-57 (2010).
256. **Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V.** The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **42**, 1297-309 (2001).
257. **Ernst, F.D. et al.** Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J Bacteriol* **187**, 3687-92 (2005).
258. **Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V.** An anti-repression Fur operator upstream of the promoter is required for iron-mediated transcriptional autoregulation in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **50**, 1329-38 (2003).
259. **Abdul-Tehrani, H. et al.** Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J Bacteriol* **181**, 1415-28 (1999).
260. **Payne, S.M. et al.** Iron and pathogenesis of *Shigella*: iron acquisition in the intracellular environment. *Biometals* **19**, 173-80 (2006).
261. **Gaballa, A. et al.** The *Bacillus subtilis* iron-sparing response is mediated by a Fur-regulated small RNA and three small, basic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11927-32 (2008).

262. **Puig, S., Askeland, E. & Thiele, D.J.** Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* **120**, 99-110 (2005).
263. **Wennerhold, J., Krug, A. & Bott, M.** The AraC-type regulator RipA represses aconitase and other iron proteins from *Corynebacterium* under iron limitation and is itself repressed by DtxR. *J Biol Chem* **280**, 40500-8 (2005).
264. **De Lorenzo, V., Herrero, M., Giovannini, F. & Neilands, J.B.** Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of fur gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **173**, 537-46 (1988).
265. **Delany, I., Ieva, R., Alaimo, C., Rappuoli, R. & Scarlato, V.** The iron-responsive regulator fur is transcriptionally autoregulated and not essential in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **185**, 6032-41 (2003).
266. **Park, S.Y. et al.** Identification, characterization, and functional analysis of a gene encoding the ferric uptake regulation protein in *Bartonella* species. *J Bacteriol* **183**, 5751-5 (2001).
267. **Vasil, M.L. & Ochsner, U.A.** The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol* **34**, 399-413 (1999).
268. **Fuangthong, M., Herbig, A.F., Bsat, N. & Helmann, J.D.** Regulation of the *Bacillus subtilis* fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J Bacteriol* **184**, 3276-86 (2002).
269. **Vecerek, B., Moll, I. & Blasi, U.** Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J* **26**, 965-75 (2007).
270. **Venturi, V., Weisbeek, P. & Koster, M.** Gene regulation of siderophore-mediated iron acquisition in *Pseudomonas*: not only the Fur repressor. *Mol Microbiol* **17**, 603-10 (1995).
271. **Thomas, C.E. & Sparling, P.F.** Isolation and analysis of a fur mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **178**, 4224-32 (1996).
272. **Tolmasky, M.E., Wertheimer, A.M., Actis, L.A. & Crosa, J.H.** Characterization of the *Vibrio anguillarum* fur gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. *J Bacteriol* **176**, 213-20 (1994).
273. **McHugh, J.P. et al.** Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* **278**, 29478-86 (2003).
274. **Ochsner, U.A., Wilderman, P.J., Vasil, A.I. & Vasil, M.L.** GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol* **45**, 1277-87 (2002).
275. **Singh, A.K., McIntyre, L.M. & Sherman, L.A.** Microarray analysis of the genome-wide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* **132**, 1825-39 (2003).
276. **Stojiljkovic, I., Baumler, A.J. & Hantke, K.** 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**, 531-45 (1994).
277. **Touati, D.** Transcriptional and posttranscriptional regulation of manganese superoxide dismutase biosynthesis in *Escherichia coli*, studied with operon and protein fusions. *J Bacteriol* **170**, 2511-20 (1988).
278. **Baichoo, N., Wang, T., Ye, R. & Helmann, J.D.** Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* **45**, 1613-29 (2002).
279. **Prince, R.W., Cox, C.D. & Vasil, M.L.** Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* fur gene. *J Bacteriol* **175**, 2589-98 (1993).
280. **Horsburgh, M.J., Ingham, E. & Foster, S.J.** In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J Bacteriol* **183**, 468-75 (2001).

281. **Xiong, A., Singh, V.K., Cabrera, G. & Jayaswal, R.K.** Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, fur, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **146 (Pt 3)**, 659-68 (2000).
282. **Litwin, C.M. & Byrne, B.L.** Cloning and characterization of an outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* required for heme utilization: regulation of expression and determination of the gene sequence. *Infect Immun* **66**, 3134-41 (1998).
283. **Carson, S.D., Thomas, C.E. & Elkins, C.** Cloning and sequencing of a *Haemophilus ducreyi* fur homolog. *Gene* **176**, 125-9 (1996).
284. **Cha, J.Y., Lee, J.S., Oh, J.I., Choi, J.W. & Baik, H.S.** Functional analysis of the role of Fur in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 11528: Fur controls expression of genes involved in quorum-sensing. *Biochem Biophys Res Commun* **366**, 281-7 (2008).
285. **Friedman, Y.E. & O'Brian, M.R.** A novel DNA-binding site for the ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem* **278**, 38395-401 (2003).
286. **Hamza, I., Qi, Z., King, N.D. & O'Brian, M.R.** Fur-independent regulation of iron metabolism by Irr in *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology* **146 (Pt 3)**, 669-76 (2000).
287. **Litwin, C.M. & Calderwood, S.B.** Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**, 137-49 (1993).
288. **Panina, E.M., Mironov, A.A. & Gelfand, M.S.** Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **29**, 5195-206 (2001).
289. **Kim, S.K., Wilmes-Riesenberg, M.R. & Wanner, B.L.** Involvement of the sensor kinase EnvZ in the *in vivo* activation of the response-regulator PhoB by acetyl phosphate. *Mol Microbiol* **22**, 135-47 (1996).
290. **Bijlsma, J.J. et al.** The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun* **70**, 606-11 (2002).
291. **Bearson, S., Bearson, B. & Foster, J.W.** Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **147**, 173-80 (1997).
292. **Foster, J.W. & Hall, H.K.** Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (fur) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J Bacteriol* **174**, 4317-23 (1992).
293. **Tsolis, R.M., Baumler, A.J. & Heffron, F.** Role of *Salmonella typhimurium* Mn-superoxide dismutase (SodA) in protection against early killing by J774 macrophages. *Infect Immun* **63**, 1739-44 (1995).
294. **Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L. & Despied, S.** Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol* **177**, 2305-14 (1995).
295. **Hassett, D.J. et al.** Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J Bacteriol* **178**, 3996-4003 (1996).
296. **Zheng, M. et al.** DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**, 4562-70 (2001).
297. **D'Autreaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J.M. & Michaud-Soret, I.** Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16619-24 (2002).
298. **Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T.** Molecular cloning : a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
299. **Datsenko, K.A. & Wanner, B.L.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-5 (2000).
300. **Olekhovich, I.N. & Kadner, R.J.** DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**, 4148-60 (2002).
301. **Salzberg, S.L., Delcher, A.L., Kasif, S. & White, O.** Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Res* **26**, 544-8 (1998).

302. **Pearson, W.R. & Lipman, D.J.** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2444-8 (1988).
303. **Lowe, T.M. & Eddy, S.R.** tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* **25**, 955-64 (1997).
304. **Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. & Hinton, J.C.** Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**, 103-18 (2003).
305. **Smyth, G.K.** Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3 (2004).
306. **Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B.M. & Irizarry, R.A.** affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* **20**, 307-15 (2004).
307. **Tsolis, R.M., Baumler, A.J., Stojiljkovic, I. & Heffron, F.** Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J Bacteriol* **177**, 4628-37 (1995).
308. **de la Hoz, A.B. et al.** Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 728-33 (2000).
309. **Maxam, A.M. & Gilbert, W.** A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 560-4 (1977).
310. **Carrasco, B., Manfredi, C., Ayora, S. & Alonso, J.C.** *Bacillus subtilis* SsbA and dATP regulate RecA nucleation onto single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst)* **7**, 990-6 (2008).
311. **Munch, R. et al.** Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* **21**, 4187-9 (2005).
312. **Patzer, S.I. & Hantke, K.** SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 3307-9 (1999).
313. **Park, S.J. & Gunsalus, R.P.** 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**, 6255-62 (1995).
314. **Vassinova, N. & Kozyrev, D.** A method for direct cloning of *fur*-regulated genes: identification of seven new *fur*-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146 Pt 12**, 3171-82 (2000).
315. **Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L. & Fee, J.A.** Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J Bacteriol* **172**, 1930-8 (1990).
316. **Panosa, A., Roca, I. & Gibert, I.** Ribonucleotide reductases of *Salmonella typhimurium*: transcriptional regulation and differential role in pathogenesis. *PLoS One* **5**, e11328 (2010).
317. **Tseng, C.P.** 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 (1997).
318. **Valdivia, R.H., Cirillo, D.M., Lee, A.K., Bouley, D.M. & Falkow, S.** mig-14 is a horizontally acquired, host-induced gene required for *Salmonella enterica* lethal infection in the murine model of typhoid fever. *Infect Immun* **68**, 7126-31 (2000).
319. **Jennings, M.P., Anderson, J.K. & Beacham, I.R.** Cloning and molecular analysis of the *Salmonella enterica ansP* gene, encoding an L-asparagine permease. *Microbiology* **141 (Pt 1)**, 141-6 (1995).
320. **Baba-Dikwa, A., Thompson, D., Spencer, N.J., Andrews, S.C. & Watson, K.A.** Overproduction, purification and preliminary X-ray diffraction analysis of YncE, an iron-regulated Sec-dependent periplasmic protein from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**, 966-9 (2008).
321. **Schnaitman, C.A. & Klena, J.D.** Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 655-82 (1993).

322. **Jiang, X.M. et al.** Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar Typhimurium (strain LT2). *Mol Microbiol* **5**, 695-713 (1991).
323. **Waldron, K.J. & Robinson, N.J.** How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol* **7**, 25-35 (2009).
324. **Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C.O. & Cronan, J.E., Jr.** Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **57**, 522-42 (1993).
325. **Lu, C.D. & Abdelal, A.T.** Role of ArgR in activation of the *ast* operon, encoding enzymes of the arginine succinyltransferase pathway in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**, 1934-8 (1999).
326. **Howard, V.J., Belyaeva, T.A., Busby, S.J. & Hyde, E.I.** DNA binding of the transcription activator protein MelR from *Escherichia coli* and its C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* **30**, 2692-700 (2002).
327. **Pilsil, H., Smajs, D. & Braun, V.** Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the *Escherichia coli* outer membrane. *J Bacteriol* **181**, 3578-81 (1999).
328. **Gil, F. et al.** The *ompW* (porin) gene mediates methyl viologen (paraquat) efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Res Microbiol* **158**, 529-36 (2007).
329. **Grass, G. et al.** FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* **183**, 9-18 (2005).
330. **Rocco, C.J. & Escalante-Semerena, J.C.** In *Salmonella enterica*, 2-methylcitrate blocks gluconeogenesis. *J Bacteriol* **192**, 771-8 (2010).
331. **Hammelmann, T.A. et al.** Identification of a new *prp* locus required for propionate catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2. *FEMS Microbiol Lett* **137**, 233-9 (1996).
332. **Roth, J.R., Lawrence, J.G. & Bobik, T.A.** Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol* **50**, 137-81 (1996).
333. **Badia, J., Ros, J. & Aguilar, J.** Fermentation mechanism of fucose and rhamnose in *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **161**, 435-7 (1985).
334. **Obradors, N., Badia, J., Baldoma, L. & Aguilar, J.** Anaerobic metabolism of the L-rhamnose fermentation product 1,2-propanediol in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **170**, 2159-62 (1988).
335. **Bry, L., Falk, P.G. & Gordon, J.L.** Genetic engineering of carbohydrate biosynthetic pathways in transgenic mice demonstrates cell cycle-associated regulation of glycoconjugate production in small intestinal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1161-6 (1996).
336. **Roof, D.M. & Roth, J.R.** Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **170**, 3855-63 (1988).
337. **Teixido, L. et al.** Control by Fur of the nitrate respiration regulators NarP and NarL in *Salmonella enterica*. *Int Microbiol* **13**, 33-9 (2010).
338. **Bury-Mone, S. et al.** Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **53**, 623-38 (2004).
339. **Palyada, K., Threadgill, D. & Stintzi, A.** Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* **186**, 4714-29 (2004).
340. **Rea, R.B., Gahan, C.G. & Hill, C.** Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. *Infect Immun* **72**, 717-27 (2004).
341. **Wang, F., Cheng, S., Sun, K. & Sun, L.** Molecular analysis of the *fur* (ferric uptake regulator) gene of a pathogenic *Edwardsiella tarda* strain. *J Microbiol* **46**, 350-5 (2008).
342. **Garcia-del Portillo, F., Foster, J.W. & Finlay, B.B.** Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* **61**, 4489-92 (1993).
343. **Campoy, S. et al.** Role of the high-affinity zinc uptake *znuABC* system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. *Infect Immun* **70**, 4721-5 (2002).
344. **Wu, H. & Fives-Taylor, P.M.** Molecular strategies for fimbrial expression and assembly. *Crit Rev Oral Biol Med* **12**, 101-15 (2001).

345. **Carsiotis, M., Stocker, B.A., Weinstein, D.L. & O'Brien, A.D.** A *Salmonella typhimurium* virulence gene linked to *flg*. *Infect Immun* **57**, 3276-80 (1989).
346. **Ling, J.M., Moore, R.A., Surette, M.G. & Woods, D.E.** The *mviN* homolog in *Burkholderia pseudomallei* is essential for viability and virulence. *Can J Microbiol* **52**, 831-42 (2006).
347. **Ellermeier, J.R. & Slauch, J.M.** Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* **10**, 24-9 (2007).
348. **Troxell, B. et al.** Fur negatively regulates *hns* and is required for the expression of *HilA* and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **193**, 497-505 (2011).
349. **Schechter, L.M., Jain, S., Akbar, S. & Lee, C.A.** The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **71**, 5432-5 (2003).
350. **Teixido, L., Carrasco, B., Alonso, J.C., Barbe, J. & Campoy, S.** Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hild* operator in vivo and in vitro. *PLoS One* **6**, e19711 (2011).
351. **Bjarnason, J., Southward, C.M. & Surette, M.G.** Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol* **185**, 4973-82 (2003).
352. **Saini, S., Ellermeier, J.R., Slauch, J.M. & Rao, C.V.** The role of coupled positive feedback in the expression of the SPI1 type three secretion system in *Salmonella*. *PLoS Pathog* **6**, e1001025 (2010).
353. **Wood, M.W. et al.** Structural analysis of *Salmonella enterica* effector protein SopD. *Biochim Biophys Acta* **1698**, 219-26 (2004).
354. **Darwin, K.H. & Miller, V.L.** Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J* **20**, 1850-62 (2001).
355. **Hong, K.H. & Miller, V.L.** Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella ipgDE*. *J Bacteriol* **180**, 1793-802 (1998).
356. **Darwin, K.H. & Miller, V.L.** The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella typhimurium* virulence genes. *Mol Microbiol* **35**, 949-60 (2000).
357. **Norris, F.A., Wilson, M.P., Wallis, T.S., Galyov, E.E. & Majerus, P.W.** SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14057-9 (1998).
358. **Miold, S. et al.** *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and *sopE2*. *J Bacteriol* **183**, 2348-58 (2001).
359. **Zhou, D., Chen, L.M., Hernandez, L., Shears, S.B. & Galan, J.E.** A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol* **39**, 248-59 (2001).
360. **Knodler, L.A. et al.** *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol Microbiol* **43**, 1089-103 (2002).
361. **Gerlach, R.G., Jackel, D., Geymeier, N. & Hensel, M.** *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **75**, 4697-709 (2007).
362. **Morgan, E. et al.** Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **54**, 994-1010 (2004).
363. **Thijs, I.M. et al.** Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *HilA* regulon through genome-wide location and transcript analysis. *J Bacteriol* **189**, 4587-96 (2007).

364. **Main-Hester, K.L., Colpitts, K.M., Thomas, G.A., Fang, F.C. & Libby, S.J.** Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **76**, 1024-35 (2008).

VII.

Anexo A: Procedimientos detallados

1. Composición y preparación de medios de cultivo

1.1. Luria-Bertani (LB)

Medio de cultivo utilizado para el crecimiento habitual de cepas de *E. coli* y *S. typhimurium*.

Disolver en 1 L de agua MQ: 10 g de triptona; 5 g de extracto de levadura; y 10 g de NaCl o 5 g en el medio LB para obtener células competentes. Añadir 15 g de agar para obtener LB sólido. Autoclavar durante 15 min. a 121° C.

1.2. Terrific Broth (TB)

Medio utilizado para el crecimiento de las cepas de *E. coli* y *S. typhimurium* transformantes a los que se realizaron extracciones plasmídicas.

Preparar dos mezclas por separado: (i) disolver en 900 ml de agua MQ 12 g de triptona; 24 g de extracto de levadura; y 4 ml de glicerol. (ii) disolver en 100 ml de agua MQ 2,312 g de KH_2PO_4 y 16,432 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Autoclavar por separado durante 15 min a 121° C, dejar enfriar y añadir la solución ii a la primera para obtener un volumen final de 1 L.

1.3. Brain Heart Infusion (BHI)

Medio de cultivo utilizado para la expresión fenotípica de los cultivos de *E. coli* y *S. typhimurium* electrotransformados.

Preparar siguiendo las especificaciones del fabricante (Oxoid).

1.4. Super Optimal Broth (SOB)

Medio utilizado para el crecimiento de células competentes para electrotransformar en el procedimiento de inactivación génica mediante un paso.

Añadir a 1 L de agua MQ: 20 g de triptona; 5 g de extracto de levadura; 0,5 g de NaCl; y 0,5 ml de KCl 2,5 M. Mezclar, ajustar el pH a 7 y autoclavar 15 min a 121°C. Antes de su utilización añadir DL-arabinosa 20 mM estéril.

1.5. SOC

Medio utilizado para la expresión fenotípica de cepas de *S. typhimurium* electrotransformadas en el procedimiento de inactivación génica mediante un paso.

Preparar justo antes de electroporar añadiendo al medio SOB DL-arabinosa y glucosa a una concentración de 20 mM cada una.

1.6. Placas verdes

Medio utilizado para la selección de cepas transductantes no lisogénicas.

Disolver en 966 ml de agua: 8 g de triptona, 1 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 15 g de agar, 833 mg de amarillo de alizarina y 132 mg de azul de anilina. Autoclavar 15 min a 121° C y añadir 34 ml de glucosa al 40 % estéril.

