



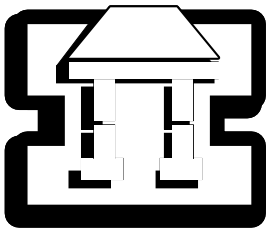
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

EL HIERRO EN LA VIRULENCIA BACTERIANA

T E S I S I N A
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
DAVID ARTURO SOSA SÁNCHEZ

ASESOR: DR. SERGIO VACA PACHECO



TLANEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mis padres María Teresa y Alfonso que me apoyaron desde el principio en cada proyecto de mi vida, sin su cariño esto no hubiera sido posible.

A mis hermanos Diego y Mauricio que han sido mis compañeros y cómplices.

A mi esposa Rosalía por darme su amor, comprensión y la mayor inspiración de mi vida, Sofía, sin su presencia no habría logrado cumplir este sueño.

A Miguel Amador por brindarme su amistad y ayuda incondicional.

A Leticia Martínez que me ha apoyado de muchas formas para llegar a cumplir a esta meta.

A mi tutor y sinodales por la paciencia y la oportunidad de presentar este trabajo.

A todos aquellos que de una u otra forma tuvieron que ver para alcanzar esta meta.

Índice

1. Introducción	4
2. El hierro es esencial para las bacterias	5
3. La biodisponibilidad del hierro es muy baja	7
4. Metabolismo del hierro	9
5. Regulación del metabolismo del hierro	15
6. Sideróforos	21
7. Sistemas de transporte para los sideróforos.	26
8. Reducción del Fe ⁺³ y transporte de Fe ⁺²	30
9. Lactoferrina y transferrina como fuentes de hierro	32
10. Hemo como fuente de hierro para las bacterias	32
11. Control de la expresión genética por hierro	34
12. Homeostasis del hierro en las bacterias	34
13. Bibliografía	40

Introducción

Hace millones de años el oxígeno redujo la concentración de Fe⁺² libre en los cuerpos de agua.

El oxígeno (O₂) apareció en la atmósfera terrestre hace aproximadamente dos mil doscientos millones de años, como subproducto de la fotosíntesis llevada a cabo por las cianobacterias. La mayoría del oxígeno producido se consumió inicialmente al formar los óxidos metálicos que constituyen parte de las rocas y los minerales actuales (Lane N, 2002). La acumulación posterior de O₂ en la atmósfera permitió la producción de la capa de ozono (O₃) así como la eliminación del ión ferroso Fe⁺² de los cuerpos de agua por formación de compuestos férricos (Fe⁺³) insolubles (Lane N, 2002). El hierro tiene dos estados de oxidación relevantes para sus funciones biológicas: Fe(II) y Fe(III). Al paso reversible de uno al otro se debe su capacidad de participar en reacciones de transferencia de electrones. El Fe(II) es un agente reductor deletéreo para los seres vivos debido a que produce el radical libre hidroxilo (OH[·]) tóxico, altamente reactivo, mediante la reacción de Fenton:



La bajísima concentración de Fe⁺² en los cuerpos de agua favoreció el florecimiento de los seres vivos aerobios al reducir los niveles del radical hidroxilo. El H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) provendría de reacciones fotoquímicas entre el agua de lluvia y el O₂ atmosférico provocadas por irradiación con luz ultravioleta (Lane N, 2002).

El hierro es esencial para las bacterias

El hierro es un metal esencial para los seres vivos. Actúa como grupo prostético de catalasas, oxidasas, citocromos, y ribonucleótido reductasas (Bergeron RJ, 1986), proteínas que participan en funciones indispensables para la mayoría de las células. Forma parte también del grupo hemo de la hemoglobina. La Tabla 1 muestra algunos ejemplos de enzimas y proteínas, tanto de mamífero como de bacterias, que requieren hierro. Como puede apreciarse, el hierro interviene en un gran número de procesos biológicos esenciales, al funcionar como centro catalítico de enzimas que participan en el transporte de electrones, en la activación del oxígeno, en la reducción del peróxido, en la síntesis de aminoácidos, en la fotosíntesis, y en la formación de los 4 desoxirribonucleótido difosfatos (necesarios para la síntesis de DNA), a partir de los ribonucleótido difosfatos por la enzima ribonucleótido reductasa.

Este metal es el micro nutriente más importante utilizado por las bacterias, con excepción de algunos miembros de la familia *Lactobacillae* que no requieren Fe para crecer (Archibald F, 1983).

Tabla 1. Ejemplos de enzimas y proteínas que requieren hierro.*

Función	Bacterianas	De mamífero
Unión de oxígeno	Leghemoglobina	Hemoglobina Mioglobina
Metabolismo del oxígeno tipo hemo tipo no hemo	Triptofano dioxigenasa Catecol oxigenasas	Triptofano-2,3-dioxigenasa Triptofano hidroxilasa Tirosina hidroxilasa Cisteamina dioxigenasa Prolil hidroxilasa Lisil hidroxilasa Fenilalanina hidroxilasa
Metabolismo del peróxido y del superóxido	Superóxido dismutasa Catalasa Peroxidasa	Catalasa Peroxidasa
Transferencia de electrones tipo hemo tipo no hemo	Citocromos Sulfito reductasa Proteínas hierro-azufre Nitrogenasa Glutamato sintetasa Hidrogenasa Ribonucleótido reductasa	Citocromos Sulfito oxidasa Proteínas mitocondriales hierro- azufre Ribonucleótido reductasa
Flavoproteínas	Deshidrogenasa succínica Nitrato reductasa Xantina oxidasa NADH deshidrogenasa Formato deshidrogenasa NAPH sulfito reductasa	Aldehído oxidasa Xantina oxidasa Xantina deshidrogenasa

*Adaptada de Griffiths E, 1987.

A mediados de los años 1940's se descubrió que proteínas que unen hierro, presentes en la clara cruda de huevo de gallina y en el plasma humano, inhibían el crecimiento de *Shigella dysenteriae* (Schade AL & Caroline L, 1944). Debido a que la inhibición del crecimiento microbiano se revertía por la adición de hierro, se concluyó que tales proteínas unían el hierro fuertemente haciéndolo inaccesible para los microbios. La proteína bacteriostática de la clara de huevo fue identificada como ovotransferrina (o conalbúmina) (Alderton G, Ward WH & Fevold HL, 1946), y la proteína del plasma como transferrina.

Poco tiempo después se describió que la inyección de hierro a animales incrementaba su susceptibilidad a la infección experimental por diversos microorganismos, entre los que se encuentran: *Aeromonas* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Neisseria* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp., *Yersinia* spp., (Griffiths E, 1999) *Mycobacterium avium* (Dhople AM, Ibañez MA & Poirier TC, 1996), *Mycobacterium tuberculosis* (Gobin J & Horwitz MA, 1996).

La biodisponibilidad del hierro es muy baja

No obstante que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la tierra (O>Si>Al>Fe), su biodisponibilidad es muy baja debido a que se encuentra como $\text{Fe}(\text{OH})_3$ insoluble. Se estima que la concentración de Fe^{+3} libre en solución acuosa a pH 7 es del orden de 10^{-18} M (Bullen JJ, Rogers HJ & Griffiths E, 1978); o de 10^{-9} M asumiendo que el hidróxido predominante es $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ y no $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (Chipperfield JR & Ratledge C, 2000; Figura 1). Cualquiera de estos valores está por debajo de la concentración micromolar requerida para el crecimiento de las bacterias. De manera que estas se encuentran, en cualquier medio, con limitación de hierro; en el suelo o en el agua debido a la insolubilidad del Fe^{+3} y en los hospederos multicelulares debido a que el metal se encuentra unido a proteínas. La limitación de hierro disponible impide que los microorganismos patógenos se multipliquen en los hospederos; sin embargo, los microbios deben poseer mecanismos de captación de hierro puesto que muchos de ellos superan esa carencia y establecen una infección.



La constante de solubilidad es:

$$K_{sp} = 2 \times 10^{-39} = [\text{Fe}^{+3}] [\text{OH}^-]^3$$

$$\therefore [\text{Fe}^{+3}] = (2 \times 10^{-39}) [\text{OH}^-]^3$$

Si pH=7, entonces $[\text{OH}^-] = 10^{-7}$ y

$$[\text{Fe}^{+3}] = (2 \times 10^{-39}) (10^{-7})^3 = 2 \times 10^{-39+21} = 2 \times 10^{-18} \text{ M}$$

Figura 1. Concentración de Fe^{+3} libre a pH 7.

