



| UNR

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**“Control de la homeostasis de zinc y su rol
en la virulencia de *Salmonella*”**

Presentada por: Lic. Nadia L. Scampoli

Director: Dr. Fernando Soncini

Rosario, Argentina

2017

“Control de la homeostasis de zinc y su rol en la virulencia de *Salmonella*”

Nadia L. Scampoli

Licenciada en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), área Biología Molecular de Microorganismos Patógenos, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2012 y el 1 de Marzo de 2017, bajo la dirección del Dr. Fernando C. Soncini

A mis abuelos

No muere aquel que dejó sobre la Tierra la melodía de su himno

Ese día me quedé pensando
que algunas personas jamás nos dejan,
nunca se van por completo,
aunque ya no estén.

Su esencia queda,
su voz se escucha,
las sentimos sonreír.

Algunas personas jamás nos dejan.

Son eternas.

(Ilani Ribero)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi director, Fernando Soncini, por darme el espacio y la oportunidad para poder realizar esta tesis. Agradezco su dirección y su paciencia por sobre todo; y aunque más de una vez hemos tenido nuestras diferencias en lo laboral, sus consejos siempre me han ayudado. También necesito agradecer por su constante preocupación hacia mí en lo personal, por su interés cuando he estado enferma o he pasado por situaciones que me han molestado.

Agradezco a Susana y a Eleonora, por sus consejos y aportes en cada una de nuestras reuniones de grupo. Por darnos otro panorama u otra visión ante las dificultades que rutinariamente este trabajo nos da.

A mis tutores, Pamela y Hugo, por estar al tanto de mi trabajo, por sus sugerencias, y porque más de una vez los perseguí por los pasillos para que me firmaran algo a último momento.

A mi familia! Como siempre, nada de lo que encaro en mi vida sería posible sin ellos. Ellos me cuidan, se preocupan, me retan, me miman, me aconsejan, me ayudan. Mami, Papi, Hugo y Vale, los amo profundamente.

A Laurita, por bancarme todo el tiempo, y aunque nos conocimos tarde en la facultad, esos últimos años, largos y difíciles, se hicieron menos densos contigo amiga!

A mis amigos de la facu. Emi, Ro, Caro, Vicky y Dani, los quiero a montones, la facultad no hubiera sido lo mismo sin ustedes ahí. A Meli, Sol, Evi, Vane y Estefi, por todos los momentos y consejos compartidos.

A mis compañeros de laboratorio (los del principio, los del medio y los del fin), porque trabajar en un ambiente donde las risas están garantizadas todos los días no tiene precio! Me llevo muy buenos momentos y muy buenos amigos, que adoro y respeto. A cada uno de Uds: GRACIAS! A Lolilla, Nina y Sut, que nos facilitan el laburo y la vida, pero que además las llevo en el corazón. Y a Martina, por ser tan bonita y buena (declaro que me debés una chocotorta).

No me olvido de los amigos que la vida me va dejando, las personas que se cruzaron en mi camino para bien. A Moi, por escucharme y bancarme todos los días desde hace más de tres años. A esas personas que han compartido un aula conmigo desde pequeñas y que ahora compartimos una cerveza o un mate, y que me sacan de la monotonía del día con algún mensaje que te deja una sonrisa.

Por la buena onda del piso 2!!!! Gente, gracias por la solidaridad en el día a día, por compartir almuerzos y anécdotas. Porque un “hola, ¿cómo estás?” por el

pasillo todas las mañanas hace la diferencia. Y a toda persona del IBR que cuando necesitás una mano, te brindan dos.

A las personas que ya no están a mi lado. Ya nos volveremos a encontrar.

Cada persona que pasa por nuestra vida algo nos deja, y ya no es la misma vida de antes. Algo nos cambia, algo nos llega. Agradecer a cada persona que se ha cruzado en mi camino desde el momento en que nací sería algo imposible de hacer, pero extendiendo mi agradecimiento hacia ellas también, aunque ni lo sepan, aunque ni se enteren. Porque todos nosotros estamos conectados, y todos nosotros influimos en la existencia de los demás. Porque no sería yo sin cada uno de Uds...

... porque estamos hechos de historias.

GRACIAS!

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido publicados en las siguiente modalidades:

Publicaciones científicas:

Pontel LB, Scampoli NL, Porwollik S, Checa SK, McClelland M, Soncini FC. Identification of a *Salmonella* ancillary copper detoxification mechanism by a comparative analysis of the genome-wide transcriptional response to copper and zinc excess. Nies D, ed. *Microbiology*. 2014;160(Pt 8):1659-1669. doi:10.1099/mic.0.080473-0.

Presentaciones científicas:

- I. Scampoli, N. L.; Checa, S. K. y Soncini, F. C. Inmunidad Nutricional: buscando nuevos blancos de Zur en el genoma de *Salmonella*. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. 2016. Rosario, Argentina.
- II. Scampoli, N. L.; Checa, S. K. y Soncini, F. C. Discovering new Zur target genes in the *Salmonella* genome. 50th Annual Meeting SAIB. 2014. Rosario, Argentina.
- III. Scampoli, N. L.; Checa, S. K. y Soncini, F. C. *Salmonella*-specific genes involved in zinc homeostasis and virulence. IX Congreso de Microbiología General-SAMIGE. 2013. Rosario, Argentina.
- IV. Scampoli, N. L.; Pontel, L. B.; Checa, S. K. y Soncini, F. C. Global transcriptional analysis of *Salmonella* adaptation to increased levels of copper and zinc. 48th Annual Meeting SAIB. 2012. Mendoza, Argentina.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	10
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	14
1. <i>SALMONELLA</i>	15
1.1. <i>EL GÉNERO SALMONELLA</i>	15
1.2. <i>CICLO INFECTIVO DE SALMONELLA Y FACTORES DE VIRULENCIA</i>	16
1.2.1. Internalización en células del hospedador.....	18
1.2.2. La vacuola que contiene a <i>Salmonella</i>	20
1.2.3. Factores de virulencia que afectan la sobrevivencia intracelular de <i>Salmonella</i>	20
1.3. <i>SUPERVIVENCIA DE SALMONELLA EN EL MEDIO AMBIENTE</i>	21
2. HOMEOSTASIS DE METALES PESADOS: SU VINCULACIÓN CON LA PATOGÉNESIS.....	22
2.1. <i>EL REQUERIMIENTO DE METALES EN LOS SERES VIVOS</i>	23
2.2. <i>INMUNIDAD NUTRICIONAL</i>	24
2.2.1. Inmunidad nutricional relacionada al hierro	25
2.2.1.1. <i>Mecanismos del hospedador para manipular el hierro</i>	26
2.2.1.2. <i>Mecanismos bacterianos para capturar el hierro</i>	27
2.2.1.3. <i>Sideróforos bacterianos</i>	28
2.2.1.4. <i>TolC y el transporte de la enterobactina</i>	31
2.2.2. Inmunidad nutricional: competencia por el zinc.....	32
2.2.2.1. <i>Una mirada desde el hospedador</i>	33
2.2.2.2. <i>Mecanismos bacterianos de captura de zinc</i>	37
3. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE ZINC.....	40
3.1. <i>REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR METALOPROTEÍNAS SENSORAS</i>	40
3.2. <i>EL MODELO DE "PUNTO FIJO"</i>	41
3.3. <i>EL REPRESOR ZUR</i>	43
3.4. <i>EL REGULÓN ZUR Y SU IMPORTANCIA EN LA PATOGÉNESIS</i>	45
3.5. <i>OTROS REGULADORES DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE ZINC</i>	48
4. EL COBRE Y LA PATOGÉNESIS.....	49

MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS	52
2. MEDIOS DE CULTIVO	59
3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ARN.....	59
4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	60
4.1. <i>PCR EN CONDICIONES NORMALES</i>	60
4.2. <i>PCR A PARTIR DE COLONIAS</i>	61
4.3. <i>PCR CON TRASCRIPTASA REVERSA (RT-PCR)</i>	61
4.4. <i>PCR SEMI-CUANTITATIVA</i>	62
4.5. <i>PCR EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA (qRT-PCR)</i>	62
5. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.....	63
6. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	63
7. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES CROMOSOMALES.....	64
8. CONSTRUCCIÓN DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES CROMOSOMALES A <i>LACZY</i>	65
9. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	68
10. TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN	68
11. UTILIZACIÓN DEL BACTERIÓFAGO P22.....	69
11.1. <i>OBTENCIÓN DE LISADOS EN MEDIO SEMISÓLIDO</i>	69
11.2. <i>OBTENCIÓN DE LISADOS DE LA CEPA DADORA EN MEDIO LÍQUIDO</i>	69
11.3. <i>TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA</i>	70
12. TÉCNICAS BIOINFORMÁTICAS	71
13. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA	71
13.1. <i>ENSAYOS DE ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA EN TUBO</i>	71
13.2. <i>ENSAYOS DE ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA EN MICROPLACA</i>	72
14. CRECIMIENTO EN CONDICIONES DE BAJO Zn	73
14.1. <i>CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO</i>	73
14.2. <i>CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO</i>	74
15. ENSAYOS DE SOBREVIDA EN MACRÓFAGOS.....	74
16. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN pZur	74
16.1. <i>PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO</i>	75

16.2.	<i>DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN</i>	75
16.3.	<i>REACCIONES DE LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN</i>	76
16.4.	<i>CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN</i>	76
17.	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ZUR.....	77
18.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	78
19.	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES	78
20.	TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA (" <i>WESTERN BLOT</i> ")	79
21.	FOSFORILACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS	79
22.	PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN MARCADO RADIATIVAMENTE PARA SU UTILIZACIÓN EN LOS ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.....	80
23.	ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	80
24.	CÁLCULO DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO APARENTES A PARTIR DE LOS GELES DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.....	81
25.	DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) PARA METALES.....	82
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
	CAPÍTULO I: La respuesta transcripcional de <i>Salmonella Typhimurium</i> frente a cobre y zinc	84
1.	LA RESPUESTA GLOBAL DE <i>SALMONELLA</i> FRENTE A IONES COBRE Y ZINC	85
2.	INDUCCIÓN DE VÍAS REGULATORIAS GLOBALES Y ESPECÍFICAS EN RESPUESTA A COBRE Y ZINC	87
	CAPÍTULO II: Análisis del regulón Zur de <i>Salmonella Typhimurium</i>	93
1.	LA RESPUESTA DEL REGULÓN ZUR.....	94
2.	BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES DEL REGULÓN ZUR.....	95
3.	ANÁLISIS DE LAS REGIONES PROMOTORAS.....	98
4.	PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>STM14_3193</i> Y <i>STM14_1454</i>	100
5.	LOS GENES <i>STM14_1454</i> Y <i>STM14_3193</i> NO CONFIEREN VENTAJA EN EL CRECIMIENTO EN MEDIO CON BAJO Zn.....	102
6.	<i>STM14_1454</i> Y <i>STM14_3193</i> SON IMPORTANTES PARA LA VIRULENCIA DE <i>SALMONELLA</i>	106

7. EL REPRESOR ZUR PURIFICADO SE UNE A LOS PROMOTORES DE LOS GENES <i>rpmE2</i> , <i>STM14_1454</i> Y <i>STM14_3193</i>	113
8. UNIÓN DIFERENCIAL DEL REPRESOR ZUR A LOS PROMOTORES DE LOS GENES <i>znu</i> , <i>zinT</i> Y <i>rpmE2</i> AL REDUCIR EL Zn DISPONIBLE.....	117
9. INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL JERÁRQUICA DE LOS GENES DEL REGULÓN ZUR.....	119
10. EL REGULÓN ZUR PROPUESTO PARA <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM 14028s.....	124
CAPÍTULO III: La interrelación entre la homeostasis de cobre y de hierro en <i>Salmonella Typhimurium</i>	127
1. LOS GENES QUE CODIFICAN PARA EL SIDERÓFORO DE HIERRO ENTEROBACTINA Y TOLC SE INDUCEN EN PRESENCIA DE COBRE	128
2. EL SIDERÓFORO DE HIERRO ENTEROBACTINA Y TOLC CONTRIBUYEN A LA RESISTENCIA A COBRE	129
CONCLUSIONES	135
REFERENCIAS	138

ABREVIATURAS

ABC	Transportadores con casete de unión a ATP
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina 5' trifosfato
ATPasa	Adenosina 5`trifosfato hidrolasa
BCIP	5-bromo, 4-cloro, 3-indolfosfato
BCWH	Hidrolasas de pared celular bacteriana
BSA	Albúmina sérica bovina
CIM	Concentración inhibitoria mínima
Cm	Cloramfenicol
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNAsaI	Desoxirribonucleasa I
DO	Unidad de densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol bis(β -aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
FL	Fracción sonda libre
FLP	Recombinasa específica
FRT	Sitio de reconocimiento de la FLP
FU	Fracción sonda unida
Fw	Directo
g	Gramo
g/l	Gramos por litro
Gm	Gentamicina
GTP	Guanosina 5' trifosfato
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
K _D	Constante de equilibrio (disociación)
KDa	Kilodaltons
Km	Kanamicina
LB	Luria Bertani
M9	Medio mínimo M9
MF	Transportador de la familia mayor de facilitadores
MFP	Proteína de fusión de membrana
MOI	Multiplicidad de infección
MT	Metalotioneína
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	Ácido N-acetilglutámico
NB	Nutrient Broth
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NGAL	Lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo
NRPS	Síntesis peptídica no ribosomal
nt	Nucleótido
NTS	<i>Salmonella</i> no tifoidea
OEP	Proteína de flujo de membrana
ONPG	O-nitrofenil-galactopiranosido
ORF	Marco de lectura abierto

p	Plásmido
P	Promotor
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
p/v	Peso en volumen
RAW	Células macrofágicas de ratón
RND	Transportador tipo resistencia-nodulación-división
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
Rv	Reverso
SCV	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SN	Sobrenadante
SPB	Proteína de unión a sustrato
SPI	Isla de patogenicidad
STM	<i>Salmonella</i> Typhimurium
T3SS	Sistema de secreción tipo 3
TBE	Buffer Tris-Boro-EDTA
TBS	Buffer Tris salin
Tc	Tetraciclina
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis-(2piridilmetil) etanoldiamina
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
U. M.	Unidades Miller
VB-MM	Medio mínimo Vogel-Bonner
v/v	Volumen en volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
ZIP	Importador de zinc
ZNT	Exportador de zinc
Δ	Delección

RESUMEN

El cobre y el zinc son iones metálicos esenciales, pero tóxicos en exceso. Las bacterias han desarrollado estrategias tanto específicas para dichos iones como no específicas, de manera de controlar la concentración intracelular de ambos metales, asegurando un suministro adecuado y al mismo tiempo evitando su toxicidad. En el primer Capítulo de esta Tesis, comparamos los perfiles transcripcionales de *Salmonella* Typhimurium luego de exponer a la bacteria a un exceso de cobre y zinc por un periodo de tiempo en un medio rico y en un medio mínimo. Además de las vías regulatorias específicas para dichos metales, observamos que muchas vías de respuesta a estrés global también se activan ante un exceso de estos metales. En el segundo Capítulo, nos enfocamos en la respuesta de genes del regulón Zur de *Salmonella* frente a un exceso de cobre y zinc. Reconocimos un patrón de expresión característico de estos genes y, de esta manera, identificamos nuevos genes pertenecientes al regulón. Los genes identificados en esta Tesis codifican para dos proteínas ribosomales que, a diferencia de sus parálogos, no unen iones zinc (RpmE2 y RpmJ2); dos inhibidores de lisozimas tipo G (STM14_1454 y STM14_3193); y por último, un gen que codifica a un ARN pequeño cuyo blanco no ha sido identificado aún (*isrD*). Verificamos los perfiles transcripcionales de estos genes por RT-PCR semicuantitativa y/o por ensayos de actividad β -galactosidasa, y confirmamos que el represor Zur es el responsable de su regulación transcripcional, y que interacciona directamente con los promotores de estos genes. Observamos que la inducción de los genes del regulón Zur responde a distintas concentraciones de zinc en el medio, aconteciendo de manera jerárquica, permitiéndonos proponer un modelo de expresión secuencial donde los genes se transcriben de acuerdo a la severidad de la escasez de zinc a la que la bacteria se enfrenta. Por otro lado, se determinó que los genes STM14_1454 y STM14_3193 no están involucrados en el crecimiento de *Salmonella* en medios con baja concentración de zinc, pero están implicados en la sobrevivencia dentro de células fagocíticas. Por último, en el tercer Capítulo detectamos genes relacionados con la homeostasis de hierro que se inducen ante el agregado de cobre en el medio. Estos hallazgos nos

permitieron establecer la existencia de una nueva vía de detoxificación del cobre donde la enterobactina y el transportador TolC están involucrados.

Introducción

1. SALMONELLA

1.1. EL GÉNERO SALMONELLA

La primera descripción de bacterias del género *Salmonella* se remonta a finales del siglo XIX, cuando Daniel Elmer Salmon y Theobald Smith aislaron *Salmonella Choleraesuis* en muestras tomadas de un cerdo con peste porcina. Ya en 1900 el bacteriólogo francés Joseph Léon Marcel Lignières sugirió que estas bacterias se denominaran *Salmonella*, en honor a Salmon.

Salmonella es un género perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, compuesto de bacilos Gram negativos móviles, anaerobios facultativos ¹. Comprende a las especies *bongori* y *enterica* ², y esta última se divide a su vez en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica*, y *houtenaue*, también denominadas subespecies del grupo I, II, IIIa, IIIb, IV y VI, respectivamente ³. Las distintas subespecies, a su vez se pueden clasificar en serotipos o serovariedades considerando los perfiles de antigenicidad de cada una. Hasta el momento se han identificado más de 2500 serotipos dentro de la subespecie *enterica*, incluyendo a *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* ³. Las cepas en el serogrupo *S. enterica* subesp. *enterica* (*S. enterica*) causan aproximadamente el 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente. Cepas con serotipos pertenecientes a las demás subespecies fueron aislados fundamentalmente de animales de sangre fría y del ambiente, especialmente del acuático ⁴.

A pesar de que son genéticamente muy semejantes, existe una enorme variación en la virulencia y en la epidemiología de los diferentes serotipos de *S. enterica*. Por ejemplo, *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), agente causal de la enfermedad sistémica conocida como fiebre tifoidea o entérica, es un patógeno exclusivo de humanos. La fiebre tifoidea es un problema global, con más de 27 millones de casos a nivel mundial cada año, resultando en una estimación de 217.000 muertes ⁵. Serotipos no tifoideos de *Salmonella* (NTS, de sus siglas en

inglés Non-Typhoidal *Salmonellae*), como *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), infectan múltiples hospedadores y generalmente son responsables de gastroenteritis en humanos y otros animales, la cual es autolimitada en hospedadores previamente sanos. Sin embargo, *S. Typhimurium* provoca una infección sistémica en ratones susceptibles que se asemeja a la fiebre tifoidea, y esto ha sido ampliamente usado como modelo de estudio en patogénesis bacteriana.

Las infecciones por serovares NTS causan un estimado de 93,8 millones de casos y 155.000 muertes a nivel mundial cada año ⁵. Los serotipos NTS son un problema muy importante en África subsahariana, donde el HIV, la malaria y la desnutrición infantil generan estragos en las poblaciones, y los serovares NTS causan bacteriemias severas, tanto en niños como en adultos, con una mortalidad de un 20 al 25% de los casos ⁶.

1.2. CICLO INFECTIVO DE SALMONELLA Y FACTORES DE VIRULENCIA

La infección por *Salmonella* generalmente comienza por la ingestión de agua o alimentos contaminados. Las vías de contaminación con *Salmonella* más comunes se ilustran en la Figura I1. Es un organismo zoonótico y, aunque es un potencial patógeno para humanos y animales, es frecuente encontrar casos de portadores asintomáticos. Los animales conforman el mayor reservorio de *Salmonella*, pero la actividad humana y de otros animales ha resultado en la diseminación de esta bacteria dentro de otros nichos ambientales, y debería ser considerada como un organismo ambiental cuya propagación parecería continuar y aumentar en el futuro ⁷.

En países desarrollados, los serovares NTS generan gastroenteritis o enterocolitis autolimitada en individuos inmunocompetentes, con náuseas, vómitos, diarrea acuosa y dolor abdominal ⁸. Más del 5% de los pacientes desarrollarán una infección bacteriana secundaria, pero la mortalidad asociada a

los serotipos NTS es muy baja (1-5%). *Salmonella* no tifoidea puede persistir en el tracto gastrointestinal luego de pasados los síntomas de la enfermedad, más aún si se utilizó alguna terapia antimicrobiana como tratamiento ⁹. Las bacteriemias causadas por los serotipos NTS ocurren fundamentalmente en grupos de riesgo, como pacientes inmunosuprimidos debido a una infección por HIV, uso de esteroides, cáncer, diabetes, enfermedad renal o hepática o en recién nacidos o ancianos, entre otros factores ¹⁰.

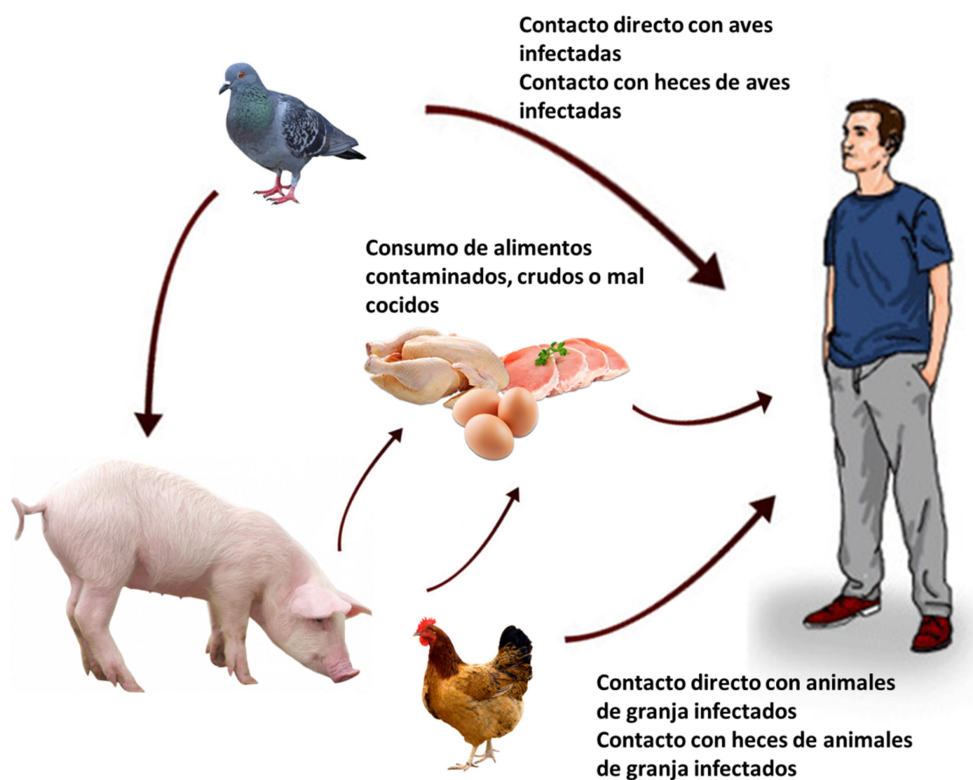


Figura I1. *Vías de infección con Salmonella Typhimurium más comunes.* Los animales conforman el mayor reservorio de *Salmonella*, pero la actividad humana y de otros animales ha resultado en la diseminación de esta bacteria dentro de otros nichos ambientales. Frecuentemente, la fuente de contaminación, particularmente de alimentos procesados y animales, puede correlacionarse con la cepa de *Salmonella* encontrada en el ambiente local.

Salmonella es una bacteria intracelular facultativa. Luego de la colonización del intestino, *Salmonella* penetra en enterocitos, células M y células dendríticas en el epitelio intestinal. De manera subsecuente, aquellas bacterias que alcancen la submucosa pueden ser internalizadas por los macrófagos y ser diseminadas rápidamente a través del sistema reticuloendotelial, acumulándose

en los nódulos linfáticos mesentéricos y el bazo ¹¹. La habilidad de *Salmonella* para sobrevivir en una variedad de células del hospedador es vital para su éxito como patógeno ¹².

En los próximos párrafos se presenta un resumen del repertorio de factores bacterianos y del hospedador que determinan el resultado de una infección, enfocándonos principalmente en el serovar Typhimurium.

1.2.1. Internalización en células del hospedador

La internalización de *Salmonella* en células del hospedador puede ocurrir por al menos dos procesos distintos (Fig. I2). Los fagocitos profesionales, como los macrófagos, utilizan el mecanismo de fagocitosis para reconocer e internalizar bacterias. *Salmonella* también puede inducir su propia internalización en este tipo celular de manera activa utilizando el sistema de secreción tipo III o T3SS1 (T3SS, de sus siglas en inglés Type III Secretion System). Los T3SS son complejos proteicos capaces de transportar proteínas efectoras directamente desde el citoplasma bacteriano al citosol de la célula hospedadora. Estos efectores modulan procesos celulares para el beneficio del patógeno, como la arquitectura del citoesqueleto, el tráfico de membranas, la transducción de señales y la replicación ¹³⁻¹⁵. Los T3SS son estructuras especializadas que exhiben secreción dependiente de contacto, y consisten en un complejo con forma de aguja, que permite que las proteínas secretadas pasen a través de las membranas bacterianas interna y externa, y un aparato de exportación, que crea un poro en la membrana de la célula hospedadora ¹⁶.

En un proceso extremadamente coordinado un pequeño grupo de proteínas efectoras (SipA, SipC, SopB/SigD, SopD, SopE2 y SptP) inducen un dramático rearrreglo del citoesqueleto de actina, concentrándose en la membrana e iniciando lo que se conoce como *ruffling*, dando lugar a la rápida internalización de la bacteria (para conocer más en detalle este mecanismo referirse al trabajo de McGhie y col. ¹⁷). Además de la fagocitosis y de la invasión mediada por el T3SS1, las fimbrias y las adhesinas de tipo no fimbriales de la

superficie de *Salmonella* también pueden mediar la unión e internalización a través de un mecanismo independiente del T3SS1 ¹⁸.

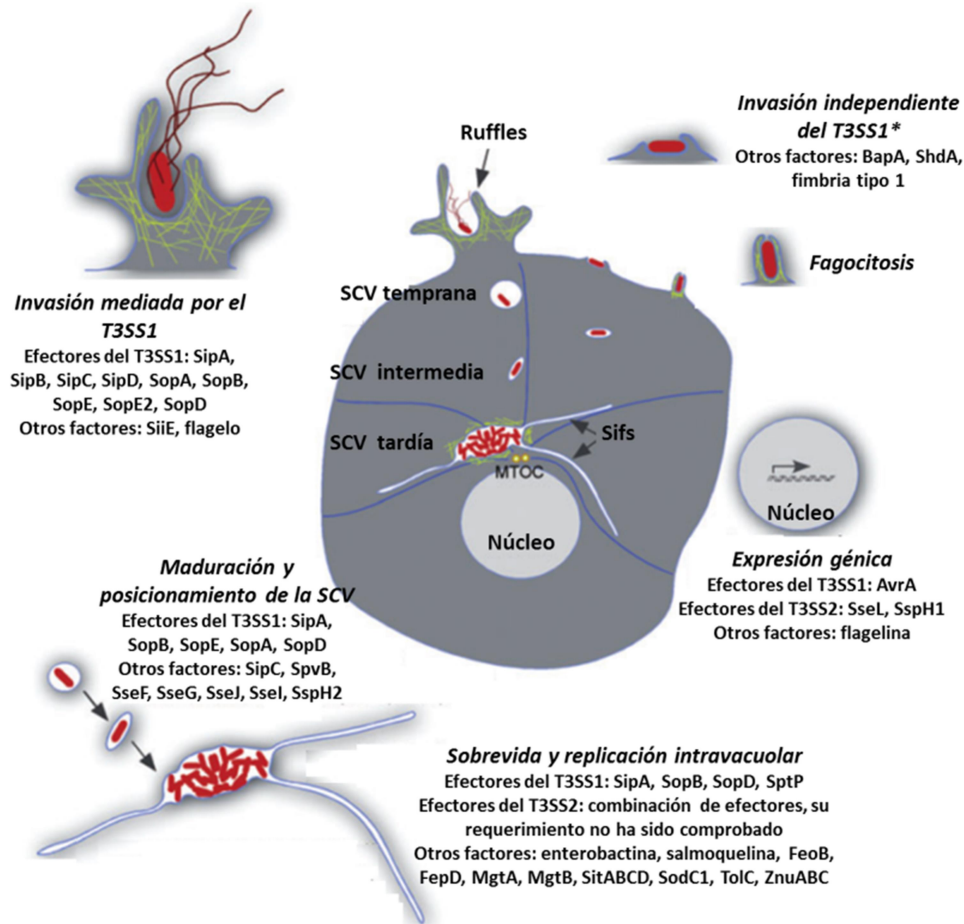


Figura 12. Factores de virulencia involucrados en la sobrevida intracelular de *Salmonella*. La bacteria puede ingresar a la célula hospedadora mediante invasión mediada por el T3SS1 o por fagocitosis. Además, en varios tipos celulares puede ocurrir un tipo de invasión independiente del T3SS1*, que es mediado por las fimbrias o adhesinas no fimbriales. Luego de la internalización, *Salmonella* se mantiene en un fagosoma modificado conocido como Vacuola que Contiene a *Salmonella* (SCV). La biogénesis de la SCV y su translocación al centro organizador de microtúbulos (MTOC) involucra interacciones con la vía endocítica del hospedador y con los microtúbulos, esto es mediado por una variedad de efectores proteicos del T3SS1 y T3SS2. La sobrevida y la replicación dentro de la SCV dependen de factores involucrados en la captura de nutrientes y en eludir mecanismos antibacterianos. Las líneas amarillas y azules representan la actina, asociada con la invasión y la SCV, y los microtúbulos, requeridos en el posicionamiento de la SCV y la formación de los Sifs, respectivamente. Adaptado de Ibarra y Steele-Mortimer, 2009.

1.2.2. La vacuola que contiene a *Salmonella*

Luego de la internalización, *Salmonella* sobrevive y se replica dentro de un fagosoma modificado denominado Vacuola que Contiene a *Salmonella* (SCV, del inglés *Salmonella*-Containing Vacuole), la cual se destaca inicialmente por la acumulación de marcadores endosomales tempranos. Estos marcadores tempranos son rápidamente removidos y, dentro de los 60 a 90 minutos luego de la invasión, las SCVs se ven enriquecidas en marcadores endosomales tardíos y lisosomales, particularmente por glicoproteínas lisosomales ¹⁹. Al mismo tiempo, la SCV se moviliza desde la periferia de la célula a una posición yuxtannuclear, en el centro organizador de microtúbulos ^{20,21}. El comienzo de la replicación intracelular se acompaña en algunos tipos celulares por la aparición de filamentos denominados Sifs (por *Salmonella*-Induced Filaments), que consiste en una red de túbulos membranosos que irradian desde la SCV ²².

1.2.3. Factores de virulencia que afectan la sobrevivencia intracelular de *Salmonella*

Mientras que el T3SS1 transloca proteínas efectoras involucradas en la invasión de *Salmonella*, esta bacteria además codifica para el T3SS2 que funciona como puerta para el intercambio de material entre la SCV y el citoplasma del hospedador ²³, translocando efectores a través de la membrana fagosomal para promover la replicación intracelular y la diseminación sistémica ²⁴. *Salmonella* codifica también para un sistema de secreción tipo I, las fimbrias, el flagelo y transportadores de iones, que se ha demostrado que tienen roles importantes en el establecimiento y mantenimiento del nicho intracelular. Muchos de estos factores requeridos para la virulencia se encuentran codificados en islas de patogenicidad en el cromosoma, que en *Salmonella* se denominan SPI (por *Salmonella* Pathogenesis Islands). De hecho, T3SS1 y T3SS2 se encuentran codificados en la SPI1 y SPI2, respectivamente ^{13,17}. Como se mencionó anteriormente, los procesos de invasión y post-invasión tempranos están modulados por el T3SS1, el flagelo, las fimbrias y las adhesinas no fimbriales; y, a continuación se inducen el T3SS2 y los factores para la adquisición de nutrientes

y la evasión de mecanismos antibacterianos ²⁵. Todos estos eventos complejos se encuentran temporalmente solapados en el tiempo ¹². En la Figura I2 se resumen algunos de los efectores implicados en estos procesos arriba mencionados.

En los últimos 20 años hubo un gran progreso en el entendimiento de cómo *Salmonella* es capaz de interactuar con las células del hospedador. Sin embargo, muchas preguntas aún quedan sin responder.

1.3. SUPERVIVENCIA DE SALMONELLA EN EL MEDIO AMBIENTE

A diferencia de otras bacterias patógenas, *Salmonella* tiene la capacidad de persistir y proliferar en el medio ambiente, aún frente a variaciones en la temperatura, osmolaridad, pH y disponibilidad de nutrientes, desarrollando un estilo de vida cíclico hospedador-ambiente-hospedador ²⁶. Si bien el paradigma actual indica que el hospedador animal es el hábitat primario de esta bacteria entérica, la misma es frecuentemente aislada de diferentes fuentes acuosas que sirven como reservorio bacteriano y pueden facilitar la transmisión entre hospedadores ²⁶. Además puede estar ampliamente diseminada en suelos y sedimentos ²⁷. Las partículas de suelo funcionan como nichos microecológicos en los cuales las bacterias pueden sobrevivir y replicarse. Se ha observado que *Salmonella* posee una amplia capacidad de adhesión que le permite establecerse en la superficie de partículas sólidas, de donde obtiene nutrientes, se replica y protege de la acción de protozoos predadores ^{4,28}.

Si se la compara con *Escherichia coli*, uno de los géneros más cercanos ²⁹, *Salmonella* puede soportar mayores fluctuaciones ambientales y puede persistir en ambientes acuosos por más tiempo ²⁶. Esta capacidad adaptativa sugiere que esta bacteria cuenta con un repertorio de genes que le permiten adaptar su metabolismo a las diversas condiciones a las que se enfrenta. De hecho, *Salmonella* posee un número importante de genes que están ausentes en otras especies entéricas relacionadas, y que no serían requeridos para la virulencia

^{26,29}, y es posible que los mismos estén involucrados en su supervivencia fuera del hospedador. En los nichos donde suele aislarse esta bacteria se distinguen ambientes ricos en metales pesados ³⁰. Aunque los metales se encuentran principalmente secuestrados como depósitos de minerales, con la industrialización, grandes cantidades de éstos fueron extraídos, liberados y dispersados sobre la superficie terrestre, proceso que está aumentando exponencialmente. Sumado a esto y a diferencia de la mayoría de los contaminantes orgánicos, los metales pesados son persistentes y por lo tanto se acumulan en el medio ambiente ³¹. En los últimos años se ha observado un gran incremento en la resistencia microbiana a metales, en la que se involucran tanto el desarrollo o la adquisición de mecanismos de resistencia por medio de transferencia horizontal de genes ³².

2. HOMEOSTASIS DE METALES PESADOS: SU VINCULACIÓN CON LA PATOGENESIS

Durante el proceso infeccioso *Salmonella* se enfrenta a diversos microambientes que le imponen diferentes tipos de estrés. Luego de la ingesta, *Salmonella* debe sobrevivir al pH ácido estomacal antes de poder llegar al intestino delgado ³³. En el caso de una gastroenteritis localizada, la respuesta del sistema inmune es prominente ^{34,35}. Durante la infección sistémica, la bacteria atraviesa la barrera intestinal mediante su dispersión dentro de fagocitos profesionales para colonizar diversos tejidos, donde se formarán los focos sistémicos de la infección ³³. La destreza de *S. enterica* sv. Typhimurium de sobrevivir dentro de la SCV en estos fagocitos es crucial para la virulencia durante una infección sistémica, a pesar de los mecanismos antibacterianos que se gatillan dentro de este compartimento ³⁶, y que incluyen a especies reactivas del oxígeno que provienen de la cadena respiratoria, la producción de óxido nítrico catalizado por una óxido nítrico sintasa inducible, la reducción del pH debido a la ATPasa vacuolar, la fusión de lisosomas que cargan hidrolasas y

péptidos catiónicos antimicrobianos, así como también la fluctuación en los niveles de metales intravacuolares ³⁷⁻⁴².

2.1. EL REQUERIMIENTO DE METALES EN LOS SERES VIVOS

Los metales poseen una conductividad térmica y eléctrica elevada, y todos son sólidos a temperatura ambiente, a excepción del mercurio. Los seres vivos requieren iones metálicos para su desarrollo normal. Algunos como Na(I), Mg(II), K(I) y Ca(II) son requeridos en grandes cantidades mientras que otros son necesarios en cantidades trazas ⁴³. Entre estos últimos encontramos metales de transición como Mn, Fe, Co, Ni, V, Mo, Zn, Cu y W que se caracterizan por tener la misma configuración electrónica de su capa *s* pero diferir en sus orbitales *d*. Los orbitales *d* incompletos permiten que los metales formen compuestos complejos con cuatro o seis ligandos, que generalmente son elementos no metálicos como nitrógeno, oxígeno o azufre con electrones libres. Los metales de transición como el hierro, el manganeso, el cobre, el zinc, cobalto y níquel, tienen numerosos roles biológicos, formando parte de numerosas proteínas, funcionando como elementos estructurales o como cofactores en enzimas. Algunos de éstos participan en la transferencia de electrones, en el balance osmótico de la célula o como componentes de metaloenzimas ⁴⁴⁻⁴⁷, y son incorporados frecuentemente a las metaloproteínas, incluyendo metaloenzimas, proteínas de almacenamiento y factores de transcripción, por lo que estos micronutrientes son esenciales para sostener la vida ⁴⁸.

La importancia de los metales de transición en la fisiología celular puede deducirse por el análisis de las bases de datos de proteínas, las cuales predicen que aproximadamente un 30 % de todas las proteínas interaccionan con un cofactor metálico ^{47,49}. Particularmente, el correcto funcionamiento del sistema inmune de vertebrados depende de los metales de transición y una deficiencia en ellos puede afectar la respuesta inmune innata y adaptativa ⁵⁰. Sin embargo, su

exceso puede causar toxicidad, ya que pueden desplazar a otros metales de sus sitios de unión en otras proteínas inhibiendo su actividad o, en caso de los metales con actividad redox, como el hierro y el cobre, su participación en reacciones tipo Fenton puede promover la generación de radicales hidroxilos altamente tóxicos que dañan a biomoléculas como el ADN, proteínas y lípidos ⁵¹. Por lo tanto, evolutivamente se han desarrollado mecanismos que de alguna manera permitan detectar las variaciones de estos elementos esenciales y adaptarse para asegurar la viabilidad celular.

Existe además un grupo de metales de transición a los que aún no se les conoce un rol biológico y son comúnmente denominados metales pesados o tóxicos, entre los que se destacan Au, Ag, Hg, Cd y Cr ^{52,53}.

2.2. INMUNIDAD NUTRICIONAL

La disponibilidad de metales en el ambiente puede variar debido a muchos factores incluyendo el nivel de oxígeno, pH y la presencia de materia orgánica, sulfatos y carbonatos ⁵⁴. El requerimiento de un determinado metal puede alterarse debido a cambios en la actividad metabólica y la producción enzimática, pero también puede afectarse por su disponibilidad ambiental ⁵⁵⁻⁵⁸. Durante la infección, *S. Typhimurium* se enfrenta con cambios dramáticos en la disponibilidad de ciertos metales esenciales, tanto intra- como extracelularmente. En parte esto está vinculado a la liberación por parte del hospedador de proteínas antimicrobianas que unen estos metales en conjunto con cambios generalizados en la homeostasis metálica en respuesta a la infección. Un ejemplo es la expresión de la hormona hepcidina que altera la homeostasis del hierro ^{59,60}. Una de las respuestas por parte de los macrófagos a la infección por *Salmonella* y a la exposición a citoquinas y otros mediadores de la inflamación, es la disminución de los niveles de zinc intracelulares y un aumento de los niveles de cobre ^{61,62}. Esta estrategia que utilizan los vertebrados

de secuestrar un nutriente esencial, es un fenómeno que se conoce como **INMUNIDAD NUTRICIONAL** ⁶³. La sobrevida de *S. Typhimurium* dentro del hospedador requiere entonces que pueda protegerse contra la toxicidad mediada por ciertos metales a la vez que compita eficientemente con el hospedador para la captación de metales que le son esenciales.

2.2.1. Inmunidad nutricional relacionada al hierro

El ejemplo más estudiado de inmunidad nutricional es el secuestro de hierro por parte del hospedador, incluso este término fue acuñado originalmente para referirse a esta restricción en la disponibilidad del hierro, pero luego se aplicó a los mecanismos para manipular otros metales esenciales o para referirse a la toxicidad de estos metales dirigida contra los invasores microbianos ^{63,64}. El hierro es un cofactor esencial y, como tal, juega un papel crucial en diversos procesos fisiológicos, como la replicación del ADN, la transcripción y el metabolismo central ⁴⁸. El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre y es el metal de transición más abundante en el cuerpo humano. De los metales redox activos, el hierro es el más utilizado, seguido por el cobre y el molibdeno. En eucariotas aproximadamente el 50% de las proteínas que contienen hierro no hemo son oxidorreductasas o proteínas de transferencia de electrones. El hierro tipo hemo es también un importante cofactor en la respiración y para varios otros procesos metabólicos y biosintéticos ⁴⁸.

Se han caracterizado numerosos factores bacterianos y del hospedador que son críticos en su competencia en la adquisición del hierro. En esta competencia el hospedador limita el contenido de este nutriente esencial en los sitios de infección (Fig. I3), mientras que diversos patógenos han elaborado mecanismos alternativos para su captación ^{63,64}.

2.2.1.1. Mecanismos del hospedador para manipular el hierro

En vertebrados, la mayor parte del hierro se encuentra unido al grupo hemo, un anillo de tetrapirol que une un átomo de Fe(II). El grupo hemo es el cofactor en la hemoglobina, la proteína transportadora de oxígeno. Esta proteína, además, se encuentra dentro de los eritrocitos. Ante la liberación de hemoglobina o el grupo hemo por mecanismos de lisis celular, estas moléculas son rápidamente capturadas por la haptoglobina y la hemopexina, respectivamente

65.