2. Miniextracción de DNA plasmídico con LiCl

- i. La noche anterior preparar un cultivo de la cepa o clon seleccionado en 3 ml de TB con los antibióticos adecuados
- ii. Centrifugar los 3 ml de cultivo en fase exponencial 1 min a 12.000 g en una microcentrífuga y eliminar el sobrenadante por aspiración
- iii. Añadir 100 µl de **solución I** y resuspender con ayuda de un vórtex
- iv. Añadir 200 µl de **solución II** y mezclar por inversión. Dejar en hielo 5 min
- v. Añadir 150 µl de **solución II** y mezclar por inversión. Dejar en hielo 15 min
- vi. Centrifugar 10 min. a 12,000 g y recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo
- vii. Añadir 1 volumen de **isopropanol** (450 µl) y mezclar por inversión. Dejar 5 min a temperatura ambiente
- viii. Centrifugar 5 min. a 12.000 g y aspirar el sobrenadante
- ix. Resuspender el pellet en 200 µl de **TE** y 2 µl de **RNasa** (25 mg/ml). Incubar 20 min mínimo a 37° C
- x. Añadir 400 µl de **LiCl** 5 M y 500 µl de **cloroformo**
- xi. Centrifugar 10 min a 12.000 g y recuperar la fase acuosa (la de arriba) en un tubo nuevo
- xii. Añadir 1 ml de **etanol** absoluto frío y agitar por inversión. Precipitar el DNA durante un mínimo de 30 min a -80° C
- xiii. Centrifugar 10 min a 12.000 g y aspirar el sobrenadante

- xiv. Añadir 500 µl de **etanol 70%** frío
- xv. Centrifugar 5 min. a 12.000 g y eliminar completamente el etanol
- xvi. Secar el pellet en un *speed-vac*
- xvii. Resuspender en 40 µl de agua **MQ** o **TE**
- xviii. Visualizar la extracción en un gel de agarosa al 0,7 % y conservar a -20 °C

Soluciones utilizadas

Solución I

Se prepara un stock 2X autoclavado:

50 mM Tris HCl (pH 8)

20 mM EDTA (pH 8)

La solución de trabajo es 1X y se conserva a 4 °C

Solución II

Se prepara al momento y se conserva durante 2 semanas como máximo

5 ml SDS 10%

1 ml NaOH 10 N

44 ml MQ

Solución III

Se prepara directamente la solución de trabajo

600 ml acetato potásico 5M

115 ml de ácido acético glacial

Ajustar el pH a 4,8 con HCl y ajustar el volumen a 1 L con MQ

TE

Autoclavar una vez preparado

10 mM Tris-HCl

0.1 mM EDTA

Cloruro de Litio

Preparar una solución 5 M de LiCl en agua y autoclavar

3. Maxiextracción de DNA plasmídico

- i. Hacer un cultivo *overday* de 10 ml de medio TB con los antibióticos correspondientes por la mañana, por la tarde hacer un cultivo overnight en 100 ml de medio TB (dilución 1:10)
- ii. Repartir el cultivo en dos tubos de polipropileno de 80 ml.
- iii. Centrifugar durante 10 min. a 8.300 g a 4º C.
- iv. Eliminar el sobrenadante por decantación y resuspender el pellet en 4 ml de **solución I** (2ml a cada tubo). Una vez resuspendido con ayuda del vórtex juntar en un único tubo.
- v. Añadir 8ml de **solución II** y agitar por inversión hasta a observar la formación de un moco. Dejar el tubo 5 min en hielo.
- vi. Añadir 6 ml de **solución III**, agitar por inversión y dejar 10 min en hielo.
- vii. Centrifugar 10 min a 8.300 g a 4º C.
- viii. Recuperar el sobrenadante (intentando no coger precipitados blancos) y pasarlo en un tubo corex de 30 ml.
- ix. Añadir 0,6 volúmenes de **Isopropanol absoluto** (10,8 ml aproximadamente) y tapar con *Parafilm*® para mezclar por inversión. Dejar 15 min a temperatura ambiente.
- x. Centrifugar 10 min a 9.000 g a 20º C
- xi. Decantar el sobrenadante y dejar a temperatura ambiente unos 30 min o hasta que se evapore el isopropanol.
- xii. Añadir 1 ml de MQ y 10 µl de **RNasa** concentrada (25 mg/ml) e incubar en un baño a 37º C durante 30 min o hasta que se resuspenda el DNA
- xiii. Repartir en tubos eppendorf 500 µl de la solución y añadir 1 ml de **Tierra de Diatomeas**. Agitar por inversión y dejar 5 min. a temperatura ambiente.
- xiv. Montar en una gradilla tubos de 5ml con las columnas Wizard® y jeringas de 5 ml. Pasar como a máximo 3 ml por columna. Cambiar el tubo de plástico.
- xv. Pasar por la columna 3ml de **etanol 70%**. Colocar la columna en un tubo eppendorf.
- xvi. Centrifugar 5 min a 9.700 g. Colocar la columna en un eppendorf nuevo.
- xvii. Poner 50 µl de **MQ** previamente atemperada a 50º C en el centro de la columna. Esperar 5 min y centrifugar 5 min más a 9.700 g. Repetir este paso para tener un volumen final de 100 µl.
- xviii. Visualizar la extracción en un gel de agarosa al 0,7 % y conservar a -20º C.

Soluciones utilizadas

Soluciones I, II y III: las mismas que las utilizadas en el protocolo de la miniextracción plasmídica.

Tierra de Diatomeas

Autoclavar previamente el material: botella de 500 ml, erlenmeyer de 250 ml y probeta de 250 ml.

- i. Poner 3,5 g de Tierra de Diatomeas en el erlenmeyer de 250 ml (utilizando guantes y máscara).
- ii. Añadir 50 ml de MQ estéril. Dejar 3 h mínimo para separar el sobrenadante.
- iii. Preparar la solución GM-TE: 100 g Guanidine hidrocloreto, 14 ml EDTA 0,5 M, 8,75 ml Tris-HCl 1M pH 7.5, 50 ml MQ. Disolver hasta que quede transparente. Enrasar con la probeta hasta 175 ml con MQ.
- iv. Eliminar el sobrenadante de la Tierra de Diatomeas.
- v. Tapar la botella con papel de plata. Añadir la solución de Guanidina y mezclar.

4. Preparación de células competentes con CaCl_2

El día anterior preparar: 100 ml de LB para competentes temperado a 37° C, 100 ml CaCl_2 (100mM) frío y un cultivo O/N de la cepa adecuada con los antibióticos correspondientes.

- i. Resembrar 1/100 en 100 ml de medio de cultivo a partir del O/N
- ii. Incubar a 37° C en agitación hasta llegar a una DO_{550} de 0,4-0,6, que correspondería a la mitad de la fase exponencial del ciclo de crecimiento de las células (aproximadamente 10^8 cél./ml)
- iii. Equilibrar 2 tubos de polipropileno estériles con el cultivo.
- iv. Centrifugar el cultivo a 8.300 g 10 min a 4° C.
- v. Eliminar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 25 ml de CaCl_2 100 mM frío (sin vórtex). Juntar los dos pellets en un tubo (vf= 50 ml).
- vi. Dejar de 15 min. a 1 h en hielo.
- vii. Centrifugar a 8.300 g durante 10 min a 4° C
- viii. Eliminar el sobrenadante. Resuspender suavemente el pellet en 5 ml de CaCl_2 100 mM frío.

- ix. Dejar el tubo en hielo durante 1 h para permitir que las células entren en estado de competencia (protoplastos)
- x. Añadir glicerol para obtener una solución al 20 % (1ml de glicerol al 100%)
- xi. Hacer alícuotas de 100 μ l y conservarlas a -80° C hasta el momento de su uso.
- xii. Con uno de los viales, hacer un recuento de viables y un control de resistencia a los antibióticos correspondientes.

5. Preparación de células electrocompetentes

El día anterior preparar: 1 L de LB para competentes atemperado a 37° C, agua MQ estéril fría, glicerol al 10 % frío y un cultivo O/N de la cepa adecuada con antibióticos si es necesario.

- i. Resembrar 1/100 en 1 L de medio de cultivo a partir del O/N
- ii. Incubar a 37° C en agitación hasta llegar a una DO_{550} de 0,4 o 0,6 dependiendo si son células *recA+* o *recA-*, respectivamente
- iii. Equilibrar 6 tubos de polipropileno estériles con el cultivo
- iv. Dejar el cultivo en hielo durante un mínimo de 15 min
- v. Centrifugar el cultivo a 8.300 g durante 10 min a 4° C. Eliminar el sobrenadante
- vi. Añadir el resto de cultivo a los tubos y repetir el paso v
- vii. Añadir MQ estéril fría y disolver el pellet con la ayuda de un vórtex
- viii. Centrifugar a 8.300 g durante 10 min a 4° C y eliminar el sobrenadante
- ix. Repetir los pasos vii y viii
- x. Añadir 20 ml de glicerol 10 % y agrupar todos los pellets en 2 tubos
- xi. Centrifugar a 8.300 g durante 10 min a 4° C. Eliminar el sobrenadante
- xii. Añadir 0,5 ml de glicerol 10 % a cada tubo y disolver el pellet con la pipeta. Juntar en un tubo
- xiii. Hacer alícuotas de 45 μ l y conservarlas a -80° C hasta su uso
- xiv. Con un vial hacer un recuento de viables y un control de resistencia a los antibióticos correspondientes

6.Transformación de células competentes por choque térmico

- i. Descongelar en hielo la alícuota de células competentes y mantener en hielo durante todo el proceso
- ii. Añadir el DNA plasmídico a transformar al tubo con las células competentes (mínimo 10-40 ng de DNA en un volumen máximo de 10 μ l)
- iii. OPCIONAL: para permitir un mejor intercambio de calor, trasvasar la mezcla a un tubo de cristal
- iv. Dejar el tubo en hielo un mínimo de 15-30 min
- v. Hacer el choque térmico durante 90 s a 42° C
- vi. Incubar en hielo durante 2 min
- vii. Añadir 1 ml de LB al tubo i mantener en hielo durante 2 min más
- viii. Incubar el tubo a 37° C en agitación durante 45 min, para permitir la expresión fenotípica de la resistencia antibiótica
- ix. Sembrar en placas con los antibióticos adecuados (típicamente 100 y 300 μ l de la suspensión)
- x. Incubar las placas O/N a la temperatura adecuada

7.Transformación de células electrocompetentes

- i. Descongelar en hielo la alícuota de células electrocompetentes y mantener en hielo durante todo el proceso
- ii. Añadir el DNA plasmídico a transformar en el tubo con las células electrocompetentes
- iii. Pasar todo el volumen dentro de la cubeta de electroporación (2 mm *electrode gap* de Biolabs), en el espacio que queda entre los dos electrodos, vigilando que no queden burbujas
- iv. Preparar el electroporador (*MicroPulser*TM de Biorad) ajustando el pulso eléctrico a 2.0 o 2.5 kV/cm² para las células de *E. coli* o *S. Typhimurium*, respectivamente

- v. Colocar la cubeta con la muestra en el electroporador y dar la descarga eléctrica
- vi. Rápidamente recoger el contenido de la cubeta con 1 ml de BHI frío y pasarlo en un tubo nuevo
- vii. Incubar los tubos durante 45 min. a 37° C como tiempo de expresión fenotípica de la resistencia
- viii. Sembrar el cultivo en placas para permitir la selección de las células que hayan incorporado el plásmido transformado
- ix. Incubar las placas O/N a la temperatura adecuada

8. Obtención de mutantes de *S. Typhimurium* mediante el método de inactivación génica en un paso

Método basado en el protocolo descrito por Datsenko *et al.*

8.1. Obtención del fragmento de DNA a transformar

- i. Diseñar los oligonucleótidos apropiados de 100 pb que contengan: 80 pb flanqueantes a la región que se desee substituir y las secuencias P1 (5'- GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC -3') y P2 (5'- CATATGAATATCCTCCTTAGT -3'), ambas flanqueando la resistencia a Kan del plásmido pKD4
- ii. Realizar una PCR con los oligonucleótidos apropiados utilizando como molde el plásmido pKD4 en un volumen final de 200 µl, siguiendo los protocolos estándar del laboratorio. La temperatura de hibridación es de 56° C y el tiempo de extensión de 1 min 30 s
- iii. Cargar la PCR en un gel de agarosa al 0,7 % y verificar que el fragmento obtenido tiene el tamaño correcto (1,6 kb)
- iv. Recortar la banda de DNA y purificar utilizando el kit *illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), siguiendo las especificaciones del fabricante. Al final eluir con un volumen de 90 µl de MQ

- v. Para eliminar los restos de DNA molde digerir el producto de PCR purificado con el enzima de restricción *DpnI* (en un volumen final de 100 μ l añadir 3 μ l de enzima)
- vi. Incubar a 37° C ON
- vii. Purificar la digestión utilizando el kit *illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), siguiendo las especificaciones del fabricante
- viii. Dializar el producto obtenido durante 20 min con un filtro de diálisis de 0,05 μ m de diámetro de poro (Millipore)

8.2. Obtención de células electrocompetentes

Para permitir la recombinación, las células competentes deben presentar el plásmido termosensible pKOBEGA, que contiene la recombinasa Red del fago λ bajo el control de un promotor *araB* inducible por arabinosa.

- i. Preparar un cultivo O/N en LB con Amp de la cepa con el pKOBEGA e incubar a 30° C
- ii. Hacer una resiembra 1/100 del cultivo O/N en 50 ml de medio SOB con Amp y DL-arabinosa 20 mM
- iii. Incubar a 30° C hasta una DO_{600} de 0,5 (aproximadamente 3 h)
- iv. Centrifugar las células 4.600 g durante 15 min a 4° C. Eliminar el sobrenadante
- v. Resuspender el pellet en 20 ml de glicerol 10% frío
- vi. Repetir el paso iv
- vii. Resuspender el pellet en 10 ml de glicerol 10% frío
- viii. Repetir el paso iv
- ix. Resuspender el pellet en 5 ml de glicerol 10% frío
- x. Repetir el paso iv
- xi. Eliminar completamente el sobrenadante
- xii. Resuspender en 300 μ l de glicerol 10% frío
- xiii. Preparar alícuotas de 100 μ l
- xiv. Utilizar las competentes el mismo día para incrementar la eficiencia. Mantener en hielo hasta el momento de usarlas

8.3. Electroporación

- i. Añadir a la alícuota de células competentes 10 μ l (1-2 μ g) del producto de PCR purificado y mezclar suavemente
- ii. Dejar en hielo de 10 a 15 min
- iii. Transformar con el electroporador ajustando las condiciones a: 25 μ F, 200 ohmios, 2.5 kv
- iv. Recuperar las células de la cubeta con 1 ml de medio SOC frío
- v. Incubar durante 1 h 30 min a 37° C
- vi. Sembrar la mitad de la transformación en placas con medio selectivo. Reservar la otra mitad del cultivo a temperatura ambiente
- vii. Incubar las placas O/N a 37° C
- viii. En el caso de no obtener transformantes se siembra el resto de cultivo (paso vi).
- ix. Comprobar los clones transformantes mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos externos a la construcción y los K1 y K2 internos a la cassette de Kan del plásmido pKD4

8.4. Eliminación del plásmido pKOBEGA

- i. Incubar los clones transformantes en medio LB con el antibiótico adecuado (Kan) a 43° C O/N
- ii. Resembrar el cultivo 1/100 en medio LB e incubar *overday* a 43° C
- iii. Sembrar diluciones del cultivo (típicamente 10^{-5} y 10^{-6}) en placas LB Kan e incubar a 43° C
- iv. Hacer réplicas de los clones aislados en LB Kan y LB Amp e incubar O/N a 30° C
- v. Seleccionar aquellos clones que ya no crecen en Amp

8.5. Eliminación de la resistencia a antibiótico

- i. Preparar células competentes de la cepa resistente a Kan (protocolo 4)
- ii. Introducir el plásmido pCP20 en la cepa por electroporación (protocolo 6)
- iii. Sembrar las células transformadas en placas selectivas para los antibióticos e incubarlas a 30° C

- a. Para eliminar la cassette de resistencia, preparar un cultivo O/N de la cepa que contiene el pCP20 en medio sin antibiótico e incubar a 43° C
- iv. Resembrar el cultivo 1/100 en medio LB e incubar *overday* a 43° C
- v. Sembrar las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} del cultivo en placas sin antibiótico e incubar O/N a 43° C
- vi. Hacer réplicas de los clones aislados en placas LB, LB Amp y LB Kan. Incubar las placas a 30° C
- vii. Seleccionar aquellos clones que solo crezcan en las placas LB sin antibiótico
- viii. Comprobar por PCR con los oligonucleótidos externos a la construcción que se ha eliminado la cassette de resistencia

9. Transducción generalizada con el fago P22_{int7} HT

9.1. Obtención del lisado

- i. Hacer un O/N de la cepa donadora (la que contiene el gen mutante) con el antibiótico adecuado
- ii. Resembrar 1/50 en 10 ml de LB con el antibiótico adecuado
- iii. Incubar a 37° C en agitación hasta una DO_{550} 0,4 - 0,5 (aproximadamente $2 \cdot 10^8$ cfu/ml)
- iv. Añadir el fago P22 *int7* HT para obtener una MOI de 5-10 (10^9 fagos aproximadamente)
- v. Incubar 20 min a 37° C sin agitación
- vi. Incubar de 4 a 5 h a 37° C en agitación
- vii. Centrifugar el cultivo 10 min a 9.000 g
- viii. Recuperar el sobrenadante y filtrar utilizando un filtro estéril con un diámetro de poro de 45 μ m
- ix. Titular el lisado y añadir cloroformo (5-10% del volumen)

9.2. Aumento del título de un lisado

En el caso de obtener un lisado con un título inferior a 10^8 pfu/ml, se necesitó realizar un aumento del título siguiendo el protocolo:

- i. Preparar un cultivo de la cepa donadora a una DO_{550} de 0,4 – 0,5
- ii. Mezclar 100 μ l de la cepa y 100 μ l de una dilución tal del lisado fágico que permita obtener de 1.000 a 10.000 calvas por placa
- iii. Sembrar la mezcla en doble capa de agar e incubar a 37° C O/N. Sembrar varias placas
- iv. Añadir 2 – 3 ml de $MgSO_4$ 10 mM a las placas y dejar en agitación moderada a 4° C durante un mínimo de 4 h
- v. Recoger el $MgSO_4$ de las placas y la capa de agar con las células
- vi. Seguir los pasos vii-ix del apartado anterior

9.3. Infección de la cepa receptora

- i. Hacer un cultivo O/N de la cepa receptora
- ii. Resembrar (1/50) en 10 ml de medio LB y dejar crecer hasta una DO_{550} de 0,4 – 0,5 ($2 \cdot 10^8$ cfu/ml)
- iii. Preparar cuatro tubos:
 - a. MOI 1: 500 μ l cultivo celular + 500 μ l lisado fágico ($2 \cdot 10^8$ pfu/ml)
 - b. MOI 10: 500 μ l cultivo + 500 μ l lisado fágico ($2 \cdot 10^9$ pfu/ml)
 - c. Control cepa: 500 μ l LB + 500 μ l cultivo
 - d. Control fago: 500 μ l LB + 500 μ l lisado fágico ($2 \cdot 10^9$ pfu/ml)
- iv. Incubar los tubos 25 min a 37° C sin agitación
- v. Incubar los tubos 3 h a 37° C en agitación
- vi. Sembrar en placas selectivas 0,3 ml y 0,5 ml
- vii. Incubar 24 – 48 h
- viii. Comprobar por PCR los clones transductantes

9.4. Selección de células no lisógenas

Los transductantes que nos interesan son aquellos que han introducido la mutación pero que no son lisógenos por el fago P22 *int7* HT. Para seleccionarlos haremos varios pases en placas verdes, seleccionando aquellos clones con coloración verde claro.