Metabolismo del hierro

Las proteínas que contienen hierro más abundantes en la naturaleza son las que poseen el grupo hemo (Figura 2). Éstas son de tres tipos (Bezkorovainy A, 1987):

1. Acarreadoras de oxígeno (hemoglobinas de plantas y animales, mioglobinas)
2. Citocromos
3. Hemoproteínas detoxificadoras (Catalasas, peroxidasas, superóxido dismutasas).

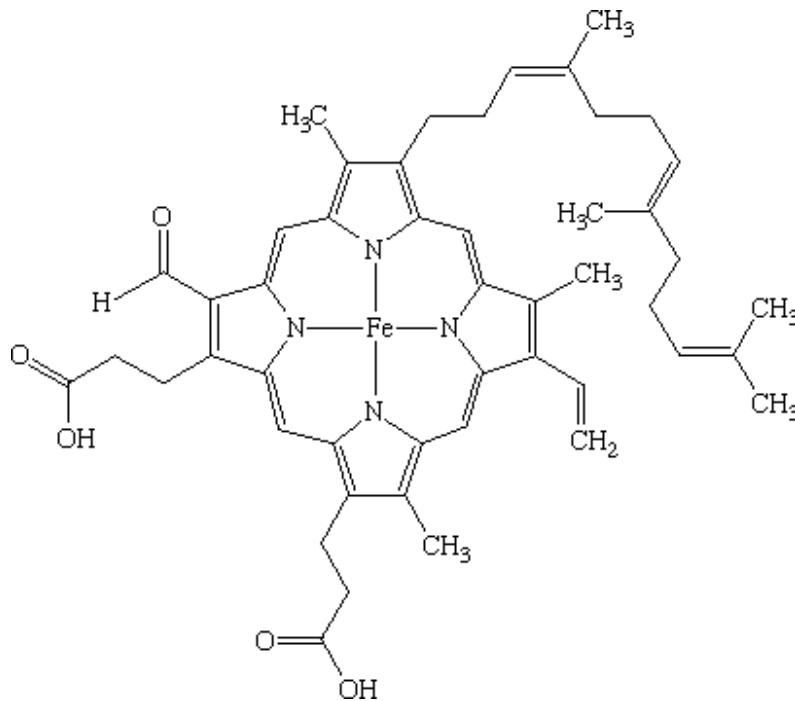


Figura 2. El grupo hemo.

El hierro se adquiere al consumir plantas (citocromos) y animales (hemo) como parte de la dieta. El Fe^{+3} de la dieta es reducido a Fe^{+2} por una ferri-reductasa duodenal en la superficie apical de los enterocitos; esta enzima podría ser la reductasa Dcytb (**D**uodenal **cy**tochrome **b**) u otra ferri-reductasa aún no

descubierta, toda vez que se ha demostrado que Dcytb no es necesaria para la absorción de hierro en ratón (Gunshin H, 2005). El Fe^{+2} se absorbe por las células de la mucosa del intestino delgado, es reoxidado a Fe^{+3} (ver más adelante) y pasa al torrente sanguíneo unido a la glicoproteína transferrina (Figura 3).

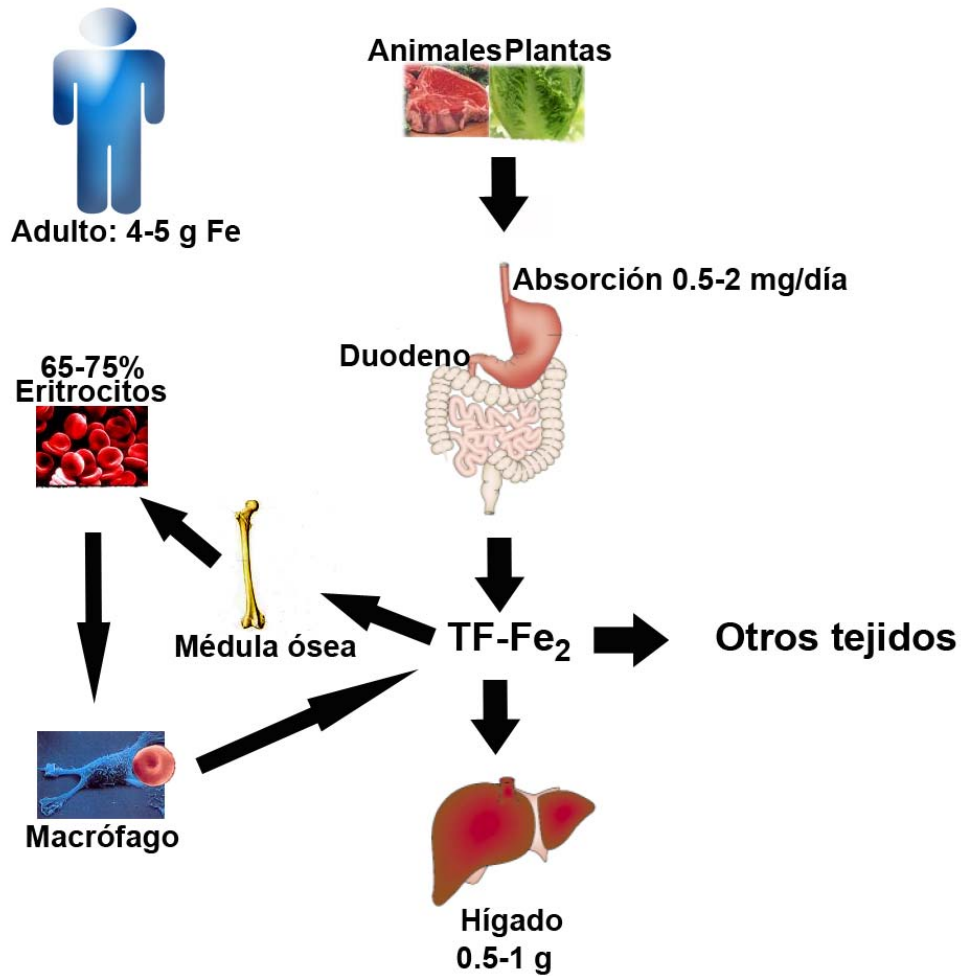


Figura 3. Distribución del hierro en el cuerpo. Un hombre adulto posee 4-5 g de hierro. En el duodeno se absorben diariamente 0.5-2 mg del Fe de la dieta; una cantidad similar se pierde por la descamación de las células epiteliales de la piel, de las mucosas y de la vejiga. La mayor parte del hierro (65-75%) se encuentra en la hemoglobina de los eritrocitos. La formación de glóbulos rojos consume alrededor de 22 mg de Fe por día. Aproximadamente 3 mg de hierro circulan unidos a la transferrina. Los glóbulos rojos viejos son fagocitados por los macrófagos reticuloendoteliales; el Fe del grupo hemo se recicla. El exceso de hierro se almacena en el hígado, a razón de 5 mg por día. (Modificado de Andrews N. 2000. y de Anderson GJ, 2007).

La proteína DMT1 (**D**ivalent **M**etal **T**ransporter 1), también conocida como Nramp2-l (por sus siglas en inglés, **N**atural resistance-associated **m**acrophage **p**rotein), presente en la membrana apical de las células epiteliales del duodeno, es la encargada de bombear el Fe^{+2} al citoplasma del enterocito (Forbes JR & Gros P, 2001; Figura 4). El Fe^{+2} se exporta a la circulación portal por la ferroportina, un transportador situado en la membrana basolateral del enterocito. Enseguida el Fe^{+2} es reoxidado a Fe^{+3} por la ferroxidasa plasmática ceruplasmina o por la hephaestina localizada en la membrana basolateral del enterocito. El Fe^{+3} es capturado por la transferrina, la cual lo libera en la médula ósea y en otros tejidos (Figuras 3 y 4).

El complejo transferrina-Fe se une a su receptor (TFR) localizado en la superficie celular y penetra a la célula por endocitosis (Aisen P, Wessling-Resnick M & Leibold EA, 1999). La acidificación del endosoma (pH 5.5) provoca la liberación del Fe, el cual es transportado a través de la membrana endosomal por DMT1 y utilizado para sintetizar proteínas que contienen Fe. El exceso de Fe es almacenado en la ferritina, una proteína formada por 24 subunidades que puede almacenar 4500 átomos de Fe^{+3} (Figuras 5, 6).