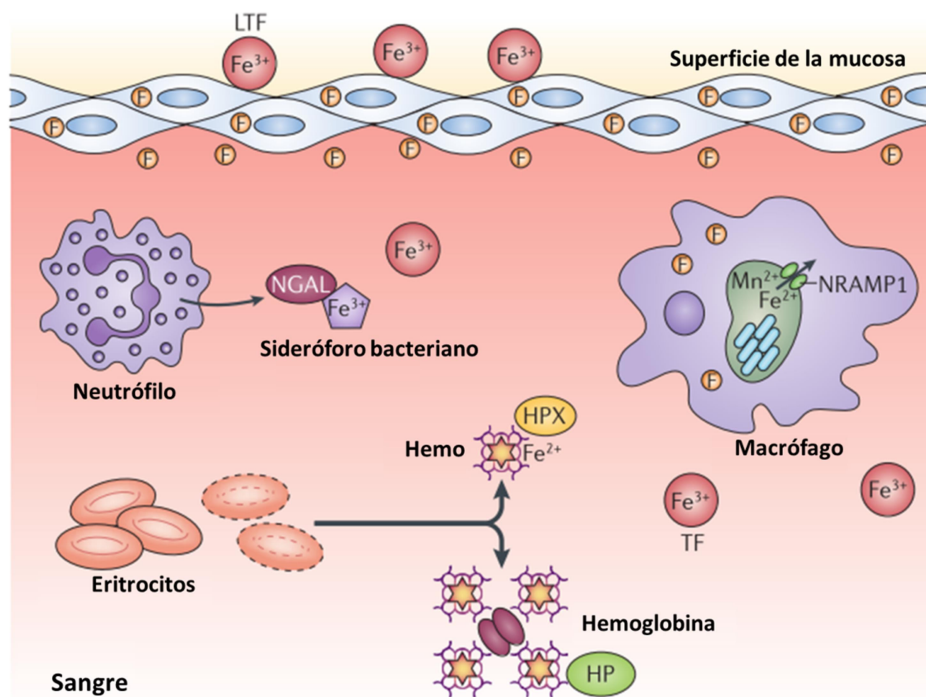


Figura 13. Limitación del hierro durante una infección bacteriana. Se muestra el panorama de las estrategias en un hospedador vertebrado. El Fe^{3+} se almacena intracelularmente complejo con la ferritina (F), unido a la transferrina del suero (TF) o a la lactoferrina (LTF) en las superficies de las mucosas. En la sangre, el Fe^{2+} se encuentra formando un complejo con el grupo hemo, el cual se encuentra unido a la hemoglobina dentro de los glóbulos rojos. Cuando se produce la lisis de los eritrocitos, la hemoglobina es unida por la haptoglobina (HP), y el grupo hemo libre es secuestrado por la hemopexina (HPX). Además de estas proteínas de unión de hemo, la lipocalina asociada a la gelatinasa de los neutrófilos (NGAL) une y secuestra los sideróforos bacterianos que quelan el Fe^{3+} . La proteína de los macrófagos asociada a la resistencia natural 1 (NRAMP1) se localiza en la membrana del fagosomal, donde bombea Fe^{2+} y Mn^{2+} fuera del compartimento fagosomal, reduciendo abruptamente el acceso a estos metales. Adaptado de Hood y Skaar, 2012.

El hierro también se almacena intracelularmente, como Fe(III), en la proteína de almacenamiento ferritina. Además, la proteína de macrófago asociada a la resistencia natural 1 (NRAMP1) se localiza en la membrana fagosomal, donde expulsa Fe(II) y Mg(II) fuera del compartimento fagosomal reduciendo aún más el acceso de estos metales por parte de patógenos que residan dentro del fagosoma ^{66,67}. El Fe(III) también puede unirse con alta afinidad a la lactoferrina, una glicoproteína globular de la familia de la transferrina presente en secreciones como la leche materna, lágrimas y saliva; la lactoferrina se encuentra además formando los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares, siendo entonces un componente crucial de la respuesta innata de las mucosas ⁶⁸.

2.2.1.2. Mecanismos bacterianos para capturar el hierro

Los patógenos han desarrollado mecanismos que le permiten escapar a la inmunidad nutricional. En el caso del hierro, estas estrategias son numerosas y variadas. Quizás la táctica más elegante desarrollada por las bacterias para evitar la escasez de hierro es el caso de *Borrelia burgdorferi*, el agente causal de la enfermedad de Lyme, este patógeno sustituyó al hierro por el manganeso dentro de sus enzimas, por lo que no requiere hierro para infectar a su hospedador ⁶⁹.

Las estrategias de adquisición de hierro pueden dividirse en producción de sideróforos y sistemas de adquisición de hemo y Fe(II) libre. Los sideróforos son quelantes de hierro de masa molecular pequeña secretados por bacterias que unen Fe(III) con una afinidad que supera a la de la transferrina y lactoferrina ⁷⁰. Como estas moléculas son muy grandes para difundir a través de porinas no selectivas de la membrana de bacterias Gram negativas, el transporte de sideróforos depende de energía. El periplasma carece de ATP o de gradientes iónicos que puedan dirigir el transporte a través de la membrana externa. Por lo tanto, el sistema TonB-ExbB-ExbD aprovecha la energía generada en la membrana interna por el gradiente de protones para mediar el transporte a través de la membrana externa. En el periplasma, las proteínas de unión a sustrato (SBPs, de sus siglas en inglés Substrate-Binding Proteins), que en este

sistema son miembros de la familia de transportadores tipo ABC (del inglés ATP-Binding Cassette), reconocen el complejo sideróforo-Fe(III) y en última instancia, lanza el complejo al transportador tipo ABC correspondiente. Las bacterias Gram positivas también expresan las proteínas SBPs, pero en este caso se encuentran ancladas a la membrana citoplasmática. Tanto en Gram positivos como en Gram negativos, cuando el complejo sideróforo-Fe(III) llega al citoplasma, la liberación del Fe(III) se produce por la reducción del hierro a Fe(II) o por la degradación del sideróforo. El resultado es la liberación del Fe(II) para ser utilizado por la bacteria.

2.2.1.3. *Sideróforos bacterianos*

Para poder adquirir el hierro en un ambiente limitante en este metal, las bacterias sintetizan y secretan compuestos de bajo peso molecular, llamados sideróforos, que tienen una gran afinidad para unir Fe^{3+} . La mayoría de los sideróforos son producidos por el mecanismo de síntesis peptídica no ribosomal (NRPS, de las siglas en inglés para Non-Ribosomal Peptide Synthesis), son pequeños polipéptidos que contienen cadenas laterales y grupos funcionales que proveen una alta afinidad para coordinar iones férricos ^{71,72}. Un ejemplo de esto es la síntesis del sideróforo enterobactina. Los pasos finales de este camino los realizan las proteínas Ent (codificadas por los genes *entD*, *entF* y *entCEBA*) ^{73,74}. La transcripción de estos genes se encuentra bajo el control del represor Fur en *Salmonella Typhimurium* entre otras bacterias ^{75,76}. Fur es una proteína de unión al ADN que reconoce secuencias específicas, utiliza Fe^{2+} o Mn^{2+} como correpresor, y bloquea la transcripción de sus genes blanco ⁷⁷. Por lo tanto, el control transcripcional de la síntesis de la enterobactina se encuentra regulado por la concentración intracelular del ión ferroso (Fe^{2+}) ⁷⁸; cuando la concentración de Fe^{2+} es baja, se induce la producción del sideróforo ⁷⁹. Los sideróforos unidos al hierro son subsecuentemente transportados dentro de la célula para abastecerla de este metal. La Figura I4 muestra las estructuras de varios sideróforos bacterianos.

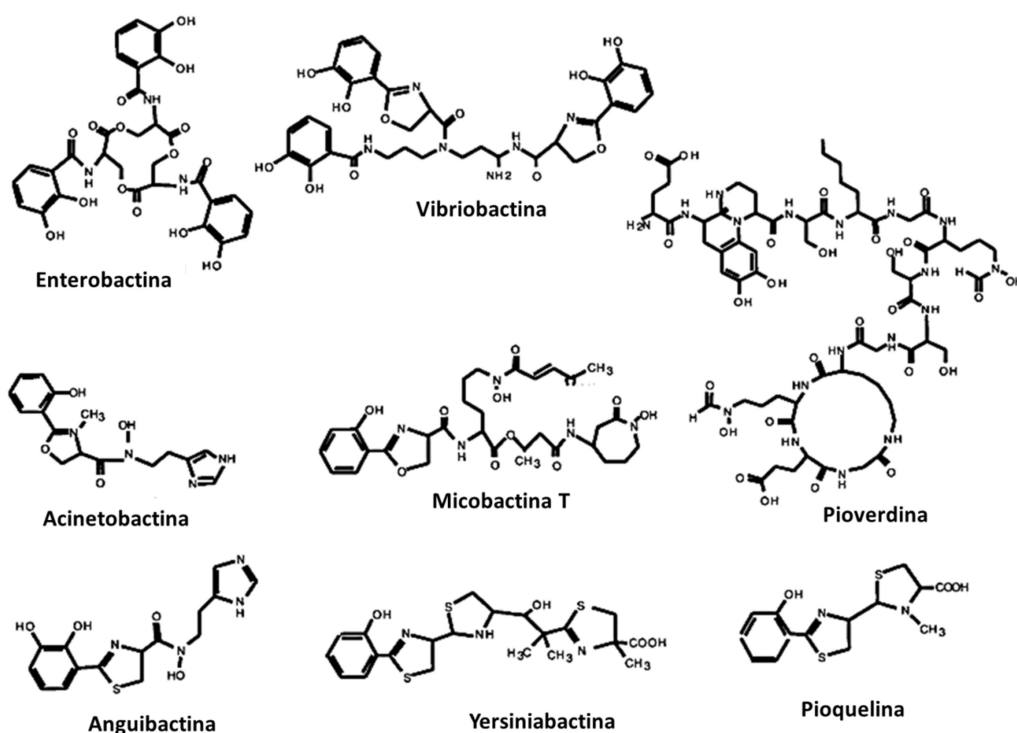


Figura 14. Estructuras de varios sideróforos bacterianos. Se muestran las estructuras químicas de la enterobactina de *E. coli*; la vibriobactina de *V. cholerae*; la acinetobactina de *Acinetobacter calcoaceticus*; la micobactina T de *M. tuberculosis*; la pioverdina y pioquelina de *P. aeruginosa*; la anguibactina de *V. anguillarum*; y la yersiniabactina de *Y. pestis*. Tomado de Crosa y Walsh, 2002.

Existen tres tipos principales de grupos funcionales de coordinación dentro de los sideróforos. El primer grupo consiste en cadenas laterales de N-hidroxiaminoácidos, como en la anguibactina, siendo el átomo de oxígeno uno de los ligandos para el Fe^{3+} . En segundo lugar, se encuentran los hidroxilos adyacentes de los anillos de catecoles, casi siempre derivados del 2,3-dihidroxibenzoato (DHB), como los que se encuentran presentes en la enterobactina, anguibactina y acinetobactina. Algunas variantes pueden involucrar motivos fenólicos como ligandos del hierro. Las tres cadenas laterales de catecolatos en la enterobactina de *E. coli* generan una geometría de coordinación hexadentada perfecta para unir el ión férrico con una K_D estimada de 10^{-52} M, convirtiendo a la enterobactina en un sumidero de hierro extraordinariamente bueno ⁷² (Fig. 15). La tercer clase de ligandos consisten en átomos de nitrógeno de anillos pentaédricos generados por la ciclación enzimática de las cadenas laterales de cisteína, serina o treonina. Este tipo de

coordinación es una característica común en los sideróforos pioquelina, yersiniabactina, vibriobactina, anguibactina y acinetobactina ^{80,81}.

Para impedir la adquisición de hierro debido a la producción de sideróforos bacterianos, los vertebrados producen lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo (NGAL, de sus siglas en inglés Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin; también conocida como lipocalina 2 o siderocalina), que une y secuestra ciertos sideróforos ⁸². Sin embargo, algunas bacterias pueden producir sideróforos modificados químicamente que no son reconocidos por la lipocalina 2 ^{83,84}.

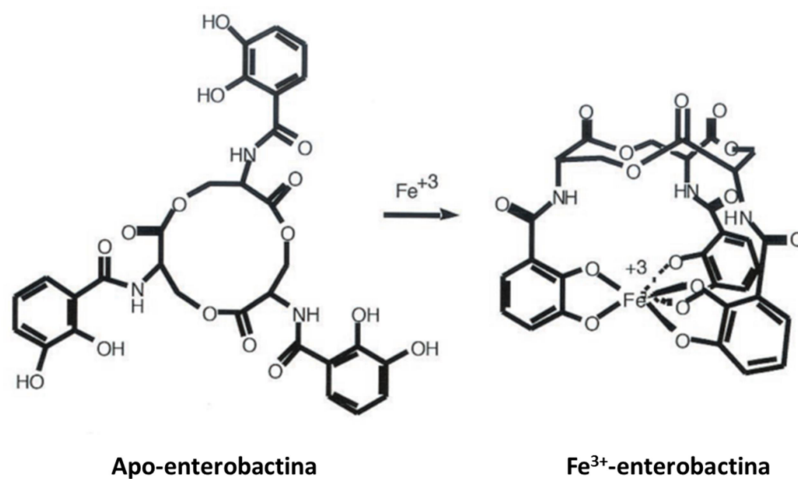


Figura 15. Estructuras espaciales de la apo-enterobactina y de la enterobactina acomplejada al hierro. Se muestra con claridad a los grupos que coordinan al Fe³⁺, los cuales consisten en seis átomos de oxígeno provenientes de tres grupos difenólicos. Este complejo requiere una sólo molécula de enterobactina. Adaptado de Crosa y Walsh, 2002.

La inmunidad nutricional no es una estrategia exclusiva de vertebrados, muchas plantas también utilizan este mecanismo para manejar sus reservas de hierro e impedir su captación por parte de patógenos ⁸⁵⁻⁸⁷. Claramente, la inmunidad nutricional generada por el hierro es una estrategia del sistema inmune innato dentro de los distintos reinos de la vida.

2.2.1.4. *TolC y el transporte de la enterobactina*

TolC pertenece a la familia de proteínas de flujo de membrana externa (OEP, de las siglas para Outer membrane Efflux Proteins), cuyos miembros funcionan en conjunto con tres tipos de sistemas de transportadores: los del tipo ABC que poseen un casete de unión al ATP, los del tipo resistencia-nodulación-división (RND), y la familia mayor de facilitadores (MF) ⁸⁸. La asociación entre los transportadores y las OEPs se encuentra mediada por proteínas periplásmicas llamadas proteínas de fusión a membranas (MFPs, de sus siglas en inglés Membrane Fusion Proteins) ⁸⁹. En la Figura I16 se muestra el modelo de estas asociaciones. La característica principal de este modelo es que TolC y otras OEPs se expanden por la membrana externa hacia el periplasma.

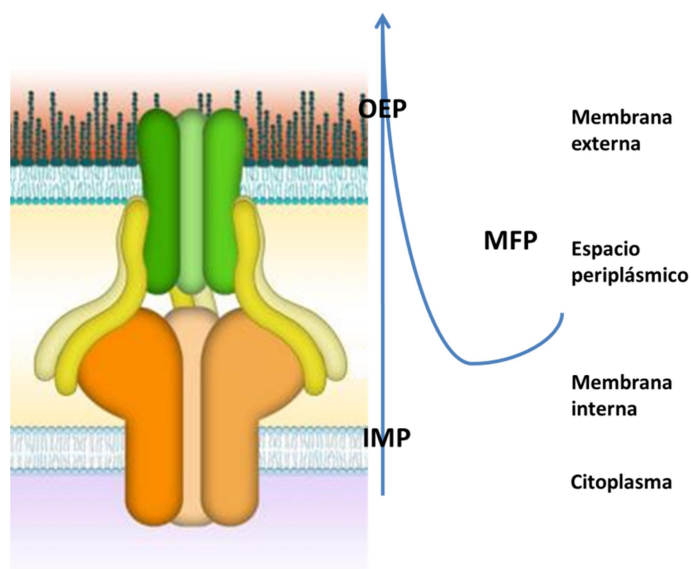


Figura I6. Modelo de la disposición espacial adoptada por las OEPs, IMPs y las MFPs. El flujo puede ser llevado a cabo desde el citoplasma o bien desde el periplasma, dependiendo de las proteínas que estén participando en el transporte. Adaptado de Kim y col., 2011.

TolC de *E. coli* se encuentra implicado en la exportación de sideróforos que son requeridos para la adquisición de hierro ^{90,91}. La captura de hierro en respuesta a su escasez dentro de la célula se atribuye a la enterobactina, la cual es secretada al medio, y luego de secuestrar el hierro, es transportada nuevamente al interior celular como enterobactina férrica (Fig. I7). La delección de *tolC* resulta en una pérdida total en la exportación de la enterobactina y de la captura del hierro. ⁹²

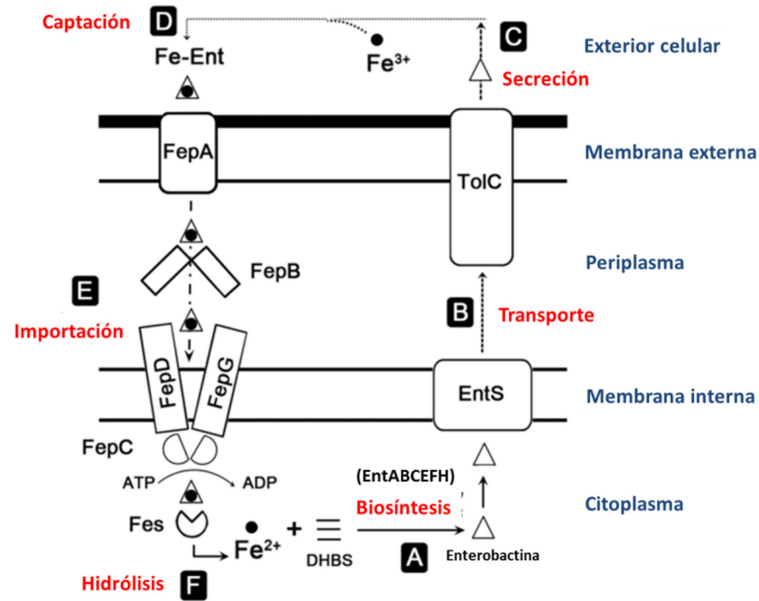


Figura 17. Representación esquemática de la biosíntesis de enterobactina y su transporte en *E. coli*. Se enumeran los distintos pasos del ciclo de la enterobactina: **(A)** síntesis de la enterobactina por los productos de los genes del locus *entABCEFH*; **(B)** la enterobactina es transportada hacia TolC vía EntS; **(C)** la enterobactina sale de la célula vía TolC; **(D)** FepA une y transporta el complejo Fe^{3+} -enterobactina hacia el periplasma; **(E)** FepB une la enterobactina férrica en el periplasma, y las proteínas de membrana interna FepCDG la importa hacia el citoplasma; **(F)** la proteína Fes degrada la enterobactina, liberando el hierro para que sea utilizado en las reacciones citoplasmáticas y creando fragmentos de DHBS (mono-, di- y tri-dihydroxybenzoilserina, los cuales son quelantes de hierro también) a partir de la enterobactina. Adaptado de Vega y Young, 2014.

2.2.2. Inmunidad nutricional: competencia por el zinc

Al igual que el hierro, el zinc es un nutriente esencial responsable del mantenimiento de la estructura y de la actividad catabólica de diversas proteínas, así como de la estabilización de diferentes motivos presentes en reguladores transcripcionales en los que este metal de transición forma parte de estructuras como los denominados dedos de zinc, los anillos de zinc o los dominios LIM^{93,94}.

En mamíferos las concentraciones de zinc son muy variables. Así, pueden ser limitantes en el plasma ⁹⁵, donde mayoritariamente se encuentra unido a proteínas como la albúmina o la α 2-macroglobulina; mientras que en otros fluidos como el semen pueden ser mucho más altas, llegando a 53 $\mu\text{g}/\text{ml}$, niveles que resultan potencialmente tóxicos para microorganismos como *N. gonorrhoeae* ⁹⁵. Esta variabilidad hace que ciertas bacterias patógenas hayan desarrollado también sistemas de control para la homeostasis de este metal.

Existen más de 300 enzimas bacterianas dependientes de zinc por su papel en la estabilidad estructural o para su actividad catalítica. La concentración en el ambiente de este elemento necesaria para el desarrollo de bacterias es de 0.5-1 μM ⁹³. Sin embargo, elevadas concentraciones de zinc pueden resultar nocivas ya que, entre otros efectos, puede producir la inhibición de la respiración por el daño directo de algunos citocromos ⁹⁶, o interferir por competencia en la unión de otros iones metálicos que, como el propio Zn, se encuentran en centros catalíticos o estabilizando determinadas estructuras proteicas ⁹⁷. Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos de control de los sistemas de adquisición y de exportación de este metal al exterior debido a las fluctuaciones que encuentran en la concentración de zinc en mamíferos ⁹⁵ y en el ambiente.

2.2.2.1. Una mirada desde el hospedador

El zinc es el segundo metal de transición más abundante en vertebrados y se estima que interactúa con alrededor del 10% de sus proteínas ⁹⁸. Los niveles de zinc en tejidos puede variar desde 0,8 $\mu\text{g}/\text{g}$ en el suero, hasta 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{g}$ en el bazo, hígado y riñones ^{99,100}. En vertebrados, el zinc funciona como cofactor en proteínas y puede tener tanto un rol estructural como catalítico. Este metal es crítico para el mantenimiento inmunológico, incluso una leve deficiencia de zinc resulta en defectos tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa ⁵⁰. A pesar que una insuficiencia de zinc resulte en efectos pleiotrópicos en el sistema inmune, evidencias recientes sugieren que el hospedador secuestra activamente este metal durante una infección para impedir el crecimiento bacteriano ¹⁰¹⁻¹⁰⁵.

Los avances técnicos que permiten imágenes de la distribución de metales dentro de secciones de tejidos muestran el secuestro de zinc durante la infección microbiana. Por ablación láser acoplada a la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (LA-ICP-MS, de sus siglas en inglés Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) se observó que un absceso causado por *Staphylococcus aureus* se encuentra virtualmente depletado de zinc, a niveles indetectables. Esto contrasta con el alto nivel de zinc presente en los tejidos sanos circundantes ¹⁰¹. Aunque no se conocen los factores responsables de este secuestro de zinc, la carencia de este nutriente en estos abscesos parece ser una estrategia para el control de la infección.

El sistema inmune mantiene el equilibrio del zinc mediante tres mecanismos: el transporte, el almacenamiento y la unión de este metal (Fig. I8). Mientras que los eucariotas más simples como los hongos poseen unos pocos transportadores de Zn(II) ¹⁰⁶, los mamíferos poseemos hasta 24 transportadores, llamados ZIPs (SLC39a, importadores) y ZNTs (Slc30a, exportadores). Algunos transportadores tienen un patrón de expresión ubicuo y otros exhiben una especificidad de tejido y una función irreemplazable. Por ejemplo, Slc30a1 se expresa en diferentes órganos, mientras que Slc39a4 se encuentra solo en riñón e intestino delgado, y es absolutamente esencial para la absorción del zinc de la dieta ¹⁰⁷. La organización espacial de los transportadores regula el zinc en el citosol y en compartimentos intracelulares incluyendo el complejo de Golgi, las mitocondrias y los zincosomas, que son una fuente del metal durante su deficiencia ¹⁰⁸. La complejidad de los transportadores de zinc refleja la necesidad de una homeostasis estricta y de un sistema regulatorio que responda a los diferentes estímulos biológicos de manera específica, ya sea en una organela, una célula o un tejido. Por ejemplo, la interleuquina 6 induce el importe de zinc vía el transportador ZIP14 en hepatocitos ¹⁰⁹, mientras que el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos gatilla la captación de zinc por medio de ZIP2 en macrófagos ¹¹⁰.

Las células fagocíticas y las células presentadoras de antígeno del sistema inmune capturan bacterias en fagosomas, que luego se fusionan con lisosomas quedando las bacterias a merced de un ataque de factores antimicrobianos. ZIP8,

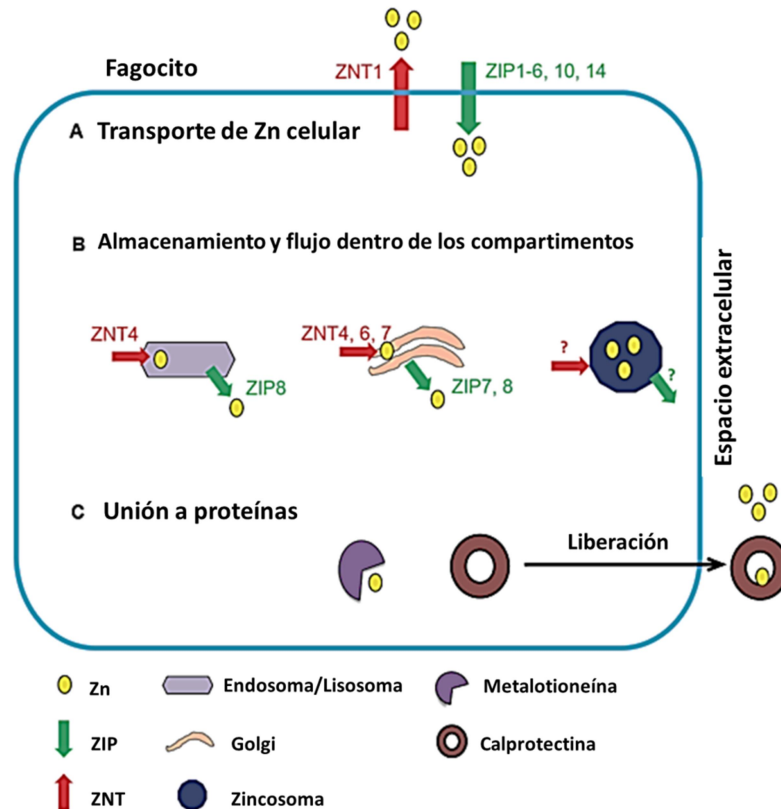


Figura 18. Esquema de la regulación de Zn en fagocitos. Los mecanismos de regulación de zinc en fagocitos pueden agruparse en tres categorías: el transporte del Zn^{2+} , el almacenamiento y la unión del metal. (A) El transporte del Zn^{2+} a través de la membrana es mediado por los transportadores ZIPs y ZNTs. (B) El Zn^{2+} intracelular es transportado hacia y almacenado en organelas como los endosomas, lisosomas, Golgi y zincosomas por medio de varios transportadores representados en la figura; los transportadores que median el tráfico de zinc en los zincosomas no se han identificado aún. (C) El Zn^{2+} se une y es secuestrado así por proteínas de unión al metal secretadas o intracelulares como la calprotectina y las metalotioneínas. Adaptado de Vignesh y col., 2013.

que pertenece a la familia de proteínas Zrt Irt de transportadores de zinc, se expresa en macrófagos y en células T estimuladas ^{102,103}. En las células T estimuladas, ZIP8 se asocia con la proteína lisosomal Lamp1, sugiriendo una asociación con el lisosoma ¹⁰³. Los estudios iniciales definen a ZIP8 como un transportador de zinc, siendo esto consistente con su pertenencia a la familia Zrt Irt ¹⁰². De acuerdo con esto, además, las células T disminuyen su nivel de zinc lisosomal luego de ser activados, y las células que sobreexpresan ZIP8 poseen cantidades elevadas de zinc en el citosol ^{102,103}. Estos resultados son consistentes

con el modelo que postula que ZIP8 transporta zinc desde el lisosoma al citoplasma como un mecanismo que evita el funcionamiento de los procesos dependientes de zinc del patógeno.

No solo se reducen los niveles de zinc dentro de los lisosomas, los vertebrados pueden también disminuir el zinc citoplasmático en respuesta a una infección bacteriana. La estimulación de las células dendríticas con lipopolisacárido resulta en una represión de la expresión de los importadores ZIP y aumenta la expresión de los exportadores de este metal, disminuyendo así los niveles de zinc en el citoplasma ^{104,105}.

Además de los transportadores, existen otras proteínas que ayudan a mantener el equilibrio del zinc. Las metalotioneínas (MTs) comprenden una clase de proteínas de unión a metal que regulan el zinc y previenen de una intoxicación. Las MTs unen Zn(II) con una afinidad en el rango picomolar y poseen siete sitios de unión, uno de los cuales es capaz de intercambiar zinc de manera más rápida, e interactúa con el glutatión, el ATP o el GTP para liberar el Zn(II) ¹¹¹. Estas propiedades facilitan el mecanismo de intercambio de manera controlada en los fagocitos infectados, restringiendo el acceso del microorganismo al metal.

Sumado a los transportadores y a las MTs, los fagocitos también producen calprotectina, una proteína con afinidad nanomolar por Zn(II). La calprotectina es una proteína de unión a calcio, zinc y manganeso compuesta de dos subunidades de 8 y 14 kDa (S100A8 o calgranulina A, y S100A9 o calgranulina B, respectivamente) ¹¹². La calprotectina se expresa principalmente en neutrófilos y macrófagos, mientras que en los linfocitos se encuentra ausente. Aproximadamente, el 40% de las proteínas citosólicas de los neutrófilos corresponde a la calprotectina ¹¹³. De demostrada acción antimicrobiana frente a bacterias y hongos, ha sido implicada en la defensa contra infecciones por *Salmonella Typhimurium* ¹¹⁴ y *S. aureus* ¹⁰¹.

Otros miembros de la familia de proteínas S100 son la psoriasina (S100A7), la cual es secretada por los queratinocitos que también inhibe el

crecimiento microbiano mediante el quelado de los iones Zn(II)¹¹⁵, y la calgranulina C (S100A12) que puede unir tanto zinc como cobre¹¹⁶.

Los vertebrados también utilizan el exceso de zinc como mecanismo para evitar una infección. En humanos, los macrófagos pueden generar un ambiente tóxico para *Mycobacterium* debido a una intoxicación con zinc ¹¹⁷. Por lo tanto, el sistema inmune puede utilizar el zinc en caminos opuestos para combatir una infección, aunque el caso de *Mycobacterium* es el único reportado hasta el momento. Todavía permanece incierto cómo las células de nuestro sistema inmune utilizan preferentemente una estrategia opuesta sobre otra contra distintas clases de patógenos y las señales que gobiernan esta toma de decisiones.

2.2.2.2. Mecanismos bacterianos de captura de zinc

Mientras que todavía falta esclarecer los mecanismos del secuestro de zinc por parte del hospedador, no caben dudas que la deficiencia de este metal tiene el potencial para interrumpir muchos procesos bacterianos que son críticos en la infección. Se predice que las bacterias incorporan el zinc en aproximadamente el 4 al 6% de sus proteínas totales ¹¹⁸. El zinc es utilizado para controlar la expresión génica en bacterias, para el metabolismo celular, y como cofactor en muchos factores de virulencia. Algunos ejemplos de proteínas bacterianas que requieren del zinc incluyen al regulador de la respuesta al hierro Fur, las enzimas alcohol deshidrogenasas, liasas, hidrolasas, y las Cu/Zn superóxido dismutasas ^{49,119}.

Aunque en bacterias que crecen donde el zinc es abundante este metal puede entrar a través de un gran número de canales inespecíficos, sólo se conoce unos pocos transportadores que median la captación específica del zinc ¹²⁰. En bacterias Gram negativas crecidas en un ambiente rico en zinc, éste entra a la célula principalmente por la proteína ZupT (ver Fig. I14, punto 3.4), un transportador de baja afinidad que se expresa constitutivamente y pertenece a la familia de transportadores ZIP ¹²¹. Esta permeasa de metales tiene un amplio

rango de especificidad, pero muestra una clara preferencia hacia el transporte de zinc y otros metales divalentes ¹²². ZupT depende de la fuerza protomotriz para dirigir el importe de zinc ¹²³.

Un mecanismo por el cual las bacterias vencen las bajas concentraciones de zinc es expresando transportadores de alta afinidad. La familia de transportadores de zinc que predomina en una gran variedad de bacterias es un sistema de alta afinidad tripartito tipo ABC, que consisten en una lipoproteína extracelular o periplasmática de unión al metal (subunidad A), una permeasa de transmembrana (subunidad B), y una ATPasa citoplasmática (subunidad C), descrito en *E. coli* como ZnuABC (Fig. I9) ¹²⁴. Estos transportadores bacterianos pertenecen al “cluster” 9 de la familia de transportadores tipo ABC, que transportan principalmente manganeso y zinc ¹²⁵. Estos transportadores son pseudosimétricos y típicamente adoptan una estequiometría tipo AB₂C₂; en algunos casos, las dos subunidades B y C se encuentran codificados por genes diferentes como resultado de una duplicación génica. Hay poca información sobre el mecanismo de transporte de zinc; basándose en estructuras relacionadas se postula un mecanismo de acceso del metal, dirigido por la alternancia entre la unión del ATP, la hidrólisis y la liberación del sustrato ¹²⁶.

En cuanto a la subunidad A de estos sistemas tipo ABC específicos de zinc, la mayoría son proteínas periplasmáticas y tienen una región central rica en los aminoácidos histidina (His), ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu) que coordinan al catión en una disposición tetraédrica, la cual parece ser lo que las diferencia de los transportadores de manganeso ^{125,127} (Fig. I10). Sin embargo, las estructuras cristalográficas de dos proteínas periplasmáticas de unión, PsaA de *Streptococcus pneumoniae* y TroA de *Treponema pallidum*, contienen zinc coordinado a residuos bien conservados de His, Glu y Asp en una coordinación hexaédrica (Fig. I10). Los datos *in vivo* e *in vitro* indican que el manganeso es el sustrato natural de estos transportadores, por lo que se postula que estas discrepancias ocurren debido a la expresión y producción de estos transportadores en una bacteria hospedadora diferente como *E. coli* ¹²⁵.

En bacterias Gram negativas, el sistema ZnuABC es esencial para la captura de zinc, pero su expresión no necesariamente les otorga una ventaja competitiva sobre el microbioma del hospedador ¹²⁸. En estos casos, algunas bacterias usan sistemas alternativos de captura o adicionales que funcionan junto con ZnuABC, por ejemplo, la expresión de una segunda proteína o dominio llamado ZinT que puede unir el zinc ¹²⁹.

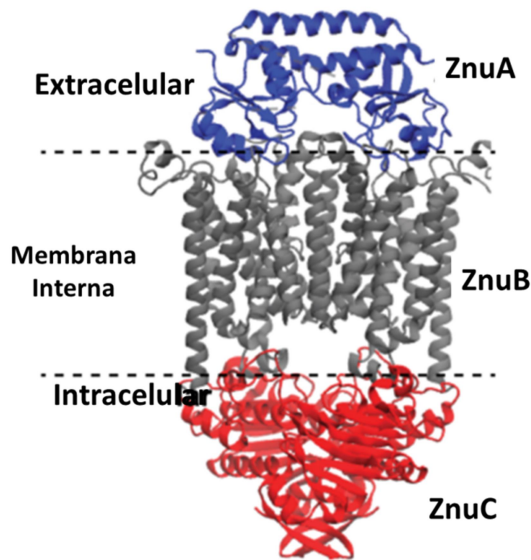


Figura I9. Modelo estructural para el sistema tripartito ZnuABC. El modelo de ZnuA se basa en la estructura de BtuCDF (PDB: 4fi3) para el transporte de cobalamina. La coordinación detallada del metal que se muestra en el acercamiento se toma de la estructura cristalina de la proteína de unión al sustrato ZnuA (PDB: 2osv) con los residuos numerados de acuerdo con la secuencia Uniprot. Se muestran los dominios de unión al soluto (ZnuA, azul), permeasa (dímero ZnuB, gris) y ATPasa (dímero ZnuC, rojo). Adaptado de Capdevila y col., 2016.

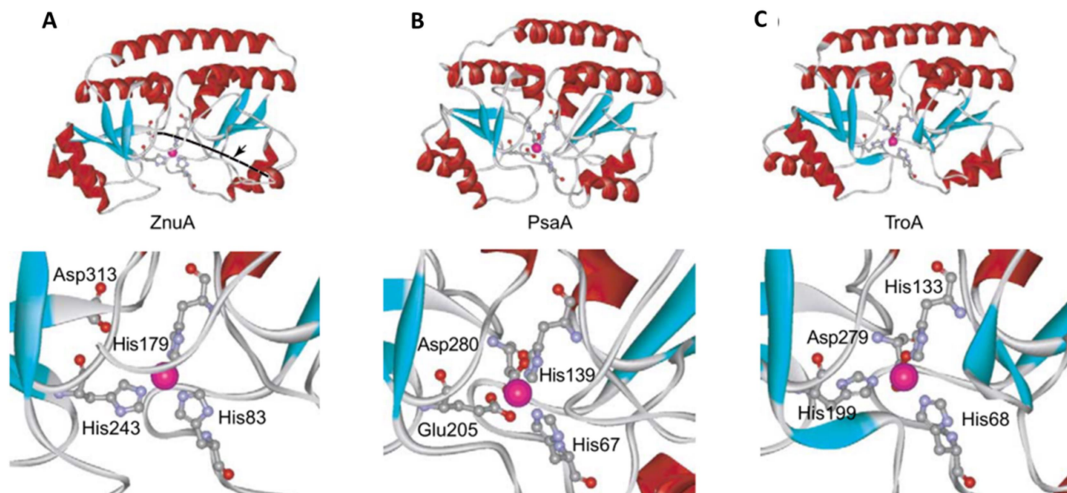


Figura I10. Estructuras cristalográficas de tres proteínas periplasmáticas de unión a metal. (A) ZnuA de *Synechocystis*. **(B)** PsaA de *S. pneumoniae*. **(C)** TroA de *T. Pallidum*. Debajo de las estructuras se muestra con detalle los sitios de unión a zinc desde el mismo punto de vista. La flecha en ZnuA señala una región desordenada representada como una línea discontinua que une los residuos Asp141 y Glu167. este loop desordenado representa una región de alta carga con diez residuos ácidos y siete histidinas. La Asp313 en ZnuA se encuentra poco visible, ya que apunta hacia atrás de una lámina β , en rojo se muestran las α -hélices. Adaptado de Hantke, 2005.

3. REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE ZINC

3.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL POR METALOPROTEÍNAS SENSORAS

Los metalorreguladores bacterianos juegan un papel esencial en el reconocimiento de un dado ión o un tipo de ión metálico entre los demás metales presentes. La alta selectividad para cada metal es un requisito clave para que estas proteínas garanticen el crecimiento bacteriano. Mecánicamente, el reconocimiento selectivo de iones de transición presenta un desafío formidable ya que algunos de estos metales tienen características similares en términos de tamaño, carga y propiedades químicas de coordinación.

Salmonella posee factores de transcripción que responden específicamente a determinados metales, como CueR, GolS, Fur, Zur, ZntR, MntR, NikR, and RcnR (Fig. I11). Estos reguladores no solo modulan la expresión de genes que codifican factores directamente asociados con la homeostasis del metal (como importe, exporte, secuestro o almacenamiento del metal), sino que también controlan la expresión de proteínas con otros roles, como la resistencia a estrés oxidativo ¹³⁰. A partir de este punto, nos focalizaremos en los metalorreguladores que detectan las fluctuaciones en la concentración de zinc y aseguran su homeostasis en bacterias.

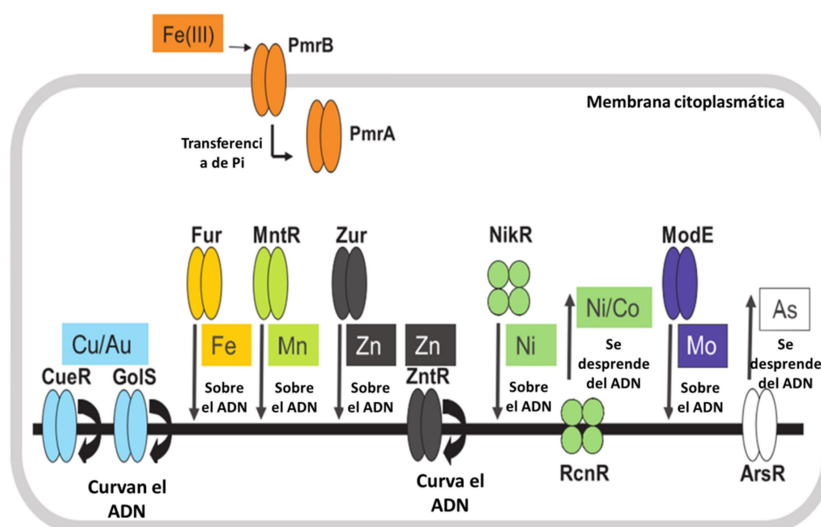


Figura I11. Esquema de las proteínas metalorreguladoras de *Salmonella enterica* sv *Typhimurium*. Los sensores se muestran junto a sus mecanismos de regulación génica indicados por flechas; se desprenden del ADN (desrepresión por metal), se unen al ADN (correpresión por metal) o tuercen el ADN (activación dependiente de un cambio en la topología del ADN), así como también se muestra el sistema de dos componentes de transferencia de grupos fosforilos (Pi). CueR y GolS detectan cobre (además de oro y plata) y activan la transcripción de genes involucrados en la resistencia a cobre. El regulador sensible a hierro Fur controla la expresión de genes involucrados en la captura y almacenamiento de hierro así como también tiene un rol en la homeostasis de otros metales. Aunque Fur unido a Fe(II) generalmente actúa como represor, también puede activar la transcripción directa o indirectamente, en este último caso mediante *ryhB*, un pequeño ARN regulatorio. El manganeso es sentido por MntR, el cual regula de manera negativa la expresión de los genes para la adquisición de manganeso. Los dos sensores de zinc, Zur y ZntR, regulan la expresión de un sistema de captación de alta afinidad de zinc (ZnuABC) y de una ATPasa tipo P de exportación de zinc (ZntA), respectivamente. Se postula que NikR puede sentir el níquel aunque los genes que regula en *S. Typhimurium* no se conocen aún, mientras que RcnR gatilla la expresión de la proteína de flujo RcnA en respuesta a elevadas concentraciones de níquel y cobalto. Se sabe que ModE y ArsR pueden detectar molibdeno y arsénico, respectivamente, basado en un estudio realizado en *E. coli*, aunque este último está ausente en la mayoría de las cepas. El sistema de dos componentes PmrA-PmrB detecta hierro extracelular e induce genes involucrados en la modificación del lipopolisacárido. Un cuarto miembro de la familia MerR (SoxR), sumado a ZntR, CueR y GolS, también cuenta con la presencia de un centro Fe-S para el sentido de estrés metálico (no se muestra). Algunas cepas de *S. Typhimurium* poseen proteínas metalorreguladoras adicionales como el sistema de dos componentes plasmídico SilS-SilR, asociado a la resistencia a compuestos de plata. Podrían existir sensores adicionales que pertenezcan a estas u otras familias regulatorias estructuralmente diferentes, pero todavía no se han caracterizado. Adaptado de Osman y Cavet, 2011

3.2. EL MODELO DE “PUNTO FIJO”

El modelo más sencillo que explica cómo la bacteria mantiene el pool de un dado metal y su biodisponibilidad intracelular, llamado de “punto fijo”, es dirigido por la sensibilidad (K_{metal}) del metalorregulador que regula transcripcionalmente la expresión de genes que codifican transportadores y otras proteínas de resistencia^{131,132} (Fig. I12). En la mayoría de las células, la homeostasis del zinc se mantiene por pares de sensores del metal que funcionan de manera colaborativa en su captación y exportación. En este modelo, la disponibilidad de Zn(II) se mantiene gracias a la acción de estos sensores, cuya función en la regulación de la transcripción de sus genes blanco es modulada alostéricamente por la unión directa del metal. Las afinidades (K_{metal}) de estos reguladores definirán entonces un rango de concentración del metal de transición “libre” o “biodisponible” dentro de la célula, donde $1/K_{\text{metal}} \approx [\text{metal}]_{\text{libre}}$

^{47,133}. Por lo tanto, cuanto mayor sea la afinidad de un dado regulador para un determinado metal bajo las condiciones que predominan dentro de la célula, menor es la concentración del metal biodisponible ¹³³. A medida que la concentración del metal aumenta por encima de $1/K_{\text{metal}}$, se producen cambios en la transcripción de los genes controlados por este regulador transcripcional, a fin de restablecer la homeostasis del metal.