10. Microarrays de DNA

10.1. Preparación de la muestra

Para los ensayos realizados se escogió el final de la fase de crecimiento exponencial como momento óptimo para los posteriores estudios de expresión. El cultivo se preparó siguiendo el siguiente procedimiento:

- i. Partir de un cultivo O/N en placa de LB, con los suplementos antibióticos requeridos en cada caso
- ii. Preparar una suspensión de la placa en 1 ml de LB
- iii. Añadir a una botella con 15 ml de LB una cantidad de suspensión tal para tener una DO_{550} de entre 0,04 y 0,06
- iv. Incubar el cultivo en agitación a 37° C hasta que llegue a una DO_{550} de entre 0,9 y 1
- v. Dividir cada cultivo en 2 tubos para centrífuga con 5 ml cada uno
- vi. Centrifugar el cultivo a 8.300 g durante 10 min a 4° C
- vii. Descartar el sobrenadante por decantación. Dejar los pellets en hielo hasta el momento de su procesado

En el caso de los cultivos tratados con quelante se añadió el suplemento de EDTA a una concentración final de 1,5 mM a la botella con los 15 ml de LB y se dejó 30 min en agitación a 37° C antes de añadir las células.

10.2. Extracción de RNA

Para evitar la degradación del RNA, todo el material utilizado fue libre de RNasas. Las soluciones preparadas se trataron con DEPC (dietil pirocarbonato) siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma). El material de vidrio se trató a 180° C durante un mínimo de 3 h y todo el material fungible utilizado estaba libre de RNasas.

Se procedió a la extracción del RNA total de cada pellet de 5 ml utilizando el kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega):

- i. Resuspender cada pellet en 100 μ l de **Buffer TE** RNasa-free (Sigma) con 50 mg/ml de **lisozima** (Sigma)
- ii. Incubar **10 min** a temperatura ambiente
- iii. Añadir 75 μ l de **reactivo de lisis**. Mezclar suavemente por inversión

- iv. Añadir 350 µl de la solución **RNA dilution**. Mezclar suavemente por inversión
- v. Calentar a **70° C** durante 3 min
- vi. Centrifugar **10 min** a máxima velocidad. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
- vii. Añadir 200 µl de **etanol 95%** y mezclar con la pipeta
- viii. Transferir todo el volumen a una **Spin Column Assembly** y centrifugar **1 min** a 12.000 g. Descartar el eluido
- ix. Añadir 600 µl de **Wash Solution**. Centrifugar **1 min** a 12.000 g. Descartar el eluido
- x. Añadir 50 µl de **DNasa mix** (preparada previamente: 40 µl de **Yellow Core Buffer**, 5 µl de MnCl₂ y 5 µl de DNasal) free directamente a la membrana de la columna
- xi. Incubar **15 min** a temperatura ambiente
- xii. Añadir 200 µl de **DNasa Stop Solution** y centrifugar **1 min** a 12.000 g. Descartar el eluido
- xiii. Añadir 600 µl de **Wash Solution** y centrifugar **1 min** a 12.000 g. Descartar el eluido
- xiv. Añadir 250 µl de **Wash Solution** y centrifugar **2 min** a 12.000 g
- xv. Transferir la columna en tubos eppendorf, añadir 100 µl de **Nucleasa-free Water** a la membrana y esperar **1 min**
- xvi. Centrifugar **2 min** a 12.000 g
- xvii. Cuantificar las muestras mediante el espectofotómetro *GeneQuant* y las cargar en un **gel de RNA** para comprobar el estado del RNA

10.3. Eliminación del DNA

Para eliminar cualquier resto de DNA presente en la extracción de RNA se procedió al tratamiento con DNasa con el kit *Turbo DNA-freeTM* (Ambion). Para cada extracción de RNA (90 µl aproximadamente):

- i. Añadir 10 µl de *10X Reaction Buffer* y 4 µl del enzima *TURBO DNaseTM*
- ii. Incubar a 37° C durante 30-45 min
- iii. Añadir de nuevo 3 µl de enzima e incubar 30 min más
- iv. Para inactivar la reacción añadir 10 µl de *DNase Inactivation Reagent* y dejar a temperatura ambiente 2 min, resuspender el contenido de vez en cuando
- v. Centrifugar 2 min a máximas revoluciones

- vi. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo sin llevarse el precipitado blanco que forma el inhibidor
- vii. Repetir los pasos v y vi dos veces más para asegurarse de que no queda nada de inhibidor ya que podría interferir en los pasos posteriores
- viii. Cuantificar de nuevo las muestras con el *GeneQuant*, cargarlas en un gel de agarosa y hacer una PCR para comprobar que no hay DNA cromosómico en las extracciones

10.4. Purificación y concentración del RNA

Para eliminar cualquier resto de inhibidor de la DNasa que haya podido quedar, y concentrar las muestras de RNA se utilizó el protocolo de *Clean-up* del kit *RNeasy Mini Kit* (Quiagen):

- i. Juntar las dos extracciones de RNA que provienen de la misma muestra (**200 µl**)
- ii. Añadir **350 µl** de **Buffer RLT**, mezclar suavemente con la micropipeta
- iii. Añadir **250 µl** de **Etanol absoluto** frío. Mezclar suavemente con la micropipeta
- iv. Transferir toda la mezcla (800 µl) en una columna montada sobre un tubo de elución
- v. Centrifugar **15 s** a 8.000 g. Descartar el eluido
- vi. Añadir **500 µl** de **Buffer RPE**
- vii. Centrifugar **15 s** a 8000 g. Descartar el eluido
- viii. Añadir **500 µl** más de **RPE**
- ix. Centrifugar **2 min** a 8000 g. Descartar el eluido
- x. Opcionalmente se puede centrifugar **1 min** más para asegurar que no queda RPE
- xi. Transferir la columna a un tubo eppendorf nuevo
- xii. Eluir la columna añadiendo la cantidad de **MQ RNasa-free** para obtener 1,5 – 2 µg/µl de RNA
- xiii. Cuantificar el RNA, cargarlo en un gel de agarosa y hacer una PCR para comprobar que no hay DNA
- xiv. Preparar una alícuota (unos 2 µl) que esté a 300 – 500 ng/µl para comprobar el estado del RNA con el **Bioanalyzer**
- xv. Conservar el RNA a **-80º C**

10.5. Obtención del cDNA

10.5.1. Retrotranscripción

Se procedió a la obtención de cDNA a partir del RNA total mediante una retrotranscripción utilizando el kit *SuperScriptTM III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Se llevaron a cabo 3 reacciones para cada muestra de RNA:

- i. Combinar en un tubo: 15 µg RNA; 150 ng de *Random Primers* (Invitrogen); 3 µl de *10mM dNTP mix* (Invitrogen); agua RNasa-free hasta un volumen final de 22 µl
- ii. Incubar la mezcla en un termociclador a 65° C durante 5 min y mantener a 4° C
- iii. Añadir a la mezcla anterior: 7 µl de *5X First-Strand Buffer*; 3.5 µl de DTT 0,1M; 200 U de *SuperScript III RT*; 40 U de *RNaseOUT* (Invitrogen); y 0.5 µl de agua RNasa-free
- iv. Mezclar e incubar en el termociclador: 10 min a 25° C, 50 min a 50° C y 5 min a 85° C. Conservar a 4° C
- v. Añadir 3 U de *RNase-H* (Epicentre)
- vi. Incubar a 37° C 10 min

10.5.2. Purificación del cDNA

Tenemos 3 reacciones de retrotranscripción que provienen de un mismo RNA. En el siguiente paso el cDNA se purifica y se concentra juntando las 3 reacciones en una columna de purificación del kit *QIAquick PCR Purification* (Quiagen):

- i. Añadir 5 volúmenes (**176,5 µl**) de **Buffer PB** a cada una de las 3 reacciones
- ii. Montar las columnas dentro de los tubos recolectores
- iii. Recoger las 3 reacciones en una sola columna y centrifugar **1 min** a 9.700 g
- iv. Descartar el eluido
- v. Añadir **750 µl** de **Buffer PE** y centrifugar **1 min** a 9.700 g
- vi. Descartar el eluido. Volver a centrifugar **1 min** a 9.700 g
- vii. Poner la columna en un tubo eppendorf nuevo
- viii. Eluir el cDNA añadiendo **50µl** de **H₂O RNase-free** a la membrana de la columna. Dejar reposar **1 min** y centrifugar **1 min** a 9.700 g
- ix. Cuantificar el cDNA con el *GeneQuant* y conservar a -80° C hasta el momento de su uso

10.5.3. Obtención del DNA genómico

10.5.3.1. Extracción de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico de la cepa SV5015 de *S. Typhimurium* se utilizó el kit *Genomic DNA* (Quiagen) (*Genomic DNA buffer set* y las columnas de purificación *Genomic-tip 100/G*):

- i. Partir de un cultivo de 6 ml en fase exponencial
- ii. Centrifugar durante 10 min a 9.000 g a 4° C. Descartar el sobrenadante
- iii. Para cada extracción preparamos las siguientes soluciones:
 - a. Buffer B1+RNasa: Añadir 35 µl de solución **RNAsa A** (20 mg/ml) a 3,5 ml de Buffer B1. Quedando a una concentración final de 200 µg/ml
 - b. Stock de lisozima: disolver la **lisozima** a una concentración final de 100 mg/ml
 - c. Stock de proteinasa K: Preparar una solución de **proteinasa K** a concentración de 20 mg/ml
- iv. Resuspender el pellet en 3,5 ml de Buffer B1+RNAsa vorteadando a máxima potencia. Es importante obtener una solución homogénea para incrementar la eficiencia de lisis de las bacterias
- v. Añadir 80 µl de stock de lisozima y 45 µl de stock de proteinasa K
- vi. Incubar a 37° C durante 30 min
- vii. Añadir 1,2 ml de Buffer B2 y mezclar por inversión varias veces. Incubar a 50° C durante 30 min
- viii. Centrifugar la muestra durante 10 min a 9.000 g a 4° C
- ix. Mientras se centrifuga la muestra, equilibrar una columna de QUIAGEN *Genomic-tip 100/G* con 4 ml de Buffer QBT
- x. Colocar la columna sobre un tubo, añadir los 4 ml de Buffer QBT y permitir que éstos pasen a través de la columna por gravedad
- xi. Recuperar el sobrenadante de la muestra del paso viii y vortear durante 10 s
- xii. Añadir el sobrenadante a la columna equilibrada y permitir que vaya pasando por gravedad
- xiii. Lavar la columna con 7,5 ml de Buffer QC
- xiv. Repetir el paso xiii

- xv. Eluir el DNA en 5 ml de Buffer QF atemperado a 50° C, recogiendo el eluido en un tubo
- xvi. Añadir 3,5 ml (0,7 volúmenes) de isopropanol a temperatura ambiente
- xvii. Agitar por inversión el tubo de entre 10-20 veces
- xviii. Centrifugar inmediatamente a 12.000 g durante 15 min a 4° C
- xix. Eliminar el sobrenadante y limpiar el pellet con 2 ml de etanol 70% frío. Vortear brevemente i centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos a 4° C
- xx. Eliminar el sobrenadante y secar al aire durante 5-10 min
- xxi. Resuspender con 200 µl de MQ
- xxii. Incubar a 55° C durante 1-2h
- xxiii. Determinar la concentración en el *GeneQuant*, cargar en un gel de agarosa al 0,4 % y conservar a -80° C hasta el momento de su uso

10.5.3.2. Fragmentación del DNA genómico

Juntamos 3 extracciones de DNA, obteniendo un volumen final de 600 µl. El DNA se fragmenta por sonicación durante 1' a 50 W en ciclos de 0,3 s, utilizando un homogenizador ultrasónico Braun Labsonic U (B.Biotech) con una sonda pequeña de titanio (40 T).

La fragmentación se chequea cargando la muestra en un gel de agarosa al 1%

10.5.4. Marcaje de las muestras de cDNA y gDNA

Para marcar las muestras de cDNA y gDNA se utiliza el kit *BioPrime® Plus Array CGH Indirect Genomic Labeling System* (Invitrogen). Este sistema utiliza un mutante del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (exo-Klenow), aminohexilacrilamido-dUTPs (aha-dUTP), y fluoróforos Alexa Fluor® (Alexa Fluor® 555 succinimidil éster y Alexa Fluor® 647 succinimidil éster) para marcar las muestras de DNA diferencialmente.

10.5.4.1. Amplificación y marcaje del cDNA y el gDNA

El primer paso permite la hibridación del DNA con los random primers, seguido de una extensión mediante una reacción de polimerización usando el enzima exo-klenow. Así se obtiene una amplificación de 7 a 10 veces el material de partida. Para cada reacción:

- i. Añadir: 20 μ l *2,5X Random Primer Solution*; 4 μ g cDNA o gDNA; hasta 44 μ l de agua RNA-free
- ii. Incubar a 95° C durante 5 min y enfriar en hielo 5 min más
- iii. Añadir a cada tubo: 5 μ l de *10X NucleotideMix aha-dUTP*; 1 μ l de *Exo-Klenow Fragment* (volumen final de 50 μ l)
- iv. Mezclar e incubar 1h 30 min a 37° C
- v. Añadir 1 μ l más de *Exo-Klenow Fragment* y repetir el paso iv
- vi. Añadir 5 μ l de *Stop Buffer* al tubo y mantener en hielo

10.5.4.2. Purificación del DNA marcado

Se purifica el DNA amino-modificado utilizando columnas de centrífuga del *BioPrime® Plus Purification Module with PureLink* para eliminar los nucleótidos que no han sido incorporados, siguiendo las instrucciones del fabricante:

- i. Añadir 200 μ l de *Binding Buffer B2* a cada tubo y mezclar con la micropipeta
- ii. Pasar la mezcla a una *PureLink™ Spin Column*
- iii. Centrifugar 1 min a 7.000 g y descartar el eluido del tubo colector
- iv. Añadir 650 μ l de *Wash Buffer W1*
- v. Repetir el paso iii
- vi. Centrifugar 2 min adicionales para eliminar restos de *Wash Buffer* y colocar la columna en un tubo eppendorf nuevo
- vii. Añadir 50 μ l de MQ RNasa-free e incubar 1 min
- viii. Centrifugar 2 min a máxima velocidad
- ix. Repetir los pasos vii y viii

10.5.4.3. Marcaje con los fluoróforos

Para precipitar el DNA con etanol:

- i. Añadir a los 100 μ l de la muestra purificada: 3 μ l de acetato sódico 3 M; 2 μ l de glicógeno y 300 μ l de etanol
- ii. Incubar toda la noche a -20° C
- iii. Centrifugar a 4° C a máxima velocidad durante 20 min y eliminar el sobrenadante
- iv. Lavar con 250 μ l de etanol al 70 %
- v. Centrifugar 2 min a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante
- vi. Dejar secar el pellet 10 min

El siguiente procedimiento es para marcar el DNA con los fluoróforos *Alexa Fluor*[®] *reactive Dye* correspondientes: el 555 (rojo) para marcar el cDNA y el 647 (verde) para marcar el gDNA:

- vii. Añadir 5 µl de *2X Copling Buffer*. Es importante proteger los tubos de la luz a partir de este momento
- viii. Añadir 3 µl de DMSO
- ix. Añadir 2 µl de DMSO al vial de *Alexa Fluor*[®] *reactive Dye* para resuspender el fluoróforo y pasar todo el contenido al tubo del paso vii
- x. Incubar el tubo a temperatura ambiente durante 4 h mínimo

10.5.4.4. Purificación del DNA marcado fluorescentemente

Paso de purificación mediante el mismo procedimiento del apartado purificación del DNA marcado, añadiendo primero 40 µl de MQ RNasa-free a cada muestra antes de empezar, hasta el paso viii.

Se cuantifican los marcajes con el espectrofotómetro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific), en la opción de cuantificación de para obtener la concentración en pmoles/µl.

10.6. Hibridación de los chips de DNA

Antes de empezar con la hibridación se fijan los cristales a 600mJ y se incuban en 100 ml de solución de prehibridación (SCC 6X; 0.5% SDS; 1% BSA) 1h a 42° C.

10.6.1. Hibridación

- i. Mezclar el marcaje de gDNA y cDNA en una proporción 1:3
- ii. Secar la mezcla en el *Speed-vac*
- iii. Añadir de 70 a 100 µl de solución de hibridación (50% formamida; SSC 3X; 10% SDS; Denhardt's 5X; 5% Dextranulfato)
- iv. Desnaturalizar 5 min a 95° C y mantener en hielo
- v. Aplicar la muestra encima del cristal
- vi. Incubar a 42° C en la oscuridad O/N

10.6.2. Lavados

Lavar los cristales con 50 ml de cada solución de lavado en agitación (500 rpm) y protegidos de la luz:

- i. Lavar 5 min con solución 1 (SSPE 0.5X; 0.1% Tween20) a 42° C
- ii. Repetir el paso i dos veces más
- iii. Lavar 5 min con solución 2 (SSPE 0.5X)
- iv. Repetir el paso iii dos veces más, para eliminar bien el Tween20
- v. Lavar 5 min con solución 3 (SSPE 0.1X) a 37° C
- vi. Repetir el paso v
- vii. Secar en una centrífuga a 600 rpm. Guardar a temperatura ambiente en la oscuridad hasta el momento de escanear

VIII.

Anexo B: Artículos

RESEARCH ARTICLES

INTERNATIONAL MICROBIOLOGY (2010) 13:33-39
 DOI: 10.2436/20.1501.01.109 ISSN: 1139-6709 www.im.microbios.org

INTERNATIONAL
 MICROBIOLOGY

Control by Fur of the nitrate respiration regulators NarP and NarL in *Salmonella enterica*

Laura Teixidó,¹ Pilar Cortés,¹ Anna Bigas, Gerard Àlvarez, Jordi Barbé,
 Susana Campoy*

Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Biosciences, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain

Received 18 January 2010 · Accepted 27 February 2010

Summary. Anaerobic metabolism is controlled by several transcriptional regulators, including ArcA, Fnr, NarP, and NarL, with the Fnr and ArcA proteins sensitive to the cell's redox status. Specifically, the two-component ArcAB system is activated in response to the oxidation state of membrane-bound quinones, which are the central electron carriers of respiration. Fnr, by contrast, directly senses cellular oxidation status through the [4Fe-4S] cluster present in its own structure. In this study, a third additional redox-associated pathway that controls the nitrate respiration regulators NarL and NarP was identified. The results showed that, in *Salmonella enterica*, the expression of these two transcriptional regulators is under the control of Fur, a metalloregulator that senses the presence of Fe²⁺ and regulates the homeostasis of this cation inside the cell. Thus, the Fur-Fe²⁺ complex increases the expression of *narL* and represses that of *narP*. Furthermore, studies of *S. enterica* mutants defective in the Fur-regulated sRNA RfrA and RfrB showed that those sRNAs control both *narP* and *narL* expression. These results confirm Fur as a global regulator based on its involvement not only in iron uptake and detoxification but also in the control of nitrate/nitrite respiration by sensing cellular redox status. [Int Microbiol 2010; 13(1):33-39]

Keywords: *Salmonella enterica* · ferric uptake regulator · nitrate respiration · sRNA control · iron · anaerobiosis

Introduction

The regulation of electron-transport components is essential for the adaptation of bacteria to environmental conditions [22,44] and is carried out by several global mechanisms. In the absence of oxygen, the ArcA/ArcB system inhibits the expression of genes required for optimal energy production when this element is the final electron acceptor [44]. The Fnr

protein plays a major role in bacterial switching from aerobic to anaerobic growth, acting as a positive regulator of a set of genes involved in anaerobic respiration [40]. Fnr is active in the absence of oxygen, in which case it specifically binds to target-DNA sites, enhancing the expression of genes under its regulation [4,24]. Conversely, the presence of oxygen induces a conformational change in the Fnr regulator such that it loses its specific-DNA binding capacity, prompting a decrease in the expression of genes required for anaerobic growth [4].