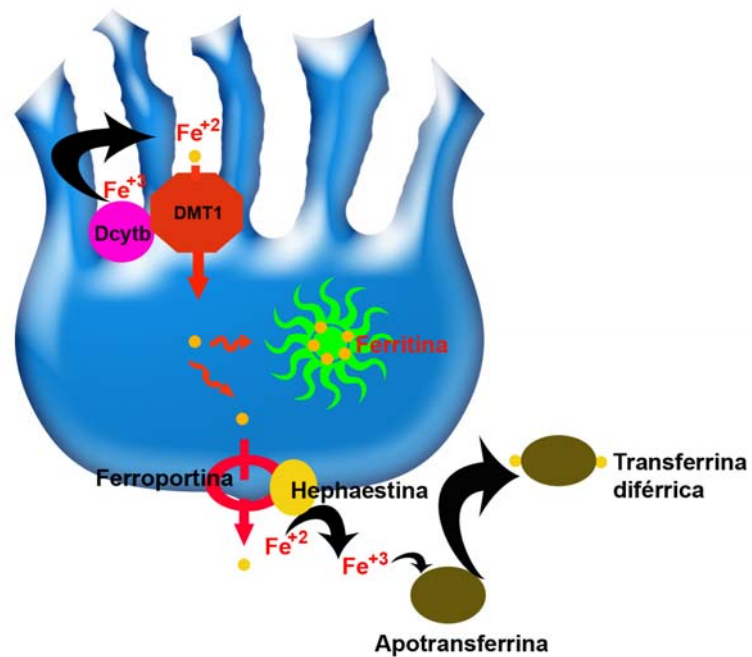


Figura 4. Transporte de hierro a través de las células epiteliales del duodeno. El Fe^{+3} (no hemo) es reducido en el lumen intestinal por la reductasa Dcytb (**D**uodenal **c**ytochrome **b**) u otra ferro-reductasa no descrita aún. El Fe^{+2} es transportado a través de la membrana apical del enterocito maduro por el transportador DMT1 (**d**ivalent **m**etal **t**ransporter 1). Una fracción del hierro se almacena en la Ferritina. El Fe^{+2} es exportado a través de la membrana basolateral del enterocito hacia la circulación portal por la ferroportina. Este paso está acoplado a la reoxidación del Fe^{+2} a Fe^{+3} por la hephaestina unida a la membrana. En el plasma, el Fe^{+3} se compleja con la transferrina, la cual libera al metal en la médula ósea y en otros tejidos (ver figura 3). (Modificado de Pantopoulos K, 2004).

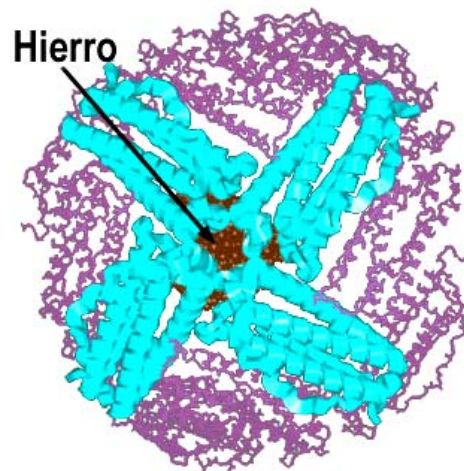


Figura 5. Representación tridimensional de la ferritina. La molécula está formada por una parte polipeptídica (apoferritina) y una micela de hidróxido-fosfato de hierro $[(\text{FeOOH})_8(\text{FeOPO}_3\text{H}_2)]$, en la que el Fe representa el 57% del peso micelar. La apoferritina es esférica, su diámetro externo es de 124-130 Ångstroms y el interno es de 70-80 Ångstroms y contiene la micela. (Bezkorovainy A, 1987; figura tomada de Wikipedia).

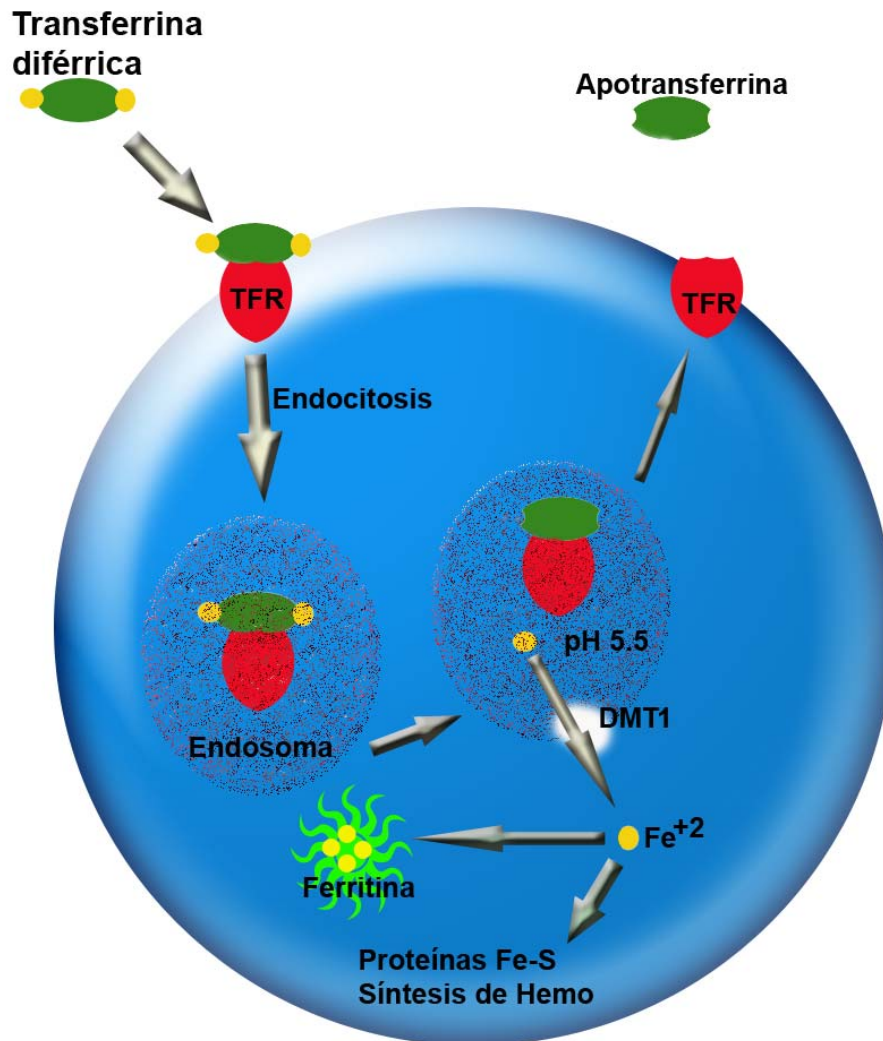


Figura 6. El ciclo de la transferrina. La transferrina diférrica se une a su receptor membranal (TRF) y es endocitada. La acidificación del endosoma provoca la liberación del ión Fe^{+3} y su reducción a Fe^{+2} , el cual es transportado a través de la membrana del endosoma por DMT1. El Fe^{+2} se utiliza para la síntesis de hemo y de proteínas que contienen Fe. El exceso de hierro se almacena en la ferritina. El complejo apotransferrina-TFR se transporta a la superficie celular y se libera la apotransferrina. (Modificado de Pantopoulos K, 2004).

Otra fuente de hierro para los mamíferos es el grupo hemo, derivado de la ruptura de la hemoglobina y la mioglobina presente en la carne de la dieta. El grupo hemo se une al receptor HCP1 (**H**eme **c**arrier **p**rotein), presente en las células del duodeno, y el complejo es internalizado por endocitosis mediada por el receptor (Shayeghi M, 2005). Se ha sugerido que la vesícula endosomal resultante migra hacia el retículo endoplásmico, en donde el Fe^{+2} es liberado del complejo Fe-HCP1 por la hemooxigenasa-1; exportado por la ferroportina y oxidado por la ferro-oxidasa hephaestina, para finalmente complejarse con la transferrina.

Regulación del metabolismo del hierro

La concentración de hierro libre en los humanos y otros animales vertebrados superiores es muy baja. El metal se mantiene soluble al formar complejos con moléculas acarreadoras, o reducido a ión ferroso en el interior de las células. La mayor parte del Fe^{+2} se encuentra unido a la ferritina (Chasteen ND, 1998) y al grupo hemo, ambos de localización intracelular. En el suero y la linfa el hierro se encuentra unido a la transferrina (Aisen P, 1998) en tanto que en las secreciones y en la leche de los mamíferos está complejoado con la lactoferrina.