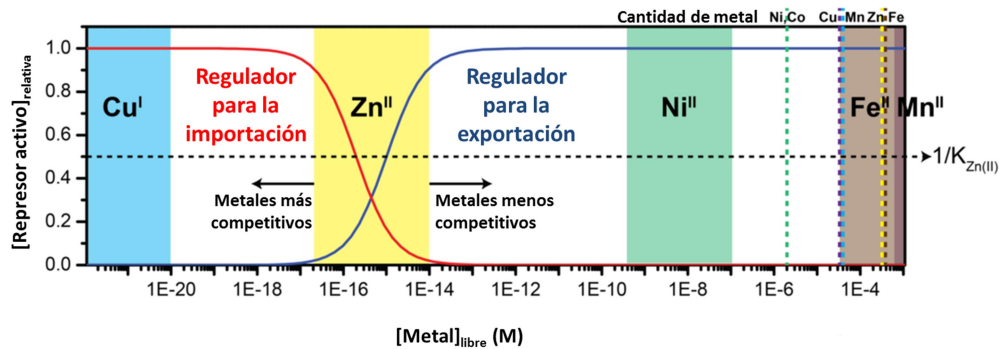


Figura I12. Representación gráfica del modelo de "punto fijo" para la homeostasis metálica. La afinidad por el metal de pares individuales de proteínas sensoras del metal correspondiente (líneas sólidas roja y azul) definen la habilidad del citoplasma celular para mantener la homeostasis de un metal de transición, requerida para mantener las funciones biológicas. La constante de afinidad K_{Zn} del par de reguladores establece la concentración libre de zinc en el citoplasma, siendo $1/K_{\text{Zn}} \approx [\text{Zn(II)}]_{\text{libre}}$. La concentración libre del metal sigue la serie de Irving-Williams (zonas sombreadas). Las concentraciones totales se representan por líneas discontinuas (el código de color se muestra en el gráfico). Los valores de constantes y concentraciones se tomaron del trabajo de Ma y col., 2009. Adaptado de Capdevila y col., 2016.

Zur, el represor de la adquisición de zinc (en inglés, Zinc Uptake Regulator), es el regulador transcripcional que controla la expresión de genes requeridos para la adaptación a condiciones de escasez severa de zinc en la mayoría de las bacterias ^{124,134-140}. Cuando la concentración intracelular de zinc se encuentra por debajo de un umbral crítico, definido por $[\text{metal}]_{\text{libre}} < 1/K_{\text{metal}}$, la apoproteína Zur, es decir su forma libre de zinc, tiene baja afinidad por el operador que reconoce en el ADN, que se solapa con el sitio de unión de la ARN polimerasa. Al no interactuar con el operador permite que la ARN polimerasa transcriba los genes del regulón que normalmente codifican sistemas de importe de zinc de alta afinidad. En estas condiciones los genes que codifican sistemas de

exportación de zinc no se encuentran transcripcionalmente inducidos, debido a que el regulador transcripcional ZntR se encuentra en su forma apo. A medida que los niveles de zinc aumentan a $[\text{metal}]_{\text{libre}} > 1/K_{\text{metal}}$, el represor Zur metalado se une a los operadores previniendo su transcripción¹⁴¹. De la misma manera, ZntR une Zn(II) y activa alostéricamente la transcripción de transportadores que eliminan el exceso del metal¹⁴².

La simpleza de este modelo no tiene en cuenta las distintas afinidades que cada represor puede tener por las secuencias de ADN con las que interactúa, ya que cada sensor regula la transcripción de más de un gen. Este es un factor importante a considerar ya que agrega un nivel extra de complejidad a la homeostasis del metal.

3.3. EL REPRESOR ZUR

Zur es el segundo miembro de la familia de reguladores tipo Fur presente en *Salmonella*. En otros organismos, miembros de esta familia incluyen los reguladores de manganeso (Mur), níquel (Nur), hemo (Irr), o el sensor de estrés por peróxido (Per)¹⁴³.

Se ha detectado la presencia de *zur* en numerosos microorganismos como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. Typhi*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae* o *Brucella melitensis*. Debido a la similitud que presentan con la proteína Fur, se cree que muchos de los genes catalogados como *fur* pueden codificar en realidad al sensor de Zn Zur^{97,144,145}.

Zur de *E. coli* comparte un 92% de identidad en sus 171 aminoácidos con el represor de *S. Typhimurium*, y ha sido caracterizado bioquímicamente^{146,147}. Al igual que Fur, se conoce que Zur contiene dos sitios de unión al metal por cada monómero, con diferentes afinidades y entornos de coordinación (Fig. I13); un

ión zinc se encuentra unido fuertemente al sitio A o estructural en una coordinación propuesta con los grupos $S_3(N/O)$, y el otro (sitio B o regulatorio) se encuentra en un ambiente de coordinación con $S(N/O)_3$, con una geometría tetraédrica ¹⁴⁷. Esta estructura en el sitio regulatorio de unión a metal en Zur, a diferencia de la coordinación a través de cinco o seis ligandos N/O con los que cuenta Fur, es lo que le da a estas proteínas la especificidad por zinc o hierro, respectivamente ¹⁴⁷.

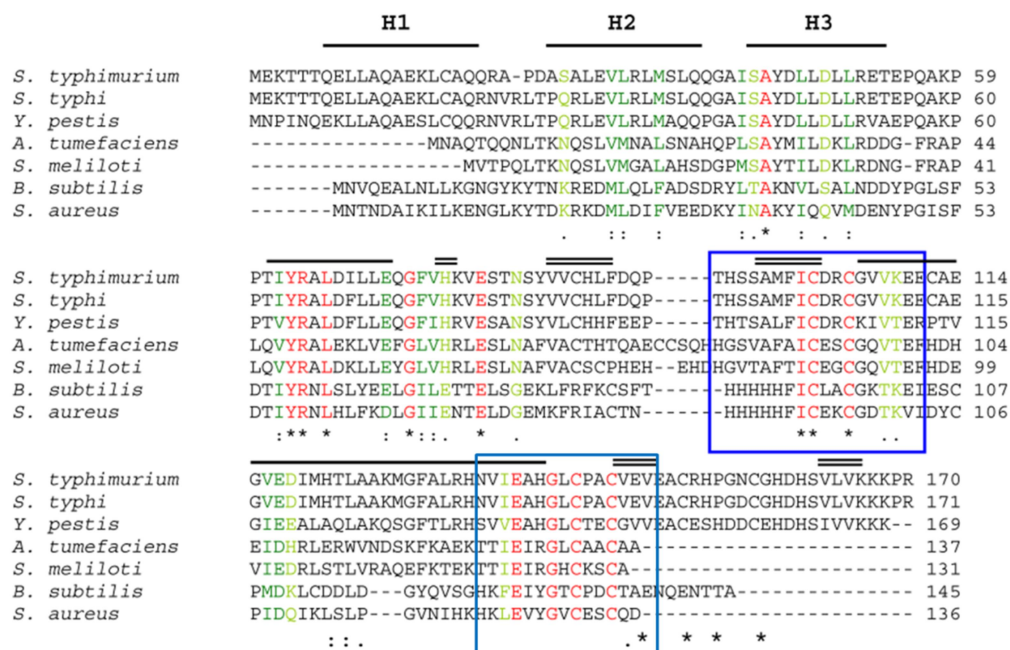


Figura I13. Alineamiento (por el método ClustalW) del gen zur de distintas especies bacterianas. En color verde se destacan las posiciones que presentan cambios conservativos y en color rojo se marcan aquellos residuos idénticos en todos los casos. Las regiones conservadas acostumbran a agruparse donde se define también una estructura secundaria clara, representada para el gen zur de *S. Typhimurium* en forma de línea simple para determinar las hélices α y con una línea doble para los plegamientos β . Además se definen las hélices α H1, H2 y H3 que intervienen en el reconocimiento de la secuencia de DNA y la unión a éste. Recuadradas en azul se muestran las regiones de unión al metal. Adaptado de Campoy, 2002.

La estructura cristalográfica de Zur de *M. tuberculosis* ha sido determinada, mostrando una gran similitud con las proteínas Fur ^{148,149}, cada monómero del dímero contiene dos dominios, un dominio amino terminal de unión al ADN compuesto por tres hélices α seguidas de una lámina β corta antiparalela y un dominio carboxi terminal de dimerización y unión al metal ¹⁵⁰.

En el represor de *M. tuberculosis* se detectaron tres sitios de unión a zinc, uno estructural y otro sitio regulatorio, mientras que el rol biológico del tercer zinc no se ha determinado y posiblemente sea un artefacto de la cristalización de la proteína ¹⁵⁰. La estequiometría homodimérica de Zur es imprescindible ya que da lugar a la unión del regulador al ADN, bloqueando así la transcripción de los genes a cuyos promotores es capaz de unirse; mediante ensayos de protección a la DNasa I se confirmó que Zur monomérica no es capaz de unirse al ADN y que el heterodímero se une de manera lábil ⁹⁷.

3.4. EL REGULÓN ZUR Y SU IMPORTANCIA EN LA PATOGÉNESIS

Como se comentó anteriormente, la respuesta a la escasez de zinc está controlada por la expresión coordinada de un set de genes regulados por el represor transcripcional Zur (Fig. I14). Entre los genes regulados por Zur se incluyen, además del operón que codifica para los componentes del sistema ZnuABC, uno o más genes que codifican para parálogos de proteínas ribosomales que unen zinc ^{138,151-153}.

En algunas bacterias, existe un componente accesorio del transportador ZnuABC, ZinT, que forma un complejo con ZnuA en presencia de zinc y aumenta la capacidad de ZnuA para reclutar el metal ^{129,154}. Un sistema similar de captación de zinc (AdcABC) se encontró en pneumococos y otras bacterias Gram positivas, donde la lipoproteína AdcA posee una estructura de dos dominios, uno con homología a ZnuA y otro a ZinT ^{151,155}.

Una faceta interesante de la respuesta mediada por Zur a la escasez de zinc es la sustitución de proteínas ribosomales que contienen zinc por homólogos que carecen del motivo de unión al catión ¹⁵⁶. Este cambio en la estructura del ribosoma reduce el requerimiento por el metal de las células bacterianas, ya que se considera que la mayor parte del zinc intracelular se encuentra asociado a los ribosomas ¹⁵⁷. Además, la producción de proteínas

ribosomales independientes de zinc puede ser de utilidad para movilizar una cantidad relevante del metal presente en los ribosomas preexistentes y facilitar así la adaptación a las nuevas condiciones limitantes ⁵⁸. Desde este punto de vista, el ribosoma puede ser considerado como un gran complejo proteico de almacenamiento de zinc.

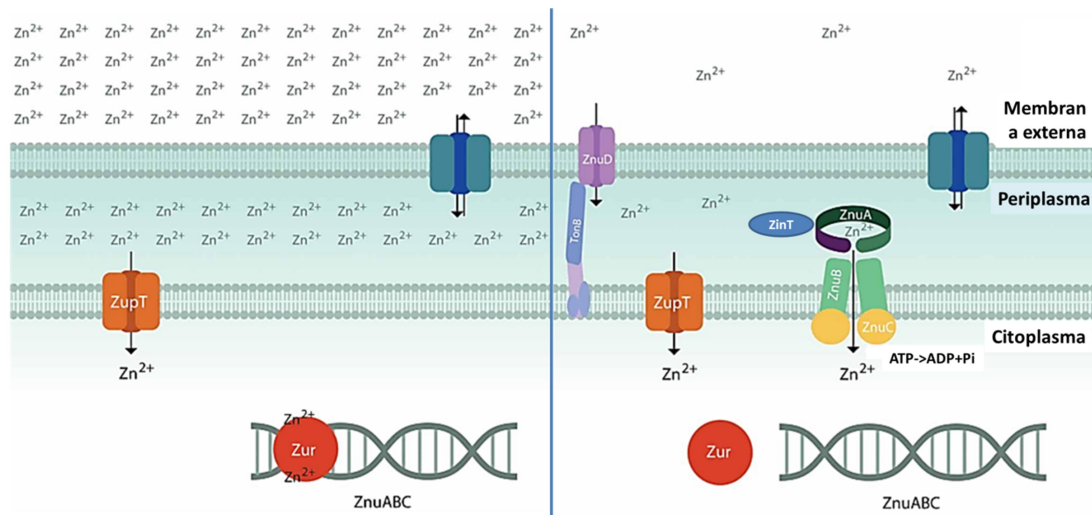


Figura 114. Diagrama esquemático de los transportadores involucrados en la captación de zinc. La membrana externa de Gram negativos es permeable a solutos hidrofílicos de menos de 600 daltons y, por lo tanto, la concentración de zinc en el periplasma depende de la disponibilidad del zinc en el ambiente. Bajo condiciones de abundancia de zinc (izquierda), el metal es importado a través de sistemas de transporte de baja afinidad como ZupT, y Zur inhibe la expresión del sistema ZnuABC (y de la proteína periplasmática ZinT). Bajo condiciones de escasez de zinc (derecha), apo-Zur no es capaz de unirse al ADN y el sistema de alta afinidad ZnuABC se expresa. *Neisseria meningitidis* expresa además una proteína de membrana externa dependiente de TonB, regulada por Zur, involucrada en la captación de zinc. Adaptado de Cerasi y col., 2013.

La membrana externa de las bacterias Gram negativas permite la difusión pasiva de solutos de bajo peso molecular. Sin embargo, este tipo de mecanismo de adquisición de nutrientes no puede garantizar una adecuada absorción de los elementos que se encuentran poco disponibles en el ambiente. Hace unos años, se identificó un receptor dependiente de TonB en la membrana externa de *N. meningitidis*, y de otras bacterias Gram negativas, involucrado en la captura de zinc ¹⁵⁸. Esta proteína, denominada ZnuD, media el transporte de zinc o del grupo hemo y se encuentra regulada tanto por Zur como por Fur ^{140,159}. En otros

organismos Gram negativos no se han encontrado receptores de zinc de membrana externa regulado por Zur, no obstante se ha observado que la proteína apo-ZinT puede ser secretada fuera de la célula, sugiriendo que podría tener un rol en la adquisición de zinc del ambiente ¹⁶⁰.

Unas pocas especies bacterianas expresan un sistema de transporte de zinc de alta afinidad adicional. Este es el caso de *Listeria monocytogenes* y *Haemophilus influenzae*, los cuales expresan los transportadores de zinc ZurAM y ZevAB, respectivamente, ambos sistemas involucrados en virulencia y en el crecimiento en condiciones limitantes del metal ^{161,162}.

El crecimiento de una mutante de *S. Typhimurium* que carece del gen *znuA* no se encuentra afectado en un medio rico en zinc, pero se ve sustancialmente perjudicado en condiciones de deficiencia del metal, siendo esto consistente con el rol del sistema ZnuABC en el transporte de zinc hacia el citoplasma bajo estas condiciones ¹⁶³. De igual manera, la expresión de *znuABC* se reprime por Zur en condiciones de suficiencia de zinc ^{163,164}. La proteína periplasmática ZinT también se encuentra regulada por Zur en *S. Typhimurium* y contribuye al crecimiento de la bacteria en escasez de zinc, aunque en menor medida que ZnuA ¹²⁹. Sin embargo, la contribución de ZinT en la captación de zinc depende enteramente de la presencia de ZnuA, y se ha visto que ambas proteínas interactúan *in vitro* en presencia del metal ¹²⁹. Estos hallazgos han llevado a afirmar que ZinT desempeña un papel auxiliar en el periplasma en la captura de zinc para la adquisición en condiciones de escasez severa del catión ¹²⁹. ZinT purificada de *E. coli* posee un solo sitio de unión a metal de alta afinidad que puede acomodar un ión cadmio o dos iones zinc ¹⁵².

ZnuA se expresa en *S. Typhimurium* aislados de macrófagos infectados (J774A o THP-1 diferenciadas) y de células epiteliales (Caco-2), o del bazo de ratones *Nramp1*^{-/-} infectados, concordando con el ambiente intracelular carente de zinc ¹⁶³. De hecho, la sobrevivencia de mutantes *znuA*⁻ se encuentra reducida en estas células y en ratones ^{163,164}. De manera similar, la pérdida de *znuC* o de todo el operón *znuABC* también produce una reducción en la sobrevivencia en ratones ^{164,165}. Se ha observado una fuerte respuesta inmune en ratones *Nramp*^{+/+}

infectados con una mutante que carece de todo el operón *znuABC*. Esta respuesta provee protección en caso de una reinfección con una cepa virulenta de *S. Typhimurium* ¹⁶⁵, demostrando el potencial de la mutante *znuABC* para el desarrollo de vacunas. Por el contrario, la delección de *zinT* no afecta la sobrevivencia de *S. Typhimurium* en ratones BALB/c ¹²⁹.

El sistema ZnuABC es requerido también para la actividad de una de las dos superóxido dismutasa de Cu y Zn, SodCII (pero no de la SodCI) de *Salmonella Typhimurium* ¹⁶⁶. Las superóxido dismutasas son enzimas que catalizan la dismutación del superóxido en oxígeno. En *S. Typhimurium* SodCI y SodCII se expresan durante la infección en macrófagos y se encuentran asociadas a la virulencia protegiendo a la bacteria de la acción de las especies reactivas del oxígeno producidas en este tipo celular, aunque SodCI parece contribuir en mayor medida a esta protección que SodCII ¹⁶⁶⁻¹⁷³. Mientras que SodCI puede unir cobre de manera estable en ausencia de zinc, SodCII no es capaz de hacerlo. Sumado a esto, SodCII se expresa en respuesta a zinc y dicha expresión se ve reducida en una mutante *znuA*, mientras que SodCI se encuentra selectivamente expresada en ambientes pobres en zinc donde SodCII se encuentra inactiva ¹⁷². Un ejemplo de esto es el interior de la SCV, correlacionándose con la mayor contribución de SodCI en la virulencia de *S. Typhimurium*, aunque otros factores deben estar involucrados ¹⁷³. Estudios en *E. coli* revelan también que en condiciones de limitación de zinc, el zinc periplásmico está unido a ZnuA, impidiendo la metalación de la superóxido dismutasa de cobre y zinc ¹⁷⁴.

3.5. OTROS REGULADORES DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE ZINC

La proteína Zur no es el único regulador transcripcional descrito para el control de los sistemas vinculados con el zinc. Así por ejemplo, ZntR controla la expresión de la bomba de exportación de cationes codificada por *zntA*. ZntR Se

ha descrito por primera vez en *E. coli*¹⁷⁵ y pertenece a la familia tipo MerR, que incluye otros reguladores transcripcionales de procariotas relacionados con la resistencia a mercurio, con bombas de flujo de amplio espectro de *B. subtilis*, reguladores transcripcionales de *S. coelicolor* o el regulador GinR de *B. cereus*.

Otro metalorregulador relacionado con el zinc es SmtB, que se encarga de la represión del gen que codifica para la metalotioneína, SmtA, que confiere resistencia a iones pesados⁹⁷.

Un regulador similar al anterior que controla la expresión de la bomba de expulsión de zinc codificada por *ziaA* es ZiaR, caracterizado en *Synechocystis*¹⁷⁶.

4. EL COBRE Y LA PATOGÉNESIS

El cobre puede existir en dos estados de oxidación principales y estables, en su forma cuprosa reducida, Cu(I), y en su forma cúprica oxidada, Cu(II)⁵⁴. La química de coordinación de los iones cobre revela que pueden unir distintos residuos proteicos; el Cu(I) se coordina típicamente con dadores de sulfuros como las cisteínas y metioninas, mientras que el Cu(II) lo hace con dadores de nitrógeno como las histidinas¹⁷⁷. La importancia del cobre en sitios activos de enzimas se basa en su habilidad para ciclar entre estos dos estados de oxidación, lo que le permite actuar como dador y aceptor de electrones en reacciones redox⁵⁴. En *S. Typhimurium*, las proteínas que unen cobre incluyen las superóxido dismutasas de cobre y zinc (proteínas SodC, descritas en el punto 3.4); una multicobre oxidasa (CueO); y una oxidasa respiratoria de membrana que contiene un grupo hemo (bo3)^{29,178}, entre otras proteínas. La multicobre oxidasa CueO también contribuye a la resistencia al cobre en *S. Typhimurium*, como parte del sistema Cue¹⁷⁹. Una cepa mutante que carece de esta multicobre oxidasa está atenuada para la virulencia en un modelo murino, aunque el rol preciso de esta enzima en la patogénesis aún no se ha determinado¹⁷⁹.

Aunque no se conoce mucho sobre su mecanismo directo de acción, el cobre contribuye a la inmunidad del hospedador ¹⁸⁰. Se ha reportado que la actividad oxidativa de las especies reactivas del oxígeno y la habilidad de los fagocitos de controlar la proliferación de *S. Typhimurium* intracelular se ve disminuida ante la deficiencia de cobre ^{180,181}; además, animales deficientes en cobre son vulnerables a infecciones producidas por *S. enterica* ^{182,183}.

Se ha visto un aumento considerable de los niveles de este ión dentro de los fagosomas de macrófagos infectados con *S. Typhimurium* ¹⁸⁴. Además, genes que codifican para ATPasas del tipo P1B asociadas a la resistencia a cobre se encuentran entre los genes expresados durante una infección en macrófagos por *S. Typhimurium* y otros patógenos intracelulares ¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Estos hallazgos son consistentes con un modelo de toxicidad donde el cobre contribuye a la eliminación del patógeno dentro del fagosoma. La producción de intermediarios reactivos del nitrógeno puede estimular además la liberación de cobre de las metaloproteínas ¹⁸⁸, y por lo tanto, puede contribuir a la toxicidad mediada por cobre.

El sistema Cue es responsable de la resistencia a cobre en *S. enterica*. Consiste en el regulador transcripcional de la familia MerR, CueR, que regula la expresión de CopA, una ATPasa transportadora de cobre de tipo P; y la multicobre oxidasa periplásmica, CueO^{179,184,189-191}. Este sistema también incluye a una proteína periplásmica de unión a cobre denominada CueP, la cual no se encuentra en el sistema Cue de *E. coli*^{184,192}.

En el presente trabajo de tesis se explora la respuesta transcripcional de *S. Typhimurium* frente a cambios en la concentración de dos metales de transición, cobre y zinc, enfocando el trabajo experimental en la búsqueda de nuevos genes del regulón Zur en esta bacteria y la respuesta de dicho regulón frente a una disminución progresiva del zinc en el medio.

Materiales y Métodos

1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Las cepas y plásmidos empleados en esta tesis se detallan en las Tablas 1 y 2, respectivamente. Los oligonucleótidos que fueron utilizados para la generación de mutantes, el clonado de las regiones especificadas, los ensayos de extensión del cebador y ensayos de retardo de la movilidad electroforética se detallan en la Tabla 3. En todos los casos estos oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma, se disolvieron en agua destilada estéril hasta una concentración 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se guardaron a -20°C hasta su utilización. Para las reacciones de PCR se realizaron diluciones de los oligonucleótidos hasta alcanzar stocks de 10 μM , y para las reacciones de qRT-PCR los stocks se diluyeron hasta una concentración de 5 μM .

Tabla 1. Cepas bacterianas

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
<i>Salmonella Typhimurium</i>		
14028s	Silvestre	ATCC
PB11628	<i>znuA::lacZ-Cm</i>	Este trabajo
PB11141	<i>STM14_3193::lacZ-Cm</i>	Este trabajo
PB12250	<i>STM14_1454::lacZ-Km</i>	Este trabajo
PB12104	<i>zinT::lacZ-Km</i>	Este trabajo
PB12181	<i>rpmE2::lacZ-Km</i>	Este trabajo
PB12143	<i>isrD::lacZ-Km</i>	Este trabajo
PB11737	Δ zur <i>znuA::lacZ-Cm</i>	Este trabajo
PB12284	Δ zur <i>STM14_3193::lacZ-Cm</i>	Este trabajo
PB12285	Δ zur <i>STM14_1454::lacZ-Km</i>	Este trabajo
PB12286	Δ zur <i>zinT::lacZ-Km</i>	Este trabajo
PB12288	Δ zur <i>rpmE2::lacZ-Km</i>	Este trabajo

PB12287	<i>Δzur isrD::lacZ-Km</i>	Este trabajo
PB10146	<i>ΔtolC</i>	Pontel y col., 2014 ¹⁹³
PB10184	<i>ΔtolC cueO::Kn^R</i>	Pontel y col., 2014 ¹⁹³
PB10462	<i>Δzur</i>	Pontel y col., 2014 ¹⁹³
PB10464	<i>entE::MudJ</i>	Pontel y col., 2014 ¹⁹³
PB10465	<i>entE::MudJ ΔcueO</i>	Pontel y col., 2014 ¹⁹³
PB10481	<i>entE::MudJ ΔtolC</i>	Pontel y col., 2014 ¹⁹³
PB6127	<i>ΔcueP</i>	Pontel y Soncini, 2009 ¹⁹²
PB7937	<i>ΔcueO</i>	Pontel y Soncini, 2009 ¹⁹²
PB1157	<i>phoP::Tn10</i>	Fields y col., 1986 ³⁶
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Sambrook y col., 1989
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> str. B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5- T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)</i>	Studier y col., 1990 ¹⁹⁴
BL21 (DE3) C43	<i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)</i>	Miroux y Walker, 1996 ¹⁹⁵
BL21 (DE3) pGRO7	<i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S) pGRO7[groEL/groES]Cm^R</i>	Nishihara y col, 2000 ¹⁹⁶

Tabla 2. Plásmidos

Plásmido	Genotipo relevante	Referencia
pKD46	oriRpSC101ts ParaBexo- <i>bet-gam</i> AmpR	Datsenko y Wanner, 2000 ¹⁹⁷
pKD3	oriγ AmpR FRT CmR FRT	Datsenko y Wanner, 2000 ¹⁹⁷
pKD4	oriγ AmpR FRT KmR FRT	Datsenko y Wanner, 2000 ¹⁹⁷
pJB20	Derivado del pKD3. <i>lacZY</i> , CmR, (cassette flanqueado por sitios FRT), AmpR	Beaber y col., 2002 ¹⁹⁸
pCP20	λ-cl857-ts Pr- <i>flp</i> AmpR CmR	Cherepanov y col., 1995 ¹⁹⁹
pHISparallel2	Promotor T7, operador <i>lac</i> , his tag [N,C] GST tag, MBP tag	Sheffiel y col., 1999 ²⁰⁰
pHISparallel2:: <i>zur</i> (pZur)	Zur clonado entre los sitios <i>Bam</i> HI y <i>Xho</i> I	Este trabajo
pKG136	riR6K FRT <i>lacZY</i> ⁺ t _{his} KmR	Ellermeier y col., 2002 ²⁰¹

Tabla 3. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'-3')	Función	Referencia
copA Fwd	CCTGGCTCTACTCCATGAGC	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193
copA Rvs	AATTTTTCCAGCGCTTTTGA	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193
cueO Fwd	TGACCTGTTAACGGCAGATG	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193
cueO Rvs	CGCTTTTTCCCTTTGTGAAGC	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193
zntA Fwd	GCAATACAGAAGGCCGATAG	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193
zntA Rvs	TACCGCATTCTCCACTTTTC	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193
rpmE2-Fwd	ATACCGCACCGTCGTATTTTC	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193
rpmE2-Rvs	TTAGCGCCGATAAAAATGACC	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193
znuA-Fwd	TTAAACCGCTTGGGTTTCATC	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193
znuA-Rvs	AACGGTTTTTACATCGGCAAG	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193
zinT-Fwd	CTTCTGGGAATGCTGTTGG	qRT-PCR	Pontel y col., 2014

				193
zinT-Rvs	CTGAAGACAGGGTCCAGCTC	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193	
GAPdH-Fwd	ACTGACTGGTATGGCGTTCC	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193	
GAPdH-Rvs	TCACGAAGTTGTCGTTCAGC	qRT-PCR	Pontel y col., 2014 193	
Zur-check	ATCAGGTGAAGTAATTCCTC	Checkeo de mutante	Pontel y col., 2014 193	
zur-P1	GTAACGGATTAGACTTTCATGCCATTCGAGGTGCTACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección de <i>zur</i>	Pontel y col., 2014 193	
zur-P2	GTGCCCCTCTCTACTGCCGCCGTTTTCCGTTTCAGGCATATGAATATCCTCCTTA	Delección de <i>zur</i>	Pontel y col., 2014 193	
1454-check	TCCGGCCTGCAGGGTG	Checkeo de mutante	Este trabajo	
1454-P1	CAATTAATCATTTTAACGCTGACTGAGGGTCTTAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección de <i>STM14_1454</i>	Este trabajo	
1454-P2-1	GCTTGGTGTGGAGCGAATCCCCTGACCAGGCTGGCATCATATGAATATCCTCCTTA	Delección de <i>STM14_1454</i>	Este trabajo	
3193-check	ACGGATCTGGCTTTTCTCTG	Checkeo de mutante	Este trabajo	
3193-P1	CAATTAATCATTTTAACGCTGACTGAGGGTCTTACATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección de <i>STM14_3193</i>	Este trabajo	
3193-P2	GTTTGGTGTGGAAACGAACCCCCTGACCAGGCTGGCATCATATGAATATCCTCCTTA	Delección de <i>STM14_3193</i>	Este trabajo	
3193-Fwd	CTAACCTCAGCTGGCTTTGC	qRT-PCR	Este trabajo	
3193-Rvs	GGTAGGTATCTGCGCCTTCA	qRT-PCR	Este trabajo	

Prom-rmpE2-check	CGAGTAAATGGGCACTGCTG	Checkeo de mutante	Este trabajo
rpmE2-P1Fwd	GTATTTTATTGTTATGTTATAACATAATTGAGAGGGCGCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección <i>rpmE2</i>	Este trabajo
rpmE2-P2Rvs	TGTTTTGCATTGCGAAGTGAGTTTAACACCTGCATTTTCATCATATGAATATCCTCCTTA	Delección <i>rpmE2</i>	Este trabajo
Prom-znuA-check	CAATCAAATGTCCGGCCTGA	Checkeo de mutante	Este trabajo
znuA-P1Fwd	TATCACATTTACACATTCATTACGATGATTAGTCGCATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección <i>znuA</i>	Este trabajo
znuA-P2Rvs	CGACAGAGCGGGCTATCTGTTGCACGTATTCACTTCCTCG CAT ATGAATATCCTCCTT A	Delección <i>znuA</i>	Este trabajo
znu-Fwd-HindIII	GCGAAGCTTATGAACCCAAGCGGTTTAAG	EMSA	Este trabajo
znu-Rvs-BamHI	CGCGGATCCTTAATTTTAGGCTTGCAGAAGTGA	EMSA	Este trabajo
zinT-Fwd-HindIII	GCGAAGCTT ATGGCCGCGTAATTTTCTT	EMSA	Este trabajo
zinT-Rvs-BamHI	CGCGGATCC CAAAACGTTACCCTCATCTTTCTT	EMSA	Este trabajo
rpmE2-Fwd-HindIII	GCGAAGCTTGCTGACCAGATGTCGTGTTG	EMSA	Este trabajo
rpmE2-Rvs-BamHI	CGCGGATCCTGCGCCCTCTCAATTATGTT	EMSA	Este trabajo
Fwd3193-HindIII	GCGAAGCTTGAAAGGATCTGCGATCTTCG	EMSA	Este trabajo
Rvs3193-	CGCGGATCCCCCTCAGTCAGCGTTAAAATG	EMSA	Este trabajo

BamHI			
Fwd1454- HindIII	CGGAAGCTTTTCTAAAAAACCTTTAAAA	EMSA	Este trabajo
Rvs1454- BamHI	CGCGGATCCATTTAAGACCCTCAGTCA	EMSA	Este trabajo
Zur-Fw-BamHI	CGCGGATCCGCGATGGAAAAGACCACAACGC	Purificación Zur	Este trabajo
Zur-Rvs-XhoI	CCGCTCGAGCGGCTAACGTGGTTTTTCTTCACC	Purificación Zur	Este trabajo
prom-zinT- check	GATCACGACCATTGCCAGAA	Checkeo de mutante	Este trabajo
zinT-P1-Fwd	GGGTAACGTTTTGGTGATTCATTTAAAAAACTGACAATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección <i>zinT</i>	Este trabajo
zinT-P2 Rvs	GCTCGCTATTCATAGCGAGCTTTTAAACATTGCAATCAGACCATATGAATATCCTCCTTA	Delección <i>zinT</i>	Este trabajo
IsrD-P1	TTGTTATATTATAACATTGCATTTATTTCAACAGAACTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Interrupción <i>isrD</i>	Este trabajo
IsrD-P2	CCAGTTGATATCAAAAAAGGCCACCTGCGCGGTGGCCGCTCATATGAATATCCTCCTTA	Interrupción <i>isrD</i>	Este trabajo
tolC-P1	TACAAATTGATCAGCGCTAAATACTGCTTCACAACAAGGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Delección <i>tolC</i>	Este trabajo
tolC-P2	GGCACAGGTCTGATAAGCGCAGCGCCAGCGAATAACTTACATATGAATATCCTCCTTAG	Delección <i>tolC</i>	Este trabajo
3193 Fwd Nuevo	CTAACCTCAGCTGGCTTTGCA	qRT-PCR	Este trabajo
1454 Rvs Nuevo	CGTGTACTGGCCATTGT	qRT-PCR	Este trabajo
znuC Fwd	ACGTCTCGGTCTCATTGGT	qRT-PCR	Este trabajo
znuC Rvs	TTTGCGGGACATAGCCGATA	qRT-PCR	Este trabajo

2. MEDIOS DE CULTIVO

Las células fueron crecidas en el medio de cultivo Luria-Bertani (LB), compuesto por 10 g/l de peptona de carne, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl (Difco). En los casos indicados, se utilizó el medio 1X SLB, el cual no contiene NaCl. Para los lisados en medio líquido se utilizó el medio rico Nutrient Broth (NB), compuesto por 3 g/l de extracto de carne bovina y 5 g/l de peptona. Como medio de crecimiento definido se utilizó el medio mínimo M9 (Difco) compuesto por 6,78 g/l de Na_2HPO_4 , 3 g/l de KH_2PO_4 , 0,5 g/l de NaCl, 1 g/l de NH_4Cl , 0,4% de glucosa como fuente de carbono, 2 mM de MgSO_4 y 0,1 mM de CaCl_2 .

El crecimiento en condiciones de escasez de Zn se logró usando el medio mínimo Vogel-Bonner (VB-MM), compuesto por 0,04 g/l de MgSO_4 , 2 g/l de ácido cítrico, 10 g/l de K_2HPO_4 anhidro, 3,5 g/l de NaH_2PO_4 y 2 g/l de glucosa como fuente de carbono.

Para la preparación de medios sólidos se agregó agar a una concentración final de 15 g/l. Los antibióticos empleados fueron: ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), cloranfenicol (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y tetraciclina (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En los casos donde fuese necesario se agregaron sales de CuSO_4 o ZnSO_4 en las concentraciones indicadas.

Las células de la línea macrofágica Raw 264.7 fueron cultivadas en medio D-MEM (del inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Internegocios). Las células fueron mantenidas a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%.

3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ARN

En los experimentos de RT-PCR semi-cuantitativa se utilizaron muestras de ARN extraídas con el reactivo RNeasy RT (Molecular Research Center). En

este caso, se inocularon 100 ml de medio M9 con cultivos crecidos toda la noche de *Salmonella Typhimurium* 14028s silvestre y Δ zur, se dejaron crecer hasta fase exponencial media (DO630 entre 0,4 y 0,7) y se agregaron los metales a una concentración final de 25 μ M para el CuSO_4 y de 125 μ M para el ZnSO_4 . Luego de 40 minutos de agregado de metal, se adicionó fenol ácido al 5% en etanol y se incubaron los cultivos 20 minutos en hielo para detener la transcripción y el tratamiento con el metal. En paralelo, se procedió de igual manera con cultivos sin agregado de metal. Luego de la extracción del ARN con el agente RNazol RT, las muestras fueron sometidas a tratamiento con DNAsa RQ1 (Promega) para mejorar su calidad. La calidad y cantidad del ARN se verificó mediante geles de garosa y mediadas espectrofotométricas, respectivamente. Las muestras se guardaron a -80°C .

Todas las preparaciones de ARN que fueron utilizadas en los ensayos de RT-PCR presentaron un valor del cociente (Abs260nm/Abs280nm) entre 1,7 y 2,0; lo que indica que se hallaban esencialmente libres de proteínas y fenol ²⁰².

4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

4.1. PCR EN CONDICIONES NORMALES

Para la amplificación de fragmentos por PCR se siguió un protocolo básico consistente en la desnaturalización inicial del ADN a 94°C durante 4 minutos, luego una iteración de 30 ciclos compuestos por desnaturalización del ADN a 94°C anillado de los cebadores entre 50 y 60°C (dependiendo de las características de los oligonucleótidos) y elongación del ADN a 72°C para la Taq Polimerasa o 68°C para Pfx Platinum, para cada ciclo. Los tiempos de desnaturalización y anillado fueron de 30 segundos cada uno, y los de elongación dependieron de la longitud de los productos a amplificar (1 minuto por cada 1 kpb). Finalmente, se incluyó una etapa de extensión a 72°C o 68°C durante 10

minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient. El volumen final de las reacciones fue de 50 μl conteniendo: Solución 1X de amplificación comercial, suplementada con 2,5 mM MgCl_2 , 0,25 mM de cada uno de los desoxinucleótidostrifosfatos, dATP; dGTP; dCTP y dTTP (Invitrogen), 1 μg de ADN molde, 10 pico moles (pmol) de oligonucleótidos directo y reverso y 2,5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) o de Pfx Platinum (Invitrogen). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, como se indica en el punto 5.

4.2. PCR A PARTIR DE COLONIAS

Esta técnica se empleó para verificar en las cepas transformadas la presencia de los distintos fragmentos de interés, ya sea como fusiones cromosomales o clonados en plásmidos. La reacción de amplificación de ADN se realizó a partir de una colonia bacteriana disuelta en un volumen 50 μl de H_2O destilada estéril. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μl conteniendo: solución de amplificación comercial suplementada con 0,25 mM de cada uno de los desoxinucleótidostrifosfato, dATP; dGTP; dCTP y dTTP (Invitrogen), 1 μl de la suspensión de bacterias, 5 pmol de cada uno de los oligonucleótidos (directo y reverso) y 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen). Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa como se indica en el punto 5.

4.3. PCR CON TRASCRIPTASA REVERSA (RT-PCR)

La síntesis de ADN copia se realizó utilizando oligonucleótidos aleatorios, 1 µg de ARN total y 1 U de la retrotranscriptasa Superscript II (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4. PCR SEMI-CUANTITATIVA

Se utilizó aproximadamente 5 ng de ADN copia y oligonucleótidos específicos (ver Tabla 3) para amplificar los genes *zinT*, *znuA* y *rpmE2* usando Taq Polimerasa (Invitrogen) en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Como control interno para la normalización se amplificó un fragmento del gen GAPDH. Las condiciones de amplificación fueron: 5 minutos de desnaturalización a 94°C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 30 segundos a 72°C, y una incubación final de 5 minutos a 72°C. Se cuantificaron las intensidades de los productos obtenidos en un gel de agarosa al 1% con el sistema Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). Para cada producto de PCR, se sustrajo una lectura del fondo vacío en cada una de las posiciones a medir. Los valores normalizados con el control interno, se utilizaron para calcular la expresión relativa de cada gen en cada condición estudiada.

4.5. PCR EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA (qRT-PCR)

5 µl de una dilución 1/10 de cada ADN copia se utilizó como molde para la reacción de qRT-PCR, usando los pares de cebadores adecuados para amplificar fragmentos de los genes *copA*, *cueO* y *zntA*. Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en presencia del colorante SYBR green que se intercala en fragmentos de ADN de doble cadena (Molecular Probes), y se monitorizaron en tiempo real con el termociclador Mastercycler ep realplex RT-PCR (Eppendorf). La expresión relativa se calculó utilizando los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos a partir de cada muestra de la siguiente manera: expresión relativa =

$2^{-\Delta\Delta Ct}$, siendo $\Delta Ct = Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{control interno}}$ y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{muestra de referencia}}$ (en donde la muestra es el transcrito en la condición en estudio, el control interno es un fragmento del gen GAPDH y la muestra de referencia corresponde a los transcritos en la condición sin agregado).

5. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

El ADN cromosomal y plasmídico y los productos obtenidos por PCR fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración según el tamaño esperado del fragmento a resolver, empleando sistemas de tipo submarino ²⁰². La solución reguladora 0,5 X TBE (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico, y 1 mM EDTA) se utilizó para la preparación de los geles y como solución de electroforesis. Para observar la resolución de las bandas se agregó bromuro de etidio en una concentración final de 0,3 µg/ml antes de la solidificación del gel de agarosa. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,25 % (p/v) azul de bromofenol, 0,25 % (p/v) xilencianol, y 30 % (v/v) glicerol, en una proporción 5:1 de volumen de muestra:solución de siembra. Como marcador de peso molecular se utilizó 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen). Los geles fueron corridos a una intensidad de corriente constante de 75 mA y una vez finalizada la electroforesis, los fragmentos de ADN se detectaron empleando un transiluminador de luz UV (FBTIV-88, Fischer Biotech). Para registrar los geles se utilizó una cámara Sony DSC-H7, adaptada para su utilización con un transiluminador.

6. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR o luego de la digestión con enzimas de restricción fueron purificados a partir de geles de agarosa 1 o 2 %

(dependiendo del tamaño del fragmento a purificar) mediante la tecnología de adsorción provista por el kit comercial GFX (General Electric Healthcare Life Sciences) siguiendo las indicaciones del proveedor.

7. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES CROMOSOMALES

En la Figura MM1 se esquematiza el método empleado para la obtención de mutantes polares y no polares de *S. Typhimurium* desarrollado por Datsenko y colaboradores ¹⁹⁷. Este método se basa en la recombinación de fragmentos pequeños de ADN mediado por el sistema red del fago λ , luego de la transformación de las células con ADN lineal. Los fragmentos de ADN lineal se obtuvieron por amplificación por PCR de un casete de resistencia a Cm o a Km flanqueado por los dos sitios de reconocimiento de la recombinasa específica FLP (FRT), utilizando oligonucleótidos con extremos 5' homólogos al gen a mutar y extremos 3' que hibridan con los sitios FRT de los plásmidos molde pKD3 (CmR) o pKD4 (KmR) ¹⁹⁷ (Fig. MM1). Con estos fragmentos se transformaron células de *Salmonella* 7065/pKD46 electrocompetentes. El plásmido pKD46 ¹⁹⁷ es termosensible, y presenta los genes *gam*, *bet* y *exo* del fago λ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa, cuyos productos génicos evitan la degradación del ADN lineal por la nucleasa RecBCD de la bacteria y facilitan la recombinación de éste con el cromosoma. La preparación de células 7065/pKD46 competentes se llevó a cabo de acuerdo al punto 9, excepto que los cultivos fueron crecidos a 30°C y con el agregado de 20 mM arabinosa (concentración final). La electroporación se realizó con 7 μ l de producto de PCR purificado y concentrado por precipitación con 10 % V/V de acetato de amonio 3 M y un volumen de isopropanol, o mediante kit comercial (ver punto 6). Previo a la selección, se incubó 1 hora a 30°C con agitación en 800 μ l de LB (para contribuir a la inserción lineal del fragmento al cromosoma) y luego 3 horas a 37°C con agitación (para curar las células del plásmido termosensible pKD46). La selección de las células transformantes se realizó plaqueando las mismas en medio LB-agar suplementado con la mitad de la concentración convencional de

antibiótico, y posterior repique de las colonias resistentes en placas LB-agar en presencia del antibiótico en la concentración final correspondiente. La presencia de la mutación deseada en las células transformantes fue confirmada por PCR a partir de colonia (punto 4.2). Finalmente, la mutación obtenida fue transferida a la cepa silvestre 14028s mediante transducción con el bacteriófago P22 HT (ver punto 11).

La inserción en un operón del casete de CmR en orientación contraria a la del gen mutado provocó en todos los casos estudiados un efecto polar sobre los genes corriente abajo. Para obtener mutaciones no polares, se deletionó el casete de resistencia al antibiótico mediante la acción de la recombinasa específica FLP sobre sus sitios blanco FRT. Para ello se transformó la cepa 14028s conteniendo la mutación polar CmR con el plásmido termosensible pCP20 (AmpR) (punto 10), que presenta el gen que codifica para FLP inducible por un aumento en la temperatura ¹⁹⁹. Se seleccionaron colonias AmpR a 30°C, y luego se repicaron en LB-agar a 42°C para inducir la expresión de la recombinasa y evitar la replicación del plásmido que, de esta manera, se pierde. Se seleccionaron las mutantes deseadas por contraselección en placas conteniendo Cm o Amp como células sensibles a dichos antibióticos (Fig. MM1).

8. CONSTRUCCIÓN DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES CROMOSOMALES A LACZY

Para la obtención de mutantes cromosomales por inserción del gen reportero *lacZ* corriente abajo de la secuencia promotora de interés (fusión transcripcional), se empleó el método de transformación lineal descrito para la construcción de mutantes cromosomales ¹⁹⁷ (punto 7) sólo que, en este caso, los fragmentos de ADN lineales se obtuvieron por reacción de PCR empleando como molde el vector pJB20, que codifica para los genes *lacZY* (carente de secuencias regulatorias propias) y el casete de Cm, flanqueado por los dos sitios de reconocimiento de la recombinasa específica FLP (FRT) (Fig. MM2). En estas

construcciones la inserción del gen reportero reemplazó el marco de lectura abierto situado corriente debajo de la secuencia promotora de interés y se utilizaron los mismos oligonucleótidos que los diseñados para delecionar dicho gen (punto 7).

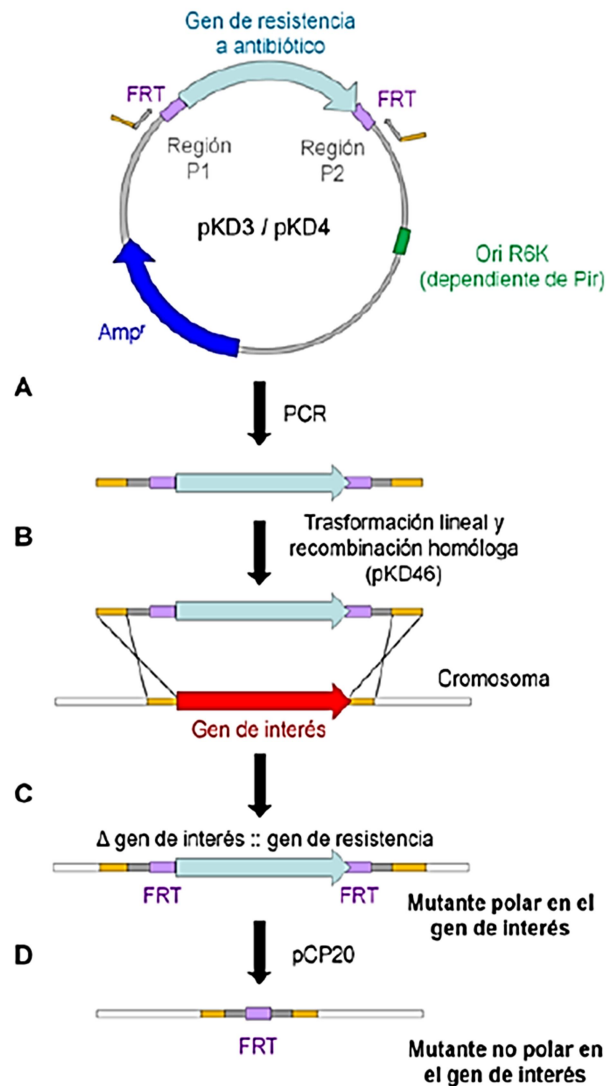


Figura MM1. Obtención de mutantes polares y no polares en *Salmonella*. El esquema muestra la estrategia descrita por Datsenko y Wanner para la obtención de mutantes cromosomales. **(A)** Se genera por PCR un fragmento de ADN lineal que contiene el gen de resistencia a Cm o Km (flecha celeste) utilizando como molde al plásmido pKD3 o pKD4, respectivamente, y oligonucleótidos que presentan secuencias homólogas a los extremos 5' o 3' del gen que se quiere delecionar (línea amarilla) y a los sitios FRT (líneas grises). **(B)** Mediante electroporación se transforma una cepa *Salmonella* 7065 que exprese el sistema de recombinación lambda *red*. **(C)** Se seleccionan aquellas cepas que han intercambiado el gen a delecionar por el gen de resistencia y se confirma la mutación mediante PCR de colonia. **(D)** Para obtener la mutante no polar se transforma la cepa con un plásmido que exprese la recombinasa FLP que va a reconocer los sitios FRT y escindir el casete de resistencia a antibiótico. Se contra seleccionan colonias sensibles al antibiótico cuya resistencia está codificada en el gen escindido.

En el caso de la construcción de mutantes reporteras apolares, el casete de Cm fue escindido por la acción de FLP presente en el vector pCP20 de manera similar a lo descrito en el punto 7. De esta manera, se pueden generar fusiones transcripcionales que no afectan a los genes corriente abajo al gen en estudio.

La selección de las células transformantes se llevó a cabo como se describe en el punto 7, pero en este caso las placas de Petri se suplementaron, además, con el cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido (X-Gal), sustrato de la actividad β -galactosidasa codificada por el gen *lacZ*, a una concentración final de 0,12 mg/ml. Una reacción positiva de actividad β -galactosidasa genera colonias de color azul en el medio sólido.

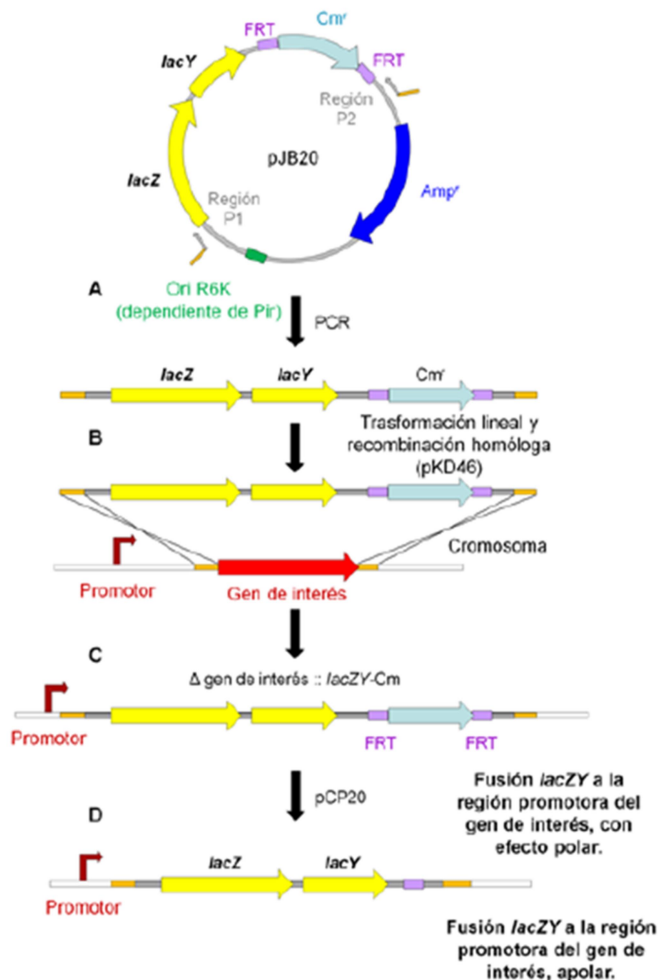


Figura MM2. Obtención de fusiones transcripcionales a *lacZY* polares y no polares en *Salmonella*. En la figura se esquematiza el método utilizado para la construcción de cepas reporteras portadoras de una fusión transcripcional a *lacZY* en un gen de interés. **(A)** Se genera por PCR un fragmento de ADN lineal que contiene los genes *lacZY* (amarillo) y el gen de resistencia a Cm (celestes), utilizando como molde al plásmido pJB20. los cebadores utilizados hibridan con las regiones P1 y P2 del vector (gris) que flanquean a los genes *lacZY-Cm* y a los sitios FRT (violeta). Además, estos cebadores presentan secuencias homólogas a las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen en estudio (naranja). **(B)** Mediante electroporación se transforma una cepa *Salmonella* 7065 que exprese el sistema de recombinación lambda *red*. **(C)** Se seleccionan aquellas cepas que han incorporado el gen de resistencia. **(D)** Este último puede a su vez ser escindido mediante acción de la recombinasa FLP que actúa específicamente sobre las secuencias FRT. Para ello, se transforma a las mutantes obtenidas en **(C)** con el plásmido pCP20, que expresa el gen de la recombinasa. Finalmente, se verifica la pérdida de la resistencia (mutante no polar).

La inserción del casete *lacZY-Cm* en las células transformantes fue confirmada por PCR a partir de colonia (punto 4.2), con un oligonucleótido directo complementario a la región promotora de interés y otro reverso que hibrida al inicio del gen *lacZ*. Finalmente, la mutación obtenida fue transferida a la cepa salvaje 14028s mediante transducción con el bacteriófago P22 HT (punto 11).

En los casos donde no se obtuvieron con éxito las fusiones transcripcionales a *lacZY* por transformación lineal, el casete de resistencia introducido como se detalla en el punto 7 fue escindido por recombinación de las secuencias FLP¹⁹⁷, seguido de la integración sitio específica del plásmido pKG136 en los sitios FRT remanentes, como se describe en el trabajo de Ellermeier y col. (2002)²⁰¹.

9. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Para la preparación de células competentes de *E. coli* o *S. Typhimurium*, se inocularon 300 ml de medio LB fresco con 3 ml de un cultivo saturado de la bacteria en el mismo medio, y se incubó con agitación permanente a 37°C hasta DO₆₃₀ de 0,5 a 0,8. El cultivo se enfrió en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 7.000 rpm a 4°C. El sedimento celular obtenido se lavó 1 vez con 1 volumen de agua destilada estéril fría y 3 veces con 10 ml de 10 % (p/v) glicerol. Finalmente, se resuspendió en 0,6 ml de 10 % (p/v) glicerol y se fraccionó en tubos estériles, que fueron utilizados inmediatamente o almacenados a -80°C hasta el momento de su uso.

10. TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN

Para la transformación celular se colocaron 40 µl de la suspensión de células competentes preparadas como se indica en la sección anterior en una celda de electroporación y se agregaron 1 a 3 µl del plásmido, la mezcla de ligación, o 7 µl del fragmento lineal purificado y se electroporó utilizando un voltaje de 2,5 kV en un electroporador marca Bio-Rad. Luego se agregó 1 ml de medio LB y se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante. Para la generación de mutantes cromosomales se detallan en el punto 7 las modificaciones de este protocolo. Las células fueron concentradas por centrifugación y se sembraron

con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB agar suplementado con el antibiótico adecuado para seleccionar las bacterias transformantes. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

11. UTILIZACIÓN DEL BACTERIÓFAGO P22

11.1. OBTENCIÓN DE LISADOS EN MEDIO SEMISÓLIDO

Las mutaciones en los diferentes genes de *Salmonella* descritas durante esta Tesis fueron movilizadas mediante transducción generalizada con fago P22. Primero se realizó un lisado de la cepa dadora, para lo cual se tomaron 100 µl de un cultivo saturado de la cepa dadora y se lo incubó con 100 µl de una dilución 10^{-4} de la suspensión de fagos P22 HT crecidos en la cepa salvaje 14028s. Luego se agregaron 3 ml de medio LB semisólido fundido a 42°C, se agitó vigorosamente y se distribuyó la mezcla sobre placas de Petri con medio de cultivo LB sólido. Las placas fueron incubadas 5-7 horas a 37°C hasta observar placas de lisis de aproximadamente 1 mm de diámetro. Para coleccionar el lisado se agregó a la placa 5 ml de medio LB líquido y, con ayuda de una espátula de Drigalsky, se recogió la mezcla de LB semisólido, bacterias y fagos. A esta mezcla se la trató con 200 µl de cloroformo para completar la lisis celular y se la centrifugó 10 min a 8.000 rpm. El sobrenadante obtenido, que contiene la suspensión de fagos, se conservó con cloroformo a 4°C hasta el momento de su uso²⁰³.

11.2. OBTENCIÓN DE LISADOS DE LA CEPA DADORA EN MEDIO LÍQUIDO

Esta técnica se utilizó para transferir, mediante transducción, el plásmido pCP20 utilizado para curar la resistencia al antibiótico de algunas mutantes. El

lisado se obtuvo centrifugando 5 minutos a 5000 rpm 1 ml de un cultivo crecido durante 16 hs de la cepa dadora correspondiente, resuspendiendo el sedimento celular en 5 ml de medio Nutrient Broth y agregando 0,05 ml de Sales E 50 X (ver composición en la Tabla 5), 0,05 ml de glucosa 20 % (p/v) y 5×10^7 pfu/ml de fago P22 HT. Tras una incubación de 6 hs a 37°C sin agitación, se agregaron 200 μ l de cloroformo y se centrifugó durante 10 minutos a 8000 rpm. El sobrenadante obtenido, que contiene la suspensión de fagos, se conservó con cloroformo a 4°C hasta el momento de su uso.

Tabla 5: Composición de sales E (50 X)

Composición	Concentración
MgSO ₄ .7H ₂ O	10 g/l
Acido cítrico.H ₂ O	100 g/l
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	655 g /l
NaNH ₄ HPO ₄ .4H ₂ O	175 g/l
CHCl ₃	3 ml/l

11.3. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA

Una alícuota de 70 μ l de un cultivo saturado de la cepa receptora se incubó durante 30 minutos a 37°C sin agitación con 30 μ l de un lisado de P22 proveniente de la cepa dadora ²⁰³. En los casos en que se utilizaron los lisados preparados en medio líquido, se agregaron sales E a una concentración final 1 X a la mezcla de transducción. Se utilizaron como controles mezclas en las cuales se reemplazaron bacterias o fagos por LB estéril, según corresponda. La selección de transductantes se realizó sembrando el volumen de reacción de transducción

en placas de Petri con medio LB sólido, suplementado con el antibiótico correspondiente para su selección y 1,7 mM EGTA.

12. TÉCNICAS BIOINFORMÁTICAS

Las secuencias de las regiones promotoras de los genes del regulón Zur fueron obtenidas de la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El motivo consenso para el sitio de unión Zur fue generado entrenando el programa MEME ²⁰⁴ con las regiones promotoras nombradas en el texto de Resultados y Discusión, considerando como restricción para el programa que encuentre sólo un motivo en cada secuencia. La matriz obtenida luego fue utilizada para buscar nuevos motivos en el genoma de *Salmonella* mediante el programa MAST ²⁰⁵. Aquellos operadores con un valor “*p*” menor a $1,0 \times 10^{-7}$, presentes en regiones intergénicas y corriente arriba de marcos de lectura abiertos fueron considerados para el análisis posterior. Para el análisis de la localización subcelular se utilizó el software PSORT ²⁰⁶ con los parámetros provistos por el servidor (<http://psort.hgc.jp/form.html>).

13. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

13.1. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA EN TUBO

Las medidas de actividad β -galactosidasa se realizaron siguiendo una modificación del protocolo propuesto por Miller ²⁰⁷. Brevemente, se creció un cultivo de la cepa a analizar en medio M9 suplementado con el antibiótico correspondiente hasta fase estacionaria, en presencia de 2 μ M o 10 μ M de CuSO₄, 10 μ M de FeSO₄, 10 μ M de CuSO₄ y FeSO₄, 50 μ M de ZnSO₄, 50 μ M de EDTA o en ausencia de cualquier agregado. Para las medidas en medio LB, los cultivos se crecieron en presencia de 0,25 mM de CuSO₄, 0,25 mM de FeSO₄, 0,25 mM de

CuSO₄ y FeSO₄, o sin ningún agregado. Las concentraciones elegidas se basaron en resultados previos del laboratorio. Luego se tomó una alícuota de 200 µl del cultivo y se le determinó la densidad celular por medidas de absorbancia a 630 nm (DO₆₃₀). Para el ensayo de actividad, se agregaron 30 µl del cultivo al medio de reacción, que contenía 275 µl de una solución reguladora Z (16,1 g/l Na₂HPO₄·7H₂O; 5,5 g/l NaH₂PO₄·H₂O; 0,75 g/l KCl; 0,246 g/l MgSO₄·7H₂O; 0,27 % (v/v) β- mercaptoetanol), 24 µl de cloroformo, y 14 µl de 0,1% (p/v) SDS. La mezcla se agitó vigorosamente por 5 segundos. La reacción se llevó a cabo a 30°C y se inició por el agregado de 60 µl del reactivo o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml a cada tubo, se mezclaron los reactivos y se dejó a 30°C hasta observar coloración amarilla. La reacción colorimétrica se detuvo con el agregado de 150 µl de 1 M Na₂CO₃. Se registró el tiempo de reacción, y se determinó la absorbancia de las muestras a 405 nm utilizando un lector de microplacas Biotek modelo Synergy 2. Cada reacción se procesó por duplicado y como blanco de reacción se utilizó un tubo al que se le agregó 30 µl de LB en lugar de cultivo. La actividad enzimática se calculó según la siguiente fórmula: Actividad (UM) = ((DO₄₀₅ tubo 1 + DO₄₀₅ tubo 2) / 2 x DO₆₃₀ x Δt) x 10000 Donde DO₄₀₅ tubo 1 y DO₄₀₅ tubo 2 son cada una de las medidas de absorbancia a 405 nm de una muestra, obtenidas al analizarla por duplicado; Δt es el tiempo de reacción en minutos; y DO₆₃₀ la densidad óptica a 630 nm del cultivo líquido.

13.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA EN MICROPLACA

Para los ensayos en microplaca, los cultivos fueron crecidos toda la noche en medio LB en una microplaca de 96 pocillos, a 37°C y con agitación continua, en un lector de microplacas Biotek modelo Synergy 2. Las concentraciones de EDTA agregadas fueron las siguientes: 0, 10, 30, 75, 100, 150, 300, 500, 1000 y 2000 µM, estas concentraciones se eligieron luego de varios ensayos de puesta a punto realizados con anterioridad. El crecimiento de los cultivos fue monitoreado durante toda la noche, obteniéndose además la DO₆₃₀ final, luego de

16 hs de crecimiento. Para el ensayo de actividad, se tomaron 100 μl del cultivo, los cuales fueron tratados con 10 μl de cloroformo, y se transfirieron 7,5 μl a una nueva microplaca de 96 pocillos conteniendo la mezcla de reacción: 75 μl de una solución reguladora Z (16,1 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,5 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,75 g/l KCl; 0,246 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,27 % (v/v) β - mercaptoetanol) y 4 μl de 0,1% (p/v) SDS, por pocillo. La mezcla se agitó por pipeteo. La reacción se llevó a cabo a 30°C en un lector de microplacas Biotek modelo Synergy 2 y se inició por el agregado de 15 μl del reactivo o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml, el cual fue agregado a cada pocillo mediante el sistema de dispensador del aparato. La reacción colorimétrica se monitoreó durante 30 minutos, tomándose una lectura cada 1,5 minutos. La actividad enzimática se calculó según la siguiente fórmula: Actividad (UM) = (pendiente x 20000)/ DO_{630} . Donde la pendiente es el cociente entre $\Delta\text{DO}_{405}/\Delta t$ para un tramo particular de la curva densidad óptica a 405 nm versus el tiempo de reacción (puntos 10 a 15 de la curva), y la DO_{630} es la densidad óptica a 630 nm del cultivo líquido.

14. CRECIMIENTO EN CONDICIONES DE BAJO Zn

14.1. CRECIMIENTO EN MEDIO SÓLIDO

Cultivos crecidos toda la noche en LB de *Salmonella* silvestre y mutantes fueron lavados dos veces con una solución de PBS 1X (del inglés Phosphate Buffered Saline; 8,5 g/L de NaCl, 1,4 g/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 2,7 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y normalizados a una DO_{630} de 1 unidad de absorbancia. Las suspensiones de bacterias se diluyeron 1:10 de manera seriada y se sembraron 5 μl de cada una sobre las correspondientes placas de LB agarosa 1,5%. Se tomaron fotografías de las placas luego de incubarlas toda la noche a 37°C.

14.2. CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO

Para analizar el crecimiento en medio líquido, las cepas fueron crecidas en medio VB-MM a 37°C y luego diluídas 1:50 en el mismo medio suplementado o no con 3 μ M de ZnSO₄. Se tomaron alícuotas de 200 μ l de estas diluciones para inocular una microplaca de 96 pocillos y seguir su crecimiento toda la noche mediante medición de la DO₆₃₀ en un lector de microplacas Biotek modelo Synergy 2

15. ENSAYOS DE SOBREVIDA EN MACRÓFAGOS

Cultivos de *Salmonella* Typhimurium saturados, crecidos a 37°C con agitación, se centrifugaron 10 minutos a 6500 rpm y el sedimento celular se lavó y resuspendió con medio D-MEM. Las células se infectaron con los cultivos bacterianos, utilizando MOIs (MOI, del inglés Multiplicity of Infection) de aproximadamente 10. La placa se centrifugó 10 minutos a 1000 rpm y se incubó 20 minutos a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS y se agregó medio de cultivo suplementado con 30 μ g/ml de gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. La placa se incubó a 37°C y luego, a los tiempos indicados, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 0,05% Tritón X-100. Las UFC (Unidades Formadoras de Colonia) se determinaron mediante diluciones seriadas en medio LB-agar. Los porcentajes de invasión se calcularon en relación al inóculo bacteriano inicial utilizado para la infección de las células.

16. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN pZur

16.1. PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

La extracción de plásmidos a partir de células de *E. coli*, previamente transformadas, se realizó creciendo las células durante toda la noche a 37°C en 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, con agitación constante. El cultivo se centrifugó y se resuspendieron las células en 350 µl de solución STET (Sacarosa 8 %, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0 y 5 % Tritón X100). Luego se agregaron 10 µl de una solución conteniendo 10 mg/ml de Lisozima, 1 mg/ml de RNasa, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 y 50 % de glicerol. La mezcla se incubó 1 minuto a 100°C y luego se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm en una microcentrífuga de mesa. Con un palillo estéril se removió el pellet, de manera de conservar el sobrenadante en el mismo tubo eppendorf. Este sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico se sometió a una extracción con volúmenes iguales de cloroformo y fenol, equilibrado con 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, conservándose la fase acuosa. Para precipitar el ADN se agregó acetato de amonio 3 M, de tal manera de lograr una dilución al décimo de la sal y 2 volúmenes de etanol absoluto. Luego se incubó a -20°C durante 2 horas y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado obtenido se lavó con etanol 80 % (v/v) y se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20 µl de agua destilada estéril y se almacenó a -20°C hasta el momento de su utilización. Alternativamente, para obtener un ADN plasmídico de mejor calidad, se utilizó un kit comercial (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

16.2. DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las condiciones de digestión usadas fueron las recomendadas por los proveedores de las endonucleasas de restricción. Los volúmenes de reacción variaron entre 15-30 µl. Se utilizó aproximadamente 1 U de enzima por µg de ADN. En general, el tiempo de incubación para las digestiones del plásmido

fueron de 3 a 4 horas. Los resultados de los cortes con enzimas de restricción se verificaron mediante electroforesis de los productos obtenidos en geles de agarosa, como se describe en el punto 5.

16.3. REACCIONES DE LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l, conteniendo 1 U de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen), solución de reacción comercial 1X, y los fragmentos de ADN a ligar (vector e inserto en una proporción 1:4, respectivamente). Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 4°C o de 4 a 5 horas a temperatura ambiente. Luego de este período, las diferentes muestras fueron sometidas a diálisis en gota contra agua previamente esterilizada, utilizando discos de diálisis de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,025 μ m) (MILLIPORE) durante 60 minutos.

16.4. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN

La construcción del plásmido pZur fue realizada como se describe a continuación. En primer lugar, se clonó el marco de lectura abierto de *zur* (516 pb, oligonucleótidos Zur-Fwd-BamHI y Zur-Rvs-XhoI, ver Tabla 3). El fragmento correspondiente se digirió con *Bam*HI y *Xho*I y se clonó en el plásmido de mediano número de copias pHisparallel2, el cual ya ha sido utilizado en el laboratorio para la expresión de proteínas unidas a una cola de histidinas¹⁹². Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* XL1-Blue y se seleccionaron las transformantes en placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico correspondiente. La presencia del inserto se verificó por PCR a partir de colonias y análisis por restricción utilizando las enzimas *Bam*HI y *Xho*I. Para verificar la ausencia de mutaciones en el inserto, el plásmido se purificó y se secuenció (Maine). Posteriormente, y ante la imposibilidad de obtener una

expresión adecuada de Zur, el plásmido pZur se insertó por transformación en otras cepas de *E. coli* electrocompetentes (BL21 DE3, BL21 DE3 C43 y BL21 DE3 pGR07).

17. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE ZUR

Las cepas de *E. coli* con el plásmido que expresa el represor Zur fueron crecidas en LB suplementado con ampicilina, con agitación constante a 37°C hasta saturación del cultivo. Luego se diluyeron 1/100 en 200 ml de medio fresco y se incubaron a 37°C o 17°C, hasta una DO_{630} de 0,6. En ese momento se adicionó IPTG hasta una concentración final de 0,1 mM y se dejó crecer los cultivos a 37°C durante 4 horas, y los cultivos a 17°C se dejaron toda la noche. Para la cepa portadora del plásmido pGR07, se adicionó cloranfenicol para la selección del plásmido y L-arabinosa 0,5 mg/ml para la inducción de las chaperonas GroES y GroEL. Las células se colectaron por centrifugación a 5.000 g a 4°C durante 10 minutos y se resuspendieron en 30 ml de solución de sonicación (50 mM Buffer fosfato pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol y 1 mM PMSF), posteriormente se sometieron a 3 pulsos de sonicación de 30 segundos cada uno al 40 % de amplitud empleando un procesador ultrasónico modelo GEX 600 (Sonics y Materials). El procedimiento se llevó a cabo a 4°C y las suspensiones obtenidas se centrifugaron durante 40 minutos a 17.000 rpm en frío. El sobrenadante se sembró en una columna de afinidad de Ni-NTA agarosa equilibrada con 50 mM Buffer fosfato pH 8,0, 300 mM NaCl y 20 mM imidazol. La columna con la proteína unida se lavó primero con esta misma solución amortiguadora y luego se pasaron sucesivamente buffers con mayor cantidad de imidazol: 75 mM, 150 mM, 250 mM y 500 mM de Imidazol. Zur-His fue recuperada por elución con 250 mM de Imidazol y dializada exhaustivamente contra el mismo buffer sin imidazol. La proteína purificada fue analizada por SDS-PAGE y la concentración fue calculada mediante el ensayo con ácido bicinonínico ($C_{20}H_{12}N_2O_4$) con albúmina sérica bovina como estándar.

18. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinonínico (Bio-Rad), según especificación de los fabricantes. Brevemente, se agregaron 200 μ l de reactivo conteniendo CuSO_4 y solución de ácido bicinonínico en una proporción 1:50 en volumen, a 50 μ l de muestra, y se incubó a 37°C. A los 10 minutos se midió absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas BioTek ELx808. Como testigo se utilizó albúmina sérica bovina (BSA).

19. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Las fracciones eluídas durante la purificación de Zur se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida ²⁰⁸. Antes de la siembra, las muestras se calentaron 3 minutos a 100°C en solución de siembra de proteínas, compuesta por 120 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,5 % (v/v) β -mercaptoetanol, 2 % (v/v) glicerol, 2 % (p/v) SDS y 0,002 % (p/v) azul de bromofenol. Las corridas electroforéticas se realizaron en una solución reguladora 25 mM tris base, 192 mM glicina pH 8,3 y 0,1 % (p/v) SDS, a una intensidad de corriente constante de 20 mA. La concentración de acrilamida utilizada en los geles de separación fue de 15 % (p/v) de una solución de acrilamida/bisacrilamida preparada en una relación 30:0,8. Luego de la corrida, los geles se tiñeron en una solución de 0,25 % (p/v) azul brillante de Coomasie R 250, 30 % (v/v) isopropanol y 10 % (v/v) ácido acético durante 2 horas, y se destiñeron en una solución de 25 % (v/v) etanol y 10 % (v/v) ácido acético durante 1 hora.

20. TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA (“WESTERN BLOT”)

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe en el punto 19 fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (GE) en una cuba de transferencia semi-seca (Trans-blot SD, Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo con una solución conteniendo 25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8,3 y 10 % (v/v) metanol, durante 30 minutos con una intensidad constante de 300 mA. Una vez terminada la transferencia, la membrana fue bloqueada con una solución de TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 137 mM NaCl) conteniendo 5 % (p/v) de leche en polvo descremada, durante 60 minutos con agitación. Luego se incubó la membrana con una dilución 1/1000 de anticuerpos monoclonales anti-HIS en la solución TBS/leche. Una vez finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS/leche. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces con solución TBS por 10 minutos cada vez, y luego se incubó durante una hora con anticuerpos policlonales anti ratón (Sigma) conjugados con la enzima fosfatasa alcalina, diluidos 1/3000 en la misma solución TBS. A continuación, se realizó un lavado de 10 minutos con TBS y un lavado con una solución conteniendo 100 mM Tris-HCl pH 9,0, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂. Luego, se colocó la membrana en una solución de la misma composición a la cual se le agregó 0,15 mg/ml BCIP y 0,3 mg/ml NBT disuelto en 70 % N-N-dimetilformamida y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente hasta desarrollo de color.

21. FOSFORILACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Las reacciones de fosforilación de los oligonucleótidos se llevaron a cabo en un volumen de 10 µl, conteniendo una solución de fosforilación comercial suplementada con 45 µCi de [γ -³²P]ATP (3000 mCi/µmol, 10 µCi/µl, New England Nuclear), 15 pmoles del oligonucleótido, y 10 U de T4 polinucleótido

quinasa (Invitrogen). Se incubó 30 minutos a 37°C, y luego se detuvo la reacción por inactivación de la enzima, calentando la mezcla a 65°C durante 10 minutos.

22. PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN MARCADO RADIATIVAMENTE PARA SU UTILIZACIÓN EN LOS ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

Para cuantificar los fragmentos de ADN utilizados en los ensayos de retardo de la movilidad electroforética, cada fragmento correspondiente a un promotor en estudio fue amplificado con un oligonucleótido marcado radiativamente y uno sin marcar según se indica en cada experimento. A su vez, se realizó la misma reacción de PCR no radiactiva. Todos los productos de PCR fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% para verificar la presencia de una única banda y purificados a partir del gel mediante el kit comercial GFX (General Electric Healthcare) siguiendo las indicaciones del proveedor. Los fragmentos no radiactivos fueron cuantificados midiendo absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta la relación: $1 \text{ UAbs}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Luego, se sembraron en un gel de agarosa cantidades conocidas del fragmento no radiactivo cuantificado y distintos volúmenes de la sonda a cuantificar. A partir de estos geles se determinó la concentración de la sonda de interés utilizando el análisis de regresión lineal.

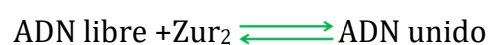
23. ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La interacción de Zur con las regiones promotoras correspondientes fue analizada mediante la técnica de retardo de la movilidad electroforética de Lane y colaboradores ²⁰⁹. Los fragmentos de ADN correspondientes a las distintas regiones promotoras fueron amplificados por PCR utilizando los oligonucleótidos detallados en la Tabla 3. Previamente, se fosforiló el extremo 5'

del oligonucleótido reverso con ^{32}P por medio de la oligonucleótido quinasa T4 (Invitrogen), como se describe el punto 21. Se utilizaron 2 fmoles de cada fragmento de ADN marcado y se incubaron con diferentes cantidades (indicadas en la leyenda de cada Figura) de Zur purificado por 20 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20 μl , conteniendo además solución tampón comercial React3 (Invitrogen), 5 mM DTT, 10 %, Glicerol, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ADN de esperma de salmón (Sigma) y 25 $\mu\text{g/ml}$ de Albúmina Sérica Bovina (BSA). Luego se agregó solución de siembra (0,25 % (p/v) azul de bromofenol, 0,25 % (p/v) xilencianol, y 30 % (v/v) glicerol) en una proporción 20:1 de muestra:solución (en volumen) y se sembró en geles de poliacrilamida:bisacrilamida 29:1 no desnaturalizantes de concentración final 7 % (p/v). Para la preparación de los geles y como solución de corrida se utilizó 25 mM Tris-HCl y 190 mM glicina pH 8,3. La corrida electroforética se llevó a cabo a 4°C a una intensidad de corriente de 6 mA por gel. Los geles fueron secados a 80°C durante 60 minutos en un secador de geles con bomba de vacío (SGD 2000, SAVANT), para luego ser incubados toda la noche en un cartucho específico con una pantalla que capta las emisiones de fósforo, y posteriormente escaneada en el analizador Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare Life Sciences).

24. CÁLCULO DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO APARENTES A PARTIR DE LOS GELES DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

Para la interacción de Zur con los promotores *PznuA*, *PzinT*, *PrpmE2*, *PSTM14_1454* y *PSTM14_3193* se calcularon las constantes de disociación aparentes (K_D), a partir de la intensidad de las bandas en los geles de interacción ADN-proteína. Para esto se consideraron las reacciones moleculares en equilibrio:



La fracción de sonda unida (FU) o de sonda libre (FL) en cada reacción se graficó en función de la concentración de Zur_2 o en función de la concentración de N,N,N',N'-Tetrakis-(2piridilmetil) etanoldiamina (TPEN), respectivamente. Los datos se ajustaron a la curva $FU=B_{m\acute{a}x}[Zur_2]/(K_D[Zur_2])$ o $FL=B_{m\acute{a}x}[TPEN]/(K_D[TPEN])$, respectivamente, mediante una regresión no lineal usando el complemento Solver del Excel, como se describe en trabajos previos a esta Tesis ^{210,211}. Mediante esta metodología, pudimos determinar los valores de la constante de equilibrio de disociación (K_D), la cual se relaciona directamente con la afinidad del represor por los promotores estudiados.

25. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) PARA METALES

Los ensayos de inhibición con Cu se hicieron tomando cultivos crecidos toda la noche de la cepa de *Salmonella* Typhimurium 14028s silvestre y de las mutantes indicadas, realizando una dilución 1:10 en medio LB fresco conteniendo concentraciones crecientes de $CuSO_4$. Los experimentos se hicieron en un volumen final de 1 ml. Luego de 15 horas de incubación a 37°C y en agitación continua, se tomó la medida de la DO_{630} .

Para los ensayos de sensibilidad a Cu en ausencia de oxígeno se prosiguió como se describe en el trabajo de Pontel y Soncini ¹⁹², sembrando 20 μ l de una dilución 5×10^{-7} en PBS 1X de un cultivo crecido hasta saturación en placas de LB-agar conteniendo concentraciones crecientes de $CuSO_4$. Las placas se incubaron a 37°C por 72 horas en condiciones anaeróbicas generadas por el Sistema de jarra Gaspak y un sobre AnaeroGen (OXOID). La ausencia de oxígeno se verificó usando indicadores de anaerobiosis (OXOID). La CIM se determinó como la mínima concentración de $CuSO_4$ a la cual no hay crecimiento bacteriano.

Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima en condiciones de aerobiosis, se siguió el mismo protocolo utilizado para la CIM en condiciones de anaerobiosis, con la diferencia que las placas fueron incubadas por 24 horas a 37°C directamente en estufa, en presencia de oxígeno.

Resultados y Discusión

Capítulo I:

La respuesta transcripcional de
Salmonella Typhimurium frente a cobre
y zinc

1. LA RESPUESTA GLOBAL DE *SALMONELLA* FRENTE A IONES COBRE Y ZINC

Los iones cobre y zinc (Cu y Zn, respectivamente) son componentes celulares esenciales requeridos en un gran número de enzimas involucradas en diferentes rutas metabólicas ²¹². A pesar de ello, incluso a concentraciones moderadas, estos iones pueden competir por sus sitios de unión en enzimas con otros iones esenciales, generando inestabilidad, conformaciones inadecuadas y pérdida de función, dependiendo de la proteína que se trate. Como ejemplo, podemos mencionar que el Cu, que puede existir en dos estados de oxidación, Cu(I) y Cu(II), puede desplazar al hierro (Fe) de grupos Fe-S accesibles en deshidratasa y otras proteínas Fe-S ²¹³. Además, al ser un metal con actividad redox, puede catalizar la formación de puentes disulfuro inespecíficos y promover la generación de especies reactivas del oxígeno que llevarán al daño oxidativo de lípidos, ADN y proteínas ²¹⁴. Para prevenir esto, existen distintas redes de respuesta que detectan rápidamente una sobrecarga del metal e inducen mecanismos específicos de manejo, almacenamiento y/o tráfico de estos iones ^{65,215}. De esta manera, frente a un desbalance en la concentración de un elemento esencial, se ponen en marcha distintos mecanismos de acción que son específicos para ese elemento, es decir que se genera una cascada de señalización de acción directa sobre el problema; pero también se disparan rutas que le van a hacer frente al problema global o al estrés que genera de manera secundaria una fluctuación de un determinado elemento.

Dos análisis genómicos independientes realizados por transcriptómica en *E. coli* ^{216,217} revelan que el Cu activa no solo la expresión específica de mecanismos de resistencia como el regulón Cue y el sistema de expulsión de Cu CusCFBA (ausente en *Salmonella*), sino también activa genes involucrados en la respuesta al estrés global y periplásmico, probablemente como un mecanismo de defensa secundario contra el daño celular causado por el Cu. Esta respuesta secundaria incluye a SoxR, un sensor con propiedades redox que monitorea el estado redox de la célula ²¹⁸, y al sistema de dos componentes CpxR-CpxA, un sistema que detecta estrés de envoltura ²¹⁹.

Para comenzar este trabajo de Tesis, analizamos la respuesta transcripcional global de *Salmonella* frente a cambios súbitos de la concentración de Cu y Zn. Mediante el uso de un microarreglo de tipo Tiling ²²⁰ se analizó y comparó la respuesta transcripcional de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s luego de la exposición a concentraciones subletales de CuSO₄ o ZnSO₄ por 10 minutos, en medio rico (SLB) o en un medio mínimo definido (M9) ¹⁹³. Este experimento fue llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Michael McClelland (Vaccine Research Institute de San Diego, California). La elección de dos medios de cultivo, uno rico y otro mínimo, se debe a que la toxicidad de los metales puede verse afectada por las condiciones del medio y esto puede afectar la magnitud de la respuesta. El microarreglo de 385k fue diseñado en base a los genomas de *S. Typhimurium* LT2 (NC_003197.1) y 14028s (CP001363.1: genoma y CP001362.1: plásmido), utilizando sondas con una longitud de 46 a 50 oligonucleótidos, solapándose alrededor de 12 nucleótidos entre ellas.

Esta metodología nos permitió detectar valores de intensidad para cada una de las sondas utilizadas. Para simplificar los datos obtenidos, nos enfocamos solo en los marcos abiertos de lectura (ORFs, de sus siglas en inglés) anotados y putativos. Usando la herramienta WebarrayDB, calculamos los valores M y los correspondientes valores P para cada uno de los 6106 ORFs analizados en cada condición. Se estableció un umbral de valores M mayores a 0,5 o menores a -0,5 (correspondientes a un cambio en la transcripción de más de 1,41 veces en ambas direcciones) para definir activación o represión ante el agregado de Cu(II) o Zn(II).

De los 6106 ORFs analizados, 117 ORFs se observaron inducidos y 80 reprimidos en SLB en presencia de Cu (SLB vs SLB+Cu), mientras que en medio M9, un total de 71 ORFs se encontraban activados y 70 reprimidos (M9 vs M9+Cu). Además, 98 ORFs se indujeron cuando las células fueron crecidas en SLB en presencia de Zn (SLB vs SLB+Zn) y 208 cuando las células crecieron en medio mínimo conteniendo Zn (M9 vs M9+Zn). El número de genes reprimidos en presencia de Zn fue de 20 en medio SLB y de 233 en medio M9. Los cambios en el patrón de transcripción observado en cada condición se atribuyeron principalmente al agregado del metal y/o a las características intrínsecas del

medio de cultivo, debido a que no se observaron cambios significativos en el pH o el nivel de oxígeno en el medio luego del agregado del metal.

Al comparar los perfiles de expresión transcripcional de la bacteria luego del agregado de concentraciones subletales de CuSO₄ o ZnSO₄, pudimos distinguir entre respuestas específicas para el metal y los mecanismos de respuesta al daño celular global. Este análisis mostró que además de las redes regulatorias específicas y locales para un metal, muchas otras vías de respuesta reaccionan ante el exceso de estos iones metálicos.

2. INDUCCIÓN DE VÍAS REGULATORIAS GLOBALES Y ESPECÍFICAS EN RESPUESTA A COBRE Y ZINC

Los datos obtenidos se analizaron mediante la herramienta *on line* VENNY (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), que nos permite ordenarlos de acuerdo a características comunes o específicas. De esta manera, los datos se agrupan en diagramas de Venn, mostrando en forma gráfica e intuitiva las relaciones que existen entre ellos. Este análisis generó 15 grupos de transcritos activados y 14 grupos de transcritos reprimidos (Fig. RD1). La lista de genes en cada grupo se encuentra publicada ¹⁹³. Los diferentes grupos contienen genes previamente descriptos como parte de regulones globales o específicos de homeostasis de metales, la mayoría de ellos ligados a la defensa contra el estrés causados por dichos metales. En la Figura RD2 se muestran los perfiles representativos para un gen en particular perteneciente a cada uno de estos regulones.