In facultative anaerobic bacteria, electron acceptors are often engaged in a specific order or hierarchy [44]. Under anoxic conditions, nitrate is the preferred electron acceptor and its presence results in the repression of other anaerobic pathways [44]. In Enterobacteriaceae, the use of nitrate as well as nitrite is under the control of the two-component regulatory systems NarX/L and NarP/Q [37,41]. NarX and NarQ membrane sensory kinases are activated by the pres-

*Corresponding author: S. Campoy
 Departament de Genètica i Microbiologia
 Facultat de Biosciències
 Universitat Autònoma de Barcelona
 08193 Bellaterra, Spain
 Tel. +34-935811665. Fax +34-935812387
 E-mail: susana.campoy@uab.cat

¹L. Teixidó and P. Cortés are joint first authors in this work.

ence of either nitrate or nitrite and mediate phosphorylation of the cytoplasmic regulators NarL and NarP [37,41]. In the phosphorylated state, these transcriptional regulators control the expression of their target genes [41]. In some cases, the NarL and NarP regulons functionally overlap and the two proteins may have opposing effects [32,44]. For instance, the respiratory nitrite reductase (encoded by the *nrfABCDEF* genes) and periplasmic nitrate reductase (*napFDAGHBC*) are repressed by NarL and activated by NarP [44]. Other genes, such as nitrate reductase-A (*narGHL*) and the cytoplasmic nitrite reductase (*nirBDC*), are positively regulated only by NarL [41,44].

Bacterial nitrate and nitrite respiratory reductases require iron in their reactive center to carry out their biological activity [20]. In many bacterial groups, Fe²⁺ uptake is under the control of Fur (ferric uptake regulator), which normally acts as a negative regulator of several genes involved in this process [21]. In *Escherichia coli*, the *fur* gene product is a 17-kDa protein that has Fe²⁺-dependent DNA-binding activity [3]. Genes under the direct control of Fur require at least three contiguous NAT(A/T)AT-like hexamers in their promoters. This sequence, known as the Fur box, can appear in either the direct or the inverse orientation. When iron is pres-

ent in the medium, the Fur-Fe²⁺ protein complex binds to the Fur box and represses genes under Fur control [17,38]. In addition, the *E. coli* Fur protein controls some genes indirectly, through repression of the RyhB small RNA (sRNA) [27]. Usually, RyhB pairs at the ribosome binding site of its mRNA targets and induces degradation by recruiting the RNA degradosome [28]. Thus, Fur exerts a positive effect on RyhB-controlled genes. However, negative indirect control by Fur via RyhB also has been described [36]. In this case, RyhB binds to the upstream region of the *E. coli shiA* mRNA, thereby disrupting an intrinsic inhibitory structure that sequesters the ribosome-binding site and the first translation codon. The RyhB interaction therefore results in a positive effect on *shiA* translation [36].

Despite the Fe²⁺ requirement of bacterial nitrate and nitrite respiratory reductases, to our knowledge the relationship between the Fur regulator and the synthesis of these enzymes has not been studied. Accordingly, and in the context of the significant role played by respiratory nitrate reductases in *Salmonella enterica* nitric oxide homeostasis [19], we examined expression of the genes *narL* and *narP* in this pathogen under conditions of low Fe²⁺ and in a *S. enterica fur*-defective mutant in the presence or absence of O₂.

Table 1. Strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Relevant features	Source
<i>Salmonella enterica</i> strains		
SV 5015	SL 1344 His ^r	[45]
UA 1779	ATCC 14028 $\Delta fur::cat$; Cam ^r	[7]
UA 1880	As SV 5015 but $\Delta fur::cat$; Cam ^r	This work
UA 1875	SL 1344 carrying the pKOBEGA TS plasmid; Amp ^r	This work
UA 1881	As SV 5015 but $\Delta rfa::kan$; Kan ^r	This work
UA 1882	As SV 5015 but $\Delta rfbB::kan$; Kan ^r	This work
UA 1883	As SV 5015 but $\Delta rfa::kan \Delta rfbB$; Kan ^r	This work
UA 1884	As SV5 015 but $\Delta fur::cat \Delta rfa::kan \Delta rfbB$; Cam ^r Kan ^r	This work
<i>Escherichia coli</i> strains		
DH5 α	<i>supE4 lacU169 (80 lacZSM15) hsdR17 recA1 endA1 gprA96 thi-1 relA1</i>	Clontech
BL21(DE3)pLysE	F ⁺ <i>ompT hsdS₂ (t₁₂m₂) gal dem (DE3) pLysI (Cam^r)</i>	Stratagene
Plasmids		
pET15b	His ₆ tag expression vector; Amp ^r	Novagen
pGEM ⁺ -T	PCR cloning vector; Amp ^r	Promega
pKOBEGA	<i>bla</i> P _{lac} <i>gam</i> <i>bet</i> <i>exo</i> pSC101 oriTS	[8]
pKD4	<i>bla</i> FRT <i>Km</i> FRT PS1 PS2 oriR6K	[12]
pCP20	<i>bla</i> <i>cat</i> <i>c857</i> λ P ₆ fp pSC101 oriTS	[9]

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. *Escherichia coli* and *S. enterica* strains used in this work are listed in Table 1. In all cases, strains were incubated at 37°C. For oxenic conditions, strains were grown in Luria-Bertani broth (LB). For anaerobic growth, media were based on 3-[N-morpholino]propane sulfonic acid (MOPS) medium [33], with several modifications described in Stewart et al. [42], and with the addition of 80 mM glucose and 40 mM NaNO₃ as carbon and nitrate sources, respective-

ly. In this case, the cultures were incubated in GasPak (BBL) anoxic jars with the BD GasPak EZ anoxic container system. The maintenance of anoxic conditions was monitored by BD BBL dry anoxic indicator strips. When necessary, ampicillin (100 µg/ml), chloramphenicol (34 µg/ml), kanamycin (150 µg/ml), or EDTA (1.5 mM) was added to the culture. DNA techniques were those described elsewhere [39].

Real-time quantitative RT-PCR assays. RNA was isolated as previously described [2]. Real-time quantitative RT-PCR analysis of gene expression was carried out for all bacterial species as previously reported [6] and using suitable oligonucleotide primer pairs for each gene (Table 2). In

Table 2. Oligonucleotides used in this work

Name	Sequence (5'→3')	Position ^a	Application
<i>fur</i> _NdeI	<u>CAIATG</u> ACTGACAACAATACCGC	1	Upper primer used to obtain the <i>S. enterica fur</i> gene
<i>fur</i> _BamHI	<u>GGATCC</u> TATTTAGTCGGTCATCGTGC	453	Lower primer used to obtain the <i>S. enterica fur</i> gene
<i>PnarX</i> _up	GGAAAGATCGTCATCAC	-266	Upper primer used to obtain the promoter region of <i>narX</i>
<i>PnarX</i> _dw	GCCAGTGGTAAACCAGC	47	Lower primer used to obtain the promoter region of <i>narX</i>
<i>rfbA</i> _P1	AGGGCCCGGAGCGTACTAAATGTACUTGAGGA GCACGAGCACTCCC'GGGGACAAAATGACAA GTAAGCCAGGCTGAAAC'gigla'ggg'ggg'gctg'cfc	3715315'	P1 primer to construct <i>S. enterica rfbA</i> mutant by one step inactivation
<i>rfbA</i> _P2	CACTAATTCACCTATCCTTATCCTCGCAGG GTTAATGTGTATTTACACTCGCTGAGAAAGA AAATTCGGTC AACCGC'atgg'gata'gccc'ggc'	3715632'	P2 primer to construct <i>S. enterica rfbA</i> mutant by one step inactivation
<i>rfbB</i> _P1	CGGCGCTGGAGATGACCCCGTATCACGCAAAA TAGCGCGGCTGAAAAAAGACCCATGAATTCGAC ATGGGATAGATAGCGGG'gta'ggc'ggag'cgc'	1352791'	P1 primer to construct <i>S. enterica rfbB</i> mutant by one step inactivation
<i>rfbB</i> _P2	GGAAAGTGAAGTTTGTGATGTCCATCACCTT TTAGCGTCTGGGATAAAAGCGCATAAATATCA GGTGTGCAATCATTAAT'ggg'aat'gccc'ggc'	1353024'	P2 primer to construct <i>S. enterica rfbB</i> mutant by one step inactivation
<i>rfbA</i> _up	TCAGTTTGTTCACGGCAAGC	3715291'	Upper primer for <i>S. enterica rfbA</i> mutant confirmation
<i>rfbA</i> _dw	CGTAATCTTTCGGTTCAAGCG	3715660'	Lower primer for <i>S. enterica rfbA</i> mutant confirmation
<i>rfbB</i> _up	TGGGGTTTATGCAAGCAGG	1352755'	Upper primer for <i>S. enterica rfbB</i> mutant confirmation
<i>rfbB</i> _dw	CGTTAGCGGTTTATTTGCCG	1353117'	Lower primer for <i>S. enterica rfbB</i> mutant confirmation
<i>narP</i> _RT up	CGCTACGCCCGGATGGTG	218	Upper primer used to analyze <i>narP</i> gene expression by RT-qPCR ^d
<i>narP</i> _RT dw	ACTCTCGTTCCGTCAGGATACTAA	475	Lower primer used to analyze <i>narP</i> gene expression by RT-qPCR ^d
<i>narL</i> _RT up	GAATAATCAAGAACCGCAACCATC	3	Upper primer used to analyze <i>narL</i> gene expression by RT-qPCR ^d
<i>narL</i> _RT dw	CTTTAGCGCCGTGACGACATCTTCT	300	Lower primer used to analyze <i>narL</i> gene expression by RT-qPCR ^d
<i>sodB</i> _RT up	AAGCACCAGCGTTTGAAGG	131	Upper primer used to analyze <i>sodB</i> gene expression by RT-qPCR ^d
<i>sodB</i> _RT dw	GCGGTACCGGCATTTGAGG	434	Lower primer used to analyze <i>sodB</i> gene expression by RT-qPCR ^d
<i>fixA</i> _RT up	TAGCGCCCGCGTGTATCGTA	1572	Upper primer used to analyze <i>fixA</i> gene expression by RT-qPCR ^d
<i>fixA</i> _RT dw	ATGCCGGAGCCCAAAGTCAG	1871	Lower primer used to analyze <i>fixA</i> gene expression by RT-qPCR ^d

^aRestriction endonuclease recognition sites are underlined. P1 and P2 sequences, homolog to the pK24 plasmid are represented in lower case.

^bPosition of the 5' end of the oligonucleotide with respect to the translation start point of the corresponding gene.

^cPosition of the 5' end of the oligonucleotide with respect to the *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 genome sequence in the National Center for Biotechnology Information.

^dRT-qPCR, real-time quantitative RT-PCR.

all GMSs, the results were normalized with respect to the *hcrG* gene. This housekeeping gene is not affected either by iron concentration or the presence or absence of O₂ [5,10]. The induction factor (IF) of each gene under each growing condition was defined as the ratio between its expression in either the *fur* or *rfbA rfbB* mutant derivatives or in the presence of EDTA and in the wild-type strain.

Construction of *Salmonella enterica* mutant derivatives.

The *S. enterica* SL1344 *fur* mutant derivative was constructed by transduction, as previously reported [7], using the P22int7(HT) bacteriophage and UA1779 as donor strain [7]. The absence of the prophage in chloramphenicol-resistant transductants was determined by streaking them onto green plates, as described previously [13]. *Salmonella enterica rfbA* and *rfbB* mutants were constructed using the one-step PCR-based gene replacement method [12]. The kanamycin antibiotic resistance cassette was amplified from the pKD4 plasmid using suitable 100-nt-long oligonucleotides containing an 80-nt region homologous to the target gene (Table 2). All PCR products were transformed in UA1875 (Table 1) carrying the pKOBEGA plasmid [8]. If necessary, the resistance cassette was excised using the pCP20 plasmid [9]. When needed, the genetic constructs were transferred to the suitable derivative strain by transduction, carried out as described above [7]. All mutant constructs were verified by PCR using the appropriate oligonucleotides (Table 2) as well as by sequencing.

Fur purification and electrophoretic mobility shift assays.

Fur protein was purified using the pET15b overexpression vector (Novagen), as previously described [30] but with modifications. Briefly, the *S. enterica fur* gene was PCR-amplified and cloned into the pET15b expression vector, which was transformed into *E. coli* strain BL21(DE3)pLysE to overexpress the encoded protein. The Fur protein was purified using the Talon Metal Affinity Resin Kit (Clontech), as reported [30]. The protein was eluted from the affinity column by thrombin cleavage and using the appropriate elution buffer (10 mM Bis-Tris/borate buffer, pH 7.5, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 100 μM MnCl₂). The activity of the purified Fur protein was confirmed based on its ability to bind the *foxA* promoter [43]. PCR using a DIG-labeled oligonucleotide was carried out to obtain promoter DNA probes (Table 2), as described [1]. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were done as previously described using the reported buffers [14]. The binding mixture was incubated for 10 min at 37°C, after which the samples were loaded onto a 5.5% polyacrylamide gel. DIG-labeled DNA-protein complexes were detected following the manufacturer's (Roche) protocol.

Results and Discussion

To determine the putative relationship between anaerobic metabolism and iron, the expression levels of the genes *arcA*, *fur*, *narP*, and *narL* were determined by quantitative real-time RT-PCR analysis conducted in the presence of the chelator EDTA or in a *S. enterica fur*-defective genetic background. Addition of the chelator to the culture increased the expression of *narL* and decreased that of *narP* (Fig. 1A). Note that the transcriptional behavior of *narL* and *narP* in the *fur* mutant was the same as in the wild-type strain grown in the presence of EDTA (Fig. 1A). However, *arcA* expression was not affected by the presence of either the *fur* mutation or EDTA (data not shown). Likewise, and as expected, the transcriptional expression pattern of *fur* did not change (data not shown), since in *E. coli* this gene is not under Fur control

[34]. By contrast, the genes *foxA* and *sodB* were, respectively, over- and under-expressed in the *S. enterica fur* mutant, in concordance with previous data [15,25].

To further confirm the relationship between Fur and *narP* and *narL* gene expression, quantitative real time RT-PCR experiments under anoxic conditions and in the presence of nitrate were also carried out. As shown in Fig. 1, the expression levels of both genes were in concordance with those observed under oxic conditions. The Fur protein is known to repress expression of the *narL* gene [35]. This negative control must interfere in the IF levels observed under anoxic conditions. For this reason, *narL* induction was lower than that observed in the presence of oxygen, where Fur was not active and control by the Fur protein of *narL* was maximized.

Moreover, and in accordance with the above-mentioned results, Fur-mediated regulation of *narP* and *narL* may also affect the expression patterns of genes encoding enzymes directly involved in nitrate respiration. For this reason, the behavior of *S. enterica narG*, *napC*, *nirB*, and *nrfA* was analyzed in the presence of EDTA and in the *fur*-defective strain (Fig. 1B). Note that, in *E. coli*, NarL positively regulates nitrate reductase A (encoded by *narGHJ*) and the cytoplasmic nitrite reductase (*nirBDC*) whereas *nap* (encoding periplasmic nitrate reductase) and *nrf* (respiratory nitrite reductase) are regulated by NarL and NarP, which act as repressor and activator, respectively [41,44]. Figure 1B shows that basal expression of *napC* and *nrfA* decreased in the *S. enterica fur* mutant whereas the transcription of *narG* and *nirB* increased dramatically. These results are in concordance with the transcription behavior of *narL* and *narP* in the presence of EDTA and in *S. enterica fur* cells (Fig. 1A). Moreover, the *napC* and *nirB* results are in agreement with data obtained in arrays performed using Fur-defective *E. coli* strain [31]. These data unequivocally show that in *Salmonella enterica* the nitrate and nitrite respiration processes are associated with the Fe²⁺ concentration and under Fur control, through the transcriptional regulation of NarP and NarL.

As described above, Fur can act directly as a repressor by binding to the Fur box, located in the promoter region of its target genes [17]. Since *narL* expression was increased in the *fur* mutant strain, *in silico* searches were done to determine whether the *narL* promoter included a putative Fur box, but none was identified. Likewise, EMSAs using this promoter region and the purified Fur protein revealed no shift in promoter mobility (data not shown). Together, these data provide evidence that negative regulation of *narL* by Fur must be indirect.