Las transferrinas son proteínas que se encuentran en todos los vertebrados. Hay tres clases principales de transferrinas: la transferrina (Tf, o serotransferrina presente en el suero y en la linfa), lactoferrina (Lf, presente en la leche, saliva, lágrimas, secreciones nasales, fluidos intestinales, moco cervical, fluido seminal, calostro, leucocitos polimorfonucleares) y ovotransferrina (antes conocida como conalbúmina, presente en la clara de huevo). Cada una de estas glicoproteínas está formada por una sola cadena de peso molecular 80,000 que contiene dos sitios de unión de hierro cuyas constantes de unión son $<10^{20}$. Las transferrinas unen dos átomos-gramo de hierro por mol de proteína, pero en el plasma humano sólo 1/3 de los sitios de unión de hierro de la transferrina están ocupados por el metal. La tabla 2 muestra las concentraciones de transferrinas presentes en varios fluidos.

Tabla 2. Concentración de transferrinas en varios fluidos biológicos*.

Proteína	Especie	Fluido	Concentración (mg/ml)
Transferrina	Humano	Suero	2.6
	Conejo		2.8
	Vaca		3.4
	Perro		3.0
Lactoferrina	Humano	Calostro	4.9
		Leche	1.0
Ovotransferrina	Gallina	Clara de huevo	125

* (Bezkorovainy A, 1987).

En el suero humano normal, la concentración de Fe libre, en equilibrio con transferrina-Fe, es 10^{-18} M (Bullen JJ, Rogers HJ & Griffiths E, 1978).

La mayor cantidad del Fe unido a ferritina se encuentra en el interior de los hepatocitos, de las células de la médula ósea y de las del bazo; el hígado es la principal reserva fisiológica de Fe (Figura 3).

La regulación del metabolismo del hierro en las células de mamífero se lleva a cabo principalmente a nivel post-transcripcional. Estructuras de asa y tallo, conocidas como IREs (**I**ron **R**esponsive **E**lements; Figura 7) se encuentran en las regiones no traducidas (UTR; untranslated region) 5' o 3' de los mRNAs de genes que participan en el metabolismo del hierro: Ferritina (5'UTR), TFR (3'UTR), eritroide-5-aminolevulinato sintetasa (5'UTR; enzima que cataliza el paso limitante de la síntesis del grupo hemo), DMT1 (3'UTR), ferroportina (5'UTR).

Dos proteínas llamadas IRP1 e IRP2 (Iron Regulatory Protein) se unen a los sitios IRE cuando las células están expuestas a deficiencia de hierro. La unión de IRP a IRE causa una disminución en la traducción del mRNA al impedir la formación del complejo de inicio de la traducción (cuando IRE está situado en la UTR del extremo 5' del mRNA), o estabiliza el mRNA protegiéndolo del ataque de una RNAasa (cuando IRE está localizado en la UTR del extremo 3' del mRNA) (Pantopoulos K, 2004).

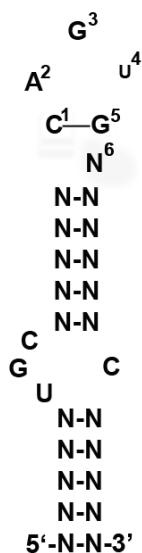


Figura 7. Secuencia consenso de IRE (Iron Responsive Element).

De esta manera, la deficiencia de Fe provoca el incremento de DMT1 (más absorción de hierro en las células del duodeno; Gunshin H, 2001) y del receptor para transferrina (más captación de Fe por las células eritroides de la médula ósea) y disminuye los niveles de ferritina (menos almacenamiento de Fe). Adicionalmente, en deficiencia de Fe se incrementa la transcripción del gen *DMT1* en el intestino, por un mecanismo desconocido hasta ahora (Hubert N & Hentze MW, 2002).

Cuando aumenta la concentración de hierro en el citosol IRP1 e IRP2 no se unen a los IREs, lo que conduce a que la célula incremente la producción de ferritina al mismo tiempo que disminuye la del receptor para transferrina (Figuras 8 y 9) y la de DMT1.

IRP1 e IRP2 son polipéptidos homólogos de 889 y 964 aminoácidos, respectivamente, que se localizan en el citoplasma. IRP1 es una proteína bifuncional que actúa como aconitasa citosólica en células repletas de hierro o, cuando hay carencia de hierro, como una proteína que se une a los sitios IRE en las UTRs de los mRNAs. La función de IRP1 está determinada por la presencia o ausencia de un grupo hierro-azufre ligado al sitio activo de la enzima (Figura 10; Rouault TA, 2005).

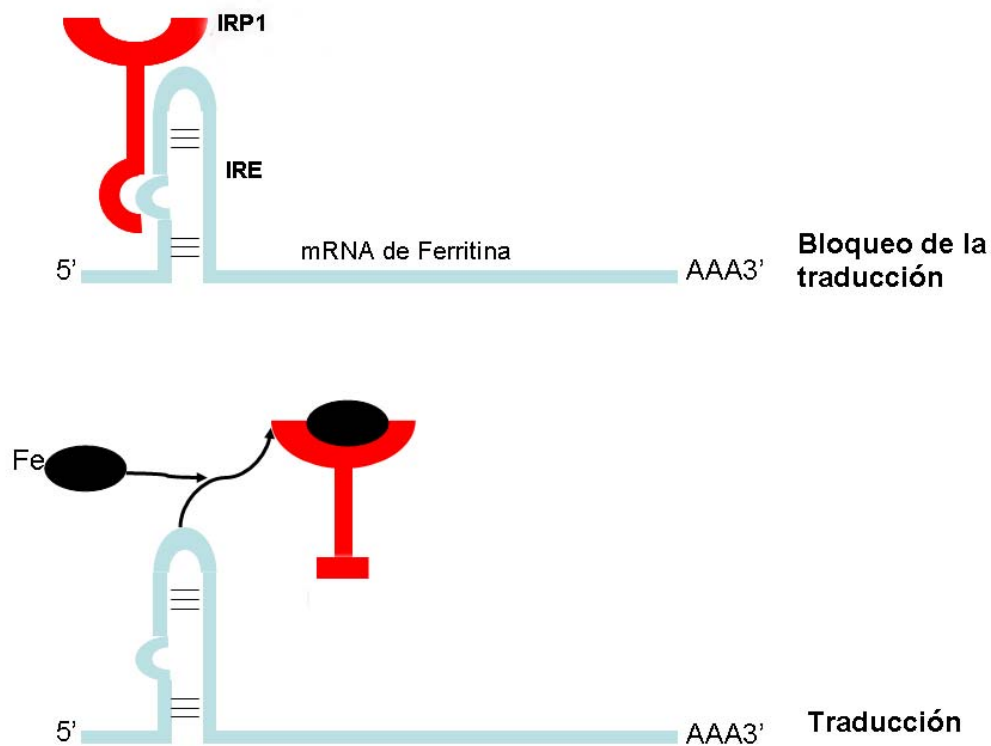


Figura 8. Regulación de la traducción del mRNA de ferritina por IRP1. Cuando se incrementa la concentración de hierro en el citosol, la célula aumenta la síntesis de ferritina para que ésta capture el exceso del metal. IRP1 se une al IRE de la 5'UTR del mRNA de la ferritina. La unión de IRP1 al IRE impide la traducción. Cuando el hierro se une a IRP1, ésta se separa del mRNA. (Modificado de Alberts B, 2002).