Inspeccionamos entonces el estado de los genes previamente descriptos como parte de los regulones de respuesta a Cu y Zn. Como se esperaba, los genes controlados por el sensor de Cu CueR, como por ejemplo *copA*, *cueO* y *cueP*, se agruparon dentro del grupo de genes activados por Cu en ambos medios utilizados (SLB y M9), mientras que el gen *zntA*, controlado por ZntR y que codifica para el transportador de Zn (II), se ubicó dentro del grupo de genes

inducidos en presencia de Zn en ambos medios también (Fig. RD2). De manera interesante, los genes del regulón Cue y el transportador de Zn se vieron selectivamente reprimidos en presencia del otro metal únicamente en medio mínimo, una condición que podría exacerbar los efectos tóxicos de cada uno de estos iones (Fig. RD2). Como se ha reportado anteriormente por nuestro grupo de trabajo, también observamos la activación por Cu de dos de los tres *loci* controlados por el sensor de Au GolS (*golB* y *golTS*, pero no *gesABC*), pero a diferencia de lo que ocurre con el regulón Cue, la inducción por CuSO₄ sólo ocurre en las células crecidas en el medio rico, y no en el medio M9 (Fig. RD2).

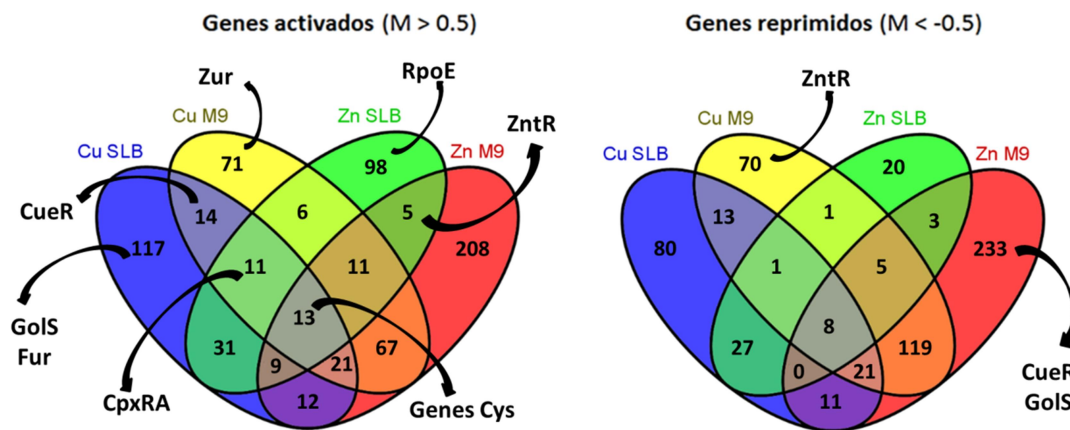


Figura RD1. Clasificación de los ORF en grupos mediante diagramas de Venn. Se realizó un estudio transcripcional de alta resolución (tiling array) de la respuesta a cobre y zinc de *Salmonella* serovar Typhimurium, tanto en medio rico (SLB) como en medio mínimo (M9) luego de 10 min de exposición al metal. Se identificaron en los diferentes grupos genes previamente asignados a regulones involucrados en la respuesta específica a estos metales, así como genes controlados por reguladores globales que intervienen en la respuesta a distintos tipos de estrés.

La sobrecarga de un determinado metal genera un desbalance que puede afectar la homeostasis de otro elemento esencial para la bacteria. Por ejemplo, una alta concentración de iones Cu(II) no solo genera disturbios en la homeostasis de Zn, sino también afecta el balance intracelular de Fe, ya que uno de los efectos tóxicos del Cu reside en la desestabilización de las proteínas con grupo Fe-S²¹³. Por lo tanto, nos enfocamos particularmente en el patrón de expresión de los genes controlados por el represor transcripcional Fur, como los operones *sitABCD* y *entCEBA*⁷⁶. Estos genes se vieron activados por Cu en SLB (Fig. RD2). La activación de los genes regulados por Fur en respuesta al exceso

de Cu y el aumento, en consecuencia, de la captura de Fe podría prevenir una competencia entre los iones Cu y Fe por los sitios de unión dentro de las proteínas y evitar así una unión inespecífica del Cu en estos centros Fe-S de gran importancia para la bacteria. Además, como se desarrollará más adelante en este trabajo de Tesis, al menos algunos de estos genes tienen un rol directo sobre la tolerancia a Cu.

En *E. coli* se ha reportado que los genes bajo el control del sistema de dos componentes CpxR–CpxA son inducidos en presencia de iones Cu ²¹⁷. La activación de esta red regulatoria también ocurre frente a iones Zn ²²¹, aunque el mecanismo de la activación de CpxA parece ser distinto en presencia de Cu o de Zn ²¹⁹. Nuestros datos revelaron la activación de al menos cinco genes controlados por CpxR (incluyendo a *ppiA*) cuando *Salmonella* es expuesta a Cu en ambos medios SLB y M9, así como a Zn en medio SLB (Fig. RD2). Estos genes se encuentran dentro de los once ORFs activados en *E. coli* como consecuencia de una sobrecarga de Cu ²¹⁷. De manera notable, los genes involucrados en la defensa contra el estrés de envoltura, pero controlados por el factor Sigma E alternativo, como *rseA*, *rseB* y *rseC*, fueron inducidos en respuesta a Zn pero no a Cu en SLB (Fig. RD2). Estos resultados avalan que, aunque tanto el Cu como el Zn generan disturbios en la homeostasis periplásmica, los blancos moleculares difieren entre estos factores de estrés.

Como cualquier metal redox activo, la exposición prolongada de *Salmonella* a Cu aumenta la transcripción de los genes del regulón SoxR/SoxS, involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, como fue notificado previamente para *E. coli* ^{216,222}. El único blanco conocido del sensor redox SoxR en enterobacterias es SoxS, que codifica un factor de transcripción que activa genes requeridos para contrarrestar el daño oxidativo ²¹⁸. En nuestros experimentos, observamos una activación marcada de *soxS* en presencia de CuSO₄ en medio SLB, pero no se observó una activación de la transcripción de ninguno de los genes controlados por SoxS (Fig. RD2). Es posible que el tiempo elegido para la recolección de las muestras (10 minutos luego del agregado del metal) no haya sido suficiente como para observar una inducción de dichos genes. De manera alternativa, puede ser necesaria una segunda señal,

independiente de Cu, para generar la activación de los genes regulados por SoxS bajo estas condiciones de exceso de iones Cu.

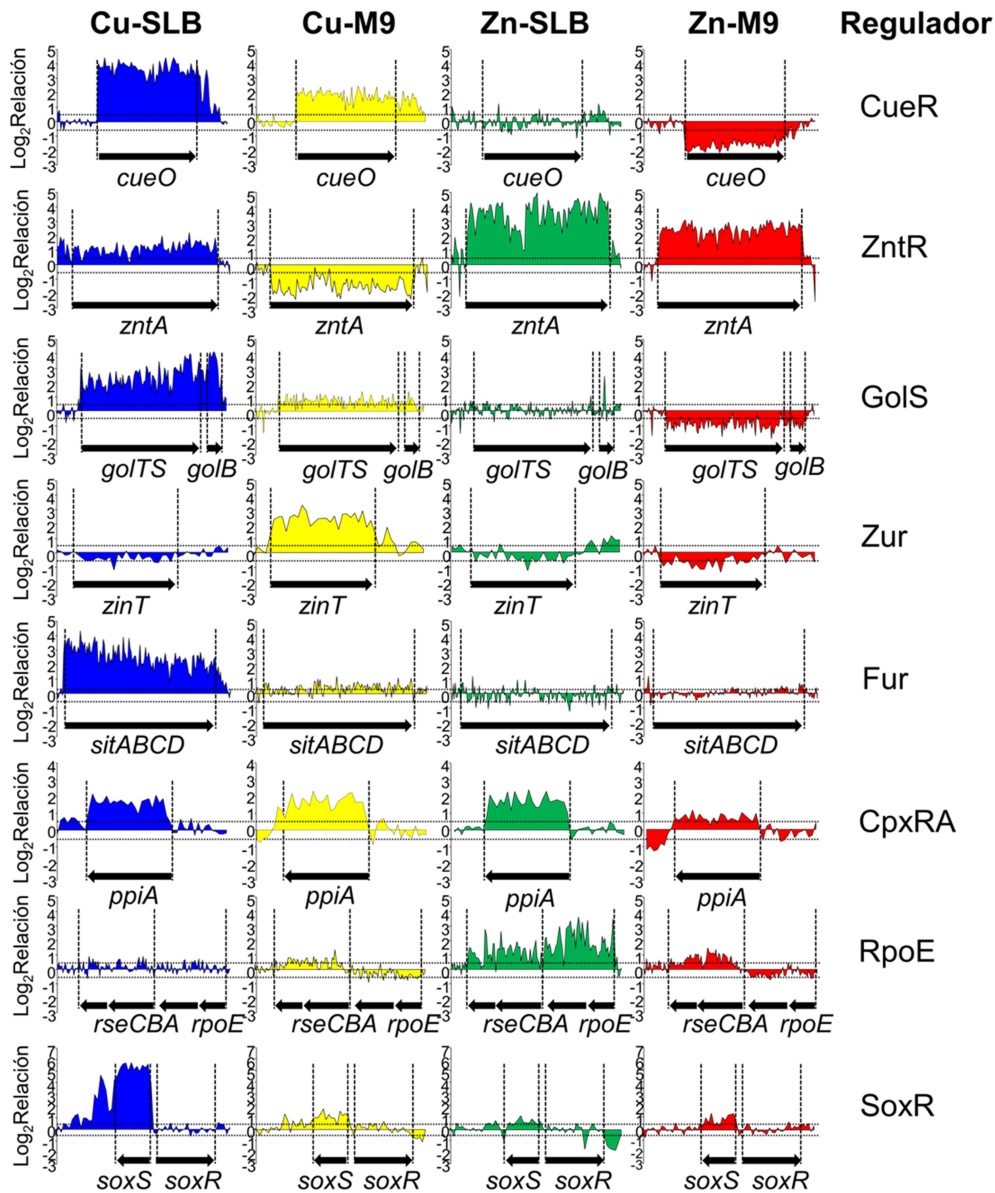


Figura RD2. Perfil transcripcional de genes representativos de los distintos regulones identificados en el análisis. La respuesta transcripcional determinada para el conjunto de oligonucleótidos correspondientes a cada ORF u operón, en cada condición ensayada, así como el regulador responsable de su expresión se indican en la figura.

Trece ORFs mostraron inducción en presencia de Cu o de Zn y tanto en medio rico o mínimo. Entre estos transcritos, cuatro codifican proteínas

involucradas en la biosíntesis de cisteína (*cysD*, *cysJ*, *cysK**cysT*) (Fig. RD1). Se reportó anteriormente que estos genes se inducen en *E. coli* por la presencia de Zn, pero no por Cu ²²³. Es importante destacar, sin embargo, que en el trabajo mencionado se usó una concentración menor de Cu(II) (5 μ M) a la que usamos en nuestros experimentos (10 μ M y 1 mM para el medio M9 y SLB, respectivamente). Los otros genes inducidos en presencia de ambos metales fueron *yhbY*, que codifica una proteína de unión al ARN; dos genes involucrados en la síntesis de pared celular (*flmB* y *pmrF*); *spr*, que codifica una lipoproteína involucrada en la resistencia al calor; y los genes *STM14_2986*, *STM14_4051* y *STM14_4163*, de función desconocida. Los productos de estos genes podrían ser requeridos en la defensa no específica contra el daño causado por metales o tener un rol central en la respuesta a estrés global.

Por otro lado, encontramos ocho genes reprimidos en presencia de Cu o de Zn y tanto en medio rico o mínimo, incluyendo a *cydA* y *cydB*, que codifican para una oxidasa terminal de citocromo d; *napF*, que codifica una proteína tipo ferredoxina que participa en el transporte de electrones hacia la reductasa periplásmica NapA; *manX* y *manY*, genes que codifican para dos transportadores específicos tipo PTS; y los genes *STM14_1405* y *STM14_3792*, que codifican proteínas cuya función no se conoce aún.

Por último, verificamos los experimentos de expresión transcripcional realizados con microarreglos, midiendo por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) en las condiciones estudiadas los patrones de inducción/represión para los genes del regulón Cue, *copA* y *cueO*, así como también el perfil de expresión del gen *zntA* (Fig. RD3).

En este Capítulo, obtuvimos una visión más clara de la respuesta de *Salmonella* frente a los estímulos de dos metales de transición, el cobre y el zinc. Ambos metales son de gran importancia para el metabolismo celular, tanto para procariontes como *Salmonella*, como para eucariotes superiores, como nosotros, los humanos. Estos metales ocupan un rol trascendental en muchas enzimas y por lo tanto, se requiere una coordinada respuesta ante cambios en el ambiente que hagan fluctuar la disponibilidad de ambos, ya sea por una sobrecarga como

por una falta de un dado metal. Vimos cómo distintas rutas de transducción de señales son alteradas ante un exceso de Cu o Zn, y cómo algunas vías que no participan directamente en la homeostasis de estos dos metales son reguladas indirectamente para mantener a la célula funcionando de manera óptima.

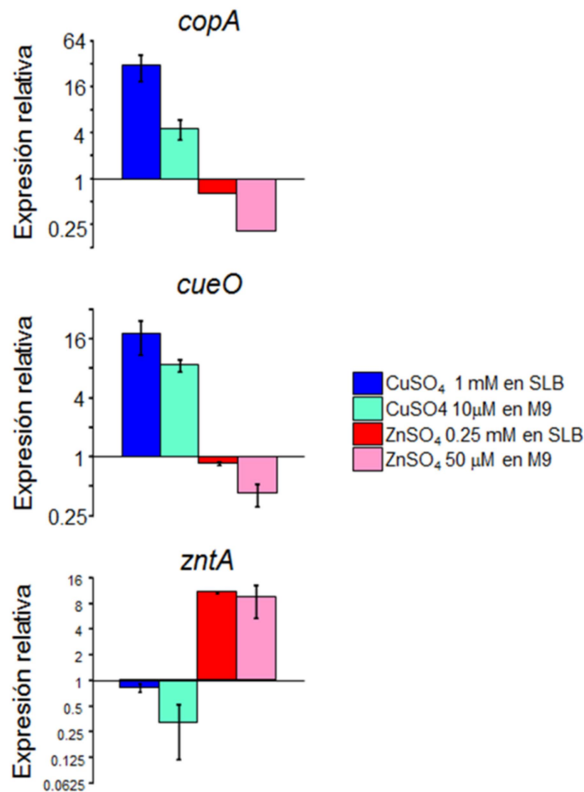


Figura RD3. Respuesta transcripcional de genes cuyo comportamiento frente a Cu y Zn es conocido. Se utilizó RT-qPCR para determinar los valores de transcripción de los genes regulados por CueR, *cueO* y *copA*; y el gen regulado por ZntR, *zntA* luego de exposición de *Salmonella* a 10 min de una concentración fija de iones Cu(II) y Zn(II), tanto en medio rico como en medio mínimo. Los niveles de transcripto fueron normalizados frente al gen control GAPDH y a su vez, al nivel sin agregado de metal. En este caso, las muestras utilizadas de mRNA fueron las mismas que las usadas en los experimentos con microarreglos. Los valores corresponden a dos experimentos independientes y las barras de error refieren a la desviación estándar de los duplicados.

Capítulo II:

Análisis del regulón Zur de *Salmonella*
Typhimurium

1. LA RESPUESTA DEL REGULÓN ZUR

Salmonella enterica, una de las mayores causas de enfermedad producida por alimentos alrededor del mundo, modula su expresión génica para sobrevivir y replicarse dentro de los tejidos del hospedador ²²⁴. Los metales esenciales como el magnesio (Mg), hierro (Fe) y manganeso (Mn) son responsables de la modulación de los mecanismos de señalización que afectan la expresión de factores de virulencia ^{65,130,225}. El transportador de Zn de alta afinidad ZnuABC ayuda ante esta limitación para que *Salmonella* pueda prosperar dentro de los tejidos del hospedador. De hecho, las bacterias intracelulares inducen la expresión de ZnuABC, y mutantes en *znuA* son incapaces de crecer dentro de células Caco-2 y fagocitos ¹⁶³. Esto sugiere que la limitación en la disponibilidad del Zn dentro de la vacuola que contiene a *Salmonella* es un proceso activo de defensa del hospedador para reducir la multiplicación del patógeno ^{114,226}. El operón *znuABC* es parte del regulón Zur, extensamente caracterizado en *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* ^{129,227}. En *Salmonella*, sólo se han reportado dos *loci* bajo el control de Zur, *znuABC* y *zinT*. Este último, codifica para un componente periplásmico y auxiliar al sistema de transporte ZnuABC requerido en condiciones severas de escasez de Zn ¹²⁹.

Los genes del regulón Zur se reprimen en presencia de Zn, por lo que se analizó el patrón de expresión presentado por dichos genes en el estudio transcripcional presentado en el Capítulo I. Este análisis no solo confirmó la represión de estos *loci* en presencia de Zn en ambos medios, sino también reveló la activación de éstos frente al agregado de CuSO₄ (Fig. RD2). Esta activación ocurre solamente en células crecidas en M9, y no había sido reportada hasta la fecha, tanto para *Salmonella* como para otras enterobacterias.

Observamos que dos genes presentan un patrón transcripcional similar al de los genes *znuA* y *zinT*, es decir, son reprimidos en presencia de Zn en medio M9 y SLB, e inducidos cuando hay Cu en medio M9 (Fig. RD4). Estos genes codifican para dos proteínas ribosomales, RpmE2 y RpmJ2. Esto corrobora observaciones previas realizadas *in silico* donde se encontró una posible modulación por Zur ¹⁵¹; pero su regulación efectiva no había sido demostrada.

Homólogos a *rpmE2* y *rpmJ2* fueron también reportados como parte del regulón Zur en otras bacterias, como en *Bacillus subtilis* y *Streptomyces coelicolor* ^{58,137}.

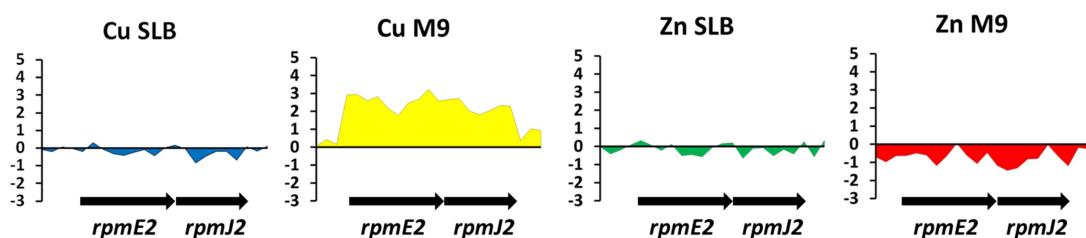


Figura RD4. Perfil transcripcional de los genes *rpmE2* y *rpmJ2* encontrado en los experimentos con microarreglos. Se grafica aquí la respuesta transcripcional determinada para el conjunto de oligonucleótidos, en cada condición ensayada, correspondientes a los genes que codifican dos proteínas ribosomales ortólogas de *Salmonella* Typhimurium 14028s.

El patrón transcripcional global fue verificado mediante RT-PCR semi-cuantitativa, donde se comprobó no solo la represión de los genes *znuA*, *zinT* y *rpmE2-rpmJ2* por la acción de Zn, sino también la inducción mediada por el agregado de Cu al medio mínimo (Fig. RD5). Es posible que exista una competencia entre estos dos iones metálicos y que esto sea el motivo por el cual los genes regulados por Zur se expresan cuando existe un exceso de iones Cu(II) en el medio M9, lo que podría generar un incremento en la disponibilidad de los iones Zn(II). Los niveles de transcripto de los genes *znuA*, *zinT* y *rpmE2* se mantuvieron elevados en todas las condiciones estudiadas en una cepa mutante para el represor Zur. Estos resultados nos permiten concluir que los genes que codifican estas proteínas ribosomales alternativas en *Salmonella* pertenecen al regulón Zur y son modulados transcripcionalmente de la misma manera que los demás genes del regulón.

2. BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES DEL REGULÓN ZUR

Uno de los principales objetivos postulados para este proyecto de Tesis doctoral, fue identificar y caracterizar genes pertenecientes al regulón Zur en

Salmonella Typhimurium 14028s. Para ello, y posteriormente al análisis minucioso realizado sobre los resultados del microarreglo contra el genoma de nuestra bacteria, se realizó un sondeo de los resultados con el fin de reconocer por los patrones de expresión a nuevos genes controlados por la metaloproteína Zur. En este análisis pudimos constatar que dos *loci* del genoma, *STM14_1454* y *STM14_3193* (Fig. RD6), se transcriben de manera similar a los genes *zinT*, *znuA* y *rpmE2-rpmJ2*. Estos genes se reprimen en presencia de Zn, tanto en medio SLB como en M9, y se inducen en presencia de Cu.

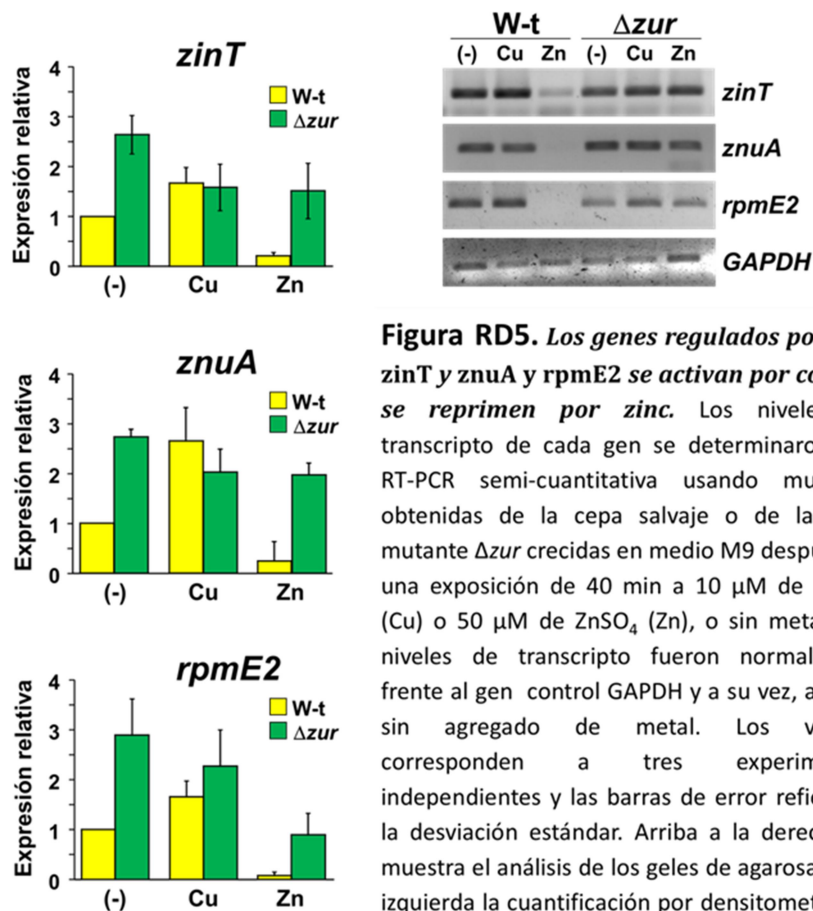


Figura RD5. Los genes regulados por Zur, *zinT* y *znuA* y *rpmE2* se activan por cobre y se reprimen por zinc. Los niveles de transcritos de cada gen se determinaron por RT-PCR semi-cuantitativa usando muestras obtenidas de la cepa salvaje o de la cepa mutante Δzur crecidas en medio M9 después de una exposición de 40 min a 10 μM de CuSO_4 (Cu) o 50 μM de ZnSO_4 (Zn), o sin metal. Los niveles de transcritos fueron normalizados frente al gen control GAPDH y a su vez, al nivel sin agregado de metal. Los valores corresponden a tres experimentos independientes y las barras de error refieren a la desviación estándar. Arriba a la derecha se muestra el análisis de los geles de agarosa y a la izquierda la cuantificación por densitometría de los productos obtenidos.

STM14_3193 y *STM14_1454* son 99% idénticos en secuencia de ADN y están codificados en dos profagos tipo Gifsy²²⁸ en la cepa 14028s del serovar Typhimurium, mientras que la cepa LT2 del mismo serovar sólo cuenta con una copia idéntica a *STM14_3193* en el profago Gifsy-1, el gen *STM2610* (Fig. RD7).

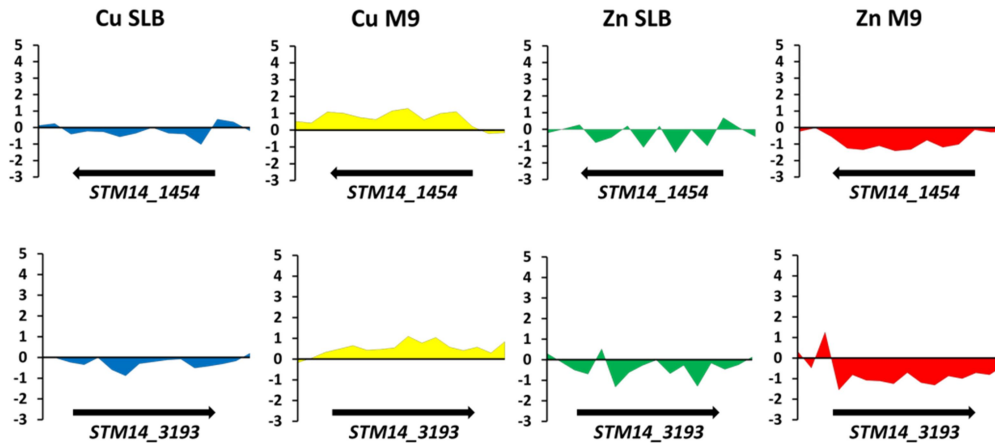
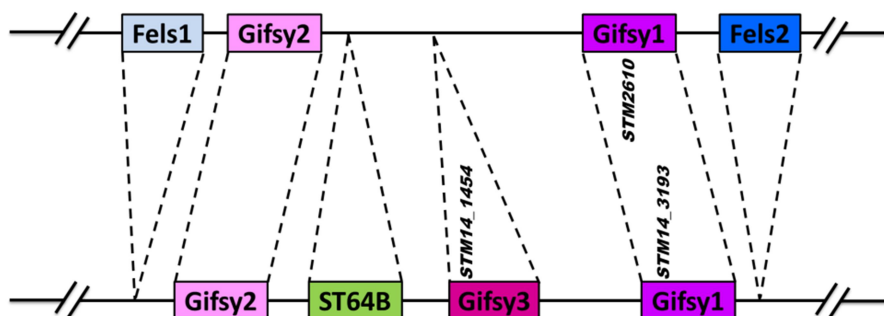


Figura RD6. Perfil transcripcional de los genes *STM14_1454* y *STM14_3193* encontrado en los experimentos con microarreglos. Perfil transcripcional de los genes *STM14_1454* y *STM14_3193* en las condiciones ensayadas determinada para el conjunto de oligonucleótidos para dichos genes. El patrón de transcripción es similar al de *zinT* (Fig. RD2), *znuA* y *rpmE2* (Fig. RD4), genes pertenecientes al regulón Zur.

Utilizando el programa *on line* PSORT ²⁰⁶, se detectó una secuencia de exportación al periplasma en ambas secuencias aminoacídicas, sugiriendo que estos genes codifican para proteínas de localización periplasmática. Esto además plantea la hipótesis que estos factores ejercen un rol en la homeostasis de Zn en este compartimento, sitio donde la bacteria detectaría tempranamente cambios en el contenido del metal en el ambiente que la rodea.

Salmonella Typhimurium LT2



Salmonella Typhimurium 14028s

Figura RD7. Alineamiento de las regiones de *Salmonella Typhimurium* LT2 y 14028s donde se encuentran los profagos ganados y perdidos por ambas cepas. Se muestra principalmente los distintos profagos de cada cepa y su ubicación relativa dentro de cada genoma. *STM14_1454* y *STM14_3193* se encuentran cosificados dentro de los profagos Gifsy3 y Gifsy1, respectivamente. *Salmonella* LT2 ha perdido al profago Gifsy1, resultando en una cepa que sólo posee un homólogo a estos genes, el gen *STM2610*.

3. ANÁLISIS DE LAS REGIONES PROMOTORAS

Utilizando la herramienta *on line* MEME ²⁰⁴ y las secuencias que se encuentran en la base de datos del NCBI de los promotores de los genes *zinT*, *znuA*, *znuC* y *rpmE2* de *Salmonella Typhimurium* y *Escherichia coli*, observamos la presencia de una caja putativa de unión al represor Zur (Fig. RD8). Este motivo, de 16 nucleótidos de largo, presenta un valor E de $6,2 \times 10^{-13}$. Haciendo uso de la herramienta bioinformática MAST ²⁰⁵, escaneamos el genoma de *Salmonella* en busca de regiones que contengan este motivo. Detectamos secuencias similares a esta caja en las regiones promotoras de los genes establecidos como parte del regulón Zur (*znuA*, *znuC*, *zinT* y *rpmE2-J2*), y en los promotores de los genes *STM14_1454* y *STM14_3193* (Fig. RD8A).

Se ha demostrado para *E. coli*, que Zur se une a los promotores de los genes que regula como un dímero de dímeros, y esto lo hace mediante su interacción con dos secuencias de nucleótidos que parecen estar invertidas y solapadas ¹⁴¹. Un análisis más detallado de las regiones que abarcan la secuencia consenso en los promotores de *Salmonella* nos permitió detectar una secuencia pseudo-palindrómica de 15 nucleótidos de longitud, muy conservada en la hebra codificante de cada gen (Fig. RD8B). En la hebra no codificante se encuentra otra caja similar, que se halla menos conservada pero en una disposición solapada respecto a la de la hebra codificante (Fig. RD8B). Esta caja podría estar regulando genes colindantes a ésta, como lo que ocurre en el caso de los genes *znuA* y *znuCB*, los cuales están dispuestos de forma divergente, compartiendo el mismo promotor (Fig. RD9).

Entre los genes que poseen una caja putativa de unión a Zur en sus regiones promotoras, sólo *zinT* (además de los genes que forman el operón divergente *znu*) podría estar compartiendo la caja de unión al represor con el gen ubicado corriente arriba. Este gen codificaría un ARN pequeño y podría entonces estar formando parte de este regulón de respuesta a la escasez de Zn. En la bibliografía se lo ha identificado como *isrD* ²²⁹, y pertenece a un grupo de ARN pequeños denominados de esta manera por sus siglas en inglés (Island-encoded sRNAs).

A

Gen	ValorE	Secuencia
<i>znuC</i> _{ST14028}	2.15e-9	AAGTGATAGA ATGTTATAATATCACA TTTCACACAT
<i>znuA</i> _{ECW3110}	2.15e-9	TAGTCATGAA ATGTTATAATATCACA CTTCATCATAT
<i>znuA</i> _{ST14028}	2.15e-9	AAGTGATAGA ATGTTATAATATCACA TTTCACACAT
<i>zinT</i> _{ST14028}	7.19e-9	AATAAATGCA ATGTTATAATATAACA ATCATCTTTC
<i>rpmE2</i> _{ST14028}	9.34e-9	CCTCTCAATT ATGTTATAACATAACA ATAAAATACG
<i>zinT</i> _{ECK12}	1.74e-8	ATTTTGCTAT ATGTTACAATATAACA TTACACATCA
<i>rpmE2</i> _{ECW3110}	1.98e-8	TTTACCTGTT ATGTTATAACATAACC ATAAAGATAC

<i>zinT</i>	0.00034	ATAAATGCAAT GTTATAATATAACA ATCATCTTTC
<i>znuA</i>	0.024	AGTGATAGAA GTTATAATATCACA TTTCACACAT
<i>znuC</i>	0.024	ATGTGTGAAAT GTGATATTATAACA TTCTATCACT
<i>rpmE2</i>	0.0022	CGTATTTTAT GTTATGTTATAACA TAATTGAGAG
<i>STM14_1454</i>	0.00054	GAACACTTAT GTTATAATATAACA AATTAATCATT
<i>STM14_3193</i>	0.0025	GAACAGTTAT GTTACAATATAACA AATTAATCATT
<i>isrD</i>	0.00022	GAAAGATGAT GTTATATTATAACA TTGCATTTAT

B

Gen	Secuencia Promotora
<i>zinT</i>	TTTCTGTTGAAATAAATGCAA TGTTATAATATAACA ATCATCTTTCTAAGAAAG AAAGACAACCTTTATTTACGTTACAAT ATTATATTGTT TAGTAGAAAGATTCCTTC
<i>znuA</i>	AGGCTTGCAGAAGTGATAGAA TGTTATAATATCACA TTTCACACATTCATTACG TCCGAACGTCTTCACTATCTTACAAT ATTATAGTGTAAGT GTGTAAGTAATGC
<i>znuC</i>	CATCGTAATGAATGTGTGAAAT TGTGATATTATAACA TTCTATCACTTCTGCAAG GTAGCATTACTTACACACTTTACACT ATAAATATTGTAAGAT AGTGAAGACGTTTC
<i>rpmE2</i>	AGCGTTGATAGCGTATTTTAT TGTTATGTTATAACA TAATTGAGAGGGCGCAAT TCGCAACTATCGCATAAAAATAACAAT ACAATATTGTATT AACCTCTCCCGGTTA
<i>STM14_1454</i>	TGGAAAAAACCGAACACTTAT TGTTATAATATAACA AATTAATCATTTTAACGCT ACCTTTTTTGGCTTGTGAATAACAAT ATTATATTGTT TAATTAGTAAAATTGCGA
<i>STM14_3193</i>	TGGAAAAAACCGAACAGTTAT TGTTACAATATAACA AATTAATCATTTTAACGCT ACCTTTTTTGGCTTGTCAATAACAAT GTTATATTGTT TAATTAGTAAAATTGCGA
<i>isrD</i>	CATCTTTCTTAGAAAGATGAT TGTTATAATATAACA TTGCATTTATTTCACAG GTAGAAAGAATCTTTCTACTAACAAT ATAAATATTGTAACGT AAATAAAGTTGTC

Figura RD8. Identificación *in silico* de sitios putativos de unión a Zur en las regiones promotoras de diversos genes de *Salmonella* 14028s. (A) Para este análisis se utilizaron las herramientas informáticas MEME y MAST, se muestra en la parte superior la caja consenso construida mediante el programa MEME. Las primeras cuatro secuencias de la lista corresponden a los genes que ya han sido previamente descritos regulados por Zur. El análisis *in silico* mediante el programa MAST reveló la existencia de dos cajas de unión a Zur en las secuencias promotoras de los genes *STM14_1454* y *STM14_3193*. **(B)** Se muestra en esta parte de la figura las regiones promotoras de los genes en estudio, con mayor detalle, incluyendo tanto la hebra codificante como la hebra no codificante. La caja putativa de unión a Zur encontrada por el programa MEME se indica subrayada, en rojo y verde se indican las secuencias pseudopalindrómicas y con asterisco, las bases que difieren en esta simetría en la hebra codificante. En la hebra no codificante las cajas son menos conservadas y la simetría es casi nula, sin embargo se marcan con colores las bases conservadas correspondientes a la caja de la hebra codificante. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción según el trabajo de Kröger y col. (2013).

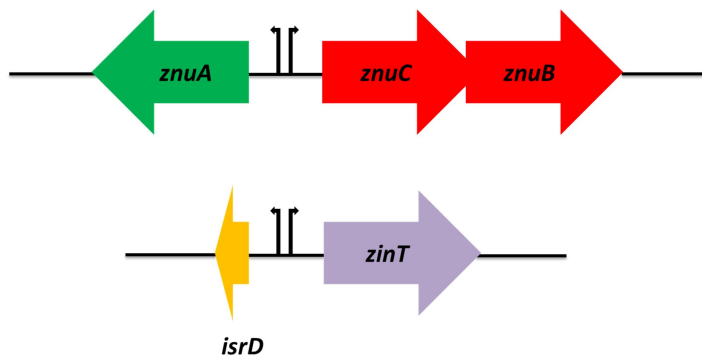


Figura RD9. Esquema de la disposición de los genes del operón *znuABC* y de los genes *isrD* y *zinT*. Estos genes se encuentran compartiendo parte de las cajas de unión al represor en sus secuencias promotoras. Las flechas indican el inicio de la transcripción divergente.

4. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *STM14_3193* Y *STM14_1454*

Para validar la regulación mediada por Zur de los genes *STM14_1454* y *STM14_3193* sugerida por el experimento de microarreglos y el análisis *in silico* realizado, se decidió generar una cepa mutante deletional en ambos genes mediante la técnica de mutagénesis en un solo paso¹⁹⁷. Debido a la extrema similitud nucleotídica de ambos genes, sólo pudo construirse la cepa

STM14_3193::lacZ-Cm, la cual posee una fusión insercional del promotor de *STM14_3193* con el reportero *lacZ* y el gen que proporciona resistencia al antibiótico cloranfenicol. Esta construcción se transfirió por transducción generalizada a una cepa de *Salmonella Typhimurium* silvestre y a una mutante Δzur . Se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa en medio mínimo con ambas cepas (Fig. RD10). Observamos que en presencia de Zn la transcripción de este gen se reprime en la cepa silvestre, y que esta represión se pierde en la mutante Δzur , que no posee el regulador Zur.

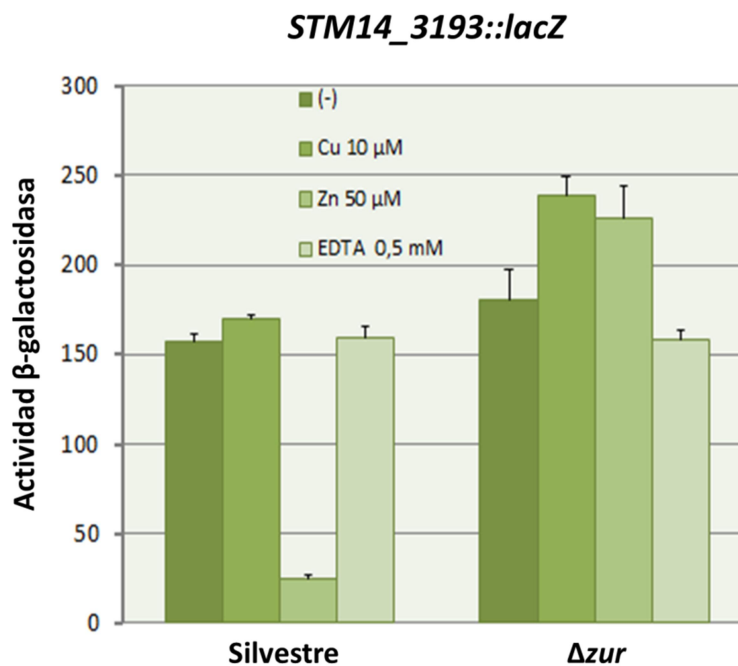


Figura RD10. Actividad β -galactosidasa de una fusión transcripcional del gen reportero *lacZ* al promotor de *STM14_3193*. Se ensayó la expresión del gen reportero en una cepa silvestre y en una cepa mutante Δzur , cultivadas en medio M9 en presencia de Cu 10 μ M, Zn 50 μ M y EDTA 50 μ M, así como sin agregado (-).

Debido a la dificultad de generar la mutante con el gen *lacZ* fusionado al promotor de *STM14_1454*, se realizaron ensayos de RT-PCR semi-cuantitativa. Los oligonucleótidos utilizados para este experimento amplifican el mismo producto en ambos genes, por lo que no se pudo en esta etapa discriminar los amplicones correspondientes a cada gen; no obstante, evidenciamos nuevamente

la represión de ambos genes *STM14_1454* y *STM14_3193* en la cepa silvestre y en presencia de Zn, ya que no se evidencia amplificación de productos de PCR; y por otro lado, la pérdida de esta represión en la cepa Δ zur (Fig. RD11).

Estos resultados nos permiten concluir que la expresión de *STM14_1454* y *STM14_3193* está bajo control del sensor de Zn, Zur, y por lo tanto son nuevos miembros de este regulón.

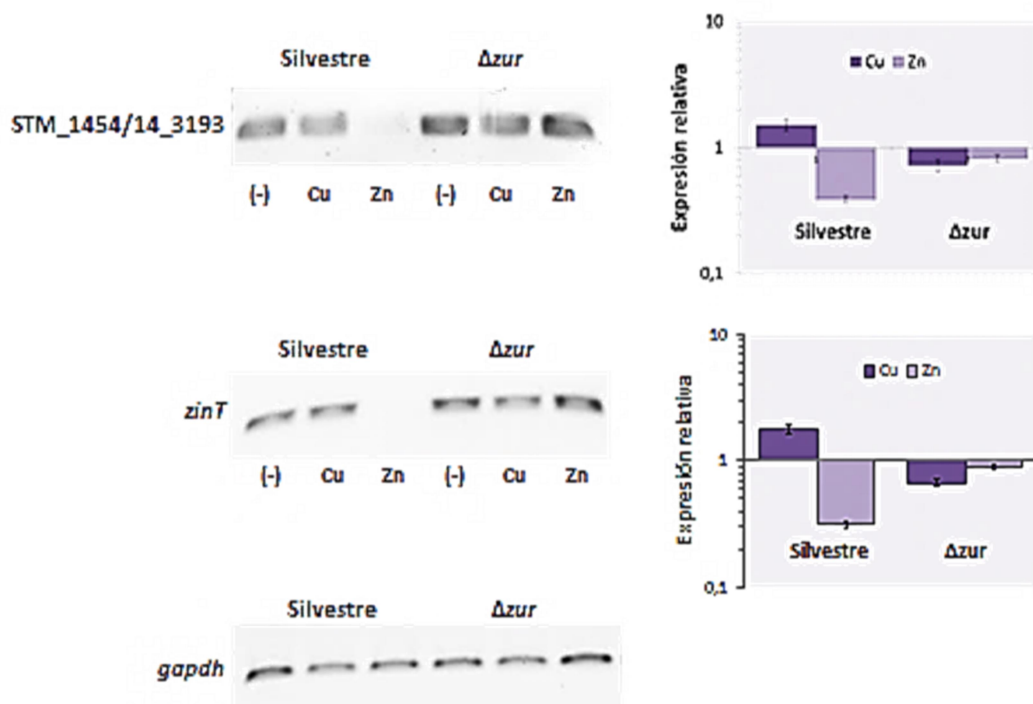


Figura RD11. Cuantificación mediante RT-PCR. Los niveles de transcritos de los genes indicados se midieron por RT-PCR semi-cuantitativa en cultivos de la cepa silvestre y de la cepa delecionada en el represor Zur, crecidos en medio mínimo e incubados en presencia de Cu 25 μ M, Zn 125 μ M o sin agregado, por un lapso de tiempo de 40 minutos. A la izquierda se muestra el análisis de los gels de agarosa y a la derecha la cuantificación por densitometría de los productos obtenidos.