It has been widely stated that, in *E. coli*, the positive, indirect regulatory action of Fur is associated with the RhyB

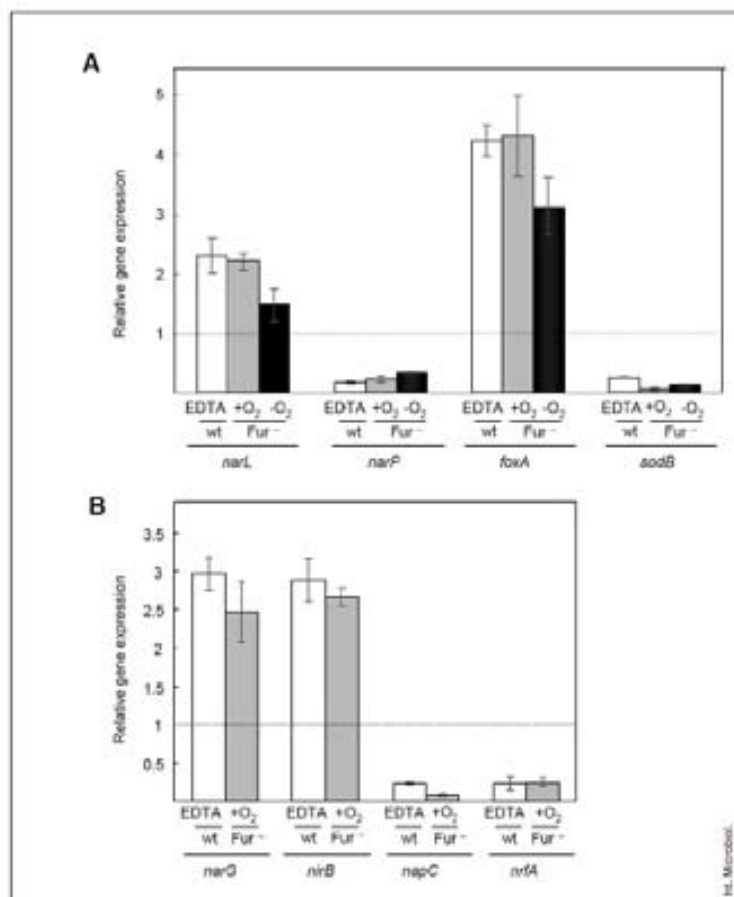


Fig. 1. (A) Expression of *Salmonella enterica narL* and *narP* genes under different growth conditions. Gene expression levels were determined in cells treated with 1.5 mM EDTA and in a *S. enterica fur* mutant derivative, under oxic or anoxic conditions. As a control, the *foxA* and *sodB* genes were also tested, serving, respectively, as *Fur* repressed or activated genes. (B) Expression of the *NarP*- and *NarL*-regulated genes *narX*, *napC*, *nirB*, and *nrfA* in *S. enterica* EDTA-treated cells and in the *fur* mutant strain. The expression level, measured by quantitative real time RT-PCR, is shown as the ratio between the relative mRNA concentration of each gene in either EDTA-treated cells or in the *fur* mutant and that of the *S. enterica* wild-type strain. mRNA concentrations were normalized to *S. enterica hucG* gene expression. Dotted line indicate an IF = 1, in which expression under the two conditions does not differ. In each case, the mean value from three different biological replicates is shown. (Error bars, SD.)

small RNA (sRNA) [29]. Moreover, and as noted above, it has been shown that some genes indirectly repressed by *Fur* are also associated with the *RhyB* sRNA regulon [36]. *Salmonella enterica* contains two sRNA, *RfrA* and *RfrB*, homologous to the product of the *E. coli rhyB* gene and which also participate in the *Fur*-mediated positive control of

several iron-related genes [16]. In this context, and to determine the role of *S. enterica RfrA* and *RfrB* sRNA in the control of *narP* and *narL* expression, strains defective in either one or in both were constructed. The results, shown in Fig. 2, clearly indicated that the pattern of *narP* and *narL* expression was altered by the absence of both sRNA either in the pres-

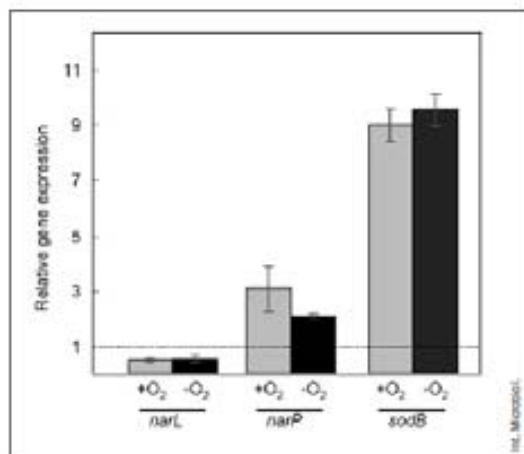


Fig. 2. Expression of the genes *narP* and *narL* in the absence of RfrA and RfrB sRNA under oxic or anoxic conditions. The expression level was calculated as the ratio between *narP* and *narL* gene expression in *Salmonella enterica* rfrA rfrB fur strain and that observed in the fur mutant. As a control to confirm the ability of sRNA to repress gene expression, the IF of *sodB* gene is shown. The experiments were otherwise carried out and the results analyzed as described in Fig. 1.

ence or in the absence of oxygen whereas in the single-gene mutants it was the same as in the wild-type strain (data not shown). Thus, in *S. enterica*, both sRNA are necessary for Fur regulation of *narP* and *narL*. Similar results were described for the *S. enterica* *sodB* gene regarding its regulation by sRNA [16]. Moreover, in *S. typhimurium* fur rfrA rfrB mutants, the level of *narP* mRNA increased whereas that of *narL* decreased (Fig. 2), indicating that sRNA regulation must be different for these genes.

The expression of most genes involved in the anaerobic growth of facultative bacteria is linked to the presence or absence of O₂. Until now, two different pathways to control anaerobic metabolism were known, both associated with the cellular oxidation or reduction (redox) status. One such pathway is through the Fnr regulator, which directly senses oxygen levels. Under conditions of very low oxygen tension, Fnr is in a dimeric state, contains a [4Fe-4S] cluster, and is able to bind DNA site-specifically. As oxygen becomes available, a conversion from the dimeric to the monomeric [2Fe-2S] state is produced through oxidation, generating a non-DNA-binding form of the regulator [4,11,23,24]. The ArcAB two-component system is the second pathway regulating cellular conversion from aerobic to anaerobic growth. In this case, the redox status of membrane-bound quinones, the central electron carriers of respiration, mediates auto-phosphorylation of the sensor kinase ArcB activator [18,26]. It has been shown that most nitrite- or nitrate-dependent respiratory genes are under Fnr regulation but their expression is also controlled by the regulators NarQP or NarXL, which are sensitive to the presence of nitrite and nitrate, respectively, as final electron acceptors under anoxic conditions [37,44]. Our

data provide evidence of a third, as yet undescribed, pathway of anaerobic respiratory transcriptional control associated with cellular redox status, involving the NarL and NarP nitrate response regulators. Expression of these genes was clearly shown to depend on the intracellular Fe²⁺ concentration and on Fur control. Thus, the Fur protein seems to act as a sensor of anoxic conditions since free Fe²⁺ is present in the absence of O₂ and only the Fur-Fe²⁺ complex is able to bind to the Fur-box. Our findings support a role for Fur as a global regulator, due to its involvement not only in iron uptake and detoxification but also in sensing the cellular redox status.

Acknowledgements. This work was funded by grants BFU2008-01078 from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) and 2009SGR1106 from the Autonomous Government of Catalonia (GC). G.A. was recipient of a pre-doctoral fellowship from the MICINN. We are deeply indebted to Prof. GM. Ghigo for the generous gift of plasmid pKOBEGA and to Joan Ruiz for his excellent technical assistance.

References

- Abella M, Erill I, Jara M, Mazón G, Campoy S, Barbé J (2004) Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the Proteobacteria phylum. *Mol Microbiol* 54: 212-222
- Aranda J, Cotos P, Garrido M, Fittipaldi N, Ligostera M, Gottschalk M, Barbé J (2009) Contribution of the FeoB transporter to *Streptococcus suis* virulence. *Int Microbiol* 12:137-143
- Bagg A, Neilands JB (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* 26:5471-5477
- Becker S, Holighaus G, Gaberlezyk T, Uden G (1996) O₂ as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178:4515-4521

5. Hjamason J, Southward CM, Surette MG (2003) Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol* 185:4973-4982
6. Campoy S, Fontes M, Padmanabhan S, Cortés P, Llagostera M, Barbé J (2003) LexA-independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Mycobacterium aurum*. *Mol Microbiol* 49:769-781
7. Campoy S, Jara M, Busquets N, de Rozas AM, Badiola I, Barbé J (2002) Intracellular cyclic AMP concentration is decreased in *Salmonella typhimurium* *fur* mutants. *Microbiology* 148:1039-1048
8. Chaveroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C (2000) A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 28:897
9. Cherepanov PP, Wackernagel W (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^r and Km^r cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9-14
10. Constantinidou C, Hobman JL, Griffiths L, Patel MD, Penn CW, Cole JA, Overton TW (2006) A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. *J Biol Chem* 281:4802-4815
11. Crack J, Green J, Thomson AJ (2004) Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *J Biol Chem* 279:9278-9286
12. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640-6645
13. Davis RW, Botstein D, Roth JR (1980) Advanced bacterial genetics. A manual for genetic engineering. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
14. de Lorenzo V, Giovannini F, Herrero M, Neilands JB (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
15. Delbec S, Touati D (2002) Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 148:147-156
16. Ellenslar JR, Schlauch JM (2005) Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HIIJ. *J Bacteriol* 190:476-486
17. Escolar L, Pérez-Martin J, de Lorenzo V (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181: 6223-6229
18. Georgellis D, Kwon O, Lin EC (2001) Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* 292:2314-2316
19. Gilberthope NJ, Poole RK (2008) Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium*: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *J Biol Chem* 283:11146-11154
20. Gonzalez PJ, Correia C, Moura I, Brondino CD, Moura JJ (2006) Bacterial nitrate reductases: molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J Inorg Biochem* 100:1015-1023
21. Hanke K (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:172-177
22. Iuchi S, Lin EC (1993) Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol Microbiol* 9:9-15
23. Khoshilova N, Popsescu C, Muncik E, Beinert H, Kiley PJ (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6087-6092
24. Kiley PJ, Beinert H (1999) Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev* 22: 341-352
25. Kingsley RA, Reischbrodt R, Rabsch W, et al. (1999) Ferrous-iron-mediated iron(III) utilization by *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol* 65:1610-1618
26. Malpica R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D (2004) Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13318-13323
27. Massé E, Gottesman S (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4620-4625
28. Massé E, Majdani N, Gottesman S (2003) Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6:120-124
29. Massé E, Salvail H, Desnoyers G, Arguin M (2007) Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr Opin Microbiol* 10:140-145
30. Mazón G, Lucena JM, Campoy S, Fernández de Henestrosa AR, Candau P, Barbé J (2004) LexA-binding sequences in Gram-positive and cyanobacteria are closely related. *Mol Genet Genomics* 271:40-49
31. McHugh J, Rodríguez-Quinones F, Abdul-Tehani H, Svitunenko D, Poole RK, Cooper CE, Andrews SC (2003) Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* 278:29478-29486
32. Moreno-Vivian C, Cabello P, Martínez-Laguado M, Blasco R, Castillo F (1999) Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol* 181: 6573-6584
33. Neidhardt FC, Bloch PL, Smith DF (1974) Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* 119:736-747
34. Niehaus F, Hanke K, Uuden G (1991) Iron content and FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 68:319-323
35. Overton T, Griffiths L, Patel M, Hobman J, Penn C, Cole J, Constantinidou C (2006) Microarray analysis of gene regulation by oxygen, nitrate, nitrite, FNR, NarL, and NarP during anaerobic growth of *Escherichia coli*: new insights into microbial physiology. *Biochem Soc Trans* 34:104-107
36. Prevost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques JF, Phaneuf E, Massé E (2007) The small RNA RyhB activates the translation of *shdA* mRNA encoding a peromase of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol* 64:1260-1273
37. Rabin RS, Stewart V (1993) Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 175:3259-3268
38. Ratledge C, Dover LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:881-941
39. Sambrook J, Russell D (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA
40. Spiro S, Guest JR (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 6:399-428
41. Stewart V (1993) Nitrate regulation of anaerobic respiratory gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 9:425-434
42. Stewart V, Parales JJ (1988) Identification and expression of genes *narL* and *narX* of the nar (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 170:1589-1597
43. Tsolis RM, Blumberg PJ, Stojiljkovic I, Heffron F (1995) Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J Bacteriol* 177:4628-4637
44. Uuden G, Bongarts J (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* 1320:217-234
45. Vivero A, Batlos RC, Mariscotti JF, Oliveros JC, García-del Portillo F, Juárez A, Madrid C (2008) Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 190:1152-1156

Fur Activates the Expression of *Salmonella enterica* Pathogenicity Island 1 by Directly Interacting with the *hilD* Operator *In Vivo* and *In Vitro*

Laura Teixidó¹, Begoña Carrasco², Juan C. Alonso³, Jordi Barbé¹, Susana Campoy^{1*}

1 Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain, **2** Area de Microbiologia, Facultat de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain, **3** Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

Abstract

Previous studies have established that the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI1), which is essential for epithelial invasion, is mainly regulated by the HilD protein. The ferric uptake regulator, Fur, in turn modulates the expression of the *S. enterica* *hilD* gene, albeit through an unknown mechanism. Here we report that *S. enterica* Fur, in its metal-bound form, specifically binds to an AT-rich region (BoxA), located upstream of the *hilD* promoter (P_{hilD}), at position -191 to -163 relative to the *hilD* transcription start site. Furthermore, in a P_{hilD} variant with mutations in BoxA, P_{hilD}^{mut} , Fur-Mn²⁺ binding is impaired. *In vivo* experiments using *S. enterica* strains carrying wild-type P_{hilD} or the mutant variant P_{hilD}^{mut} showed that Fur activates *hilD* expression, while *in vitro* experiments revealed that the Fur-Mn²⁺ protein is sufficient to increase *hilD* transcription. Together, these results present the first evidence that Fur-Mn²⁺, by binding to the upstream BoxA sequence, directly stimulates the expression of *hilD* in *S. enterica*.

Citation: Teixidó L, Carrasco B, Alonso JC, Barbé J, Campoy S (2011) Fur Activates the Expression of *Salmonella enterica* Pathogenicity Island 1 by Directly Interacting with the *hilD* Operator *In Vivo* and *In Vitro*. PLoS ONE 6(5): e19711. doi:10.1371/journal.pone.0019711

Editor: Michael Hensel, University of Osnabrück, Germany

Received: January 20, 2011; **Accepted:** April 4, 2011; **Published:** May 6, 2011

Copyright: © 2011 Teixidó et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIN) [grants BFU2008-01078 to J.B. and BFU2009-07167 to J.C.A.] and the Generalitat de Catalunya [2009SGR1106 to J.B.]. B.C. was the recipient of a Juan de la Cierva fellowship from the MICIN. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Susana.Campoy@uab.cat

Introduction

Salmonella enterica is a bacterial pathogen that causes numerous diseases, ranging from gastroenteritis to systemic infections, in several hosts including humans. Moreover, it is one of the most important pathogens associated with food-borne illness worldwide [1,2]. An early step in the pathogenesis of non-typhoidal *Salmonella* species involves their ability to penetrate the intestinal epithelium. Invasion is mediated by the presence of a type III secretion system (T3SS), which is encoded on the tightly regulated *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) [3–5]. The main regulator of SPI1, HilA, directly activates the expression of the *invF* and *prgH* operons, which encode the components of the T3SS apparatus [6,7]. InvF facilitates the expression of several effector genes on SPI1 and elsewhere in the *S. enterica* genome [8–10]. In turn, *hilD* expression is under the control of other transcriptional activators, HilD and HilC, likewise encoded within the SPI1, and RtsA, located elsewhere in the chromosome [11–13]. These three transcription factors independently activate not only HilA expression but also each others' and their own, thus comprising a complex feed-forward regulatory loop [14]. Moreover, HilC and HilD can directly activate *invF* independently of HilA [11].

T3SS expression is also modulated by several distinct environmental signals [3,15], ensuring that the system is available by the time the bacterial pathogen reaches the distal small intestine, where invasion of the epithelial monolayer takes place [5]. For example, it is well known that osmolarity and bile salt concentration influence T3SS production by controlling *hilD* expression through the EnvZ/

OmpR and BarA/SirA two-component systems, respectively [16–18]. In addition, it has been shown that phosphate or Mg²⁺ and Ca²⁺ concentrations, sensed by the PhoR/PhoB and PhoP/PhoQ systems, respectively, are likewise involved in SPI1 regulation [3,19]. In both cases, the sensor system controls expression of the SPI1 repressor HilE, which is encoded by a gene located outside of SPI1. It has been suggested that the negative regulatory effects of HilE are exerted by its direct interaction with HilD, such that HilD-mediated activation of *hilA* is prevented [20]. Another protein, HNS, has also been described to control SPI1. This nucleic-acid-associated protein, binds to the promoter region of *hilA*, *invA*, *hilD* and *hilC* genes diminishing their expression [21,22].

Iron concentration is also associated with T3SS expression [23]. Fe²⁺ is essential for bacterial development [24–26] and *S. enterica* is confronted with different free-iron concentrations during its infectious process. Normally, free Fe²⁺ is scarce inside the host due its sequestration by several different cellular mechanisms [25,27]. However, in the lumen of the small intestine, where dietary iron is mainly absorbed [28], there is abundant free Fe²⁺. Accordingly, it has been reported that several of the *Salmonella* genes that are expressed when iron is scarce remain silent as long as the bacterium is confined the intestinal lumen [29]. The Fe²⁺ concentration is thought to act as a signal that allows the pathogen to sense its location inside the host [25].

The Fur (ferric uptake regulator) protein is the main regulator of iron homeostasis in many bacteria. As a major regulator of gene expression, it not only controls genes involved in iron homeostasis but also ultimately coordinates intracellular iron levels with many

other cellular processes [30]. In transcriptional and translational gene fusions, Fur was shown to activate SPI1 expression by increasing the amount of *HliD* [4,23]. Recent studies described the ability of Fur to modulate *hliA* expression by negatively controlling the levels of the H-NS global regulator [31]. In the presence of Fur-Fe^{2+} , *hns* expression is repressed. The resulting decrease in the H-NS concentration reduces the repression that it exerts on the *hliA* promoter, thus allowing a rise in the expression of this gene [31,32]. Nevertheless, the previously described Fur-Fe^{2+} -mediated activation of *hliD* expression remains unknown [23,31].

In *Escherichia coli*, Fur exhibits Fe^{2+} -dependent DNA-binding activity to a specific sequence, namely the Fur box, located in the promoter region of genes directly repressed by Fur [33]. The Fur box is a 19-bp consensus sequence organized either as two inverted repeats separated by 1-bp, or as at least three contiguous hexamers, 5'-NATWAT-3' (where N is any nucleotide and W is an A or a T), aligned in either a direct or an inverse orientation [33–35]. In the Fe^{2+} -bound form, *E. coli* Fur represses genes involved in respiration, flagellar chemotaxis, the TCA cycle, glycolysis, methionine biosynthesis, phage DNA packaging, DNA synthesis, purine metabolism, and redox stress resistance [36–39]. Moreover, *E. coli* Fur has also an indirect positive effect on some genes by repressing the expression of the *ryhB* [40]. The absence of RhyB for pairing at the ribosomal binding site of mRNAs of genes positively regulated by Fur prevents their degradation by subsequent recruitment of the RNA degradingosome [41].

Fur has been characterized in several other bacterial species [42–45] and other Fur-regulated pathways not related with sRNA have been described [46]. For instance, in *Neisseria meningitidis*, the Fur-Fe^{2+} complex has been shown to act directly as a transcriptional activator once it binds to the promoter region of several virulence-associated genes [47]. Other Fur activation pathways have been reported in *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Helicobacter pylori*, and *E. coli* [48–51]. In *S. enterica* two sRNAs,

RfiA and RfiB, have been identified. Both are homologous to *E. coli* RhyB and participate in the Fur-mediated positive control of genes such as *sabB* [23,52]. Nevertheless, neither RfiA nor RfiB mediates Fur control of *hliD* expression [23]. Moreover, direct control by Fur of the SPI1 repressor, *hliE*, has been ruled out [23].