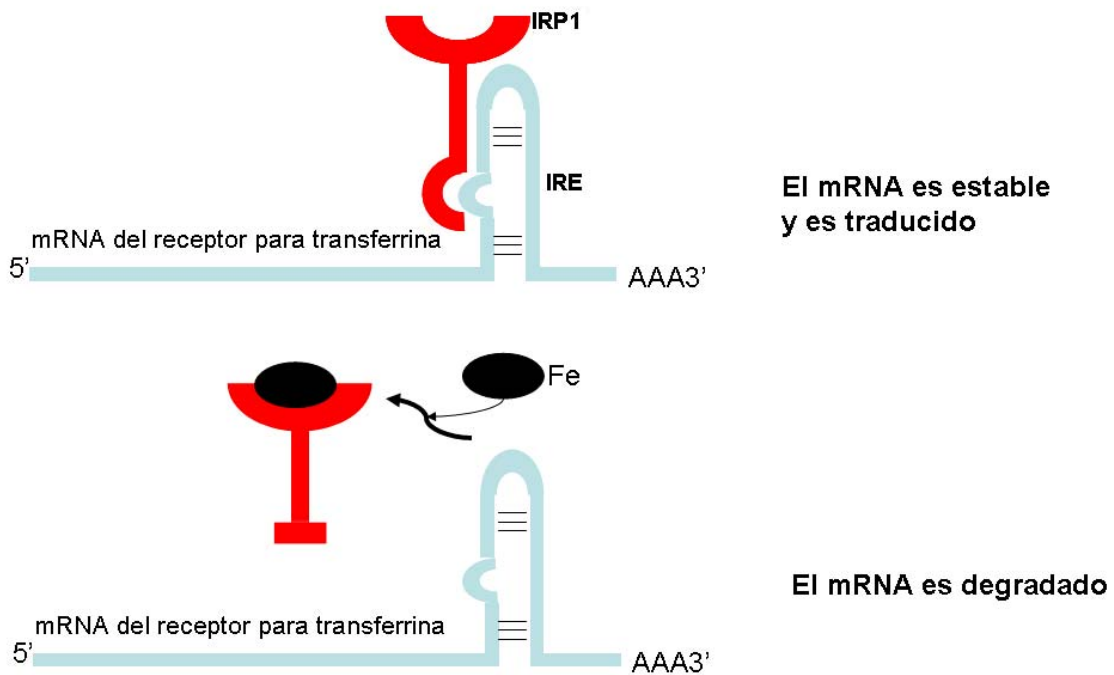


Figura 9. Regulación de la traducción del mRNA del receptor para transferrina. Cuando se incrementa la concentración de hierro en el citosol la célula disminuye la síntesis del receptor para transferrina para evitar el ingreso de más hierro. La IRP1 estabiliza al mRNA del receptor para la transferrina al unirse a la 3'UTR ya que bloquea un sitio de corte para una endonucleasa. Cuando el hierro se une a IRP1, ésta se separa del mRNA, el cual es degradado por una endonucleasa (Modificado de Alberts B, 2002).

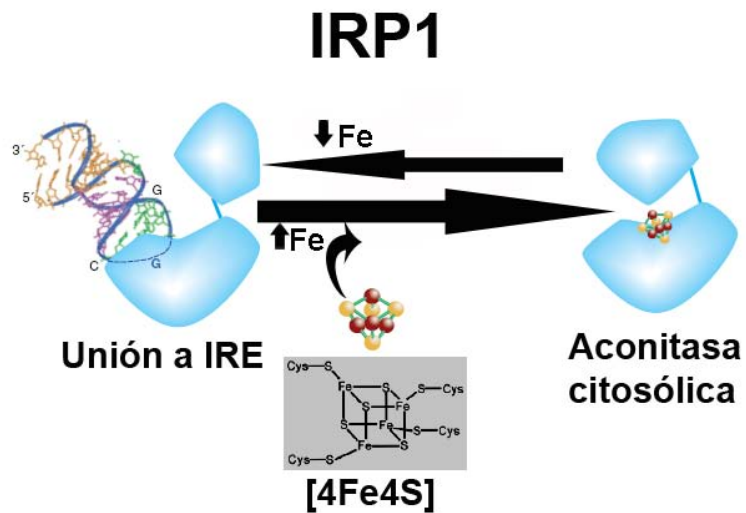


Figura 10. IRP1 es una proteína bifuncional. En ausencia de un grupo [4Fe4S] IRP1 tiene afinidad por los sitios IRE; en presencia del grupo [4Fe4S] actúa como aconitasa citosólica. (Modificado de Rouault TA, 2005).

Para los propósitos de este trabajo, los aspectos mencionados sobre la regulación del metabolismo del Fe son suficientes; para una revisión más completa de la homeostasis del hierro consúltese la referencia (Anderson GJ, 2007).

Sideróforos

Los sideróforos son compuestos orgánicos quelantes de Fe^{+3} producidos y secretados por las bacterias cuando están ayunadas de hierro. Son compuestos pequeños (masa molecular >1000 Da) que tienen gran especificidad y alta afinidad por Fe^{+3} ($K_{\text{aff}} >10^{30}$) (Byers BR & Arceneaux JEL, 1998). Los complejos Fe(III)-sideróforo de las bacterias gramnegativas se unen a receptores específicos localizados en la membrana externa y son transportados a través de la membrana interna por permeasas ABC dependientes de proteínas periplásmicas. En las bacterias grampositivas los complejos Fe(III)-sideróforo son reconocidos por receptores específicos anclados en la membrana interna y luego transportados por permeasas ABC. (Wandersman C & Depelaire P, 2004).

Los sideróforos son de tres tipos:

1) Tipo catecol, como la enterobactina que contiene tres moléculas del agente quelante 2,3-dihidroxibenzoato (Catecol) unidos a una trilactona cíclica constituida por tres moléculas de serina (Figura 11).

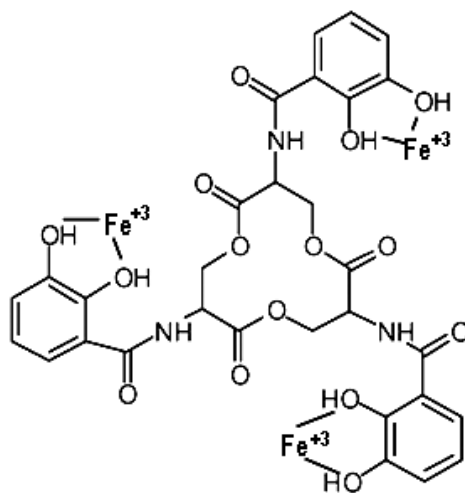


Figura 11. Enterobactina.

2) **Tipo hidroxamato** como la ferrioxamina, en la que tres moléculas de ácido hidroxámico forman un compuesto cíclico carente de carga cuando está complejoado con Fe^{+3} (Figura 12). Otro hidroxamato es la aerobactina (Figura 13), sideróforo aislado por primera vez a partir de *Aerobacter aerogenes*, que es producido también por cepas patógenas de *E. coli*, particularmente por las aisladas de hemocultivo, muchas de las cuales poseen al plásmido pColV-K30 el cual contiene un operón que posee los genes para la síntesis del quelante (*aer*). (Neilands JB, 1995). Los genes *aer* también pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano.

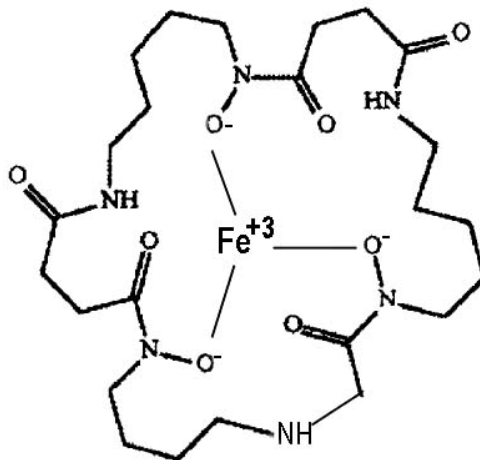


Figura 12. Ferrioxamina.

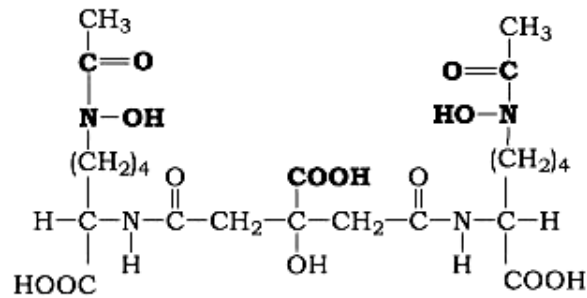


Figura 13. Aerobactina.

3) Tipo carboxilato. Los ácidos dicarboxílicos o tricarboxílicos son buenos quelantes de hierro. Un ejemplo es el citrato (Figura 14).

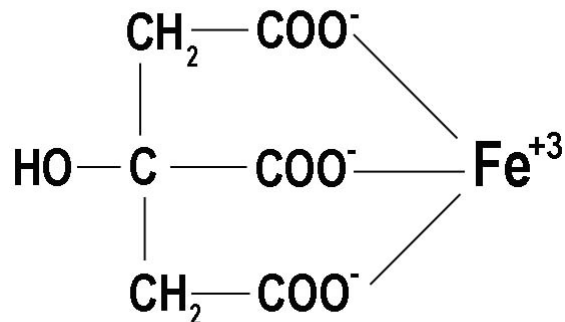


Figura 14. Citrato férrico.

Para comparar las afinidades por el Fe que poseen los sideróforos y las proteínas del hospedero que almacenan o transportan hierro, es útil recordar la definición de constante de estabilidad. En la reacción entre el metal (M) y el ligando (L) para formar el complejo metal-ligando (ML):



la constante de estabilidad se define como $K = [ML] / [M] \cdot [L]$

Obviamente, entre más grande es el valor de esta constante, más estable es el complejo metal ligando. La tabla 3 muestra los valores de la constante de estabilidad de algunos complejos de Fe^{+3} .