5. LOS GENES *STM14_1454* Y *STM14_3193* NO CONFIEREN VENTAJA EN EL CRECIMIENTO EN MEDIO CON BAJO Zn

Reportes previos a este trabajo han demostrado que la ausencia de *znuA* no altera la capacidad de *Salmonella* de crecer en un medio rico como el LB, pero

afecta significativamente el crecimiento de esta bacteria en un medio mínimo donde la concentración de Zn se encuentra por debajo del rango micromolar ¹⁶³. En el caso de *zinT*, el crecimiento de una mutante delecional en este gen se vio afectado en cultivos en medio sólido en presencia de quelantes de metales divalentes como EDTA y TPEN ¹²⁹. El crecimiento defectuoso debido a la deleción de *zinT* es menor que el observado para una cepa mutante en *znuA*, sugiriendo un rol preponderante de ZnuA en la homeostasis de Zn, y secundario o accesorio para ZinT. Para analizar el rol de *rpmE2*, *STM14_1454* y *STM14_3193* en la homeostasis de Zn, se comparó el crecimiento de las cepas mutantes en dichos genes con la cepa silvestre bajo condiciones de escasez de Zn, tanto en medio sólido como en medio líquido (Fig. RD12-14). Un problema potencial de esta clase de experimentos es que el uso de agentes quelantes puede afectar la disponibilidad no solo del metal a ensayar, sino también la disponibilidad de otros metales divalentes que son importantes para la bacteria, y de esta manera se podrían observar fenotipos que no están directamente relacionados con los procesos involucrados en la homeostasis de Zn.

Se observó recientemente que el crecimiento de las cepas que carecen de los genes involucrados en la captura de Zn es menor en placas de LB preparadas con un 1,5% de agarosa en vez de agar (como se suelen preparar las placas para crecimiento bacteriano en medio sólido) sin la necesidad de agregar un agente quelante. La agarosa tiene una habilidad intrínseca de secuestrar el Zn, pero no otros metales de relevancia biológica como el Fe o el Mn ²³⁰. Nosotros observamos que el crecimiento de la cepa de *Salmonella* Typhimurium que carece del transportador de alta afinidad funcional ZnuABC se vio levemente inhibido en estas placas (Fig. RD12), mientras que la cepa que no posee la proteína ribosomal alternativa RpmE2 no presentó un defecto en su crecimiento. El crecimiento de la cepa $\Delta znuA$ se recuperó a niveles comparables con la cepa silvestre cuando se les adicionó Zn a las placas (Fig. RD12), pero no cuando se agregó Cu (Fig. RD13), indicando que el defecto en el crecimiento se debe a la baja disponibilidad del Zn.

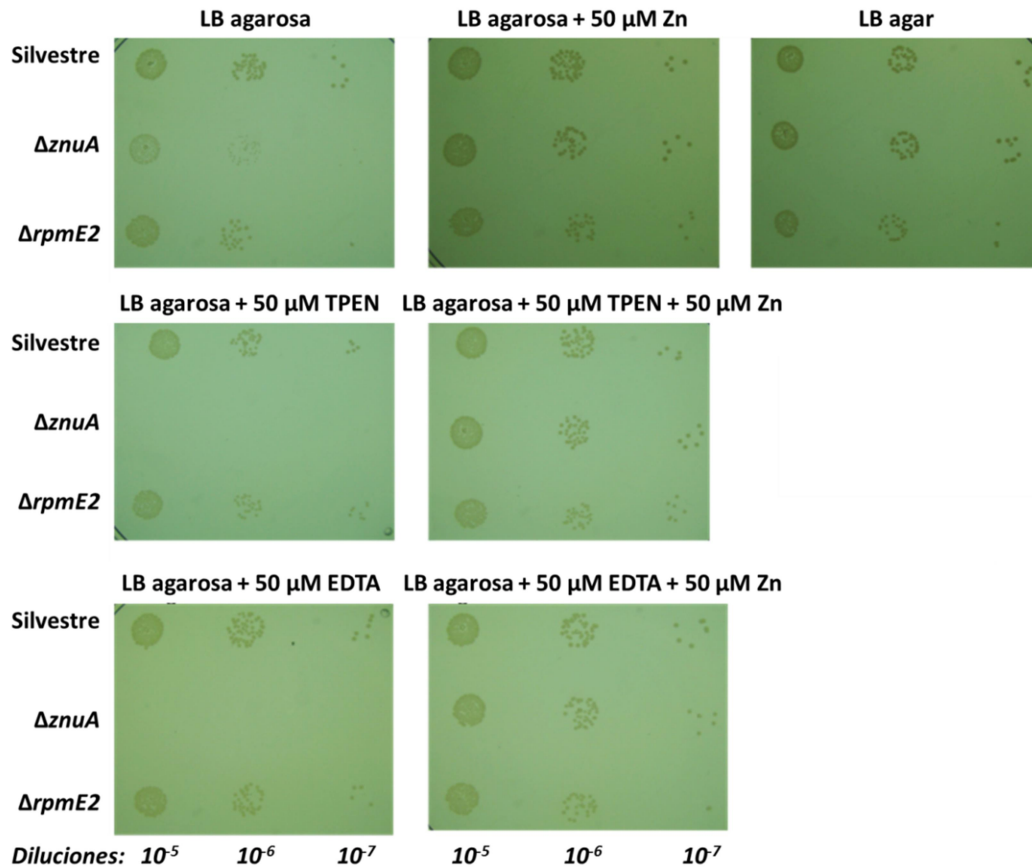


Figura RD12. Crecimiento de *Salmonella Typhimurium* en placas de LB-agarosa. Las placas se prepararon utilizando LB común y suplementadas con Zn, TPEN + Zn o EDTA + Zn, según se indica en la parte superior de cada placa. Se sembraron sobre la superficie de las placas gotas de 5 μ l de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} de cada cultivo indicado. Se sembró además una placa de LB agar como control del crecimiento.

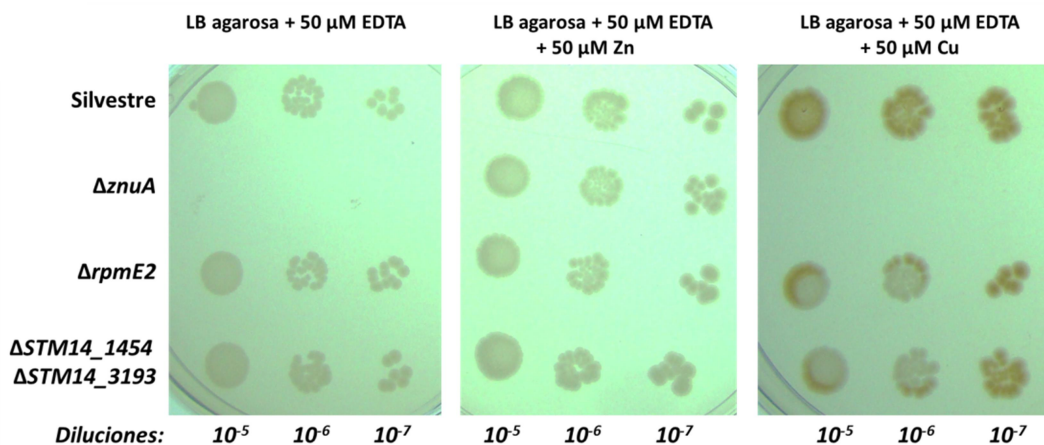


Figura RD13. Crecimiento de *Salmonella Typhimurium* en placas de LB-agarosa. Las placas se prepararon utilizando LB común y suplementadas con EDTA, EDTA + Zn o EDTA + Cu, según se indica en la parte superior de cada placa. Se sembraron sobre la superficie de las placas gotas de 5 μ l de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} de cada cultivo indicado. Como se muestra, el agregado de Cu a la placa no se recuperó el crecimiento de la cepa $\Delta znuA$.

Para generar un ambiente con escasez más severa de Zn y poder evidenciar con mayor facilidad el fenotipo observado en las placas con agarosa, se agregó 50 μM de EDTA o TPEN. En estas placas el crecimiento de la cepa $\Delta znuA$ se vio más comprometido aún, pero la cepa $\Delta rpmE2$ no modificó su crecimiento. Con estas observaciones no podemos sugerir que *rpmE2* cumple un rol en la homeostasis del Zn, confiriendo una ventaja a *Salmonella* para crecer en medios con bajas concentraciones de este metal. Sin embargo, si su rol en la homeostasis es sutil es probable que se necesite un ambiente con una deficiencia más severa de Zn para poder observar un fenotipo cuantificable.

Al igual que con la cepa $\Delta rpmE2$, no se observó un defecto en el crecimiento de las cepas $\Delta STM14_1454$ y $\Delta STM14_3193$ en ninguna de las condiciones ensayadas (Fig. RD14), incluso en las placas con agregado de quelante. Para descartar la posibilidad de que ambos genes estuvieran cumpliendo una función redundante en la capacidad de *Salmonella* de crecer en condiciones de bajo Zn debido a la alta homología que presentan, se construyó la cepa doble mutante $\Delta STM14_1454 \Delta STM14_3193$ y se probó si su crecimiento se veía afectado en las placas de LB con agarosa, con y sin agregado de quelante. Nuevamente, no se evidenció defecto en el crecimiento de esta mutante comparado con el crecimiento de la cepa silvestre, indicando que en las condiciones de ensayo estos genes no le confieren a *Salmonella* una ventaja para crecer.

La función de estos genes bajo condiciones de escasez de Zn también se analizó en medio líquido, utilizando el medio VB-MM (Fig. RD15). La delección de *znuA* provocó un retardo en el inicio del crecimiento, presentando una fase “lag” muy prolongada, en comparación con la cepa silvestre, aunque la DO final alcanzada por la cepa mutante no reflejó tal deficiencia. Esto concuerda con lo visto en las placas de medio LB-agarosa (Fig. RD12). Las cepas mutantes en *rpmE2* y $STM14_1454 STM14_3193$ no mostraron deficiencias en el crecimiento en medio líquido. A su vez, una cepa mutante tanto en *znuA* como en *rpmE2* presentó una deficiencia en su capacidad de crecer en este medio mínimo similar a la cepa $\Delta znuA$. Cuando el medio VB-MM se suplementó con 3 μM de Zn, una

concentración de metal que inhibe la expresión de *znuA*¹⁶³, el crecimiento de todas las cepas mutantes fue similar al de la cepa silvestre (Fig. RD15B).

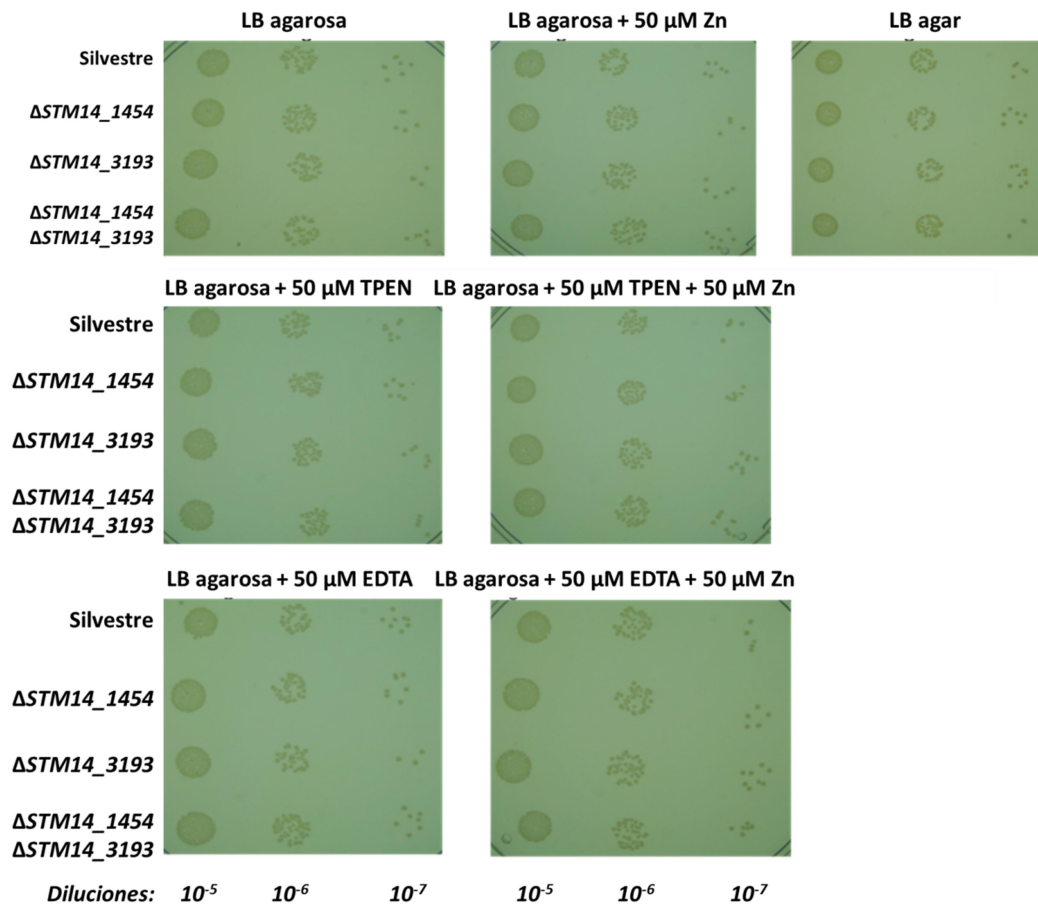


Figura RD14. Crecimiento de *Salmonella Typhimurium* en placas de LB-agarosa. Las placas se prepararon de la misma manera que en la figura RD12, utilizando LB común y suplementadas con Zn, TPEN + Zn o EDTA + Zn, según se indica en la parte superior de cada placa. Se sembraron sobre la superficie de las placas gotas de 5 μ l de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} de cada cultivo indicado, en este caso se utilizaron las cepas de *S. Typhimurium* silvestre, las simples mutantes $\Delta STM14_1454$ y $\Delta STM14_3193$, y la doble mutante $\Delta STM14_1454\Delta STM14_3193$. Se sembró además una placa de LB agar como control del crecimiento.

6. *STM14_1454* Y *STM14_3193* SON IMPORTANTES PARA LA VIRULENCIA DE *SALMONELLA*

Investigamos si *STM14_1454* y *STM14_3193* cumplen un rol en la virulencia de la bacteria. Un gen homólogo a *STM14_1454* y *STM14_3193* que codifica un inhibidor de lisozima tipo G, denominado PliG, se ha caracterizado recientemente

en *E. coli* y *S. Typhimurium* (b1178 o *ycgK* en *E. coli* K12, y STM2610 en *S. Typhimurium* LT2) ²³¹.

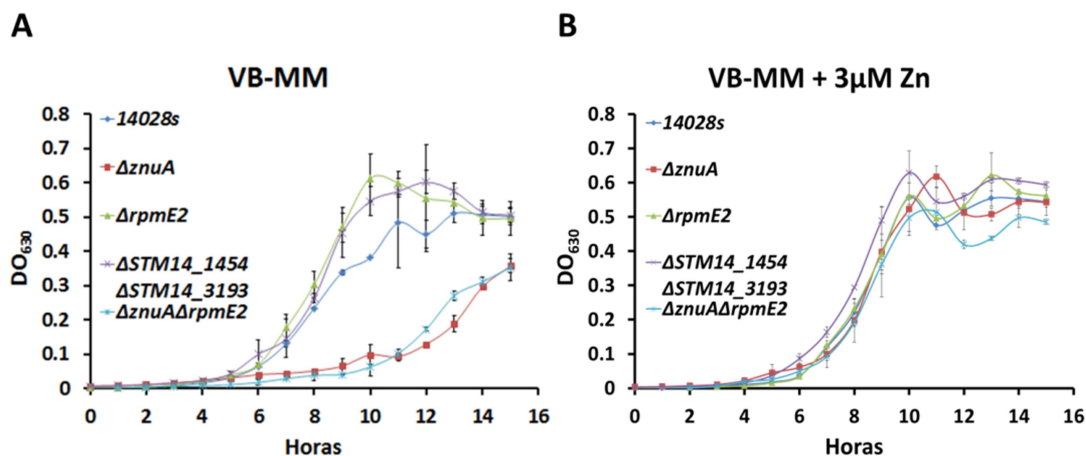


Figura RD15. Crecimiento de las cepas silvestre, $\Delta znuA$, $\Delta rpmE2$, $\Delta STM14_{1454}$, $\Delta STM14_{3193}$ y $\Delta znuA \Delta rpmE2$ en medio VB-MM. Este medio mínimo posee una baja concentración de Zn. Se grafica el crecimiento de las cepas antes mencionadas en el medio VB-MM sin agregado (A) y con agregado de 3 μM de Zn (B). Se siguió el crecimiento bacteriano toda la noche mediante medición de la DO₆₃₀ en un lector de microplacas Biotek modelo Synergy 2.

Las lisozimas son enzimas implicadas en la respuesta defensiva de un amplio rango de organismos taxonómicamente diferentes incluyendo hongos, protozoos, plantas, animales vertebrados e invertebrados, e incluso bacteriófagos, frente a bacterias, indicando su éxito evolutivo como herramientas antibacterianas ²³². Estas enzimas pertenecen a un grupo muy amplio de hidrolasas de pared celular bacteriana (BCWHs), y se encuentran dentro del subgrupo de enzimas que escinden el enlace glicosídico β -(1,4) entre la N-acetilglucosamina (NAG) y el ácido N-acetilmurámico (NAM) de la cadena de peptidoglicano ²³³, el heteropolímero entrecruzado de la pared celular de las bacterias que forma un sáculo, rodeándola en su totalidad. Estas enzimas cumplen un papel muy importante en la defensa de los animales ya que hacen sensibles a las bacterias frente a la lisis osmótica. Existen tres clases de lisozimas en el reino animal (Fig RD16):

- lisozima tipo C, llamada así porque se encuentra en la clara de huevo de gallina (del inglés: chicken);

- lisozima tipo G, es la que se encuentra en la clara de huevo de ganso; y
- lisozima tipo I, presente en los invertebrados.

Los vertebrados tienen genes que codifican para las dos lisozimas tipo C y G, pero su expresión espacio-temporal es específica de cada especie ²³⁴. La lisozima tipo G le debe su nombre a que se identificó inicialmente en 1967 en el huevo de ganso de la raza Embden ²³⁵. Desde entonces, esta clase de lisozima ha sido caracterizada en distintas especies de aves como gallina, cisne negro, avestruz, entre otros. En el trabajo de Hikima y col. ²³⁶ se demostró por primera vez la existencia de esta clase de lisozimas en el lenguado japonés, o sea fuera del grupo de las aves, y después le siguieron una serie de trabajos que identificaron esta lisozima en otras especies de peces.

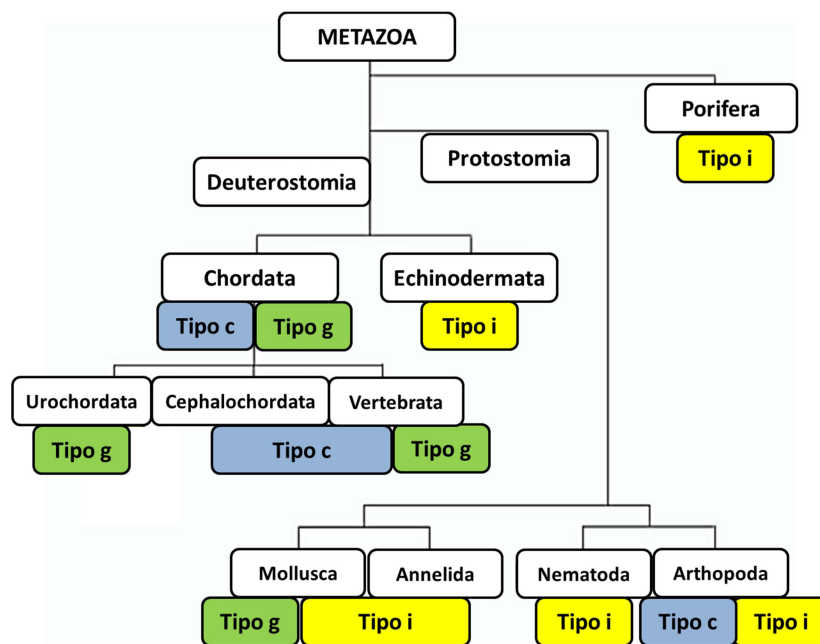


Figura RD16. Esquema de la distribución de los diferentes tipos de lisozimas en el reino animal. Esta simple estructura muestra sólo muestra las ramas donde se han detectado especies que poseen genes de lisozimas, ya sea por secuenciación del ADN o por estudios funcionales, según la literatura (adaptado de Callewaert y Michiels, 2010).

Las bases de datos que se encuentran disponibles revelan que existen homólogos a la lisozima tipo G en otros vertebrados como los mamíferos y anfibios ²³⁴. En mamíferos, el rol de la lisozima tipo C en la defensa antibacteriana ha sido estudiado y fundamentado durante muchos años, pero no

existen estudios sobre la función de las lisozimas tipo G en esta clase de animales. Mientras que la lisozima tipo C se encuentra en varios fluidos corporales (por ejemplo lágrimas, saliva, leche materna, orina, suero, etc) y en varios tejidos como el tracto respiratorio, intestinal y en los gránulos de neutrófilos y macrófagos; la expresión de la lisozima tipo G no se encuentra bien estudiada y documentada ²³⁴. A pesar de ello, la expresión de esta clase de lisozima parece ser tejido específica y difiere entre los distintos animales, por ejemplo se ha reportado la expresión de lisozima tipo G en los riñones de humanos adultos, la cual puede ser afectada por *E. coli* uropatógena, en la lengua y piel del ratón, y en el intestino de gallina, estos últimos son barreras importantes en la invasión bacteriana ²³⁷. Esta enzima se expresa principalmente en los macrófagos del pez cebra en desarrollo (www.zfin.org).

Dada la alta especificidad en el modo de acción de las lisozimas y a su larga historia evolutiva, no es sorprendente que las bacterias hayan desarrollado mecanismos específicos de resistencia, como por ejemplo la producción de variantes químicas del peptidoglicano que resiste la acción de las lisozimas (N-desacetilación y O-acetilación de la NAG; O-acetilación y N-glicosilación del NAM) ²³⁸, o la producción de inhibidores proteicos de estas enzimas. Existen distintas familias de inhibidores conocidas, las cuales tienen, en general, especificidad por un determinado tipo de lisozima ²³¹. Estos inhibidores son los primeros de su clase y su distribución dentro de los Gram negativos puede ser un reflejo de la adaptación a un estilo de vida en particular, y especialmente, a un hospedador en particular ²³³. El primer inhibidor de lisozima descubierto fue una proteína periplasmática de *E. coli*, designada como Ivy (de sus siglas en inglés, Inhibitor of vertebrate lysozyme), con especificidad contra las lisozimas tipo C de vertebrados ²³⁹. Ivy protege a esta bacteria del ataque de las lisozimas en presencia de compuestos que permeabilizan la membrana externa como la lactoferrina; y es esencial para que *E. coli* pueda sobrevivir y crecer en ambientes ricos en lisozimas, como la saliva humana o dentro del huevo de gallina ^{240,241}. Se encontró a Ivy en unos cuantos géneros bacterianos, pero la búsqueda de este inhibidor llevó a descubrir una nueva familia de inhibidores de lisozima tipo C, no relacionada con Ivy y mucho más distribuida entre bacterias Gram negativas

²³². Dentro de esta familia, los inhibidores pueden llamarse, dependiendo de su localización subcelular, MliC (de sus siglas en inglés, Membrane-bound lysozyme inhibitor of c-type lysozyme) o PliC (de sus siglas en inglés, Periplasmic lysozyme inhibitor of c-type lysozyme). Más tarde, se aisló e identificó en *Aeromonas hydrophila* el primer inhibidor de lisozimas de invertebrado, la familia PliI (de sus siglas en inglés, Periplasmic lysozyme inhibitor of i-type lysozyme) ²⁴². Finalmente, se identificaron los primeros inhibidores de lisozimas tipo G, denominados PliG, tanto en *E. coli* como en *S. Typhimurium* ²³¹.

Para muchas bacterias, el perfil de inhibidores de lisozima que poseen en sus genomas concuerda con el perfil de lisozimas que poseen sus hospedadores más comunes. Por ejemplo, los típicos patógenos de vertebrados, y humanos en particular, pertenecientes a los géneros *Escherichia* y *Shigella*, portan genes que codifican para PliG, MliC y para Ivy o PliC, mientras que sus hospedadores producen lisozimas tipo G o C (Fig. RD17). Un ejemplo interesante de nombrar es el de *Yersinia pestis*, el agente causante de la peste, el cual alterna entre dos mamíferos (ratas y humanos) vía un intermediario invertebrado (mosca), todos los genomas disponibles de *Y. pestis* denotan que tiene tanto inhibidores de lisozima tipo C como de lisozima tipo I ²³³.

Debido a la alta homología que estos últimos inhibidores de lisozima tipo G descubiertos en enterobacterias presentan con nuestros dos genes en estudio, *STM14_1454* y *STM14_3193*, decidimos enfocarnos en el rol fisiológico que pudieran tener estos genes frente a la patogenicidad de *Salmonella* 14028s en una línea celular utilizada previamente en nuestro laboratorio, los macrófagos Raw 264.7. Se realizaron ensayos de sobrevivencia donde se enfrentaron tanto la cepa silvestre como la cepa simple mutante en *STM14_3193* y la doble mutante $\Delta STM14_1454 \Delta STM14_3193$, a una monocapa de esta línea de macrófagos (Fig. RD18). Observamos que estos genes son necesarios para la sobrevivencia de *Salmonella* en estos macrófagos, ya que la cepa mutante en *STM14_3193*, o la doble mutante $\Delta STM14_1454 \Delta STM14_3193$ mostraron una sobrevivencia reducida a las 18 horas post infección. Concluimos entonces que dichos genes cumplen un rol fisiológico importante en la resistencia de la bacteria en este ambiente intracelular.

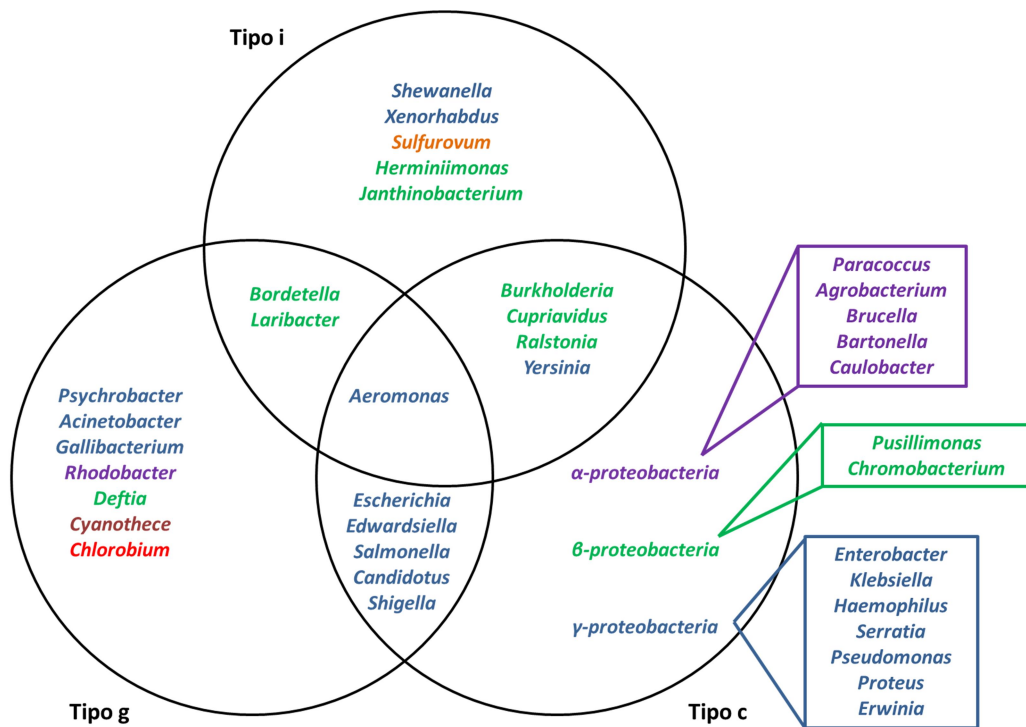


Figura RD17. Distribución de los homólogos de inhibidores de lisozimas tipo c, g e i entre las bacterias. Esta representación se basa en un análisis tipo t-BLAST de las secuencias de genomas completos encontradas en el NCBI, realizado en el trabajo de Callewaert y col. (2012). Los colores utilizados en los nombres de los géneros reflejan la pertenencia al grupo de las α -proteobacterias (violeta), β -proteobacterias (verde), γ -proteobacterias (azul), ϵ -proteobacteria (naranja), Cianobacterias (marrón) y Clorobi (rojo).

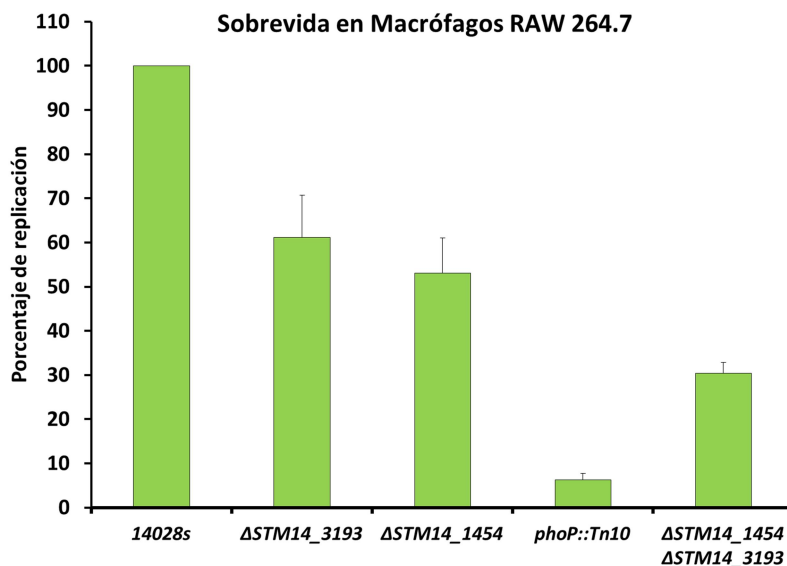


Figura RD18. La delección de los genes STM14_1454 y STM14_3193 afecta la supervivencia en macrófagos. Se determinó la supervivencia relativa a la cepa silvestre para las mutantes indicadas a las 18 horas post infección de una monocapa de macrófagos RAW 264.7. Como control del ensayo, se utilizó la cepa delecionada en el gen *phoP*, para la cual se conoce su menor potencial patagénico.

De este modo, podemos aseverar que estos dos genes encontrados en nuestro modelo de estudio son relevantes para que la bacteria pueda replicar dentro del macrófago. Resta responder hasta qué punto los inhibidores PliG contribuyen a la colonización del hospedador y a la virulencia, y para ello habrá que esperar más trabajos que se enfoquen en experimentos *in vivo* con modelos animales. De todas maneras, vale la pena tener en cuenta la evidencia que empieza a surgir y que pone en juego a las lisozimas tipo G como una importante defensa antibacteriana.

Otro aspecto importante a destacar de estos inhibidores se relaciona a su regulación, todos los inhibidores de lisozima tipo C de *E. coli* (Ivy_{Ec} y MliC_{Ec}) y *S. enterica* serovar Typhimurium (PliC_{ST} y MliC_{ST}) son parte del regulón Rcs que responde al estrés de pared celular ²⁴³. El sistema RcsCDB, se descubrió originalmente por su rol en la regulación de la síntesis de la cápsula, pero se ha establecido muy bien su activación por distintos tipos de estrés de envoltura, como la presencia de antibióticos β -lactámicos y de lisozimas ²⁴⁴. En este sentido, luego de una exposición de *E. coli* a lisozima, el regulón Rcs aumenta la resistencia de la bacteria induciendo la expresión de los inhibidores proteicos ²⁴³. A pesar de la importancia de estos actores en la resistencia bacteriana frente a una enzima tan eficiente como la lisozima, la regulación de los inhibidores tipo G no ha sido estudiada hasta el momento. Encontramos que ambos genes se encuentran regulados por el represor transcripcional Zur, y se reprimen en medios con baja concentración de zinc (puntos 2 y 4). Dentro de los macrófagos, la concentración de zinc puede llegar a ser indetectable ⁶², y observamos que mutantes en ambos genes tienen una sobrevivencia reducida dentro de este tipo celular. Teniendo en cuenta estos resultados, postulamos que la dependencia de Zur de los genes *STM14_1454* y *STM14_3193* resulta favorable para la virulencia de *Salmonella*.

7. EL REPRESOR ZUR PURIFICADO SE UNE A LOS PROMOTORES DE LOS GENES *rpmE2*, *STM14_1454* Y *STM14_3193*

Para determinar si la dependencia de la expresión de los genes *rpmE2*, *STM14_1454* y *STM14_3193* con respecto al represor Zur se debe a una interacción directa del regulador a los promotores de estos genes, purificamos a Zur de *Salmonella Typhimurium* 14028s expresándola en una cepa de *E. coli*, y luego medimos la habilidad del represor para unirse a las diferentes sondas en ensayos de retardo de la movilidad electroforética.

Para la purificación del represor, se comenzó clonando el marco abierto de lectura entre los sitios *Bam*HI y *Xho*I del plásmido pHisparallel2, utilizado en nuestro laboratorio para la expresión y purificación de otras proteínas¹⁹². Se transformaron las cepas de *E. coli* XL1Blue, BL21 (DE3), BL21 (DE3) C43 y BL21 (DE3) pGRO7 con el plásmido denominado pZur. En la cepa XL1Blue no se observó la expresión de la proteína frente al agregado de 0,1 mM de IPTG a ninguna de las dos temperaturas utilizadas (17 y 37°C). Las demás cepas de *E. coli* expresan el represor a ambas temperaturas, pero sólo se observó la proteína soluble en la cepa BL21 (DE3) C43 a 17°C. La presencia de la forma soluble de la proteína His-Zur se confirmó mediante la técnica de western blot con anticuerpos comerciales anti His-Tag (Fig. RD19).

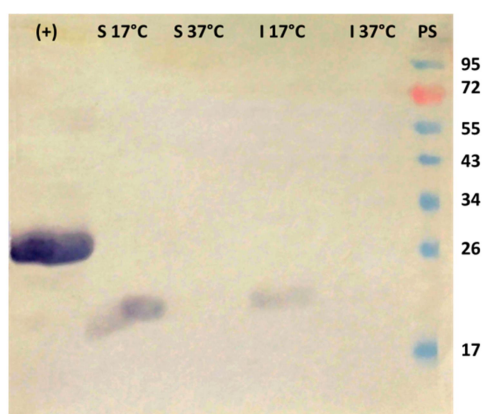


Figura RD19. Western blot de la expresión de Zur en la cepa BL21 DE3 C43. Se sembraron alícuotas tanto de la fracción soluble (S) como insoluble (I) luego de la inducción de la expresión de Zur, a 17°C y 37°C. Se muestra también el marcador de peso molecular (PS) y los pesos moleculares correspondientes en KDa.

Los fragmentos de ADN utilizados como sondas fueron generados por PCR (todos ellos con una longitud entre 190 y 235 nucleótidos), marcados radioactivamente y cuantificados con el fin de agregar la misma cantidad de ADN de cada uno de los promotores a ensayar y en cada una de las reacciones sembradas en los geles nativos. Además de los promotores de los genes a investigar, incluimos a los promotores de *znuA* y *zinT* a modo de control positivo de la unión. Para cada gen, se llevaron a cabo diez reacciones, en las cuales se agregó cantidades crecientes de la proteína purificada, que consideramos formando dímeros en solución, como se estableció para Zur de otras especies relacionadas, como *E. coli*⁹⁷. Todas las sondas ensayadas presentan un retraso en la movilidad electroforética ante el agregado del represor (Fig. RD20). Además, los experimentos de competencia realizados con un exceso de sonda específica y no específica determinaron que los complejos que se forman son específicos. De esta manera podemos afirmar que las secuencias de unión a Zur putativas que encontramos en las regiones promotoras de los tres genes en estudio son reconocidas por el represor.

Para cada sonda se observó una diferencia en la concentración mínima de proteína requerida para la formación del complejo ADN-proteína. Esto puede deberse a diferencias dentro de las secuencias promotoras de los genes del regulón Zur, como se mencionó en el punto 3 de este Capítulo. Estas diferencias podrían generar una disparidad en la afinidad con la cual Zur se une a los promotores de los genes que regula, y por lo tanto podría ser el motivo por el cual vemos a los complejos ADN-proteína formarse de manera diferente para cada gen.

Se realizó un análisis densitométrico con el programa ImageJ de las imágenes obtenidas luego de exponer los geles, para cuantificar la señal radioactiva proveniente de cada banda. De esta manera, se determinó la fracción de ADN unido mediante la siguiente expresión: sonda unida/(sonda unida + sonda libre). La fracción de sonda unida (FU) en cada reacción se graficó en función de la concentración de Zur₂ (Fig. RD21) y los datos se ajustaron a la curva $FU = B_{\text{máx}}[Zur_2]/(K_D[Zur_2])$ mediante una regresión no lineal usando el complemento Solver del Excel. Mediante esta metodología, pudimos determinar

los valores de la constante de equilibrio de disociación (K_D), que representa la concentración de Zur₂ a la cual el 50% del ADN se encuentra formando un complejo con el represor. La relación entre la K_D y la afinidad es recíproca, cuanto más chica sea la K_D mayor será la afinidad de la proteína por esa secuencia de ADN utilizada como sonda.

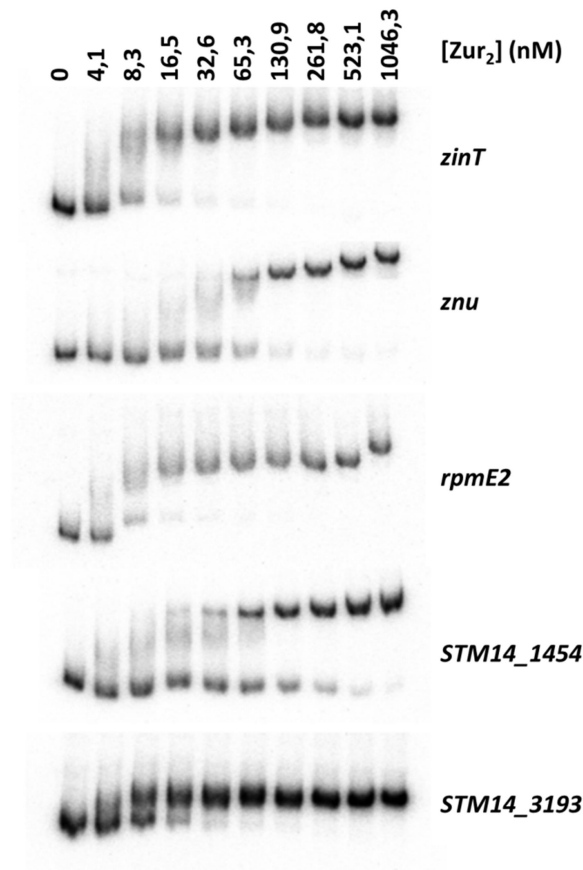


Figura RD20. *Determinación de la afinidad de Zur mediante titulación con la proteína purificada.* Gel representativo de la afinidad de Zur por cada secuencia promotora. Cada línea en cada gel representa una reacción diferente entre Zur y la secuencia de ADN correspondiente, a una concentración de Zn constante en el medio (50uM). Se muestra en la parte superior las concentraciones crecientes de represor utilizadas.

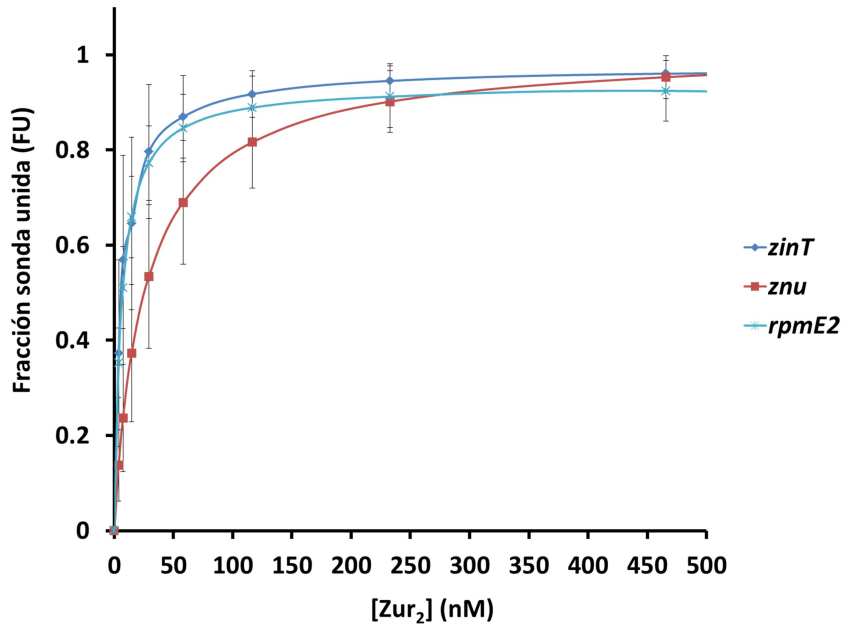


Figura RD21. Representación gráfica del porcentaje de ADN unido versus la concentración del represor Zur. Los datos presentados en este gráfico son representativos de cuatro experimentos realizados por separado. Estas isotermas de unión se ajustan a la ecuación presentada en el texto y nos permiten calcular las constantes de disociación ADN-proteína.

Los resultados que obtuvimos en estos ensayos de retraso de la movilidad electroforética fueron reproducibles para los promotores de los genes *znu*, *zinT* y *rpmE2-J2*, mientras que para los genes *STM14_1454* y *STM14_3193* los resultados fueron variables y no pudimos determinar el valor de la K_D para estos dos genes, motivo por el cual no se encuentran graficadas sus curvas en la Fig. RD21. La constante de equilibrio de disociación para el promotor de *znu* fue mayor que para *zinT* y *rpmE2-J2*, con valores de $29,73 \pm 12,15$ nM, $2,48 \pm 0,76$ nM y $5,98 \pm 0,51$ nM, respectivamente. Estas constantes corresponden a la concentración del dímero de Zur a la cual la mitad de la sonda se encuentra unida. Estos resultados indican que Zur se une con menor afinidad al promotor de los genes que codifican para el sistema de captación de Zn, mientras que su unión con los promotores de los genes *zinT* y *rpmE2-J2* es más estable.