To understand the molecular mechanism(s) that modulate *hliD* expression by Fur-Fe^{2+} , we analysed whether the Fur protein of *S. enterica* serovar Typhimurium directly controls *hliD* expression. Our results show that Fur protein, in its metal-bound form, binds to an AT-rich operator located upstream of the *hliD* promoter region (P_{hliD}), and it acts directly as a transcriptional activator of *hliD*. These findings help to elucidate the role of iron in the regulation of SPI1 expression and provide the first evidence of a Fur-mediated direct activation mechanism in *S. enterica*.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

All bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. Bacterial cultures were grown at 37°C in LB. When necessary, ampicillin (100 µg/ml), chloramphenicol (34 µg/ml), or kanamycin (150 µg/ml) was added to the bacterial culture. When needed, 2,2-dipyridyl (DIP) was added to the medium at a concentration of 0.2 mM [31,53].

In silico searches for Fur binding sites

The 337-bp P_{hliD} spanning –247 to +90 (relative to the transcription start site [12]) was used for *in silico* searches with the Virtual Footprint online framework program [54]. The searches were carried out using the pre-existing *P. aeruginosa* (li-mer) matrix [54].

Protein purification

S. enterica fur was PCR-amplified using suitable oligonucleotides (Table S1), cloned into the pET115b expression vector, and

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this work.

Strain or plasmid	Relevant features	Source
<i>Salmonella enterica</i> strains		
SV5015	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium 551344 16s*	[83]
UA1875	SV5015 but carrying the pKOBEGA TS plasmid; Amp ^R	[84]
UA1880	As SV5015 but Δ <i>urcA</i> ; Cm ^R	[81]
UA1891	As SV5015 but Δ <i>hliD</i> :kan; Kan ^R	This study
UA1892	As UA1880 but Δ <i>hliD</i> :kan; Cm ^R , Kan ^R	This study
UA1888	As SV5015 but kan- P_{hliD} ; Kan ^R	This study
UA1889	As SV5015 but kan- P_{hns} ; Kan ^R	This study
UA1890	As UA1880 but kan- P_{hns} ; Cm ^R , Kan ^R	This study
<i>Escherichia coli</i> strains		
DHS-α	<i>sdp4</i> Δ <i>sdhA</i> /169 (D80 Δ <i>ic2</i> Δ <i>M15</i>) <i>hliR17</i> <i>rcA1</i> <i>endA1</i> <i>gtr90</i> <i>trf-1</i> <i>relA1</i>	Contact
BL21(DE3)pLysE	F ⁺ <i>amp^r</i> <i>hlyE</i> (<i>h₂</i> "m ₂ ") <i>gal</i> <i>skm</i> (DE3) pLysE (Cm ^R)	Stratagene
Plasmids		
pET115b	<i>HliA</i> tag expression vector; Amp ^R	Novagen
pGEM [®] -T	PCR cloning vector; Amp ^R	Promega
pKOBEGA	<i>hli</i> P_{hliD} <i>gam</i> <i>bet</i> <i>exo</i> pSC101 oriTS	[84]
pKD4	<i>hli</i> FRT <i>kan</i> FRT P51 P52 <i>oriR6K</i>	[80]
pUA1111	pGEM [®] -T with a 337-bp spanning P_{hns} (–247 to +90)	This study
pUA1112	pGEM [®] -T with a 337-bp spanning P_{hliD} (–247 to +90) bearing mutations in BoxA	This study

doi:10.1371/journal.pone.0019711.t001

transformed into *E. coli* BL21(DE3) pLysE strain. The Fur protein was purified using the Talon™ Metal Affinity Resin Kit (Gentech), as reported [55], and eluted from the affinity column by thrombin cleavage in buffer A (50 mM Bis-Tris/borate pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol) containing 500 mM NaCl. Fur was then loaded onto a Q-Sepharose equilibrated with buffer A containing 100 mM NaCl and eluted with a 600–1000 mM NaCl gradient. *S. enterica* Fur, which is free of *E. coli* H-NS protein, is expressed as dimers. The activity of purified *S. enterica* Fur was confirmed by electrophoretic mobility shift assays (EMSAs), which tested the ability of the protein to bind the promoter region of a confirmed Fur-regulated gene, *foxA* [56]. Figure S1 shows the Fur binding region in *P_{foxA}* and the EMSA results using purified Fur protein.

Electrophoretic mobility shift assays

Appropriate DNA probes were obtained by PCR using suitable DIG-labeled oligonucleotides (Table S1). Fur EMSAs were done as previously described, with slight modifications [57]. In each case, 100 ng of each DIG-labeled DNA probe (20 nM) was incubated with increasing concentrations of Fur in buffer B (10 mM Bis-Tris/borate pH 7.5, 5% glycerol, 1 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 100 μg BSA/ml, 0.2 mg salmon sperm DNA/ml) with or without 100 μM MnCl₂. For competitive assays, at least a 200-fold excess of either specific or non-specific non-labeled DNA was added. To assay the binding ability of Fur in its apo form, EDTA chelator was included in the binding mixture at a concentration of 1 mM. The binding mixture was incubated for 10 min at 37°C, after which the samples were separated by 3.5% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in Bis-Tris buffer [57]. The DIG-labeled DNA-protein complexes were detected by following the manufacturer's (Roche) protocol.

Footprinting assay

For the footprinting assay, the 375-bp [α -³²P]-*NotI*-*HindIII* *P_{hldD}* DNA (10 nM) from pUA1111 was incubated with increasing concentrations of Fur (1.5–100 nM) for 15 min at 37°C in buffer C (50 mM Bis-Tris/borate pH 7.5, 5% glycerol, 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂). DNase I digestion was carried out by addition of the enzyme in binding buffer containing 5 mM CaCl₂ followed by incubation for 5 min at 37°C; the reactions were stopped by the addition of 25 mM EDTA. The samples were ethanol precipitated, resuspended in 6 μl of loading buffer, and fractionated on 6% denaturing (d) PAGE [58]. As the molecular weight marker, a G + A sequence reaction [59] was carried out and run in parallel with the corresponding footprinting reactions.

Construction of *S. enterica* mutant derivatives

S. enterica UA1888 and UA1889 strains, containing a Kan^R cassette (inserted at position -192) and either wild-type (*P_{hldD}*) or the Fur BoxA mutant variant (*P_{hldD}^Δ*), and the *hldD* knock-out mutant (UA1891) were constructed using the one-step PCR-based gene replacement method as described [60] and the appropriate oligonucleotides (Table S1). The PCR products were transformed in UA1875 carrying the pKOBEGA plasmid (Table 1). In the *P_{hldD}* or *P_{hldD}^Δ* mutant derivative, transcription orientation of the *hld* gene was opposite that of the *hldD* gene, thus avoiding promoter interference. Indeed, the expression of neither *hldD* nor the downstream *jugH* genes was affected by the presence of the Kan^R cassette in UA1888, and the expression levels were the same as those obtained using the SV5015 wild-type strain. All constructs were transferred as described [61] into the SV5015 wild-type strain or the null *fur* mutant derivative (Δ *fur*, UA1880) by transduction using the P22int2(HIT) bacteriophage and the

suitable constructed strain as donor. The absence of the prophage in the transductants was determined by streaking them onto green plates, as described previously [62]. The obtained mutants were verified by PCR, using the appropriate primers (Table S1), and by nucleotide sequencing.

Quantitative RT-PCR assays

Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) assays of *hldD* or *foxA* expression in different genetic backgrounds were carried out. To maximize the iron effect, bacteria were grown in LB medium, which contains saturated iron concentrations. When needed and to generate an iron-limiting environment DPD was added to the medium. All bacterial strains were overnight cultured and then diluted 1/100 in the appropriate media (with or without DPD) and incubated aerobically at 37°C. Once the bacterial culture reached OD₆₀₀ = 0.8, the cells were harvested and then the RNA was extracted using the Qiagen RNeasy kit following the manufacturer's instructions. The qRT-PCR assays were performed as previously reported [63] using suitable oligonucleotides (Table S1). It should be noted that the *hldD* oligonucleotide pair is located upstream the Kan^R cassette insertion site in the *hldD* knock-out mutant (UA1891), thus allowing determination of the mRNA level in this genetic background. The results were normalized with respect to *ncdA*, a standard control gene not associated with the Fur regulon [64]. A change in the *ncdA* expression pattern was not observed in any of the genetic backgrounds assayed in this study (see Figure S2, in which 16S RNA is used as the standard). The relative expression level was defined as the ratio between the expression of *hldD* or *foxA* in each mutant derivative and that observed in the UA1888 strain containing a wild-type upstream Fur promoter region (*P_{hldD}*).

In vitro transcription assays

The *P_{hldD}* upstream region, spanning -247 to +90 (relative to the transcription start site), with either a wild-type BoxA or BoxA* mutant variant was cloned into pGEM[®]-T, generating plasmids pUA1111 and pUA1112, respectively (Table 1). *In vitro* transcription assays (run-off transcription) were performed using 10 nM of *HindIII*-cleaved pUA1111 (containing *P_{hldD}* or pUA1112 (*P_{hldD}^Δ*), or with pGEM[®]-T plasmid DNA (*P₊*) as an unrelated Fur control. The pUA1111 vector was also used as a supercoiled DNA RNAP template. All of the DNAs were pre-incubated with increasing concentrations of Fur protein (1.5–200 nM) for 15 min at 37°C in buffer D (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5% glycerol, 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 2 mM spermidine, 10 mM DTT) in a 25-μl reaction. One unit of *E. coli* RNAP Eσ⁷⁰ holoenzyme (USB, Cleveland) and 0.5 mM of each rNTP (with [α -³²P]-rUTP) were added. The reactions were incubated for 60 min at 37°C and then stopped by the addition of 15 μl of loading buffer followed by heating to 75°C for 10 min. The *in vitro* generated transcripts from the linear templates, which contained the cloned *P_{hldD}* or *P_{hldD}^Δ*, the vector promoter (*P₊*), and the supercoiled pUA1111 vector, were separated in 6% dPAGE, visualized, and quantified as described [65].

Results

Fur-Mn²⁺ binds *P_{hldD}* DNA with high affinity

A search for putative Fur cognate sites in *S. enterica* SL1344 *P_{hldD}*, spanning -247 to +90 (relative to the transcription start site [12]), was carried out using the Virtual Footprint online framework [54]. Accordingly, two putative Fur boxes were predicted (Figure 1A): (i) BoxA, at position -191 to -163, corresponding to an AT-rich region (dG + dC content <15%, vs. 50% for the total genome)

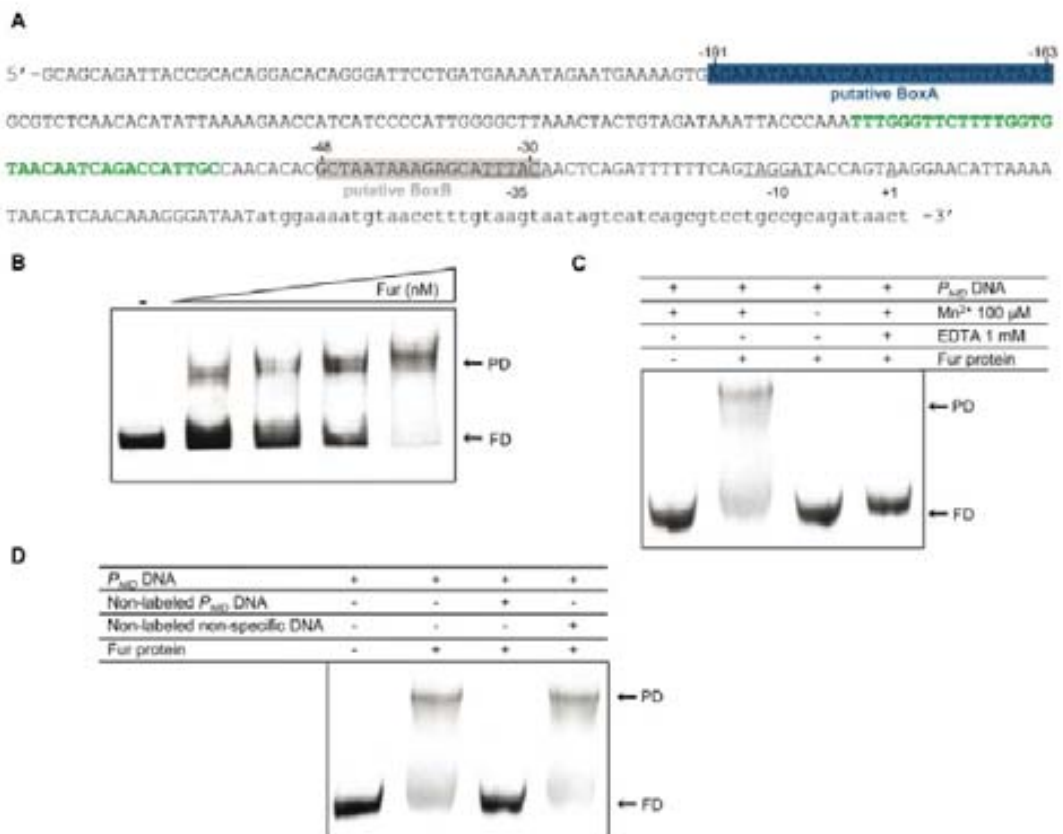


Figure 1. Fur-Mn²⁺ specifically binds P_{hld} DNA. **A.** Upstream region (-247 to +90, *FrgA*) of the *S. enterica* SL1344 *hld* gene. The putative Fur Boxes A (-191 to -163) and B (-48 to -30), identified through the Virtual Footprint framework program, are boxed in blue and gray, respectively, with the *HlD* and *HlC* binding region (-57 to -91 [12]) shown in green. The -35 and -10 promoter (P_{hld}) consensus regions and the +1 transcription start site [12] are underlined. The coding region of *hld* is denoted in lower-case characters. **B.** EMSA of P_{hld} DNA (*FrgA*) (20 nM) in the presence of increasing concentrations (2.5, 12.5, 50, and 187 nM) of Fur protein in buffer B. The mobility of P_{hld} DNA in the absence of Fur protein is shown as a control (-). **C.** EMSA of the *FrgA* probe in the presence of the chelator EDTA or with no Mn²⁺ added to buffer B. The mobility of the P_{hld} DNA probe in buffer B containing Mn²⁺ in the absence or presence of 50 nM Fur protein is shown as a negative and positive control, respectively. **D.** EMSA of the *FrgA* probe in the presence or absence of non-labeled P_{hld} or pGEM[®]-T DNA used as a specific or non-specific competitor, respectively. The specificity of Fur binding was determined using a 200-fold excess of the corresponding non-labeled DNA. The presence or absence of a component is indicated by + or -, respectively. FD, free P_{hld} DNA; PD, the protein-DNA complex. doi:10.1371/journal.pone.0019711.g001

located ~100-bp upstream of the *HlD* and *HlC* binding sites and (ii) BoxB, at position -48 to -30 (dG + dC content ~31%), overlapping the promoter -35 element and situated ~30-bp downstream from the *HlD* and *HlC* binding sites [12] (Figure 1A).

To validate the function of these putative Fur binding sites, the *S. enterica* Fur protein was purified and EMSA studies were performed using the P_{hld} region (position -247 to +90) as probe (Figure 1B). All EMSAs were done in buffer containing Mn²⁺ as a common substitute of Fe²⁺ due to its greater stability under aerobic conditions [33,47]. As shown in Figure 1B and Figure S1, in the presence of Mn²⁺, Fur dimers bound with high specificity and affinity to P_{hld} s with an apparent binding constant (K_{Dapp}) of about 4.5 ± 1.5 nM, defined as the protein concentration necessary to complex 50% of labeled DNA. In contrast, in the absence of

Mn²⁺ or following the addition of EDTA, Fur was unable to form a complex with P_{hld} DNA (Figure 1C), suggesting its metal-dependent DNA-binding activity [66]. In addition, the Fur-Mn²⁺ complex displayed a higher DNA affinity than Fur-Mg²⁺ (Figure S1). Together these observations suggest that Fur binds to the P_{hld} promoter with the same characteristics as those reported when it acts as a repressor [33].

To test the specificity of the reaction, competition experiments were performed. A large excess (200-fold) of non-specific DNA (pGEM[®]-T DNA) was unable to compete with P_{hld} for Fur-Mn²⁺ binding, whereas an excess of non-labeled P_{hld} DNA fully competed for binding with labeled P_{hld} DNA (Figure 1D). It is therefore likely that at least one Fur-Mn²⁺ binding site is present in P_{hld} s supporting the *in silico* predictions.

Fur-Mn²⁺ binds to BoxA DNA

To elucidate which of the two putative Fur boxes, or even both, binds Fur-Mn²⁺, serial deletions of the *P_{hliD}* region were obtained, generating FrgB, FrgC, and FrgD (Figure 2A). As shown in Figure 2B, FrgD (spanning the -247 to -123 interval) but not FrgB (-170 to +90) or FrgC (-16 to +90) bound Fur-Mn²⁺ (Figure 2B). It is therefore likely that: (i) Fur-Mn²⁺ interacts with the region spanning -247 to -123 (containing the putative BoxA, -191 to -163), and (ii) Fur-Mn²⁺ interacts neither with the core *P_{hliD}* region nor with the -91 to -57 interval, which includes the HliD and HliC binding sites [12,21].

Fur-Mn²⁺ recognizes BoxA DNA and spreads to adjacent regions

DNase I footprinting experiments were carried out to further determine the specific Fur-Mn²⁺ binding site in the *P_{hliD}* region. At low Fur-Mn²⁺ concentrations (0.5 Fur dimers/*P_{hliD}* DNA), only the -189 to -170 region, including BoxA, was protected from DNase I attack (Figure 3, lane 4). The BoxA site contains three copies of the hexameric 5'-NATWAT-3' Fur consensus sequence separated from each other by 4-bp. Two hexamers (subsites I and III) are in the direct (→) orientation and one (subsite II) is in the inverse (←) orientation (→4-bp←4-bp→), conforming to a typical Fur box [33]. At limiting Fur-Mn²⁺ concentrations, the protected sequence included subsites I and II spaced by 4-bp, but subsite III was poorly protected (see Figure 3). At sub-saturating and saturating Fur-Mn²⁺ concentrations (2.5:1 to 10:1 Fur-Mn²⁺/*P_{hliD}* DNA ratio), an extended DNase I-protected interval (from -147

to -219) was observed (Figure 3, lanes 1–3). Sites hypersensitive to DNase I attack were not apparent, suggesting that upon Fur-Mn²⁺ binding no obvious major distortion of the DNA occurred. It is likely that, by cooperative interaction, Fur-Mn²⁺ showed limited spread onto the 5' (~30-bp) and 3' (~23-bp) regions of *P_{hliD}* DNA (Figure 3). Fur-Mn²⁺, under the concentrations used, halted before reaching the HliD, HliC, RstA binding region (-91 to -57). Similar results were described in *E. coli*, when Fur-Mn²⁺ acts as a transcriptional repressor [33,67,68].

To test the contribution of the AT-rich upstream operator (BoxA) to Fur recognition of *P_{hliD}* DNA, a mutant BoxA DNA (*P_{hliD}*^Δ) was constructed and then used in EMSA experiments (Figure 4). As expected, *S. enterica* Fur specifically recognized *P_{hliD}* DNA with wild-type BoxA in the upstream region but failed to bind *P_{hliD}* carrying mutations in the three subsites of the Fur box region (Figure 4B).