Tabla 3. Constantes de estabilidad de algunos complejos de Fe^{+3}

Compuesto	Constante de estabilidad a pH=7.0
Enterobactina- Fe^{+3}	10^{52}
Ferrioxamina E- Fe^{+3}	10^{32}
Ferricromo A- Fe^{+3}	10^{29}
Transferrina A- Fe^{+3}	10^{24}
EDTA- Fe^{+3}	10^{25}

Tomada de: Fuchs G, 1999.

Los ferricromos son sideróforos hexapeptídicos cíclicos (Figura 15) producidos por los hongos que pueden ser utilizados también por las bacterias, por ejemplo por *E. coli*.

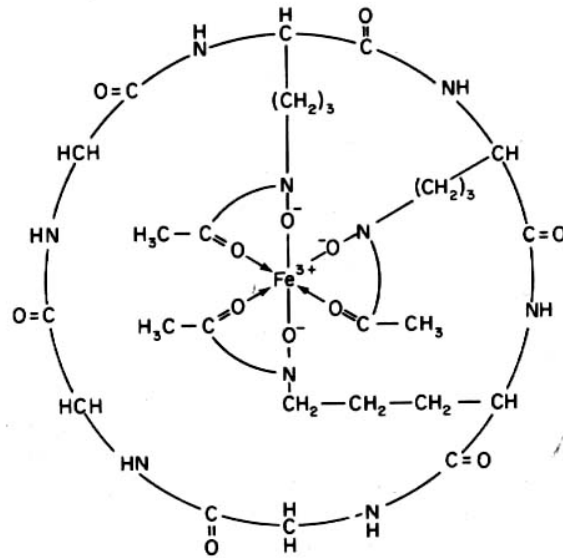


Figura 15. Estructura del ferricromo.

Sistemas de transporte para los sideróforos.

Proteínas de membrana externa son los receptores que unen fuertemente moléculas grandes como los sideróforos y la vitamina B₁₂. Después de unirse a los receptores multifuncionales los sideróforos atraviesan la membrana externa, por un proceso que consume energía, y se unen a proteínas periplásmicas. La captación de los sideróforos-Fe(III) ocurre mediante varios sistemas de transporte dependientes de ATP (Figura 16).

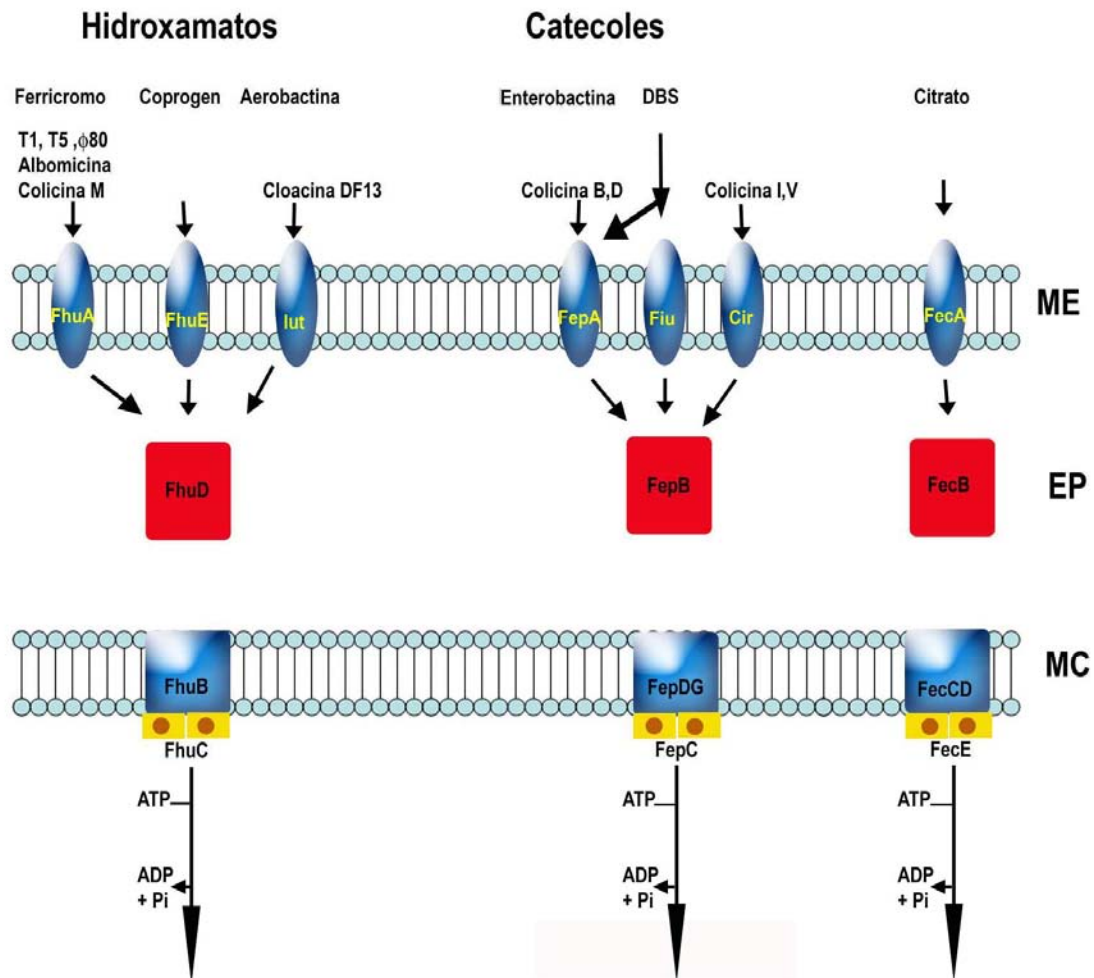


Figura 16. Sistemas de transporte de sideróforos-Fe en *E. coli*. Proteínas receptoras localizadas en la membrana externa (ME) unen de manera específica hidroxamatos férricos (FhuA, FhuE, Iut), catecolatos férricos (FepA, Fiu) y citrato férrico (FecA) en un proceso que es impulsado por el potencial de la membrana citoplásmica (MC) y mediado por el sistema de transducción de energía formado por las proteínas TonB-ExbB-ExbD (no mostradas en la figura). Proteínas periplásmicas (FhuD, FepB, FecB) transportan los ferri-sideróforos desde los receptores de la ME a permeasas (FhuBC, FepCDG, FecCDE) de la MC que internalizan el ferri-sideróforo con gasto de ATP. T1, T5 y Φ 80 son fagos. DBS = Ácido dihidroxibenzoico. (Modificado de Braun V, 1995. y de Andrews SC, Robinson AK & Rodríguez-Quñones F, 2003).

Los sideróforos liberan el hierro por:

- 1) Reducción a Fe^{+2} (el ferricromo no une Fe^{+2})
- 2) hidrólisis enzimática del sideróforo (enterobactina)
- 3) En el caso del citrato férrico sólo el Fe^{+3} penetra a la célula.

Las bacterias que usan la enterobactina para captar hierro (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* Thyphimurium y algunas especies de *Shigella*) utilizan el quelante una sola vez, ya que el complejo Fe^{+3} -enterobactina es hidrolizado por una esterasa específica (codificada por el gen *fes* en *E. coli*) cuando el compuesto entra a la célula, produciendo 2,3-dihidroxibenzoilserina que se descarta (Figura 17).