8. UNIÓN DIFERENCIAL DEL REPRESOR ZUR A LOS PROMOTORES DE LOS GENES *znu*, *zinT* Y *rpmE2* AL REDUCIR EL Zn DISPONIBLE

Se decidió realizar experimentos de retardo de la movilidad electroforética en condiciones de escasez de Zn. Para ello, se enfrentó al represor Zur purificado bajo las mismas condiciones que en el punto anterior pero agregando concentraciones crecientes de N,N,N',N'-Tetrakis-(2piridilmetil) etanoldiamina (TPEN), un potente quelante de Zn, manteniendo constante tanto la cantidad de proteína como de ADN en la reacción.

En la Fig. RD22 puede verse nuevamente la formación de los complejos ADN-proteína para todos los promotores ensayados. Del mismo modo que en los ensayos de movilidad anteriores, los geles fueron expuestos en una placa y se determinó por análisis densitométrico (utilizando el programa ImageJ) la fracción de sonda libre (FL) mediante la siguiente expresión: sonda libre/(sonda libre + sonda unida). Luego, se graficó la fracción de sonda libre en función de la concentración del quelante de Zn y se ajustaron los datos realizando una regresión no lineal a la siguiente ecuación utilizando el complemento Solver:

$$FL = B_{\text{máx}}[TPEN] / (K_D + [TPEN])$$

A medida que aumenta la cantidad de TPEN en el medio, y por ende disminuye progresivamente la concentración de Zn en cada mezcla de reacción, se definen patrones que reflejan la afinidad que Zur posee por cada uno de los promotores a los que se une (Fig. RD23). Nuevamente, obtuvimos una buena reproducibilidad para las sondas de los genes *znu*, *zinT* y *rpmE2-J2*, mientras que para los genes *STM14_1454* y *STM14_3193* los experimentos resultaron variables. Las constantes de equilibrio de disociación (K_D) para estos tres genes fueron de $0,25 \pm 0,11$ nM para *znu*, $1,23 \pm 0,08$ para *rpmE2-J2* y $3,05 \pm 0,62$ para *zinT*. Esto sugiere que al disminuir la concentración de Zn disponible en el medio, Zur se desprende de manera secuencial, en primer lugar del promotor de *znu*, luego de *rpmE2-J2* y por último del promotor de *zinT*. Este patrón concuerda con lo hallado en el punto anterior, donde vimos que Zur tiene una afinidad mayor por la caja de unión corriente arriba del gen *zinT*, siguiéndole *rpmE2* y luego *znu*.

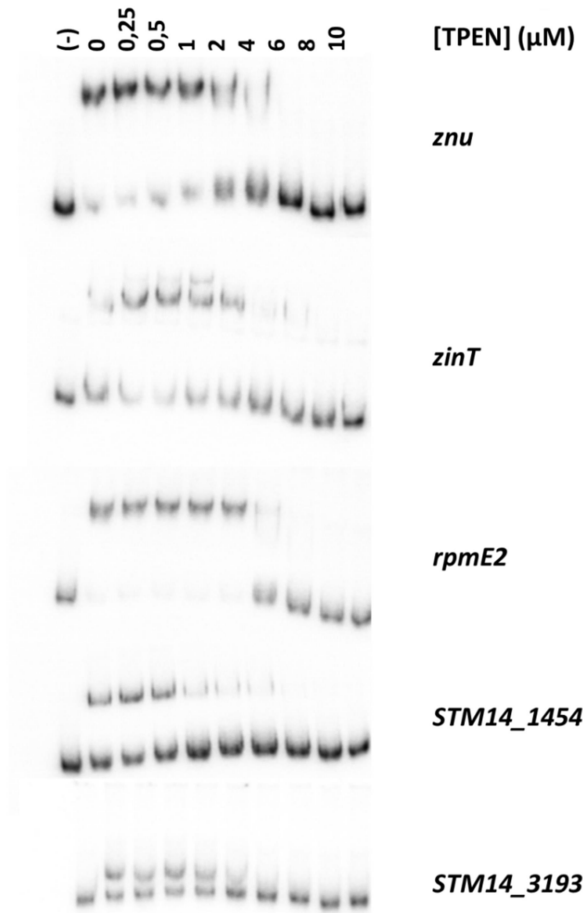


Figura RD22. Sensibilidad diferencial de los blancos de Zur frente a la disminución del zinc del medio *in vitro*. Gel representativo del efecto del agregado de TPEN sobre la capacidad de Zur de unir a su ADN blanco. Cada uno de los promotores se incubó previamente con una concentración fija de la proteína. Se muestra en la parte superior las concentraciones crecientes de TPEN utilizadas.

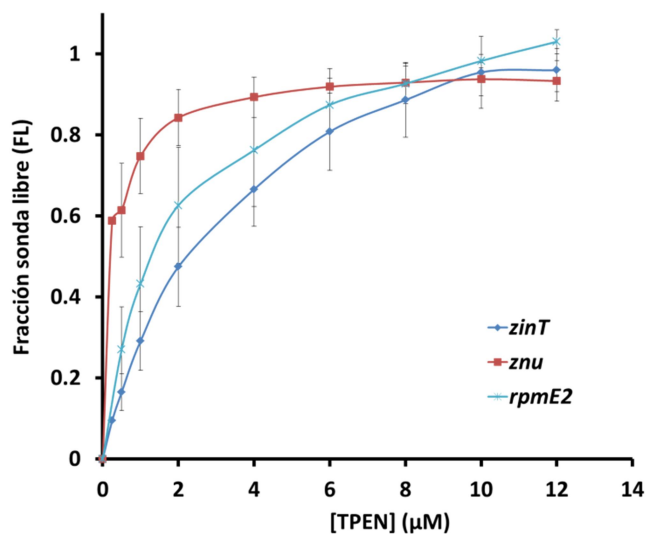


Figura RD23. Representación gráfica del porcentaje de sonda libre versus la concentración del quelante agregado. Los datos presentados en este gráfico son representativos de cuatro experimentos realizados por separado. Estas isotermas de unión se ajustan a la ecuación presentada en el texto y nos permiten calcular las constantes de disociación ADN-proteína.

9. INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL JERÁRQUICA DE LOS GENES DEL REGULÓN ZUR.

Al hacer un alineamiento de las regiones promotoras de los genes *rpmE2-J2*, *STM14_1454* y *STM14_3193*, para los cuales hemos demostrado que son regulados por el represor Zur, junto a los promotores de los genes *znuA* y *zint* (caracterizados dentro del regulón en trabajos previos a éste ¹²⁹), observamos diferencias en los nucleótidos de la secuencia de unión del represor (Fig. RD24), que podría traducirse en una diferencia en la afinidad de éste por sus operadores, permitiendo de esta manera la expresión jerárquica de estos promotores ante distintos grados de escasez de zinc.

Gen	Secuencia Promotora	N° de diferencias
<i>zint</i>	TTTCTGTTGAAATAAATGCAATGTTATAATATAACAATCATCTTCTAAGAAAG AAAGACAACCTTTATTTACGTTACAATA <u>TTATATGTTAGTA</u> GAAAGATTCCTTC	0 9
<i>znuA</i>	AGGCTTGCAGAAGTGATAGAAATGTTATAATATCACATTTACACATTTCATTACG TCCGAACGCTTCACTATCTTACAATA <u>TTATAGTTAAAGT</u> GTTGTAAGTAATGC	1 7
<i>znuC</i>	CATCGTAATGAATGTGTGAAATGTCATAATATAACATTCATCACTTCTGCAAG GTAGCATTACTTACACACTTTACACTA <u>TAATATGTTAAGAT</u> TAGTGAAGACGTTTC	2 6
<i>rpmE2</i>	AGCGTTGATAGCGTATTTTATGTTATGTTATAACATAAATGAGAGGGCGCAAT TCGCAACTATCGCATAAAATAACAATACAATAT <u>TGTATTAA</u> CTCTCCCGGTTA	2 4
<i>STM14_1454</i>	TGGAAAAAACCGAACACTTATGTTATAATATAACAATTAATCATTTTAACGCT ACCTTTTTGGCTTGTGAATAACAATA <u>TTATATGTTAAT</u> TAGTAAAATTGCGA	0 8
<i>STM14_3193</i>	TGGAAAAAACCGAACAGTTATGTTACAATATAACAATTAATCATTTTAACGCT ACCTTTTTGGCTTGTCAATAACAATGTTATATGTTAATTAGTAAAATTGCGA	1 9
<i>isrD</i>	CATCTTCTTAGAAAGATGATGTTATAATATAACATTCGATTTATTTCAACAG GTAGAAAGAATCTTCTACTAACAATAT <u>TAATATGTTAACG</u> TAAATAAAGTTGTC	1 5

Figura RD24. Alineamiento de secuencias promotoras. Regiones corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (indicado con una flecha) mostrando la caja de unión a Zur de cada uno de los genes del regulón. Se pueden ver diferencias en algunos nucleótidos dentro de cada una de las cajas Zur, señaladas en rojo.

Como puede verse, incluimos en este análisis a *isrD*, que codifica un ARN pequeño (ver punto 5) corriente arriba de *zint* y compartiría la misma caja de

unión a Zur. Luego de observar la disposición de los genes *znuA* y *znuC* en el genoma de *Salmonella* 14028s, donde ambos se encuentran codificados en sentidos opuestos formando un pequeño operón divergente (junto con *znuB*), es lógico pensar que la misma disposición génica podría estar gobernando la transcripción de *isrD* y *zinT*, compartiendo el mismo promotor entre ambos genes (Fig. RD25).

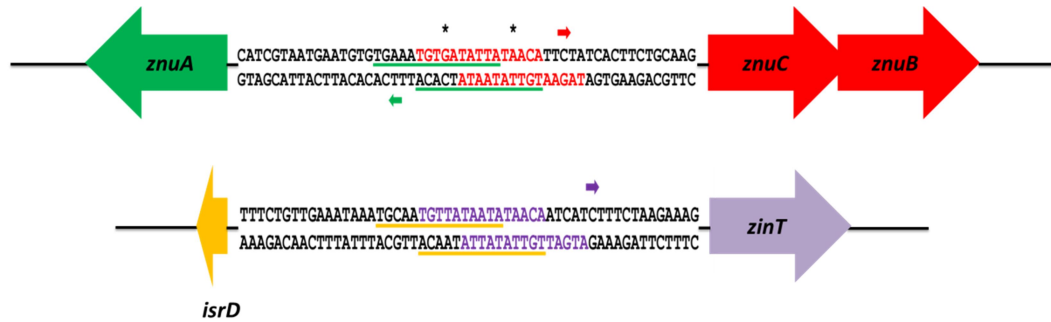


Figura RD25. Esquema de la disposición de los genes del regulón Zur que se encuentran compartiendo parte de las cajas de unión al represor en sus secuencias promotoras. Se indica con colores en la secuencia intergénica las cajas correspondientes al gen coloreado de igual manera. Las flechas pequeñas señalan los sitios de inicio de la transcripción según el trabajo de Kröger y col. (2013). Los asteriscos indican las bases que difieren en la simetría pseudopalindrómica de las cajas.

Usando fusiones transcripcionales del gen reportero *lacZ* a cada uno de los promotores de los genes del regulón Zur, se analizó la expresión de cada gen en LB. Con el fin de ver el perfil de inducción de estos genes a medida que la escasez de Zn aumenta, se realizaron cultivos con cantidades crecientes de EDTA. Este quelante es impermeable a la membrana celular y genera una disminución de la concentración del Zn libre extracelular. Se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa con las cepas *znuA::lacZ-Cm*, *zinT::lacZ-Kn*, *STM14_3193::lacZ-Cm*, *STM14_1454::lacZ-Kn*, *rpmE2::lacZ-Kn* e *isrD::lacZ-Kn* (Fig. RD26). Las fusiones transcripcionales a la construcción *lacZ-Cm* fueron realizadas por el método de mutación en un solo paso (técnica también conocida como transformación lineal) de acuerdo al trabajo de Datsenko y col.¹⁹⁷, reemplazando en cada caso el ORF completo por la construcción *lacZY-Cm*. En los casos donde no se logró con éxito insertar el gen reportero *lacZ* por esta técnica (para los genes *STM14_1454*, *zinT*, *rpmE2* e *isrD*), se utilizó una estrategia alternativa. En esta estrategia se reemplaza el gen que codifica a la resistencia (insertado previamente por

transformación lineal) utilizando la recombinasa específica FLP y el plásmido pKG136, el cual posee el mismo marco abierto de lectura del gen *lacZ* y el gen de resistencia a kanamicina flanqueados por los sitios FRT donde actúa la recombinasa (ver puntos 7 y 8 de Materiales y Métodos).

Los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron en microplacas, que nos permitió un seguimiento más controlado de la reacción al monitorear la aparición de color en tiempo real y en todas las cepas y todas las condiciones al mismo tiempo. En cada caso, la expresión del gen reportero aumentó conforme aumentaba la concentración de EDTA agregado al medio de cultivo, pero para cada gen la curva de inducción difiere, reflejando diferencias en la dinámica de unión/despegue de Zur a los distintos promotores. Como control del experimento se utilizó la misma metodología con las cepas Δ *zur znuA::lacZ-Cm*, Δ *zur zinT::lacZ-Kn*, Δ *zur STM14_3193::lacZ-Cm*, Δ *zur STM14_1454::lacZ-Kn*, Δ *zur rpmE2::lacZ-Kn* y Δ *zur isrD::lacZ-Kn*, cuya expresión fue máxima y constitutiva en todas las condiciones estudiadas, incluso sin el agregado de EDTA.

Como se puede observar en la Figura RD26, se ve un aumento considerable de la transcripción del gen reportero fusionado al promotor de *znuA* ante el agregado de 30 μ M de EDTA. Esto sugiere que Zur se desprende en primer lugar de la secuencia promotora de este gen. Vemos que las curvas de actividad β -galactosidasa presentan mayores diferencias en el rango entre 0-500 μ M de EDTA, por lo que en la Fig. RD26B se muestra una ampliación de dicho rango.

A una concentración de 150 μ M de EDTA se observa la inducción de *zinT*, mayores concentraciones de quelante permiten la expresión de *STM14_3193*, y luego de los genes *STM14_1454*, *rpmE2* e *isrD*. Este resultado confirma también que el gen *isrD* es un nuevo miembro del regulón Zur, ya que su expresión depende del represor y es máxima en ausencia del mismo.

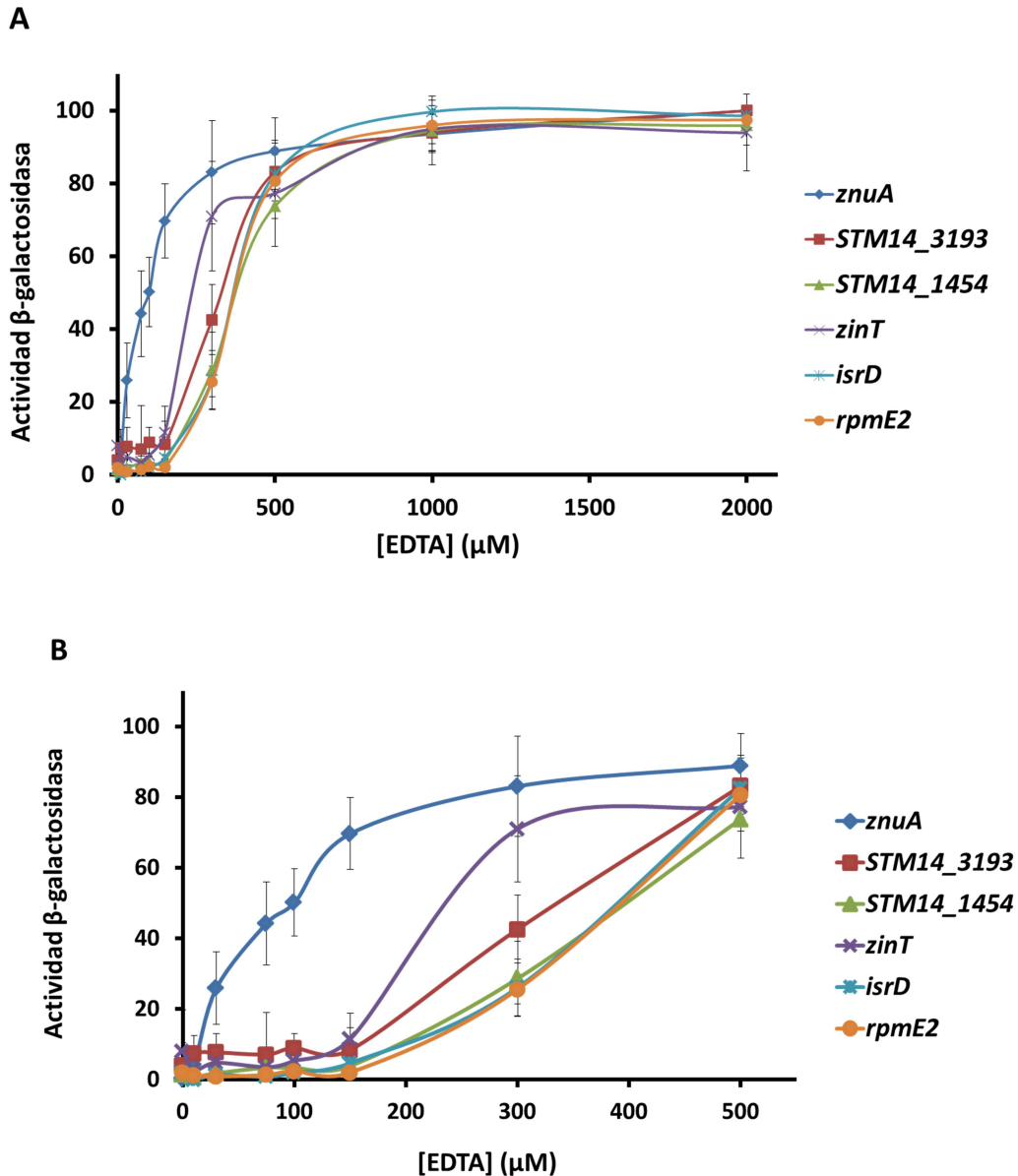


Figura RD26. La expresión transcripcional de los genes *znuA*, *zinT*, *rpmE*, *STM14_3193*, *STM14_1454* e *isrD* se activa a diferentes concentraciones de quelante para cada uno de ellos. A) Actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales del gen reportero *lacZ* a los promotores de los genes mencionados más arriba. Se ensayó la expresión del gen reportero en las cepas cultivadas en medio LB en presencia de concentraciones decrecientes de zinc. B) Ampliación de la curva en el rango de 0 a 500 μM de Zn. En esta región puede observarse con mayor detalle el inicio de cada curva y las diferentes concentraciones de EDTA a la cual cada gen comienza a inducirse.

Con estos experimentos se pudo analizar los perfiles de inducción de los genes *STM14_1454* y *STM14_3193*, para los cuales no logramos resultados confiables en los ensayos de retardo de la movilidad electroforética realizados

con anterioridad. Por otro lado, agregamos a estos genes el perfil transcripcional de un ARN pequeño regulado por Zur. En conjunto con los ensayos de movilidad, podemos concluir que el primer gen del regulón en inducirse ante una disminución de la concentración de Zn es *znuA*, el cual codifica para la proteína chaperona periplasmática que captura Zn con alta afinidad en este compartimento. La profundización en la escasez de Zn activa subsecuentemente a *zinT*, otra proteína periplasmática que une este metal, seguido de *STM14_3193* y luego de los genes que codifican para las proteínas ribosomales RpmE2-J2. Si bien los ensayos de retardo de la movilidad electroforética plantean que la inducción de los genes *zinT* y *rpmE2-J2* se daría de manera inversa, sus K_D son similares. Si bien numerosas publicaciones científicas respaldan el uso de los experimentos de retardo de manera cuantitativa, el ensayo de inducción de la transcripción refleja una situación fisiológica por ser un ensayo netamente cuantitativo e *in vivo*. Por último, se obtuvieron curvas de inducción muy similares para los genes *STM14_1454* e *isrD* (las cuales se solapan también con la de *rpmE2-J2*), indicando que Zur requiere de un ambiente muy pobre en Zn para permitir la expresión desde estos promotores.

Los resultados de los EMSAs coinciden en parte con el patrón visto *in vivo* en estos ensayos con el reportero LacZ, indicando que la modulación gradual de la actividad de Zur debido a la disponibilidad de Zn es lo que está detrás de la expresión diferencial de sus genes blanco. Estos ensayos demuestran que el represor Zur tiene afinidades distintas para cada una de las secuencias de la caja de unión, provocando una respuesta **coordinada y secuencial** frente al hambreado de zinc. Una disminución leve del metal, generada en nuestros ensayos por una concentración baja de quelante, afectaría la unión de Zur con los operadores con menor afinidad, y permitiría la transcripción de estos genes, actuando como un mecanismo de respuesta inicial ante la escasez del metal. La prolongación y/o profundización de la escasez permitiría la inducción de la transcripción del resto del regulón para hacer frente a dicha condición.

10. EL REGULÓN ZUR PROPUESTO PARA *SALMONELLA* TYPHIMURIUM 14028s

En el análisis del experimento de transcripción masivo utilizando microarreglos tipo Tiling descubrimos el patrón de expresión de los genes del regulón Zur. Como se esperaba, estos genes están reprimidos en presencia de Zn, tanto en medio rico como en medio mínimo. La inducción de estos genes cuando *Salmonella* es expuesta a una sobrecarga de iones Cu resultó novedosa y sugiere que un desbalance en un determinado metal puede afectar la respuesta de genes que están íntimamente relacionados a la homeostasis de otro metal diferente. De esta manera la bacteria responde y se adapta a las distintas situaciones que encuentra para mantener su integridad metabólica.

Con este nuevo patrón de inducción de los genes Zur en la mira, nuestro objetivo se centró en la búsqueda de nuevos posibles miembros del regulón aún no identificados. Nos focalizamos en primer lugar en los genes *rpmE2-J2*, que a diferencia de los productos de *rpmE1-J1* codifican para proteínas ribosomales alternativas que no unen Zn. Estos genes habían sido predichos como parte de regulón Zur por métodos bioinformáticos¹⁵¹. Nuestros resultados confirmaron que estos genes son reprimidos en presencia de Zn de manera dependiente de Zur.

Además identificamos en los microarreglos dos nuevos genes con patrones de expresión similares al de los genes del regulón. Realizando los experimentos de actividad β -galactosidasa y de RT-PCR semi-cuantitativa, incorporamos estos dos nuevos genes, *STM14_1454* y *STM14_3193*, al regulón Zur de *S. Typhimurium* 14028s.

Mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética, comprobamos que el represor interacciona con los promotores de los genes *rpmE2-J2*, *STM14_1454* y *STM14_3193*, y que su afinidad por cada secuencia promotora es diferente, siendo menor para el promotor de los genes *znu* y mayor para las secuencias corriente arriba de *zinT* y *rpmE2-J2*.

Con todo lo expuesto en este trabajo de tesis, proponemos entonces ampliar el regulón Zur de *Salmonella* Typhimurium 14028s e incluir a los genes *rpmE2-J2*, *STM14_1454*, *STM14_3193* e *isrD* dentro del mismo. Los ensayos de actividad β -galactosidasa a distintas concentraciones de un quelante de metales divalentes permitieron distinguir un orden jerárquico de activación de los genes del regulón frente a distintos grados de escasez de Zn. Una disminución leve del metal permite la expresión de *znuA*, que codifica para la chaperona periplasmática responsable de la captura del Zn en este compartimento. ZnuA se encarga de capturar el Zn para su incorporación al citoplasma mediante el canal formado por las proteínas ZnuBC¹²⁴. Cabe aún responder a la pregunta si los genes *znuCB* se inducen junto a la chaperona. La prolongación y/o profundización de la escasez permitiría la inducción de la transcripción de *zint* que codifica para otra chaperona del espacio periplasmático, responsable de auxiliar al sistema de captación de Zn de alta afinidad a atrapar el Zn libre^{129,154}. Una condición de hambreado más avanzada o prolongada induce la expresión de *STM14_3193*, que codifica para un inhibidor de las lisozimas tipo G del hospedador, que se expresan en células del sistema inmune, como las células macrofágicas. El ambiente bajo en Zn con el que *Salmonella* se encuentra dentro de estas células⁶² sería el estímulo necesario para inducir a *STM14_3193*, así como también a *STM14_1454*, otro inhibidor de lisozimas tipo G, que se expresa frente a una escasez de zinc mayor. Junto a *STM14_1454* se inducen *isrD* y *rpmE2-J2*, las proteínas ribosomales alternativas que no unen Zn. Todavía nos queda determinar el blanco del ARN pequeño codificado por *isrD*, en nuestros análisis *in silico* previos no detectamos ninguna diana que pueda relacionarse a la homeostasis de metales, pero cabe la posibilidad que este ARN pequeño esté reprimiendo la expresión de alguna proteína que una Zn, ya sea para catalizar alguna reacción o para mantener su integridad física. Las proteínas RpmE1 y RpmJ1 necesitan del metal para cumplir sus funciones dentro de la gran maquinaria que es el ribosoma. En condiciones de escasez extrema, estas proteínas estarían siendo reemplazadas dentro del ribosoma por sus contrapartes, RpmE2 y RpmJ2, las cuales no poseen el motivo CXXC de unión a Zn²⁴⁵. De esta manera, las proteínas C+, como se las denomina a RpmE1 y RpmJ1 (por contener el motivo CXXC) son proteolizadas en el citoplasma y el Zn que

éstas contenían es liberado para que la bacteria pueda utilizarlo ^{227,246}. La inducción de estas proteínas parálogas de genes ribosomales, y por ende, la modificación de la maquinaria de síntesis proteica constituiría el último recurso que utiliza *Salmonella* frente a la escasez severa de Zn.

Todos los actores involucrados en la capacidad de *Salmonella* de sobrevivir en ambientes pobres en Zn se encuentran esquematizados en la Figura RD27.

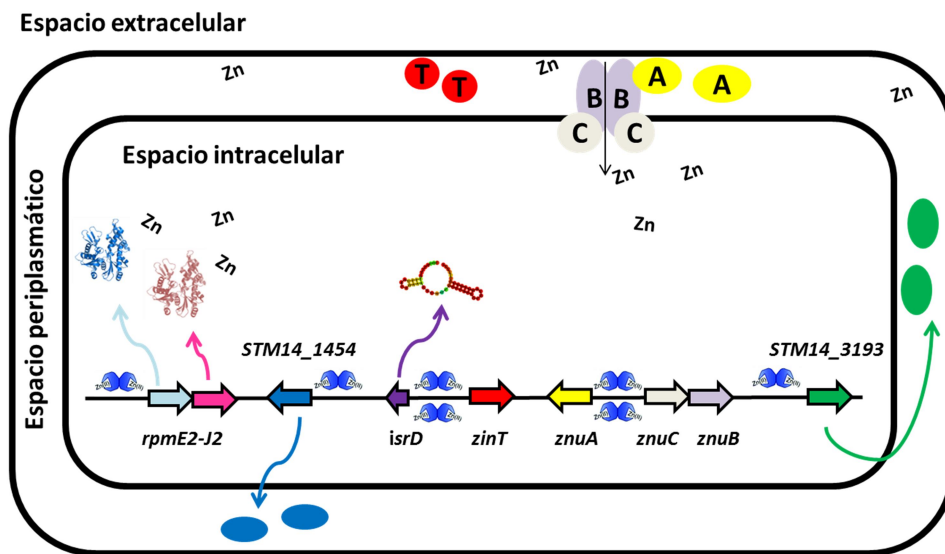


Figura RD27. Diagrama general de los genes del regulón Zur. Se muestra en la figura la disposición relativa de cada uno de los genes del regulón Zur, con sus productos y la localización subcelular de los mismos. Se grafica además el represor unido a cada una de las regiones promotoras como un dímero, en vez de un dímero de dímeros, para simplificar el diagrama.

Capítulo III:

La interrelación entre la homeostasis de
cobre y de hierro en *Salmonella*
Typhimurium

1. LOS GENES QUE CODIFICAN PARA EL SIDERÓFORO DE HIERRO ENTEROBACTINA Y TOLC SE INDUCEN EN PRESENCIA DE COBRE

El análisis de expresión realizado en el Capítulo I de esta tesis reveló la inducción del locus *entCEBA* luego de la exposición de las células a 10 minutos en CuSO_4 en medio SLB (Fig. RD28). La expresión de *entCEBA* está controlada por el represor Fur y codifica enzimas implicadas en la biosíntesis de la enterobactina. Se observó también una activación en esta misma condición de *tolC*, que codifica para un transportador de membrana externa utilizado como camino de detoxificación^{247,248} (Fig. RD28).

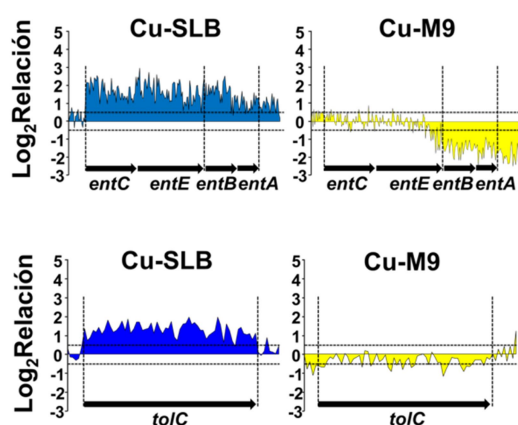


Figura RD28. Perfil transcripcional del locus *entCEBA* y de *tolC*. Los genes *ent* están implicados en la producción de enterobactina (sideróforo responsable de la captación de hierro y controlado por el regulador global Fur) y *tolC* codifica para un transportador de membrana externa. Estos genes se ven inducidos en presencia de cobre en medio rico.

Para confirmar la inducción de *entCEBA* frente a Cu, así como también su represión en presencia de hierro, un comportamiento esperado para los genes regulados por Fur⁷⁶, empleamos una cepa que se encontraba disponible en nuestro laboratorio y que posee la fusión transcripcional *entE::MudJ*. Como se muestra en la Figura RD29, la expresión de *entE::MudJ* aumenta más de 4 veces en presencia de 0,25 mM CuSO_4 , mientras se observa una represión en el medio con FeSO_4 . En M9, donde la expresión basal del reportero es alta debido a la falta de hierro, no se detecta una inducción debido al agregado de Cu (Fig. RD29). Sin embargo, la adición simultánea de FeSO_4 y CuSO_4 no puede abolir totalmente la

transcripción de la fusión *entC::MudJ* y puede detectarse una pequeña activación mediada por el cobre (Fig. RD29).

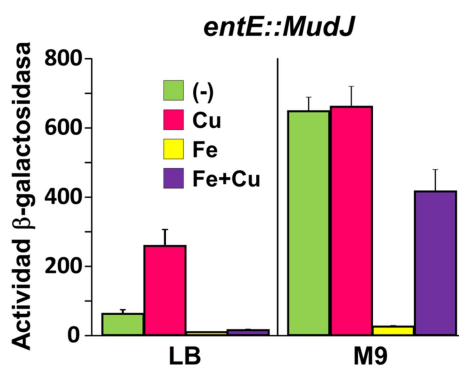


Figura RD29. Validación de la inducción por cobre utilizando un reportero *entE::MudJ*. Se determinó la actividad β -galactosidasa en extractos de la cepa reportera cultivada en medio LB y M9 en presencia de Cu, Cu+Fe, o en ausencia de metales. Para los ensayos en medio rico se utilizó 0,25 mM de cada metal en cada caso; y para las cepas crecidas en medio mínimo las concentraciones fueron: 2 μ M de Cu, 10 μ M de Fe y 10 μ M de Fe y Cu cuando ambos se combinaron.

Postulamos que el incremento en la síntesis de la enterobactina inducida por cobre podría ser requerida o bien para compensar la falta del metal de las proteínas con centros Fe-S, como una consecuencia del daño producido por el exceso de Cu²¹³; o para capturar el metal tóxico, evitando su internalización.

2. EL SIDERÓFORO DE HIERRO ENTEROBACTINA Y TOLC CONTRIBUYEN A LA RESISTENCIA A COBRE

Se reportó previamente que la enterobactina es exportada a través del canal de membrana externa formado por TolC, para secuestrar el hierro del medio extracelular⁹⁰⁻⁹². La inducción de *tolC* por Cu en SLB (Fig. RD28) nos llevó a analizar su rol de en la resistencia a cobre. Se determinó la OD final de cultivos crecidos toda la noche de mutantes de *Salmonella* 14028 en *ent*, *tolC* y/o *cueO*, en presencia de concentraciones crecientes de CuSO₄ (Fig. RD30). La mutante

entE::MudJ mostró un comportamiento bifásico, alcanzando un tercio de la OD de la cepa silvestre a concentraciones de Cu mayores a 0,5 mM (estos niveles de Cu no afectan el crecimiento de ninguna de las otras mutantes simples analizadas). A concentraciones mayores a 3 mM de CuSO_4 se observa una nueva disminución de la OD. La cepa ΔcueO mostró una curva sigmoidea, alcanzando la mitad del valor de OD de la cepa parental a 1,5 mM de CuSO_4 y no mostró crecimiento a 3 mM de Cu. La cepa mutante en *tolC* llegó a la mitad del valor de OD de la cepa silvestre a una concentración de CuSO_4 de 2,1 mM, siguiendo también una curva sigmoidea frente a la sensibilidad a Cu. Por otro lado, la curva observada para la cepa doble mutante *ent* ΔcueO muestra una contribución aditiva de ambos genes a la resistencia a cobre. De igual manera, el efecto que ejerce el CuSO_4 en la OD final de la cepa doble mutante ΔtolC ΔcueO parece ser aditivo, sugiriendo una independencia de los caminos utilizados por cada uno en la resistencia a cobre. La doble mutante *ent* ΔtolC , sin embargo, exhibe una curva de sensibilidad similar a la cepa simple mutante *ent*, sugiriendo que el rol de TolC en la resistencia a cobre depende de la enterobactina. De esta manera, se puede postular que los genes *ent* y *tolC* probablemente contribuyan en esta resistencia a través del mismo camino de detoxificación, el cual no incluye a CueO (Fig. RD30).

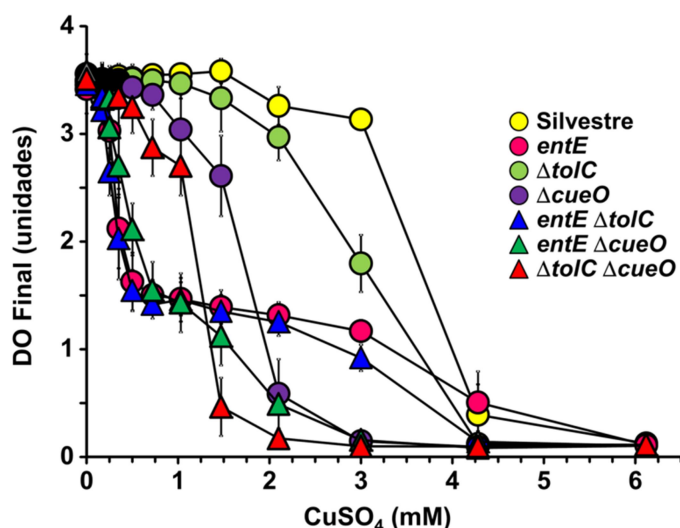


Figura RD30. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a cobre en medio líquido para distintas cepas mutantes. Se utilizaron mutantes delecionadas en *cueO* (multicobre oxidasa periplásmica controlada por CueR), *entE*, *tolC* o las mutantes dobles que se indican.

Se ha propuesto que la inactivación de TolC puede afectar la detoxificación de algunos compuestos, no como una consecuencia directa de la deficiencia en el flujo, sino como resultado del daño oxidativo a las membranas causado por las especies tóxicas ²⁴⁸. Considerando que uno de los mayores efectos tóxicos del cobre es la inactivación de las deshidratasas hierro-azufre, que puede aumentar el estrés oxidativo en el periplasma ²¹³, se evaluó la contribución del gen *tolC* y de los genes *ent* en la resistencia a cobre en ausencia de oxígeno. Determinamos la concentración inhibitoria mínima (CIM) del Cu en placas de LB-agar para las mutantes *ent*, $\Delta tolC$ y *ent* $\Delta tolC$, comparada con la cepa silvestre y la cepa $\Delta cueP$, las cuales ya han sido reportadas como sensibles a cobre en estas condiciones¹⁹². En ausencia de oxígeno (Fig. RD31), los valores de CIM fueron de 0.28 ± 0.03 mM CuSO₄ para la cepa mutante en *ent* y de 0.19 ± 0.03 mM CuSO₄ para las cepas $\Delta tolC$ y *ent* $\Delta tolC$. Los valores para la cepa silvestre y la mutante $\Delta cueP$ fueron de 0.40 ± 0.07 mM y 0.16 ± 0.04 mM, respectivamente. Aunque no fue posible distinguir las contribuciones individuales de cada gen a concentraciones subletales de cobre utilizando esta técnica, los resultados confirman el rol de las proteínas Ent y del canal de membrana externa TolC en la detoxificación del cobre. Si bien observamos una inducción transcripcional extendida a todo el locus *ent* en Cu-SLB, en el medio mínimo M9, el tercer y cuarto gen (*entB* y *entA*), se vieron reprimidos por cobre (Fig. RD28). Los productos de ambos genes, isocorismato liasa y 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa, respectivamente, participan en la conversión del corismato a 2,3-dihidroxibenzoato (DHB), la primer parte de la síntesis de enterobactina ²⁴⁹. Además, el dominio C-terminal bifuncional de la proteína EntB participa en el último paso de la biosíntesis de enterobactina, la condensación del DHB con serina y el ciclado. La expresión diferencial de estos genes en Cu-M9 sugiere la existencia de mecanismos adicionales de regulación cuya relevancia fisiológica aún no ha sido determinada.

La sensibilidad a Cu de las mutantes también fue ensayada en medio sólido en presencia de oxígeno, para determinar de esta manera la CIM de cada cepa en condiciones de aerobiosis (Fig. RD32). Al igual que en la CIM en ananerobiosis, este experimento no nos permitió determinar las contribuciones

individuales de cada gen a concentraciones subletales de Cu, pero nos permite obtener una idea del rol de cada proteína en la homeostasis del Cu. Para la cepa mutante en los genes *ent*, si bien la CIM es comparable con la cepa silvestre (4,67 mM de Cu versus 4,75 mM de Cu, respectivamente), encontramos que las colonias de la cepa mutante *ent* crecen de manera deficiente, las colonias son de un menor tamaño en comparación con las colonias de la cepa parental, ya desde una concentración baja de Cu (0,5 mM). Esto nos da una idea de la importancia de la enterobactina en la detoxificación del Cu, lo cual es consistente con lo que vimos anteriormente en medio líquido y en medio sólido en anaerobiosis. La cepa $\Delta cueO$ se vio más afectada, como era de esperarse, ya que esta cepa carece de la multicobre oxidasa y su fenotipo se encuentra caracterizado ¹⁹², con una CIM de 1,5 mM de Cu. La cepa $\Delta tolC$ mostró también un crecimiento afectado en las placas con Cu, presentando una CIM de 2,75 mM, confirmando nuevamente que la proteína de membrana externa cumple un rol ayudando a la bacteria frente a los efectos nocivos del Cu.

Sin embargo, la doble mutante *ent* $\Delta tolC$ exhibió nuevamente un comportamiento similar a la simple mutante *ent*, esto mismo observamos en los ensayos en medio líquido. No obstante, en este caso la cepa crece a concentraciones mayores que la *tolC*, aunque con colonias pequeñas aún a bajas concentraciones de Cu. Esto nos sugiere que el rol de TolC en la detoxificación de Cu depende de la presencia del producto de los genes *ent*, la enterobactina.

Por otro lado, las dobles mutantes *ent* $\Delta cueO$ y $\Delta tolC$ $\Delta cueO$ presentan una CIM menor a las simples mutantes por separado (1,43 mM y 1,06 mM, respectivamente), confirmando que tanto la enterobactina como TolC cumplen un rol en la resistencia de *Salmonella* frente al Cu, pero lo hacen por un camino independiente al utilizado por la multicobre oxidasa.

Todos estos resultados indican que existe una compleja red implicada en el manejo del Cu y en la resistencia a este metal, que abarca factores previamente asociados con la captura del hierro, involucrando a TolC y la enterobactina en la supervivencia de *Salmonella* frente al estrés por cobre. Sin embargo, la relación entre la homeostasis del cobre y del hierro todavía no ha sido aclarada, y solo unas cuantas líneas de evidencia conectan a los mecanismos que manejan a estos

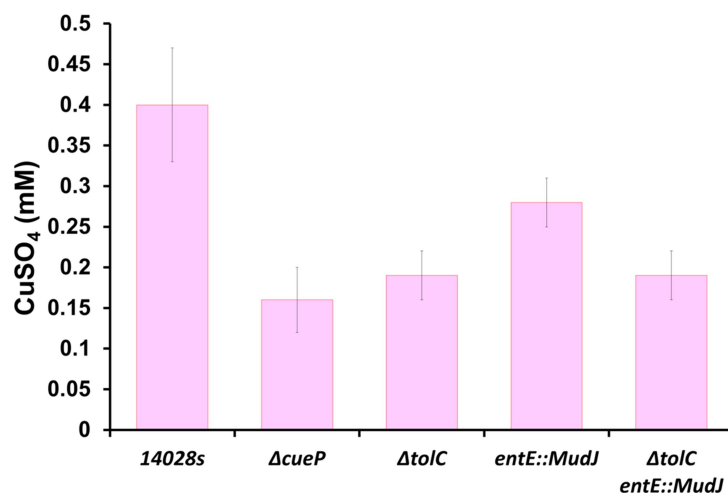


Figura RD31. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a cobre en medio sólido y en anaerobiosis para distintas cepas mutantes. Se utilizaron mutantes delecionadas en *cueP* y *tolC*, y la mutante en los genes *ent* o la mutante doble que se indica, además de la cepa silvestre.