Fur activates *hliD* gene expression *in vivo*

To determine whether Fur increases *P_{hliD}* utilization *in vivo*, the transcription level of *hliD* was assayed in several *S. enterica* strains. Wild-type *P_{hliD}* and the *P_{hliD}*^Δ variant, each with an upstream Kan^R cassette, were integrated into their native locus, leading to strains UA1880 and UA1889, respectively (Table 1). It is worth noting that the mutations in BoxA* (*P_{hliD}*^Δ, Figure 4A) were located upstream of the HliD, HliC, RstA [12], and RNA polymerase (RNAP) binding sites [12], Figure 1A). Also, the presence of the Kan^R cassette upstream of BoxA did not modify *hliD* expression, since the transcription level of this gene was similar to that obtained using the SV5015 wild-type strain (Figure 5).

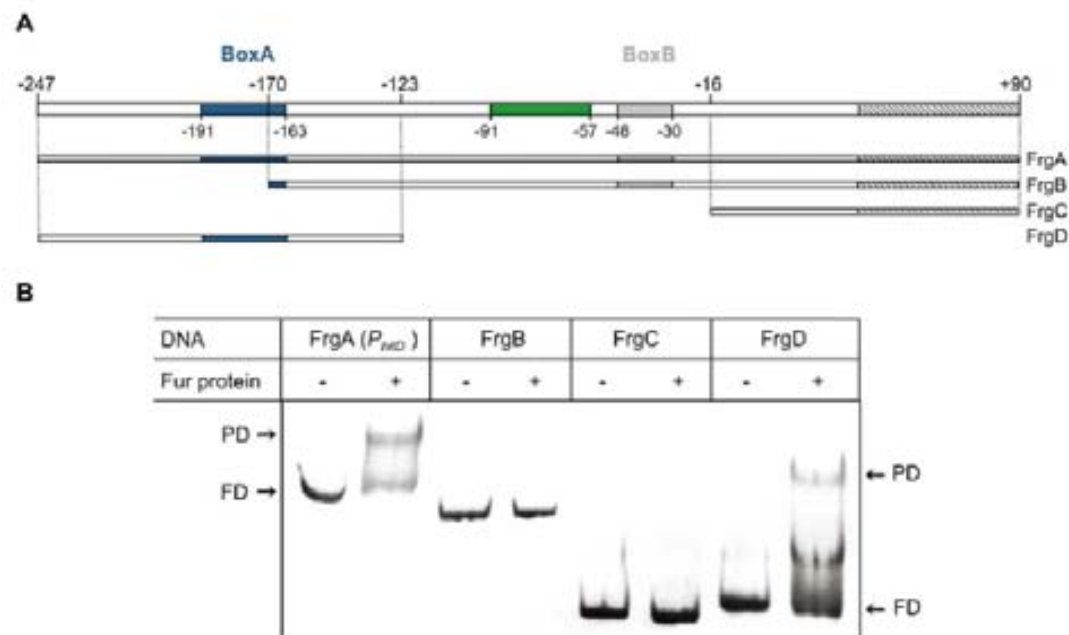


Figure 2. Fur-Mn²⁺ specifically binds BoxA in *P_{hliD}*. A. Diagram of the *P_{hliD}* region. The putative Fur BoxA, located from -191 to -163, and BoxB, from -48 to -30, are framed in blue and gray, respectively. The HliC and HliD binding sites [12] are shown in green. The positions refer to the +1 transcription start site of the *hliD* gene [12]. The *hliD* coding region is stippled. B. EMSA experiments using FrgA (*P_{hliD}*), FrgB, FrgC, and FrgD DNA probes (20 nM) from the *P_{hliD}* region in the absence (-) or presence (+) of 50 nM Fur protein.

doi:10.1371/journal.pone.0019711.g002

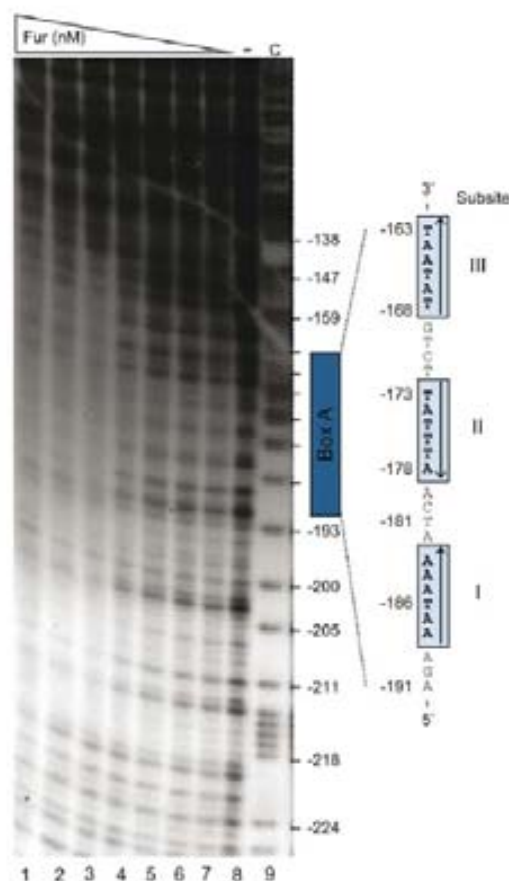


Figure 3. Footprint assay of P_{hllD} DNA using increasing Fur concentrations. The 375-bp [γ - 32 P]-NcoI-HindIII P_{hllD} (top strand) DNA (5 nM) was incubated with increasing Fur concentrations (1.5–100 nM). The positions are related to the transcription start site (+1) [12]. The three BoxA sub-sites are boxed and enlarged, with arrows denoting their relative orientation. Abbreviations: –, absence of Fur; C, a G + A sequence ladder of the DNA probe was used as molecular size marker. doi:10.1371/journal.pone.0019711.g003

The *hllD* mRNA levels were analyzed by qRT-PCR and normalized with respect to the *scdI* gene, which is not associated with the Fur regulon [64]. As a control, expression of the *fixA* gene, previously shown to be Fur repressed [56], was also measured under the same growth conditions. There was no evidence that the P_{hllD} mutation affected *fixA* expression (Figure 5). In the absence of Fur or when iron was scarce (DPD addition), *fixA* expression levels increased (Figure 5), consistent with the ability of Fur-Fe²⁺ to repress P_{hllD} utilization [56]. Under iron-saturated conditions, *hllD* mRNA level was ~10-fold higher than under iron-limiting conditions (DPD addition) (Figure 5). Similar results were observed when 1.5 mM EDTA was added to the media as a chelator (data not shown). The fact that *hllD* expression level in the UA1888 (P_{hllD} , DPD addition), UA1889 (P_{hllD}), and UA1890 (Δfur) strains were similar suggests that inactivation of BoxA (in P_{hllD}) had no effect on basal expression of the gene.

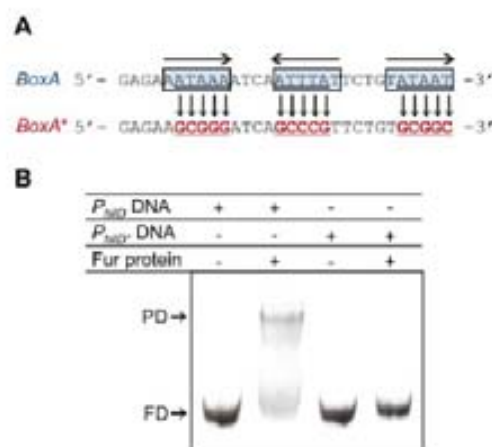


Figure 4. Fur-Mn²⁺ does not bind to a mutated BoxA (P_{hllD}). A. Sequence of wild-type BoxA in P_{hllD} and the mutated BoxA* variant in P_{hllD}^* . The three sub-sites of the Fur box and their relative orientation are also indicated. B. EMSA using 20 nM P_{hllD} or P_{hllD}^* DNA and 50 nM Fur-Mn²⁺. The presence or absence of a component is indicated inside the table by + or -, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0019711.g004

Under iron-saturated conditions, the expression of *hllD* mRNA in the P_{hllD}^* mutant derivative was similar to that measured under iron-limiting conditions (Figure 5), suggesting that P_{hllD} activation does not occur by a mechanism involving transcriptional depression. In the P_{hllD}^* mutant derivative, *hllD* mRNA levels were also similar to those obtained with the wild-type P_{hllD} in a null Fur mutant strain (Figure 5), implying that a wild-type BoxA sequence *in vivo* is necessary for the increased accumulation of *hllD* mRNA.

There is a caveat to these findings, however, as there was no decrease in *hllD* expression in the absence of both HllD and Fur proteins, determined using transcriptional fusions [23]. This was confirmed by qRT-PCR experiments using the UA1892 (Δfur , $\Delta hllD$) strain, in which, as expected, *hllD* expression was increased by a factor of 1.2 ± 0.18 with respect to the wild-type strain. Nonetheless, even though the absence of Fur or a decrease in the iron concentration resulted in a clear reduction in *hllD* expression (Figure 5), both HllD and Fur appear to be necessary for full *in vivo* expression of the gene. This complex response might be explained by the fact that only when the HllD protein reaches a significant threshold it is able to activate the expression of *hllU* and further induce its own expression [69].

Fur-Mn²⁺ activates *hllD* expression *in vitro*

To address whether the presence of Fur-Mn²⁺ is sufficient to activate P_{hllD} utilization, *in vitro* transcription experiments with linearized P_{hllD} (pUA111) or P_{hllD}^* (pUA112) DNA were performed (Figure 6). A single transcript band was obtained with HindII-linearized DNA, indicating that *hllD* is expressed from a single promoter (Figure 6A, lane 1). The length of the transcript was in full agreement with transcripts initiated at P_{hllD} , as determined by primer extension [12], confirming that the 116-nt transcript was the genuine transcript from P_{hllD} . Minor transcripts with small molecular masses were attributed to RNAP pausing sites since no obvious promoter sequences could be predicted in the putative upstream regions.

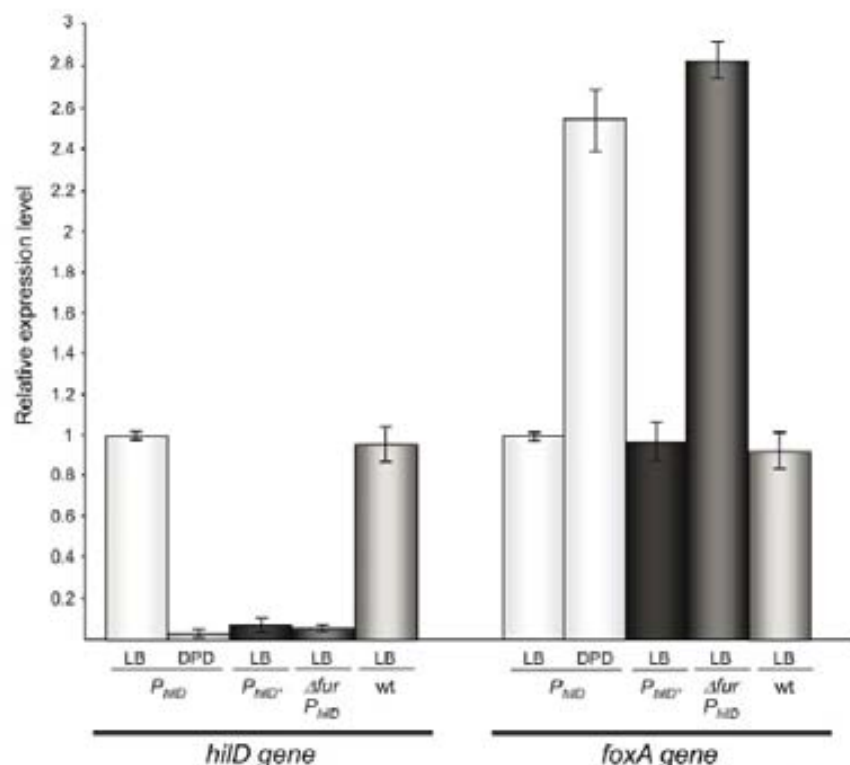


Figure 5. Relative *hld* mRNA levels in several bacterial strains and iron concentrations. Relative *hld* mRNA were estimated by qRT-PCR in P_{MID} (UA1888), P_{MID}^+ (UA1889), Δfur P_{MID} (UA1890), or wild-type (SV5015) strains grown in high (LB) or low (DPD) iron concentration, as described in the Materials and Methods section. To demonstrate that P_{MID} utilization is not affected by the upstream Kan^R cassette, the *hld* mRNA level in the wild-type SV5015 strain (wt) is also shown. The expression level of *foxA*, which is repressed by Fur [56], in all genetic backgrounds and conditions was determined as a control. For each condition, the relative gene expression levels were calculated as the ratio of each relative mRNA concentration with respect to that obtained in the isogenic wild-type strain (P_{MID}) and normalized to that of the *S. enterica* *secA* gene. The mean value from three independent experiments (each in triplicate) is shown. doi:10.1371/journal.pone.0019711.g005

In the presence of Mn^{2+} and the absence of Fur, steady-state levels of the 116-nt transcripts from P_{MID} and P_{MID}^+ were similar (37 ± 3 arbitrary units, AU), suggesting that the *BoxA* mutations did not affect P_{MID}^+ utilization (Figure 6B). In the presence of Mn^{2+} , P_{MID} utilization, or accumulation of the 116-nt transcript, increased with increasing Fur concentration, with an optimum reached when ~ 2.5 Fur dimers/DNA molecule were added (123 ± 5 AU) (Figure 6A). Similar levels of P_{MID} utilization were obtained using supercoiled DNA ($P_{MID}sc$) as template, ruling out any topological requirement for transcription activation (Figure 6B). At sub-saturating Fur- Mn^{2+} concentrations, P_{MID} utilization increased by more than 3-fold over the control without Fur- Mn^{2+} (Figure 6). However, the addition of Fur- Mn^{2+} did not significantly increase the levels of transcription of an unrelated promoter (*Pv*) (27 ± 5 AU) (Figure 6B).

P_{MID}^+ utilization was not significantly increased at Fur- Mn^{2+} concentrations equal to or higher than those required to activate this promoter (Figure 6B). As seen in Figure 6B, Fur- Mn^{2+} , at sub-saturating or half-saturating concentrations, interacted with *BoxA*, suggesting that the protein facilitates RNAP utilization of the P_{MID} region. It is therefore likely that Fur- Mn^{2+} acts as a transcriptional

activator of *S. enterica hld* expression. Since transcription activation was not observed when *BoxA* was inactivated by mutations (P_{MID}^-), half-saturating Fur- Mn^{2+} concentrations are apparently necessary for transcription activation of the *hld* promoter *in vitro*. However, in the presence of ~ 20 Fur dimers/DNA molecule, similar activation was not observed (Figure 6B). Since ~ 20 Fur dimers/DNA molecule similarly did not affect the expression of P_{MID}^+ or an unrelated promoter (*Pv*) (Figure 6), a contaminant RNase or any other non-specific effect can be ruled out as responsible for the reduced RNA synthesis at constant Mn^{2+} and higher Fur concentrations. It could be hypothesized that Fur- Mn^{2+} prevents P_{MID} activation based on its reported cooperative spreading. Thus, nucleoprotein assembly along the promoter region may interfere with, rather than stimulate, the interaction of RNAP with P_{MID} , returning *hld* expression to its basal level.

Discussion

We show that the *S. enterica hld* gene, whose product is the most important regulator of the HIA activator and therefore of SPI1 T3SS expression, contains a Fur binding site (*BoxA*) in the

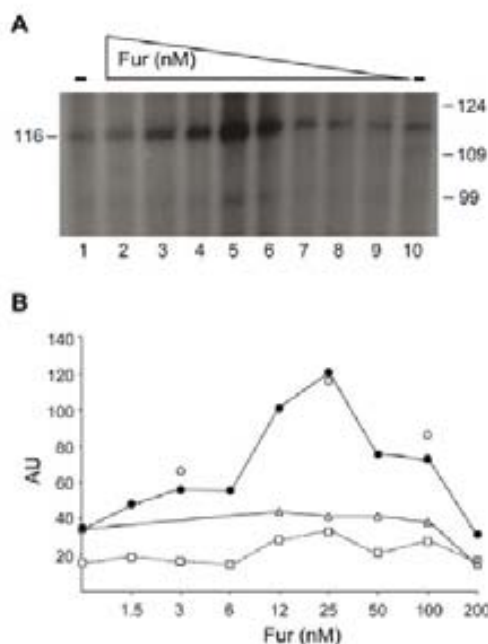


Figure 6. *In vitro* transcription of P_{hld} in the presence of Fur protein. **A.** Linear *Hind*III-cleaved pUA1111 DNA (10 nM) containing P_{hld} was pre-incubated with increasing concentrations of Fur (1.5–200 nM). Transcription reactions, performed in the absence or presence of increasing concentrations of Fur, were initiated by adding RNAP and 0.5 mM of each rNTP (with [α - 32 P]-rUTP). The reactions were incubated for 60 min at 37°C. Transcripts generated *in vitro* from the P_{hld} template DNA were separated in 6% dPAGE. The *in vitro* transcripts from P_{hld} and their lengths are shown. The sizes of the markers are indicated. **B.** Linear *Hind*III-cleaved pUA1111 or pUA1112 DNA (10 nM) containing P_{hld} or P_{hldP} was pre-incubated with increasing concentrations of Fur (1.5–200 nM). Relative mRNA synthesis from P_{hld} (filled circles) and P_{hldP} (empty triangles) in the absence or presence of increasing Fur was compared and is denoted in arbitrary units (AU). Also, the pUA1111 vector containing P_{hld} (P_{hld} 9C) (open squares) and the pGEM-T plasmid vector promoter (P_v) (empty circles) were used under the same conditions as supercoiled DNA and the non-specific control, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0019711.g006

upstream region of P_{hld} (–191 to –163). Fur, in its metal-bound form, bound with high affinity to BoxA in P_{hld} DNA but not to the BoxA mutant variant (BoxA*) in P_{hldP} . *In vivo* and *in vitro* experiments revealed that Fur bound to the upstream element of P_{hld} activated *hld* expression, but did not activate transcription from P_{hldP} . Thus, metal-bound Fur appears to be a direct transcriptional activator of the *S. enteria hld* gene. Being this the first evidence of Fur acting directly as an activator in this bacterium.

In most bacterial species, Fur-Fe²⁺ is a transcriptional repressor, binding to cognate sites within position –35 to +12 in the promoter region [33,47,57,70–72]. In these cases, transcription of the target promoters is blocked by steric hindrance rather than by preventing transcription elongation [46,66,73]. Fur-Mn²⁺ bound to BoxA in P_{hld} , which is situated upstream of Hld, H3C (see Figure 1A [12]), or even RtaA binding sites [21], activates RNAP

utilization of P_{hld} . A similar upstream location of the Fur cognate site has been described for Fur-activated genes in other microorganisms [46,47,51,74,75], suggesting a close relationship between the location of the Fur binding site in the promoter of the controlled gene and its role as an activator.