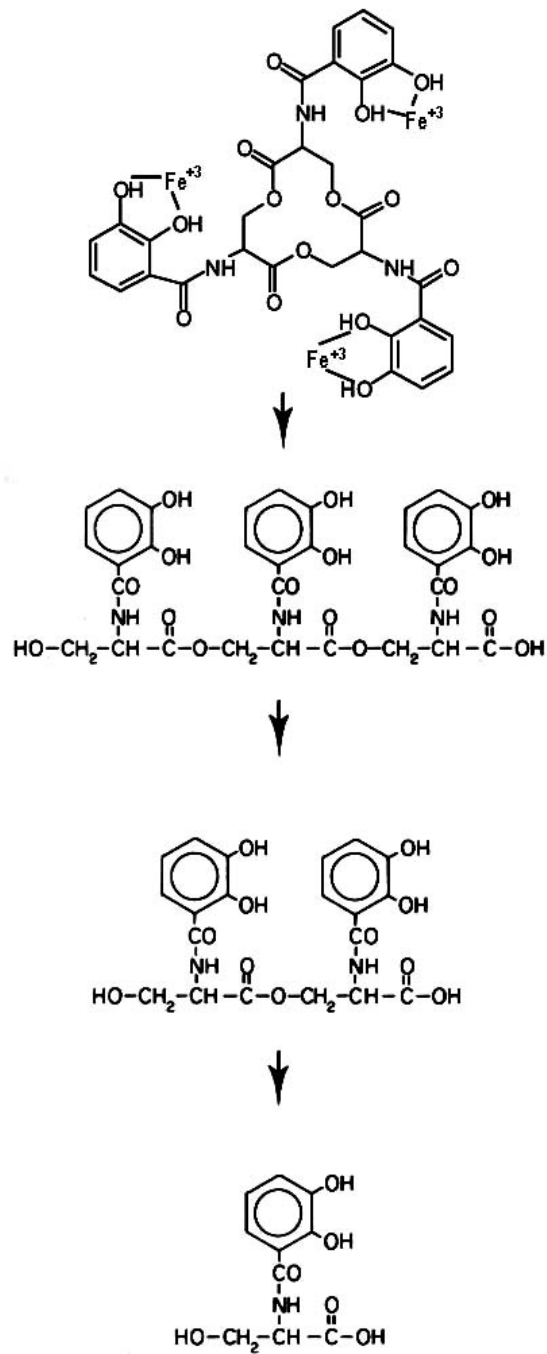


Figura 17. Hidrólisis de la enterobactina. Los enlaces del triéster cíclico de la enterobactina-Fe⁺³ son hidrolizados por una esterasa produciendo 2,3-dihidroxibenzoilserina.

Aunque algunas bacterias producen exclusivamente un sideróforo, otras secretan varios tipos. Algunas cepas de *E. coli* producen enterobactina y aerobactina, lo cual les permite competir más exitosamente por el hierro en el hospedero, ya que la enterobactina es inactivada por la unión de albúmina sérica, mientras que la aerobactina no.

La enterobactina y la aerobactina son producidas por miembros de la familia Enterobacteriaceae: *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y *Klebsiella*.

Reducción del Fe^{+3} y transporte de Fe^{+2}

Muchas bacterias secretan reductasas capaces de reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2} (Cowart RE, 2002; Adams TJ, Vartivarian S & Cowart RE, 1990; Johnson W, Varner L & Poch M, 1991) y son capaces de transportar al hierro ferroso mediante un sistema denominado Feo, distinto del mediado por sideróforos. Este sistema está codificado por los genes *feoABC*, los cuales forman un operón (Figura 18), son inducidos por anaerobiosis y reprimidos por hierro. Los genes *feoABC* se describieron inicialmente en *E. coli* (Hantke K, 1987) y están conservados en muchas otras bacterias, aunque en algunas sólo se encuentra *feoB* (Hantke K, 2003). El gen *feoB* codifica para una proteína de 773 aminoácidos (FeoB) que se encuentra unida a la membrana citoplásmica, posee actividad de GTPasa y contiene un sitio de unión para Fe^{+2} (Marlovits TC, 2002).

El gen *feoA* codifica a la proteína FeoA, de 75 aminoácidos, y el gen *feoC* (anotado en el genoma de *E. coli* K12 como *yhgG*) codifica para una proteína de 78 aminoácidos: FeoC.

El sistema Feo es importante para el transporte de hierro (incluso en bacterias incapaces de reducir el Fe^{+3} a Fe^{+2}) cuando hay poco oxígeno, condición en la que el Fe^{+2} permanece estable y predomina sobre el Fe^{+3} . Las mutantes *feoB* de *E. coli* y *Salmonella* tienen disminuida su capacidad para colonizar el intestino de los ratones probablemente debido a su deficiencia para transportar Fe^{+2} en el ambiente anaeróbico del intestino (Stojiljkovic I, Cobeljic M & Hantke K, 1993; Tsolis RM, 1996). FeoB también se requiere para que *Helicobacter pylori* colonice la mucosa gástrica del ratón (Velayudhan J, 2000) y para que *Legionella*

pneumophila sea capaz de crecer en células en cultivo (Robey M & Cianciotto NP, 2002).

La captación de Fe^{+2} está sujeta a represión por hierro y está des-reprimida en una mutante *fur*. La región río arriba del promotor del operón *feoABC* posee un sitio de unión de Fur (ver más adelante) al que se ha demostrado que se une la proteína Fur in vivo. Esta región promotora posee también un sitio de unión de Fnr (Figura 18). La proteína Fnr activa la transcripción de genes requeridos para el crecimiento óptimo en anaerobiosis. Se ha demostrado que la expresión de β -galactosidasa a partir de una fusión *feo-lacZ* es menor en una mutante *fnr* que en la cepa silvestre. De modo que la activación del operón *feo* por Fnr podría servir para acoplar la captación de Fe^{+2} con el crecimiento en anaerobiosis, condición en la que predomina el hierro ferroso. (Hantke K, 2004).

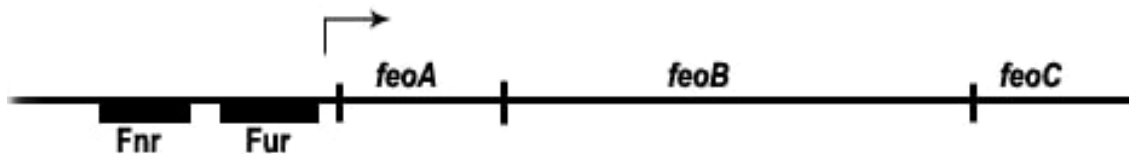


Figura 18. El operón *feo* de *E. coli* K-12. La flecha indica el sentido de la transcripción. **Fnr**= sitio de unión de la proteína Fnr. **Fur**=sitio de unión de la proteína Fur (Fur-box).

Lactoferrina y transferrina como fuentes de hierro

Existen otros sistemas de captación de hierro, además de la producción de sideróforos y del sistema Feo. Algunas bacterias patógenas, por ejemplo *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Bartonella quintana*, *Shigella*, *E. coli*,...poseen receptores en su superficie externa que les permiten unir transferrina o lactoferrina y utilizarlas como fuente de hierro (Blanton KJ, 1990; Gray-Owen SD & Schryvers AB, 1996; Ekins A, 2004).

Hemo como fuente de hierro para las bacterias

Algunas bacterias patógenas son capaces de utilizar el hierro del grupo hemo del hospedero ya sea secretando una proteína especial que une al hemo (hemóforo) o mediante receptores específicos para hemo, hemoglobina o hemopexina, los cuales extraen el hierro y lo transportan a través de la membrana externa (Hantke K, 2003; Carrol JA, 2000; Stugard CE, Daskaleros PA & Payne SM, 1989).

En *Haemophilus influenzae* se ha descrito un hemóforo formado por la proteína HxuA la cual es secretada por una vía dependiente de péptido señal. HxuA adquiere el hierro de la hemopexina y lo presenta a HxuC, un receptor específico de la membrana externa.

Otro sistema de captación de hemo se ha descrito en varias bacterias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens* y *Yersinia pestis*. Estos hemóforos llamados HasA (por **h**eme **a**cquisition **s**ystem), constituyen una nueva familia de proteínas que carecen de péptido señal y son secretadas al exterior de la célula por transportadores ABC. Una vez en el medio HasA capturan al hemo libre o lo extraen de la hemoglobina y lo presentan a receptores específicos de la membrana externa. Estos receptores son esenciales para la captación de hemo, en tanto que el hemóforo no, aunque el papel de este último es estimular el proceso y reducir la concentración mínima de hemo o hemoglobina necesaria para el crecimiento de la bacteria (Debarbieux L & Wandersman C, 2004).

Algunas otras bacterias producen exotoxinas que actúan como hemolisinas, capaces de lisar a eritrocitos por medio de la formación de poros al insertarse en

regiones hidrofóbicas de la membrana de la célula; la hemoglobina liberada es la fuente de hierro. Las Rtx (repeats in toxin) son una clase importante de hemolisinas que forman poros; éstas son producidas por bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Moraxella bovis*, ... (Welch RA, 1995).

CONTROL DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA POR HIERRO

Homeostasis del hierro en las bacterias

Debido a que el hierro es indispensable para el crecimiento bacteriano al mismo tiempo que tóxico por la formación de especies reactivas de oxígeno, las bacterias deben asegurar su disponibilidad para los procesos celulares en los que interviene el metal y mantener un balance cuidadoso de los niveles de hierro intracelular.