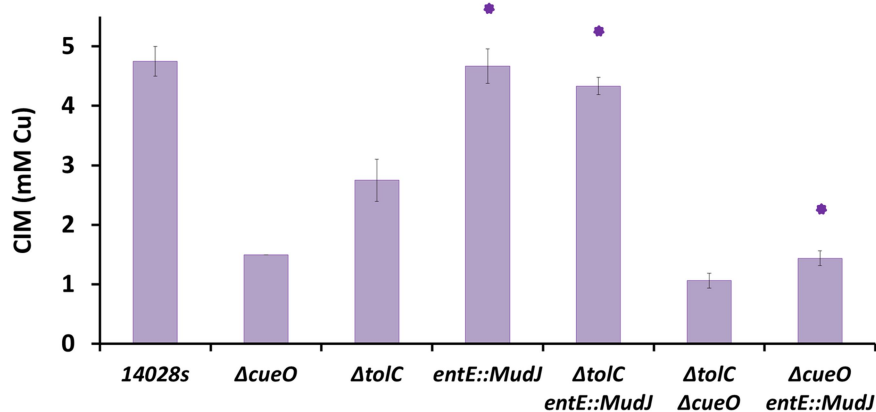


Figura RD32. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a cobre en medio sólido y en aerobiosis para distintas cepas mutantes. Se utilizaron mutantes delecionadas en *cueO* y *tolC*, la mutante en los genes *ent* o las mutantes dobles que se indican, además de la cepa silvestre. El asterisco sobre las barras indican que las colonias de esas cepas ensayadas eran de tamaño reducido con respecto a la cepa silvestre.

dos metales de transición. La multicobre oxidasa CueO, que se expresa en presencia de Cu, es la responsable de la oxidación del Cu(I) y también del sideróforo enterobactina²⁵⁰. Los compuestos catecolados, como la enterobactina, son capaces de reducir el Cu(II) a Cu(I), su forma más tóxica para la célula, que puede, a su vez, oxidar numerosos compuestos por medio de las especies reactivas del oxígeno. En este sentido, la oxidación de la enterobactina mediada por CueO puede impedir la reducción del Cu(II) dada por este sideróforo. Es

importante destacar además, que la forma oxidada del ácido 2,3-dihidroxibenzoico, un intermediario en la síntesis de la enterobactina, puede unir Cu de manera estable actuando como un sumidero del metal ²⁵¹. Recientemente, se describió la relación entre dos sideróforos y el cobre en la cepa de *E. coli* uropatogénica ²⁵². En esta especie, el sideróforo yersiniabactina (pero no la enterobactina) protege a la bacteria de ser atacada intracelularmente secuestrando el Cu(II) del hospedador en el espacio extracelular, previniendo así su reducción a Cu(I). Además de esto, el complejo yersiniabactina-Cu(II) parece tener una actividad superóxido dismutasa protegiendo a la bacteria del estrés oxidativo dentro de las vesículas de los fagocitos ²⁵³.

En resumen, los resultados obtenidos en este Capítulo revelan la complejidad de los mecanismos utilizados por *Salmonella* para detoxificar a la célula de los iones Cu, principalmente a nivel de la envoltura celular, probablemente el sitio de preferencia para el ataque con metales en las interacciones patógeno-hospedador. El arsenal que posee la bacteria en cuanto a estrategias paliativas ante el exceso de Cu en el espacio periplasmático incluye a miembros del regulón CueR (CueO y CueP) y a factores asociados previamente a la adquisición y manejo de hierro, como la enterobactina y TolC. La alta sensibilidad al Cu que exhiben las cepas mutantes *ent*, *ent ΔtolC* y *ΔtolC ΔcueO*, sugieren la existencia de un camino de remoción del Cu mediada por la enterobactina y TolC, donde estos actores juegan un rol más activo y no una simple restauración del Fe en las proteínas con grupos Fe-S dañadas por el exceso de Cu. Queda por establecer aún dónde la enterobactina une al Cu, si ésta es exportada al espacio extracelular por TolC o si esta proteína de membrana externa puede mediar la salida del sideróforo unido a Cu. Este camino de detoxificación del Cu mediado por la enterobactina podría ser de particular importancia durante la supervivencia intracelular de *Salmonella*, donde se espera que la bacteria enfrente un ambiente rico en Cu pero privado de Fe ^{224,254}.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- Realizamos un análisis transcripcional global de la respuesta de *Salmonella* Typhimurium 14028s a Cu y Zn. Los genes activados o reprimidos en presencia de cobre o zinc fueron clasificados en grupos, identificándose en 6 de ellos genes específicos de la respuesta al daño producido por estos metales (CueR, GolS, ZntR y Zur) o regulados por reguladores globales involucrados en la respuesta al estrés como RpoE y CpxRA.
- Revelamos la complejidad de los mecanismos de homeostasis relacionada a cobre y zinc. La presencia de un exceso de estos iones genera un cambio drástico en la transcripción génica de *Salmonella*. Así, los genes involucrados con la homeostasis y/o resistencia a uno de estos metales se inducen en su presencia, pero al mismo tiempo son reprimidos cuando el otro metal está presente en exceso en un medio mínimo.
- Identificamos nuevos genes de *Salmonella* Typhimurium 14028s (*STM14_1454*, *STM14_3193*, *rpmE2*, *rpmJ2* e *isrD*) que se reprimen en presencia de zinc, presentando un patrón de expresión similar al de genes del regulón Zur.
- Demostramos que la represión por zinc de estos genes depende de la presencia del represor Zur, confirmando su pertenencia al regulón. Descubrimos con ello que la respuesta de este patógeno ante la escasez de zinc es más amplia y compleja que lo descrito hasta el momento en la bibliografía.
- Evidenciamos la presencia de una caja de unión a Zur en los promotores de estos genes identificados como parte del regulón, encontrándose dos cajas parcialmente solapadas y conservadas en la hebra codificante.

- Demostramos que los genes *rpmE2*, *STM14_1454* y *STM14_3193* no confieren una ventaja en el crecimiento de *Salmonella* en medios con bajo zinc, a diferencia de *znuA* y *zinT*.
- Observamos que los genes *STM14_1454* y *STM14_3193* otorgan una ventaja para la proliferación de *Salmonella* dentro de células fagocíticas, sugiriendo un rol en la patogénesis de esta bacteria.
- Determinamos el orden jerárquico de la desrepresión de los promotores de *znu*, *zinT* y *rpm* en presencia de un quelante de zinc mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética.
- Constatamos que la respuesta transcripcional de los genes del regulón Zur de *Salmonella* frente a la depleción de zinc no es la misma para cada uno de ellos, observando una activación de la transcripción coordinada y jerárquica frente al hambre de zinc.
- Demostramos el rol de los genes involucrados en la síntesis del sideróforo de hierro (*ent*) y del transportador de membrana externa (*tolC*) en la resistencia a cobre, probablemente aliviando la toxicidad debida a cobre en el periplasma.
- La activación del locus *ent* y de otros genes controlados por el represor Fur (el regulador maestro de la homeostasis de hierro en bacterias) en presencia de Cu sugiere que la respuesta a estos metales se encuentra conectada.

Referencias

1. Scherer, C. A. & Miller, S. I. Molecular Pathogenesis of Salmonellae. 265 – 333 (2003).
2. Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. & Swaminathan, B. *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2465–2467 (2000).
3. Porwollik, S. *y col.* Characterization of *Salmonella enterica* Subspecies I Genovars by Use of Microarrays. **186**, 5883–5898 (2004).
4. Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A. & Lebaron, P. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1544–1552 (2000).
5. de Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T. & Wiersinga, W. J. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog.* **8**, 1–9 (2012).
6. Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S. & Gordon, M. A. Invasive non-typhoidal salmonella disease: An emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet* **379**, 2489–2499 (2012).
7. Wray, C. & Wray, A. *Salmonella in Domestic Animals.* (2000).
8. Hohmann, E. L. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 263–269 (2001).
9. Sirinavin, S. & Garner, P. Antibiotics for treating salmonella gut infections. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001167 (2000). doi:10.1002/14651858.CD001167
10. Gordon, M. A. *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *J. Infect.* **56**, 413–422 (2008).
11. 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**, 587–597 (2001).
12. Ibarra, J. A. & Steele-Mortimer, O. *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell. Microbiol.* **11**, 1579–86 (2009).
13. Galán, J. E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**, 263–271 (1996).
14. Hueck, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379–433 (1998).

15. Kubori, T. *y col.* Supramolecular Structure of the Salmonella typhimurium Type III Protein Secretion System. *Science* **280**, 602–605 (1998).
16. Velge, P. *y col.* Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis. *Microbiologyopen* **1**, 243–258 (2012).
17. McGhie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D. & Koronakis, V. Salmonella takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 117–124 (2009).
18. Guo, A., Lasaro, M. A., Sirard, J. C., Kraehenbühl, J. P. & Schifferli, D. M. Adhesin-dependent binding and uptake of Salmonella enterica serovar Typhimurium by dendritic cells. *Microbiology* **153**, 1059–1069 (2007).
19. Steele-Mortimer, O., Meresse, S., Gorvel, J. P., Toh, B. H. & Finlay, B. B. Biogenesis of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell. Microbiol.* **1**, 33–49. (1999).
20. Salcedo, S. P. & Holden, D. W. SseG, a virulence protein that targets Salmonella to the Golgi network. *EMBO J.* **22**, 5003–5014 (2003).
21. Deiwick, J. *y col.* The translocated Salmonella effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect. Immun.* **74**, 6965–6972 (2006).
22. Drecktrah, D. *y col.* Dynamic behavior of salmonella-induced membrane tubules in epithelial cells. *Traffic* **9**, 2117–2129 (2008).
23. Garai, P., Gnanadhas, D. P. & Chakravorty, D. Salmonella enterica serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: Revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence* **3**, 377–388 (2012).
24. Waterman, S. R. & Holden, D. W. Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* **5**, 501–511 (2003).
25. Hansen-Wester, I. & Hensel, M. Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* **3**, 549–559 (2001).
26. Winfiel, M. D. & Groisman, E. A. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of Salmonella and E. coli. *Appl. Environ. Microbiology* **69**, 3687–3694 (2003).

27. Thomason, B. M., Cherry, W. B. & Dodd, D. J. Salmonellae in health foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 602–603 (1977).
28. Paul, J. H. *y col.* Viral tracer studies indicate contamination of marine waters by sewage disposal practices in Key Largo, Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2230–2234 (1995).
29. McClelland, M., Sanderson, K. & Spieth, J. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Genome Announc.* **1**, (2001).
30. Olukoya, D. K., Smith, S. I. & Ilori, M. O. Isolation and characterization of heavy metals resistant bacteria from Lagos Lagoon. *Folia Microbiol. (Praha)*. **42**, 441–4 (1997).
31. Han, F. X. *y col.* Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. *Naturwissenschaften* **89**, 497–504 (2002).
32. Roane, T. M. & Perkins, S. J. Microorganisms and metal pollutants. 403–423 (2000).
33. Haraga, A., Ohlson, M. B. & Miller, S. I. Salmonellae interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 53–66 (2008).
34. Hapfelmeier, S. & Hardt, W. D. A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol.* **13**, 497–503 (2005).
35. Tsolis, R. M., Adams, L. G., Ficht, T. A. & Bäumler, A. J. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.* **67**, 4879–4885 (1999).
36. Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G. & Heffron, F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 5189–93 (1986).
37. Segal, A. W. & Shatwell, K. P. The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **832**, 215–222 (1997).
38. Mastroeni, P. *y col.* Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J. Exp. Med.* **192**, 227–236 (2000).
39. Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Mastroeni, P., Ischiropoulos, H. & Fang, F. C. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and

- inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J. Exp. Med.* **192**, 227–236 (2000).
40. Blackwell, J. M. *y col.* SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cell. Microbiol.* **3**, 773–784 (2001).
 41. White, J. K., Mastroeni, P., Evans, C. A. W. & By, L. Slc11a1-mediated resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Leishmania donovani* infections does not require functional inducible nitric oxide synthase or phagocyte oxidase activity lated innate resistance to *Salmonella enterica* serovar. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 311–320 (2005).
 42. Techau, M. E. *y col.* Evolution of differences in transport function in Slc11a family members. *J. Biol. Chem.* **282**, 35646–35656 (2007).
 43. Barton, L. L. *y col.* The bacterial metallome: Composition and stability with specific reference to the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *BioMetals* **20**, 291–302 (2007).
 44. Davis, A. V & Halloran, T. V. O. A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. **4**, 148–151 (2008).
 45. Leitch, J. M. *y col.* Activation of Cu,Zn-superoxide dismutase in the absence of oxygen and the copper chaperone CCS. *J. Biol. Chem.* **284**, 21863–21871 (2009).
 46. Tottey, S., Harvie, D. R. & Robinson, N. J. Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones. *Acc. Chem. Res.* **38**, 775–783 (2005).
 47. Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D. & Robinson, N. J. Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**, 823–30 (2009).
 48. Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G. L. & Thornton, J. M. Metal ions in biological catalysis: From enzyme databases to general principles. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 1205–1218 (2008).
 49. Waldron, K. J. & Robinson, N. J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 25–35 (2009).
 50. Wintergerst, E. S., Maggini, S. & Hornig, D. H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann. Nutr. Metab.* **51**,

- 301–323 (2007).
51. Babior, B. M. The respiratory burst oxidase. *Trends Biochem. Sci.* **2**, 55–60 (1995).
 52. Nies, D. H. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 730–750 (1999).
 53. Silver, S. & Phung, L. T. Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic MINIREVIEW Genes and Enzymes Involved in Bacterial Oxidation and Reduction of Inorganic Arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 599–608 (2005).
 54. da Silva, F. & Williams, R. J. P. The biological chemistry of the elements: The inorganic chemistry of life. 2001 (2001).
 55. Rutherford, J. C., Cavet, J. S. & Robinson, N. J. Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **274**, 25827–25832 (1999).
 56. McHugh, J. P. *y col.* Global Iron-dependent Gene Regulation in Escherichia coli: A new mechanism for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**, 29478–29486 (2003).
 57. Rowe, J. L., Starnes, G. L. & Chivers, P. T. Complex transcriptional control links NikABCDE-dependent nickel transport with hydrogenase expression in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **187**, 6317–6323 (2005).
 58. Gabriel, S. E. & Helmann, J. D. Contributions of Zur-controlled ribosomal proteins to growth under zinc starvation conditions. *J. Bacteriol.* **191**, 6116–22 (2009).
 59. Collins, H. L. Withholding iron as a cellular defence mechanism - Friend or foe? *Eur. J. Immunol.* **38**, 1803–1806 (2008).
 60. Wessling-Resnick, M. Iron Homeostasis and the Inflammatory Response. *Annu. Rev. Nutr.* **30**, 105–122 (2010).
 61. White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K. & Petris, M. J. A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J. Biol. Chem.* **284**, 33949–33956 (2009).
 62. Kehl-Fie, T. E. & Skaar, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 218–24 (2010).

63. Weinberg, E. D. Nutritional Immunity Host's Attempt to Withhold Iron From Microbial Invaders. *JAMA* **231**, 39–41 (1975).
64. Weinberg, E. D. Iron availability and infection. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1790**, 600–605 (2009).
65. Hood, M. I. & Skaar, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 525–37 (2012).
66. Jafarzadeh, N. *et al.* Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J. Exp. Med.* **192**, 1237–1248 (2000).
67. Forbes, J. R. & Gros, P. Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood* **102**, 1884–1892 (2003).
68. Schaible, U. E., Collins, H. L., Priem, F. & Kaufmann, S. H. E. Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *J. Exp. Med.* **196**, 1507–1513 (2002).
69. Posey, J. E. & Gherardini, F. C. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science (80-.)*. **288**, 1651–1653 (2000).
70. Schalk, I. J. Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: Specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J. Inorg. Biochem.* **102**, 1159–1169 (2008).
71. Crosa, J. H. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 517–530 (1989).
72. Neilands, J. B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds *. *J. Biol. Chem.* **270**, 26723–26726 (1995).
73. Gehring, A. M., Mori, I. & Walsh, C. T. Reconstitution and characterization of the Escherichia coli enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* **37**, 2648–2659 (1998).
74. Salvail, H. *et al.* A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15223–15228 (2010).

75. Foster, J. W. & Hall, H. K. Effect of Salmonella-Typhimurium Ferric Uptake Regulator (Fur) Mutations on Iron-Regulated and Ph-Regulated Protein-Synthesis. *J. Bacteriol.* **174**, 4317–4323 (1992).
76. Tsolis, R. M., Bäumlér, J., Stojiljkovic, I. & Heffron, F. Fur regulon of Salmonella typhimurium: identification of new iron-regulated genes. *J. Bacteriol.* **177**, 4628–4637 (1995).
77. Hantke, K. Regulation of ferric iron transport in Escherichia coli K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol. Gen. Genet.* **182**, 288–292 (1981).
78. Bagg, A. & Neilands, J. B. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol. Rev.* **51**, 509–18 (1987).
79. Bryce, G. F. & Brot, N. Iron Transport in Escherichia coli and Its Relation to the Synthetase Repression. 399–406 (1971).
80. Actis, L. A. *y col.* Characterization of anguibactin, a novel siderophore from Vibrio anguillarum 775(pJM1). *J. Bacteriol.* **167**, 57–65 (1986).
81. Jalal, M. *y col.* Structure of anguibactin, a unique plasmid-related bacterial siderophore from the fish pathogen Vibrio anguillarum. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 292–296 (1989).
82. Flo, T. H. *y col.* Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**, 917–921 (2004).
83. Abergel, R. J. *y col.* Anthrax pathogen evades the mammalian immune system through stealth siderophore production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18499–18503 (2006).
84. 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**, 3677–3682 (2003).
85. Lemanceau, P., Expert, D., Gaymard, F., Bakker, P. A. H. M. & Briat, J. F. *Chapter 12 Role of Iron in Plant-Microbe Interactions. Advances in Botanical Research* **51**, (Elsevier Ltd, 2009).
86. Watson, R. J., Millichap, P., Joyce, S. a, Reynolds, S. & Clarke, D. J. The role of iron uptake in pathogenicity and symbiosis in Photorhabdus luminescens TT01. *BMC Microbiol.* **10**, 177 (2010).

87. Geiser, D. L. & Winzerling, J. J. Insect transferrins: Multifunctional proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**, 437–451 (2012).
88. Paulsen, I. T., Park, J. H., Choi, P. S. & Jr., M. H. S. A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett* **156**, 1–8 (1997).
89. Dinh, T., Paulsen, I. T. & Saier, M. H. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176**, 3825–3831 (1994).
90. Bleuel, C. *y col.* TolC Is Involved in Enterobactin Efflux across the Outer Membrane of Escherichia coli TolC Is Involved in Enterobactin Efflux across the Outer Membrane of Escherichia coli. (2005). doi:10.1128/JB.187.19.6701
91. Newton, S. M., Trinh, V., Pi, H. & Klebba, P. E. Direct measurements of the outer membrane stage of ferric enterobactin transport: Postuptake binding. *J. Biol. Chem.* **285**, 17488–17497 (2010).
92. Vega, D. E. & Young, K. D. Accumulation of periplasmic enterobactin impairs the growth and morphology of Escherichia coli tolC mutants. *Mol. Microbiol.* **91**, 508–521 (2014).
93. Lu, D., Boyd, B. & Lingwood, C. A. Identification of the key protein for zinc uptake in Hemophilus influenzae. *J. Biol. Chem.* **272**, 29033–29038 (1997).
94. Schmiedeskamp, M. & Klevit, R. E. Paramagnetic cobalt as a probe of the orientation of an accessory dna- binding region of the yeast ADR1 zinc-finger protein. *Biochemistry* **36**, 14003–14011 (1997).
95. Chen, C. & Morse, S. A. Identification and characterization of a high-affinity zinc uptake system in Neisseria gonorrhoeae. **202**, 67–71 (2001).
96. Beard, S. J., Hughes, M. N. & Poole, R. K. Inhibition of the cytochrome bd-terminated NADH oxidase system in Escherichia coli K-12 by divalent metal cations. *{FEMS} Microbiol. Lett.* **131**, 205–210 (1995).
97. Patzer, S. I. & Hantke, K. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **275**, 24321–32 (2000).
98. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. & Rosato, A. Counting the zinc-proteins

- encoded in the human genome. *J. Proteome Res.* **5**, 196–201 (2006).
99. Gurusamy, K. & Davidson, B. R. Trace element concentration in metastatic liver disease - A systematic review. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **21**, 169–177 (2007).
 100. Wang, Y., Tang, J. W., Ma, W. Q. & Feng, F. J. Dietary zinc glycine chelate on growth performance, tissue mineral concentrations, and serum enzyme activity in weanling piglets. *Biol. Trace Elem. Res.* **133**, 325–334 (2010).
 101. Corbin, B. D. *y col.* Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* **319**, 962–5 (2008).
 102. Begum, N. *a y col.* Mycobacterium bovis BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics* **80**, 630–645 (2002).
 103. Aydemir, T. B., Liuzzi, J. P., McClellan, S. & Cousins, R. J. Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFN-gamma expression in activated human T cells. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 337–48 (2009).
 104. Murakami, M. & Hirano, T. Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci.* **99**, 1515–1522 (2008).
 105. Kitamura, H. *y col.* Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat. Immunol.* **7**, 971–977 (2006).
 106. Wilson, D., Citiulo, F. & Hube, B. Zinc Exploitation by Pathogenic Fungi. *PLoS Pathog.* **8**, 12–15 (2012).
 107. Liuzzi, J. P. & Cousins, R. J. Mammalian zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 151–172 (2004).
 108. Eide, D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**, 711–722 (2006).
 109. Liuzzi, J. P. *y col.* Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6843–8 (2005).
 110. Subramanian Vignesh, K., Landero Figueroa, J. A., Porollo, A., Caruso, J. A. & Deepe, G. S. J. Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor-induced Zn Sequestration Enhances Macrophage Superoxide and Limits

- Intracellular Pathogen Survival. *Hear. Res.* **4**, 331–341 (2013).
111. Maret, W. The Function of Zinc Metallothionein: A Link between Cellular Zinc and Redox State. *J. Nutr* **130**, 1455–1458 (2000).
 112. Schäfer, B. W. & Heizmann, C. W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 134–140 (1996).
 113. Yui, S., Nakatani, Y. & Mikami, M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 753–760 (2003).
 114. Liu, J. Z. *y col.* Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances Salmonella growth in the inflamed gut. *Cell Host Microbe* **11**, 227–39 (2012).
 115. Gläser, R. *y col.* Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection. *Nat. Immunol.* **6**, 57–64 (2005).
 116. Moroz, O. V *y col.* Both Ca²⁺ and Zn²⁺ are essential for S100A12 protein oligomerization and function. *BMC Biochem.* **10**, 11 (2009).
 117. Botella, H. *y col.* Mycobacterial P 1-Type ATPases mediate resistance to Zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe* **10**, 248–259 (2011).
 118. Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. & Rosato, A. Zinc through the three domains of life. *J. Proteome Res.* **5**, 3173–3178 (2006).
 119. Vallee, B. L. & Auld, D. S. Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and Other Proteins. *Biochemistry* **29**, 5647–5659 (1990).
 120. Hantke, K. Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 196–202 (2005).
 121. Grass, G., Wong, M. D., Rosen, B. P., Smith, R. L. & Rensing, C. ZupT Is a Zn(II) Uptake System in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **184**, 864–866 (2002).
 122. Grass, G. *y col.* The Metal Permease ZupT from Escherichia coli Is a Transporter with a Broad Substrate Spectrum. *Society* **187**, 1604–1611 (2005).
 123. Karlinsey, J. E., Maguire, M. E., Becker, L. A., Crouch, M. L. V & Fang, F. C. The phage shock protein PspA facilitates divalent metal transport and is required for virulence of Salmonella enterica sv. Typhimurium. *Mol.*

- Microbiol.* **78**, 669–685 (2010).
124. Patzer, S. I. & Hantke, K. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **28**, 1199–210 (1998).
 125. Claverys, J. P. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res. Microbiol.* **152**, 231–243 (2001).
 126. Chandra, B. R., Yogavel, M. & Sharma, A. Structural Analysis of ABC-family Periplasmic Zinc Binding Protein Provides New Insights Into Mechanism of Ligand Uptake and Release. *J. Mol. Biol.* **367**, 970–982 (2007).
 127. Hantke, K. Bacterial zinc transporters and regulators. *BioMetals* **14**, 239–249 (2001).
 128. Sheng, Y. *y col.* Dual zinc transporter systems in *Vibrio cholerae* promote competitive advantages over gut microbiome. *Infect. Immun.* IAI.00447-15 (2015). doi:10.1128/IAI.00447-15
 129. Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P. & Battistoni, A. The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *J. Bacteriol.* **192**, 1553–64 (2010).
 130. Osman, D. & Cavet, J. S. *Metal sensing in Salmonella: implications for pathogenesis. Advances in microbial physiology* **58**, (Elsevier Ltd., 2011).
 131. Reyes-Caballero, H., Campanello, G. C. & Giedroc, D. P. Metalloregulatory proteins: Metal selectivity and allosteric switching. *Biophys. Chem.* **156**, 103–114 (2011).
 132. Foster, A. W., Osman, D. & Robinson, N. J. Metal preferences and metallation. *J. Biol. Chem.* **289**, 28095–28103 (2014).
 133. Osman, D. *y col.* Generating a Metal-Responsive Transcriptional Regulator to Test What Confers Metal-Sensing in Cells. *J. Biol. Chem.* (2015). doi:10.1074/jbc.M115.663427
 134. Capdevila, D. A., Wang, J. & Giedroc, D. P. Bacterial strategies to maintain zinc metallostasis at the host-pathogen interface. *J. Biol. Chem.* **291**, 20858–20868 (2016).
 135. Shin, J.-H. *y col.* Graded expression of zinc-responsive genes through two regulatory zinc-binding sites in Zur. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5045–50 (2011).

136. Bhubhanil, S. *et al.* Control of zinc homeostasis in *Agrobacterium tumefaciens* via zur and the zinc uptake genes znuABC and zinT. *Microbiology* (2014). doi:10.1099/mic.0.082446-0
137. Shin, J.-H., Oh, S.-Y., Kim, S.-J. & Roe, J.-H. The zinc-responsive regulator Zur controls a zinc uptake system and some ribosomal proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **189**, 4070–7 (2007).
138. Li, Y. *et al.* Characterization of Zur-dependent genes and direct Zur targets in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* **9**, 128 (2009).
139. Huang, D.-L. *et al.* The Zur of *Xanthomonas campestris* functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4295–309 (2008).
140. Pawlik, M.-C. *et al.* The zinc-responsive regulon of *Neisseria meningitidis* comprises 17 genes under control of a Zur element. *J. Bacteriol.* **194**, 6594–603 (2012).
141. Gilston, B. *et al.* Structural and mechanistic basis of zinc regulation across the *E. coli* Zur regulon. *PLoS Biol.* **12**, e1001987 (2014).
142. Philips, S. J. *et al.* Allosteric Transcriptional Regulation via changes in the Overall Topology of the Core Promoter. **349**, 877–881 (2015).
143. Lee, J. W. & Helmann, J. D. Functional specialization within the fur family of metalloregulators. *BioMetals* **20**, 485–499 (2007).
144. Panina, E. M., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res.* **29**, 5195–5206 (2001).
145. Gaballa, A. & Helmann, J. D. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**, 5815–5821 (1998).
146. Outten, C. E. & O'Halloran, T. V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**, 2488–92 (2001).
147. Outten, C. E., Tobin, D. a, Penner-Hahn, J. E. & O'Halloran, T. V. Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein. *Biochemistry* **40**, 10417–

- 23 (2001).
148. Pohl, E. *y col.* Architecture of a protein central to iron homeostasis: Crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* **47**, 903–915 (2003).
 149. Sheikh, M. A. & Taylor, G. L. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* ferric uptake regulator (Fur) reveals insights into metal co-ordination. *Mol. Microbiol.* **72**, 1208–1220 (2009).
 150. Lucarelli, D. *y col.* Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **282**, 9914–22 (2007).
 151. Panina, E. M., Mironov, A. a & Gelfand, M. S. Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9912–7 (2003).
 152. Graham, A. I. *y col.* Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins. *J. Biol. Chem.* **284**, 18377–89 (2009).
 153. Lim, C. K., Hassan, K. A., Penesyan, A., Loper, J. E. & Paulsen, I. T. The effect of zinc limitation on the transcriptome of *Pseudomonas protegens* Pf-5. *Environ. Microbiol.* **15**, 702–715 (2013).
 154. Ilari, A. *y col.* The *Salmonella enterica* ZinT structure, zinc affinity and interaction with the high-affinity uptake protein ZnuA provide insight into the management of periplasmic zinc. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1840**, 535–544 (2014).
 155. Dintilhac, a, Alloing, G., Granadel, C. & Claverys, J. P. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* **25**, 727–739 (1997).
 156. Haas, C. E. *y col.* A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC Genomics* **10**, 470 (2009).
 157. Hensley, M. P., Tierney, D. L. & Crowder, M. W. Zn(II) binding to *E. coli* 70S Ribosomes. *October* **50**, 9937–9939 (2011).

158. Stork, M. *y col.* An outer membrane receptor of *Neisseria meningitidis* involved in zinc acquisition with vaccine potential. *PLoS Pathog.* **6**, e1000969 (2010).
159. Kumar, P., Sannigrahi, S. & Tzeng, Y.-L. The *Neisseria meningitidis* ZnuD zinc receptor contributes to interactions with epithelial cells and supports heme utilization when expressed in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **80**, 657–67 (2012).
160. Gabbianelli, R. *y col.* Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. *BMC Microbiol.* **11**, 36 (2011).
161. Corbett, D. *y col.* Two zinc uptake systems contribute to the full virulence of *Listeria monocytogenes* during growth in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* **80**, 14–21 (2012).
162. Rosadini, C. V., Gawronski, J. D., Raimunda, D., Argüello, J. M. & Akerley, B. J. A novel zinc binding system, zevAB, is critical for survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in a murine lung infection model. *Infect. Immun.* **79**, 3366–3376 (2011).
163. Ammendola, S. *y col.* High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **75**, 5867–76 (2007).
164. Campoy, S., Pe, A. M., Rozas, D., Badiola, I. & Barbe, J. Role of the High-Affinity Zinc Uptake znuABC System in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence. **70**, 4721–4725 (2002).
165. Pasquali, P. *y col.* Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking the ZnuABC transporter confers immune-based protection against challenge infections in mice. *Vaccine* **26**, 3421–3426 (2008).
166. Ammendola, S. *y col.* Regulatory and structural differences in the Cu,Zn-superoxide dismutases of *Salmonella enterica* and their significance for virulence. *J. Biol. Chem.* **283**, 13688–99 (2008).
167. De Groote, M. *a y col.* Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13997–4001 (1997).

168. 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**, 147–156 (2002).
169. Krishnakumar, R., Craig, M., Imlay, J. A. & Slauch, 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**, 5230–5238 (2004).
170. Krishnakumar, R., Kim, B., Mollo, E. A., Imlay, J. A. & Slauch, J. M. Structural properties of periplasmic SodCI that correlate with virulence in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **189**, 4343–4352 (2007).
171. Figueroa-Bossi, N., Ammendola, S. & Bossi, L. Differences in gene expression levels and in enzymatic qualities account for the uneven contribution of superoxide dismutases SodCI and SodCII to pathogenicity in Salmonella enterica. *Microbes Infect.* **8**, 1569–1578 (2006).
172. Pacello, F. y col. Periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase and cytoplasmic Dps concur in protecting Salmonella enterica serovar Typhimurium from extracellular reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1780**, 226–232 (2008).
173. Kim, B., Richards, S. M., Gunn, J. S. & Slauch, J. M. Protecting against antimicrobial effectors in the phagosome allows SodCII to contribute to virulence in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **192**, 2140–2149 (2010).
174. Berducci, G., Mazzetti, A. P., Rotilio, G. & Battistoni, A. Periplasmic competition for zinc uptake between the metallochaperone ZnuA and Cu,Zn superoxide dismutase. *FEBS Lett.* **569**, 289–292 (2004).
175. Brocklehurst, K. R. y col. ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* **31**, 893–902 (1999).
176. Thelwell, C., Robinson, N. J. & Turner-Cavet, J. S. An SmtB-like repressor from Synechocystis PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 10728–10733 (1998).
177. Bertini, I., Gray, H., Steifel, E. & Valentine, J. S. Biological Inorganic

- Chemistry: Structure and Reactivity. 319–350 (2007).
178. Deng, W. *y col.* Comparative Genomics of Salmonella enterica Serovar Typhi Strains Ty2 and Comparative Genomics of Salmonella enterica Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18 †. *Society* **185**, 2330–2337 (2003).
 179. Achard, M. E. S. *y col.* The multi-copper-ion oxidase CueO of Salmonella enterica serovar typhimurium is required for systemic virulence. *Infect. Immun.* **78**, 2312–2319 (2010).
 180. Percival, S. S. Copper and immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 1998 (1998).
 181. Huang, Z. L. & Failla, M. L. Copper Deficiency Suppresses Effector Activities of. 1536–1542 (2000).
 182. Newberne, P., Hunt, C. & Young, V. The role of diet and the reticuloendothelial system in the response of rats to Salmonella typhimurium infection. *Br. J. Exp. Pathol.* **49**, 448–457 (1968).
 183. Suttle, N. F. & Jones, D. G. Recent developments in trace element metabolism and function: trace elements, disease resistance and immune responsiveness in ruminants. *J. Nutr.* **119**, 1055–1061 (1989).
 184. Osman, D. *y col.* Copper homeostasis in Salmonella is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. *J. Biol. Chem.* **285**, 25259–68 (2010).
 185. Heithoff, D. M. *y col.* Bacterial infection as assessed by in vivo gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 934–9 (1997).
 186. Graham, J. E. & Clark-Curtiss, J. E. Identification of Mycobacterium tuberculosis RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11554–9 (1999).
 187. Rankin, S., Li, Z. & Isberg, R. R. Macrophage-induced genes of Legionella pneumophila: Protection from reactive intermediates and solute imbalance during intracellular growth. *Infect. Immun.* **70**, 3637–3648 (2002).
 188. Gold, B. *y col.* NIH Public Access. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 609–616 (2008).
 189. Kim, J. S. *y col.* The sctR of Salmonella enterica serova Typhimurium encoding a homologue of MerR protein is involved in the copper-responsive regulation of cuiD. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**, 99–103 (2002).

190. Lim Sung-Young, Min-Ho Joe, Sang-Sun Song, Mun-Hee Lee, John W. Foster, Y.-K. P. *cuiD* Is a Crucial Gene for Survival at High Copper Environment in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Korean Soc. Mol. Cell. Biol.* **14**, 177–184 (2002).
191. Espariz, M., Checa, S. K., Audero, M. E. P., Pontel, L. B. & Soncini, F. C. Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology* **153**, 2989–97 (2007).
192. Pontel, L. B. & Soncini, F. C. Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in Gram negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **73**, 212–25 (2009).
193. Pontel, L. B. *y col**. Identification of a *Salmonella* ancillary copper detoxification mechanism by a comparative analysis of the genome-wide transcriptional response to copper and zinc excess. *Microbiology* (2014).
(*Pontel y Scampoli, co-primeros autores)
194. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes.pdf. **185**, 60–89 (1990).
195. Miroux, B. & Walker, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289–298 (1996).
196. Nishihara, K., Kanemori, M. & Yanagi, H. Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 884–889 (2000).
197. 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).
198. Beaver, J. W., Hochhut, B. & Waldor, M. K. Genomic and Functional Analyses of SXT , an Integrating Antibiotic Resistance Gene Transfer Element Derived from *Vibrio cholerae* Genomic and Functional Analyses of SXT , an Integrating Antibiotic Resistance Gene Transfer Element Derived from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **184**, 4259–4269 (2002).
199. Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the

- antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9–14 (1995).
200. Sheffield, P., Garrard, S. & Derewenda, Z. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of ‘parallel’ expression vectors. *Protein Expr. Purif.* **15**, 34–39 (1999).
 201. Ellermeier, C. D., Janakiraman, A. & Slauch, J. M. Construction of targeted single copy lac fusions using λ Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene* **290**, 153–161 (2002).
 202. Sambrook, J. F. & Maniatis, E. F. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1989 (1989).
 203. Davis, R. W., Botstein, D. & John, R. *Advanced bacterial genetics : a manual for genetic engineering*. Cold Spring Harb. N.Y. Cold Spring Harb. Lab. 8009661 (1980).
 204. Bailey, T. L. & Elkan, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. (1994).
 205. Bailey, T. L., Gribskov, M., Diego, S. & Box, P. O. Combining evidence using p-values : application to sequence homology searches. **14**, 48–54 (1998).
 206. Nakai, K. & Horton, P. PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 34–35 (1999).
 207. Miller, J. H. *Experiments in molecular genetics*. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972).
 208. Hames, B.D., Rickwood, D. *Gel Electrophoresis of Proteins A Practical Approach*. (1981).
 209. Lane, D., Prentki, P. & Chandler, M. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.* **56**, 509–528 (1992).
 210. Heffler, M. A., Walters, R. D. & Kugel, J. F. Using electrophoretic mobility shift assays to measure equilibrium dissociation constants: GAL4-p53 binding DNA as a model system. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **40**, 383–387 (2012).
 211. Kemmer, G. & Keller, S. Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. *Nat. Protoc.* **5**, 267–281 (2010).
 212. Braymer, J. J. & Giedroc, D. P. Recent Developments in Copper and Zinc Homeostasis in Bacterial Pathogens. *ACS Chem. Biol.* 59–66 (2014).

- doi:10.1021/cb400658k
213. Macomber, L. & Imlay, J. a. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8344–9 (2009).
 214. Dupont, C. L., Grass, G. & Rensing, C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance-new insights and applications. *Metallomics* **3**, 1109–18 (2011).
 215. Porcheron, G., Garénaux, A., Proulx, J., Sabri, M. & Dozois, C. M. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 90 (2013).
 216. Kershaw, C. J., Brown, N. L., Constantinidou, C., Patel, M. D. & Hobman, J. L. The expression profile of Escherichia coli K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. *Microbiology* **151**, 1187–1198 (2005).
 217. Yamamoto, K. & Ishihama, A. Transcriptional response of Escherichia coli to external copper. *Mol. Microbiol.* **56**, 215–227 (2005).
 218. Kobayashi, K., Mizuno, M., Fujikawa, M. & Mizutani, Y. Protein conformational changes of the oxidative stress sensor, SoxR, upon redox changes of the [2Fe-2S] cluster probed with ultraviolet resonance raman spectroscopy. *Biochemistry* **50**, 9468–9474 (2011).
 219. Vogt, S. L. & Raivio, T. L. Just scratching the surface: An expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiol. Lett.* **326**, 2–11 (2012).
 220. Morales, E. H. *y col.* Probing the ArcA regulon under aerobic/ROS conditions in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *BMC Genomics* **14**, 626 (2013).
 221. Lee, L. J., Barrett, J. A. & Poole, R. K. Genome-Wide Transcriptional Response of Chemostat-Cultured Escherichia coli to Zinc. **187**, 1124–1134 (2005).
 222. Kimura, T. & Nishioka, H. Intracellular generation of superoxide by copper sulphate in Escherichia coli. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **389**, 237–242 (1997).

223. Yamamoto, K., Oshima, T., Nonaka, G., Ito, H. & Ishihama, A. Induction of the *Escherichia coli* *cysK* gene by genetic and environmental factors. *FEMS Microbiol. Lett.* **323**, 88–95 (2011).
224. Bäumlér, A. J., Winter, S. E., Thiennimitr, P. & Casadesús, J. Intestinal and chronic infections: *Salmonella* lifestyles in hostile environments. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**, 508–517 (2011).
225. Groisman, E. A. *y col.* Bacterial Mg²⁺ Homeostasis, Transport, and Virulence. 625–646 (2013). doi:10.1146/annurev-genet-051313-051025.Bacterial
226. Wang, D., Hosteen, O. & Fierke, C. A. ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. 173–181 (2012). doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations
227. Moore, C. M. & Helmann, J. D. Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 188–195 (2005).
228. Figueroa-Bossi, N., Coissac, E., Netter, P. & Bossi, L. Unsuspected prophage-like elements in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **25**, 161–73 (1997).
229. Padalon-Brauch, G. *y col.* Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1913–1927 (2008).
230. Cerasi, M. *y col.* The ZupT transporter plays an important role in zinc homeostasis and contributes to *Salmonella enterica* virulence. *Metallomics* (2014). doi:10.1039/c3mt00352c
231. Vanderkelen, L. *y col.* Identification of a bacterial inhibitor against g-type lysozyme. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 1053–64 (2010).
232. Callewaert, L. *y col.* A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria. *PLoS Pathog.* **4**, e1000019 (2008).
233. Callewaert, L. *y col.* Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors. *Trends Microbiol.* **20**, 501–10 (2012).
234. Callewaert, L. & Michiels, C. W. Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.* **35**, 127–160 (2010).
235. Canfield, R. E. & McMurry, S. Purification and characterization of a

- lysozyme from goose egg white. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 38–42 (1967).
236. Hikima, J. ichi, Minagawa, S., Hirono, I. & Aoki, T. Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1520**, 35–44 (2001).
237. Irwin, D. M. & Gong, Z. Molecular evolution of vertebrate goose-type lysozyme genes. *J. Mol. Evol.* **56**, 234–242 (2003).
238. Vollmer, W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 287–306 (2008).
239. Monchois, V., Abergel, C., Sturgis, J., Jeudy, S. & Claverie, J. M. Escherichia coli ykfE ORFan Gene Encodes a Potent Inhibitor of C-type Lysozyme. *J. Biol. Chem.* **276**, 18437–18441 (2001).
240. Deckers, D., Vanlint, D., Callewaert, L., Aertsen, A. & Michiels, C. W. Role of the lysozyme inhibitor Ivy in growth or survival of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa bacteria in hen egg white and in human saliva and breast milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4434–4439 (2008).
241. Deckers, D. *y col.* Periplasmic lysozyme inhibitor contributes to lysozyme resistance in Escherichia coli. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1229–37 (2004).
242. Van Herreweghe, J. M. *y col.* Lysozyme inhibitor conferring bacterial tolerance to invertebrate type lysozyme. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1177–1188 (2010).
243. Callewaert, L., Vanoirbeek, K. G. A., Lurquin, I., Michiels, C. W. & Aertsen, A. The Rcs two-component system regulates expression of lysozyme inhibitors and is induced by exposure to lysozyme. *J. Bacteriol.* **191**, 1979–1981 (2009).
244. Laubacher, M. E. & Ades, S. E. The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **190**, 2065–2074 (2008).
245. Makarova, K. S., Ponomarev, V. a & Koonin, E. V. Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins. *Genome Biol.* **2**, RESEARCH 0033 (2001).

246. Prisic, S. *y col.* Zinc regulates a switch between primary and alternative S18 ribosomal proteins in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **97**, 263–80 (2015).
247. Baucheron, S. *y col.* AcrAB-TolC Directs Efflux-Mediated Multidrug Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104. **48**, 3729–3735 (2004).
248. Zgurskaya, H. I., Krishnamoorthy, G., Ntrel, A. & Lu, S. Mechanism and function of the outer membrane channel TolC in multidrug resistance and physiology of enterobacteria. *Front. Microbiol.* **2**, 1–13 (2011).
249. Crosa, J. H. & Walsh, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 223–49 (2002).
250. Kim, C., Lorenz, W. W., Hoopes, J. T. & Dean, J. F. D. Oxidation of Phenolate Siderophores by the Multicopper Oxidase Encoded by the *Escherichia coli* *yacK* Gene. **183**, 4866–4875 (2001).
251. Grass, G. *y col.* Linkage between Catecholate Siderophores and the Multicopper Oxidase CueO in *Escherichia coli*. (2004). doi:10.1128/JB.186.17.5826
252. Chaturvedi, K. S., Hung, C. S., Crowley, J. R., Stapleton, A. E. & Henderson, J. P. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. **8**, 731–736 (2012).
253. Chaturvedi, K. S. *y col.* Cupric Yersiniabactin Is a Virulence-Associated Superoxide Dismutase Mimic. (2014).
254. Achard, M. E. S. *y col.* Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochem. J.* **444**, 51–7 (2012).

“Vive como si fueras a morir mañana.
Aprende como si fueras a vivir siempre”

Mahatma Gandhi