The majority of transcriptional activators, upon binding to their cognate upstream element adjacent to the core RNAP sites, either drive the recruitment of the latter to the target promoter or alter the conformation of the promoter DNA to facilitate RNAP loading [76–79]. Here we provide the first evidence of a direct mechanism of *S. enteria hld* transcription activation by showing that Fur-Mn²⁺ binds to a distal upstream-activating sequence. We thus propose that Fur-Fe²⁺ is sufficient, *in vitro*, to increase RNAP recruitment. It is unlikely that Fur-Fe²⁺ alone alters the DNA conformation, because DNase I hypersensitive sites were not observed. There are not evidences for Fur-Mn²⁺ and RNAP interaction and activation via a looping mechanism, but Fur-Mn²⁺ bound to its target site are sufficient for increased P_{hld} utilization. It can be envisaged, however, that the Hld regulation *in vivo* is complex as suggested the *hld* expression results obtained in the double *hld fur* mutant and the fact that RtaA, H3C and Hld recognize a sequence downstream Fur and apparently antagonize H-NS- and Hha-mediated repression, suggesting that these complex control region (–120 to –57) laid within BoxA (–191 to –163) and the core promoter region (–60 to +10) [21,23].

The expression of SPII is known to be modulated by environmental signals, which indirectly control *hld* transcription [3]. Among these signals, a relationship between extracellular iron concentrations and SPII expression has been suggested [23] and an indirect association of Fur and *hld* expression through H-NS described [31]. In addition, several reports have shown that low-oxygen concentrations, such as those present in the intestinal lumen, increase SPII expression [4,16,80]. Free iron is scarce inside the host, but Fe²⁺ is abundant in the intestinal lumen, where it is efficiently absorbed by intestinal epithelial cells [20]. Fur does not sense oxygen concentrations directly but is instead able to monitor the redox signal via the equilibrium between Fe²⁺ and Fe³⁺ [81]. It should be noted that the Fur-Fe²⁺ complex is not functional and that, as Fe³⁺ is insoluble, it cannot be translocated inside the cell [33,47].

This work describes the direct activation of SPII by Fur through its interaction with an upstream region on P_{hld} and thus adds new information to Fur SPII regulation models [21,23,31] (Figure 7). Taken together, our data shed light on the role of Fur in SPII control. Specifically, Fur is able to control, either directly (in the case of Hld) or indirectly through H-NS (in *hld*, *hld*, *h3c*, and *rtaA*), all the main regulators of SPII. These results strengthen the relationship between *S. enteria* invasiveness and both iron and oxygen concentrations inside the host. Accordingly, the expression of *hld*, *h3c*, and *rtaA*, and consequently that of T3SS1, should be stimulated once *S. enteria* reaches the epithelial surface, where iron concentrations are high and those of oxygen low. T3SS expression has been reported as essential for epithelial invasion [5]. Once Fe²⁺ levels decrease or those of O₂ increase, the number of Fur-Fe²⁺ complexes should diminish markedly, as should T3SS, which is no longer needed and must remain silent in subsequent steps of the infection process [5]. This sequence of events is supported by a previously published report in which, the epithelial invasiveness of Fur-defective mutants was shown, in an acid-sensitive independent manner, to be lower than that of the wild-type strain [82]. Direct regulation by Fur of *hld* expression would allow rapid signal transduction once the Fe²⁺ concentration increases, situating P_{hld} in a similar hierarchic position as sRNAs that indirectly control other genes positively regulated by Fur.

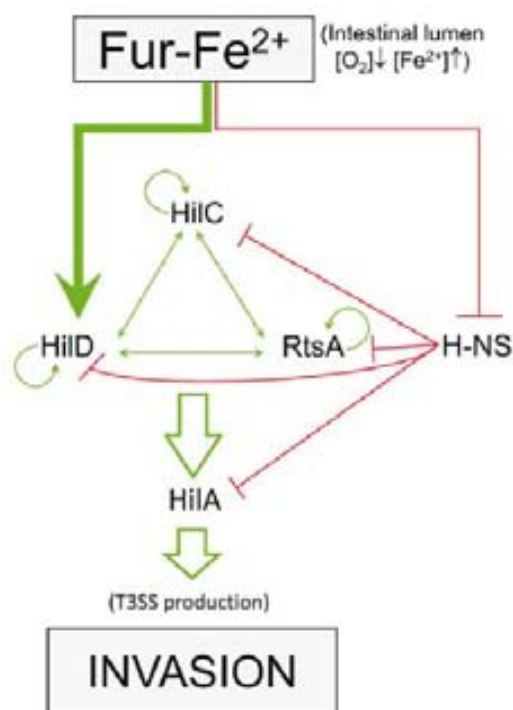


Figure 7. Scheme of SPI1-Fur mediated regulation. A Fur SPI1 regulation model after Ellermeier et al. [23] and Tröxel et al. [31]. Green arrows indicate a direct activation effect; red lines correspond to direct repression. The thick green arrow shows the herein described pathway of direct activation by Fur of *hiiD* gene expression. H-NS control of the *hiiC*, *hiiC*, *rtsA* and *hiiA* promoters is also shown [21,22,31]. doi:10.1371/journal.pone.0019711.g007

Supporting Information

Figure S1 A SDS-PAGE showing the Fur purified protein. Lanes 1 and 2 correspond to non-induced and IPTG-induced cell

References

- Pang T, Bhartiya ZA, Holey BB, Abzug M (1995) Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol* 3: 251–255.
- Majowicz SE, Munto J, Scallan E, Angulo TJ, Kirk M, et al. (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50: 882–889.
- Jones BD (2005) *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* 43 Spec No. pp 110–117.
- Ellermeier JK, Stauch JM (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* 10: 24–29.
- Mantoni P, Grant A, Restif O, Maskell D (2009) A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. *Nat Rev Microbiol* 7: 75–80.
- Loehlin CP, Bajaj V, Lee CA (2008) The *cin* requirement for transcriptional activation by HlxA, a virulence determinant encoded on SPI-1. *Mol Microbiol* 32: 300–315.
- Loehlin CP, Lee CA (2001) The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* 3: 1281–1291.
- Darsin KH, Miller VI. (1999) InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 181: 4949–4954.
- Eicheberg K, Galan JE (1999) Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and HlxA. *Infect Immun* 67: 4099–4105.

crude extracts of BL21(DE3)pLys containing the *S. enterica* *fur* gene cloned in the pET15b vector. Lane 3 is the purification fraction containing the Fur native protein after thrombin digestion. **B.** Scheme of P_{hiiC} indicating the location of the Fur binding site in blue. The ATG start codon is indicated in bold. **C.** EMSA performed using DIG labeled P_{hiiC} probe (20 nM) and the purified Fur protein at increasing concentrations (2.5, 12.5, 50, and 187 nM). Lane (-) indicates the mobility of the DNA probe without Fur in the binding mixture.

(TIF)

Figure S2 Fur-Mn²⁺ binds with high affinity to P_{hiiD} DNA. The 375-bp [³²P]-*NcoI*-*HindIII* DNA (2 nM) fragment containing P_{hiiD} was incubated with increasing Fur concentrations (5–400) for 15 min at 37°C in buffer A (50 mM Bis-Tris/borate buffer pH 7.5, 5% glycerol, 10 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂) or E (50 mM Bis-Tris/borate buffer pH 7.5, 5% glycerol, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM MnCl₂). The absence of a component is indicated by -; FD, protein-free P_{hiiD} DNA; IC, intermediate complexes; PD, protein-DNA complexes.

(TIF)

Figure S3 qRT-PCR assays of *nod* expression in the different genetic backgrounds used in this work. For each condition, the relative *nod* expression levels were calculated as the ratio of its mRNA concentration with respect to that obtained in the isogenic wild-type strain (P_{hiiD}) and normalized to that of the *S. enterica* 16S RNA. The mean value from three independent experiments (each in triplicate) is shown.

(TIF)

Table S1 Oligonucleotides used in this work.

(DOC)

Acknowledgments

We are deeply indebted to Prof. G.M. Ghigi for the generous gift of plasmid pKOBEGA and to María Pilar Coriás and Joan Ruiz for their excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LT BC JCA JB SC. Performed the experiments: LT BC SC. Analyzed the data: LT BC JCA JB SC. Contributed reagents/materials/analysis tools: JCA JB. Wrote the paper: JCA JB SC.

Fur Activates *hlyD* Expression

18. Topinski M, Goodier RI, Ames BM (2003) Pathways leading from *BaeA/SiaA* to modify and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* 185: 7257–7265.
19. Pappas BA, Hartman MJ, Bellan I, Miller SI (1995) *PhoP/PhoQ* transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Mol Microbiol* 17: 109–101.
20. Baxter MA, Faldut TF, Wilson RL, Jones BD (2003) *HlyE* interacts with *HlyD* and negatively regulates *hlyA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* invasive phenotype. *Infect Immun* 71: 1295–1303.
21. Oshkhatovich IN, Kacher RJ (2007) Role of nucleoid-associated proteins *HhaA* and *H-NS* in expression of *Salmonella enterica* activators *HlyE*, *HlyC*, and *RtxA* required for cell invasion. *J Bacteriol* 189: 6832–6839.
22. Navarro WW, Puroshak S, Wang Y, McCliffand M, Kwon H, et al. (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the *H-NS* protein in *Salmonella*. *Science* 313: 236–238.
23. Elmerhorst JK, Stauch JM (2006) *Fur* regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through *HlyD*. *J Bacteriol* 188: 476–486.
24. Weisberg ED (1978) Iron and infection. *Microbiol Rev* 42: 45–66.
25. Radtke C, Dover LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54: 381–941.
26. Schallig UE, Kaufmann SH (2000) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* 2: 946–955.
27. Wauderman C, Delpolázar P (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58: 611–647.
28. Conrad ME, Umbreit JN (2002) Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis* 29: 336–355.
29. Jankharian A, Stauch JM (2000) The putative iron transport system *StnABCD* encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 35: 1146–1155.
30. Haasik K (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4: 172–177.
31. Tronel B, Siles ML, Fink RC, Vaqueiro-Torres A, Jones-Carson J, et al. (2010) *Fur* negatively regulates *hns* and is required for the expression of *HlyA* and virulence in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J Bacteriol* 192: 493–505.
32. Schechter JM, Jain S, Akbar S, Lee CA (2003) The small nucleoid-binding proteins *H-NS*, *HU*, and *FliA* affect *hlyA* expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infect Immun* 71: 5432–5435.
33. Escobar L, Piroz-Martin J, de Lorenzo V (1999) Opening the iron box: transcriptional metallogenesis by the *Fur* protein. *J Bacteriol* 181: 6225–6229.
34. de Lorenzo V, Wu S, Herrera M, Neiland JE (1987) Operator sequence of the aerobic operon of plasmid *GaIV-K30* binding the ferric uptake regulator (*fur*) repressor. *J Bacteriol* 169: 2624–2630.
35. Rabinov N, Helman JD (2002) Recognition of DNA by *Fur*: a reinterpretation of the *Fur* box consensus sequence. *J Bacteriol* 184: 5026–5032.
36. Stajkovic I, Baender AJ, Harel 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.
37. Park SJ, Gonzalez RP (1995) Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarate *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *arcB*, and *oxyR* gene products. *J Bacteriol* 177: 6255–6262.
38. Tassal D (1998) Transcriptional and posttranscriptional regulation of manganese superoxide dismutase biosynthesis in *Escherichia coli*, mediated with operon and protein factors. *J Bacteriol* 170: 2511–2520.
39. Vasniotis N, Kopyev D (2003) A method for direct cloning of *fur*-regulated genes: identification of seven new *fur*-regulated *hlyD* in *Escherichia coli*. *Microbiology* 146 Pt 12: 3171–3182.
40. Maas E, Gottesman S (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4620–4625.
41. Maas E, Eceviz TE, Gottesman S (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 17: 2374–2383.
42. Litwin CM, Boyko SA, Calderwood SB (1992) Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae fur* gene. *J Bacteriol* 174: 1897–1903.
43. Pison RW, Cox CD, Vaid ML (1993) Coordinate regulation of siderophore and exoenzyme A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J Bacteriol* 175: 2509–2508.
44. Thomas CE, Spurling PF (1994) Identification and cloning of a *fur* homolog from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 11: 725–737.
45. Bus N, Hofmann JD (1999) Interaction of *Barillus subtilis Fur* (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol* 181: 4299–4307.
46. Carpenter BM, Williams JM, Merril DS (2009) This is not your mother's repressor: the complex role of *fur* in pathogenesis. *Infect Immun* 77: 2590–2601.
47. Delany L, Rappaport K, Scatena V (2004) *Fur* functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 52: 1081–1090.
48. Wilderman PJ, Srna NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, et al. (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9792–9797.
49. Alamuri P, Melia N, Burk A, Maier RJ (2006) Regulation of the *Helicobacter pylori* Fe-S cluster synthesis protein *NiS* by iron, oxidative stress conditions, and *fur*. *J Bacteriol* 188: 5325–5330.
50. Gao H, Zhou D, Li Y, Gao Z, Han Y, et al. (2008) The iron-responsive *Fur* regulon in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 190: 3063–3073.
51. Nasid A, Higgins CG, Woodfull MR, McHugh J, Rodriguez-Quinones F, et al. (2009) Induction of the ferritin gene (*fthA*) of *Escherichia coli* by Fe(2+)-*Fur* is mediated by reversal of H-NS silencing and is RylB independent. *Mol Microbiol* 75: 637–657.
52. Sitka A, Laczinski S, Papenfuss K, Sharma CM, Rufe K, et al. (2000) Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, *Hly*. *PLoS Genet* 4: e1000163.
53. Garrido ME, Bosch M, Medina R, Rigas A, Higuera M, et al. (2003) *Fur*-independent regulation of the *Pasteurella multocida hlyA* gene encoding a haem-binding protein. *Microbiology* 149: 2273–2281.
54. Munch R, Heller K, Gross A, Scher M, Klein J, et al. (2005) Virtual Footprint and PRODIGIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* 21: 4187–4189.
55. Manzi G, Lucera JM, Campoy S, Fernandez de Henautou AR, Candia P, et al. (2008) *LexA*-binding sequences in Gram-positive and cyanobacteria are closely related. *Mol Genet Genomics* 271: 40–49.
56. Trullis RM, Baender AJ, Stajkovic I, Hoffman F (1995) *Fur* region of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J Bacteriol* 177: 4620–4637.
57. de Lorenzo V, Giacomin F, Herrera M, Nollands JB (1988) Metal ion regulation of gene expression. *Fur* repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobic system of *pGaIV-K30*. *J Mol Biol* 203: 875–884.
58. de la Huat AB, Ayora S, Siskiewicz I, Fernandez S, Paskiewicz R, et al. (2000) Plasmid copy-number control and hemin-thiamin-random segregation genes of *pSM10035* share a common regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 728–733.
59. Manam AM, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 560–564.
60. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640–6645.
61. Campoy S, Jara M, Baqueris N, de Rosas AM, Badilla I, et al. (2002) Intracellular cyclic AMP concentration is decreased in *Salmonella typhimurium fur* mutants. *Microbiology* 148: 1039–1048.
62. Davis RW, Botstein D, Roth JR (1980) *Advanced Bacterial Genetics. A Manual for Genetic Engineering*. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
63. Campoy S, Flores M, Padmanabhan S, Corvo P, Higuera M, et al. (2003) *LexA*-independent DNA damage-mediated induction of gene expression in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 49: 769–781.
64. Bjornson J, Southworth CM, Saez MG (2003) Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* by high-throughput screening of an arabinid promoter library. *J Bacteriol* 185: 4975–4982.
65. Carmona B, Manfredi C, Ayora S, Alonso JC (2008) *Bacillus subtilis* *SdaA* and *DATP* regulate *RecA* nucleation onto single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst)* 7: 900–906.
66. Lee JW, Helman JD (2007) Functional specialization within the *Fur* family of metallorepressors. *Biomol* 20: 835–839.
67. Escobar L, Piroz-Martin J, de Lorenzo V (2000) Evidence of an unusually long operator for the *fur* repressor in the aerobic promoter of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275: 24709–24714.
68. Laurae JL, McIntosh MA (2001) Architecture of a *fur* binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* 183: 2194–2202.
69. Saki S, Hrenowator JR, Stauch JM, Rao CV (2010) The role of coupled positive feedback in the expression of the SPI1 type three secretion system in *Salmonella*. *PLoS Pathog* 6: e1000225.
70. Grigg DW, Kozicky J (1995) Mechanism for iron-regulated transcription of the *Escherichia coli* *cbiA* gene: metal-dependent binding of the *fur* protein to the promoters. *J Bacteriol* 171: 1046–1054.
71. Tardas B, Tsai D (1993) Iron and oxygen regulation of *Escherichia coli* *MisO* expression: competition between the global regulator *Fur* and *ArcA* for binding to DNA. *Mol Microbiol* 9: 55–63.
72. Oatman FW, Djanogly A, Storz G (2004) A *raf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 52: 861–872.
73. Kojo F (2001) Mechanisms of transcriptional repression. *Curr Opin Microbiol* 4: 145–151.
74. Lee HJ, Bang SH, Lee KH, Park SJ (2007) Positive regulation of *fur* gene expression via direct interaction of *fur* in a pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*. *J Bacteriol* 189: 2829–2836.
75. Grifantini R, Frigoletta E, Delano E, Bartolini E, Giordano S, et al. (2004) Characterization of a novel *Neisseria meningitidis Fur* and iron-regulated operon required for protection from oxidative stress: utility of DNA microarray in the assignment of the biological role of hypothetical genes. *Mol Microbiol* 54: 962–979.
76. Wu HM, Crothers DM (1984) The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature* 308: 509–513.
77. Ciflis CM, Melby PL, Roth GW, Drew HR (1983) Influence of the sequence-dependent cleavage of DNA on transcription in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 11: 9447–9463.

Fur Activates *hlyD* Expression

78. Traut AA (1989) DNA conformation and protein binding. *Annu Rev Biochem* 58: 427–452.
79. Adhya S, Gottesman M, Garg S, Oppenheim A (1992) Promoter restruction by activators—a minireview. *Gene* 132: 1–6.
80. Rajg V, Lucas RL, Hwang C, Lee CA (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hlyA* expression. *Mol Microbiol* 22: 705–714.
81. Trincado L, Cortes P, Bigas A, Alvarez G, Barbe J, et al. (2010) Control by Fur of the nitrate respiration regulators NarP and NarX in *Salmonella enterica*. *Int Microbiol* 13: 23–30.
82. Garcia-del Portillo F, Foster JW, Finlay BB (1993) Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* 61: 4489–4492.
83. Vivero A, Basso RC, Maricotti JF, Olivares JC, Garcia-del Portillo F, et al. (2005) Modulation of horizontally acquired genes by the Hly-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 190: 1152–1156.
84. Chaveroche MK, Ghigo JM, d'Enfert C (2003) A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 28: E97.