Las bacterias regulan el metabolismo del hierro en respuesta a la disponibilidad de este metal. En muchas bacterias Gram negativas esta regulación está mediada por la proteína Fur (ferric uptake regulator) que controla la expresión de más de 90 genes en *E. coli* (Hantke K, 2001). La proteína Fur es un represor transcripcional que utiliza Fe^{+2} como corepresor. Cuando se incrementan los niveles intracelulares de Fe^{+2} , éste se une a Fur y el complejo Fur- Fe^{+2} reprime la transcripción de los genes responsables de la captación de hierro. El complejo Fe^{+2} -Fur reprime la transcripción al unirse a una secuencia de 19 pb, denominada "Fur box" (Fig. 19) que se localiza río arriba de la caja Pribnow de los promotores sujetos a represión por Fur. La unión de Fe^{+2} -Fur impide que se una la RNA polimerasa al promotor y con ello se evita la transcripción (Figura 20).

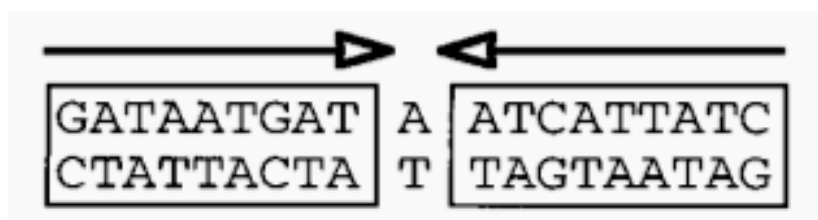


Figura 19. Secuencia de nucleótidos de la caja Fur.

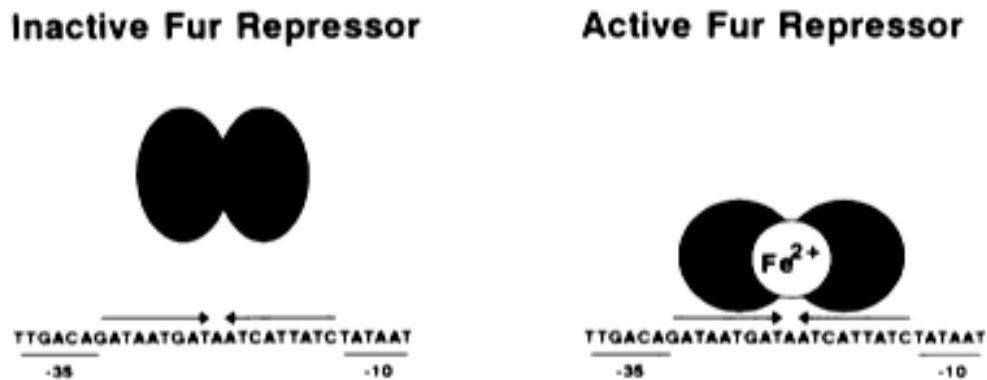


Figura 20. Representación esquemática de la regulación transcripcional mediada por Fur. La proteína Fur utiliza Fe como corepresor; el complejo Fur-Fe se une a la “Fur box” , lo cual impide la unión de la RNA polimerasa al promotor (Litwin CM, Calderwood SB, 1993).

Cuando *E. coli* se encuentra en un medio con hierro en exceso además de reprimir la transcripción de los genes de captación de hierro, almacena el metal en las proteínas FtnA (ferritina) y Bfr (bacterioferritina). FtnA almacena aproximadamente 50% del hierro celular durante el crecimiento post-exponencial en medio rico en hierro y constituye una fuente del metal que compensa parcialmente la deficiencia de hierro durante el crecimiento de la bacteria en condiciones de baja disponibilidad de hierro (Abdhul-Therani H et al., 1999).

Se había descrito que Fur podía actuar como regulador positivo de la transcripción de varios genes: *acnA* (aconitasa), *fumA* (fumarasa) *ftnA* (ferritina), *bfr* (bacterioferritina) y *sodB* (superóxido dismutasa) (Hantke K, 2001). La aconitasa y la fumarasa son enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos que unen hierro; la ferritina y la bacterioferritina almacenan hierro, y la superóxido dismutasa une hierro. Posteriormente se demostró que la supuesta activación transcripcional de estos genes mediada por Fur se debe a que Fur-Fe⁺² reprime la transcripción de

RyhB, un RNA pequeño (90 nucleótidos) que promueve la degradación de los RNA mensajeros de *fumA*, *ftnA*, *bfr* y *sodB* (Massé E y Gottesman S, 2002). RyhB recluta a la RNAasaE y facilita la degradación de los RNAs mensajeros (Massé et al., 2003).

De manera que cuando se alcanzan niveles intracelulares de Fe^{+2} altos en *E. coli*, se reprime la transcripción de los genes de captación de hierro y se incrementan los niveles de las proteínas que lo almacenan (FtnA, Bfr) y de las proteínas que utilizan al metal (superóxido dismutasa, fumarasa, aconitasa).

En presencia de peróxido de hidrógeno, los niveles altos de Fe^{+2} son peligrosos para la bacteria. Para contender con este riesgo, el regulador transcripcional OxyR se activa y promueve la transcripción de *fur*; Fur provoca la disminución de hierro libre (Figura 21). La activación de la proteína reguladora OxyR por peróxido se debe a la formación de dos puentes disulfuro en las cisteínas C199 y C208; de este modo en su forma reducida (SH) OxyR es inactivo, mientras que oxidado (S-S) activa la transcripción (Zheng M, Storz G. 2000).

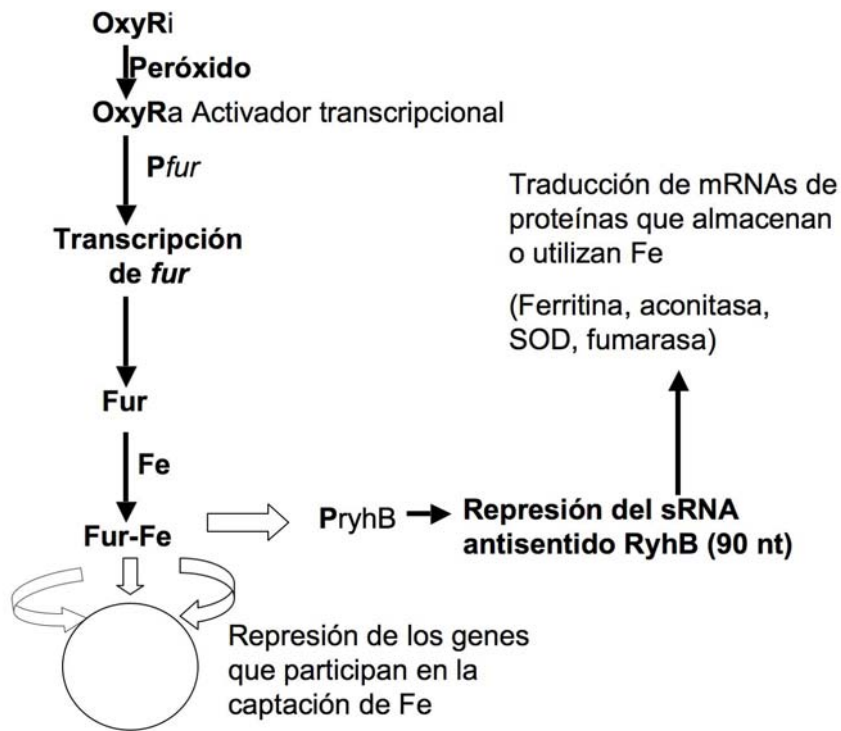


Figura 21. La presencia de peróxido más hierro es peligrosa para la bacteria. El mecanismo para lidiar con este peligro es: el peróxido provoca la activación de la proteína regulatoria OxyR, la cual activa la transcripción de *fur*. Fur se compleja con Fe⁺². El complejo Fur-Fe⁺² reprime la transcripción de los genes que participan en la captación de hierro. El complejo Fur-Fe⁺² reprime la transcripción del gen *ryhB*. La disminución en los niveles del RNA RyhB favorece la traducción de mRNAs de proteínas que almacenan o utilizan hierro. P_{fur}= promotor de *fur*. P_{ryhB}= promotor de *ryhB*.

Determinantes de virulencia regulados por hierro

Además de regular la expresión de los genes para captación y almacenamiento de hierro, la concentración de este metal participa en el control de la expresión de genes que codifican factores de virulencia. Para concluir esta revisión, incluimos en la siguiente tabla los ejemplos mejor estudiados (Tabla 4).

Tabla 4. Factores de virulencia bacteriana cuya expresión depende del hierro.

BACTERIA	FACTOR DE VIRULENCIA	COMENTARIOS
<i>Escherichia coli</i>	Aerobactina SLT-I α -Hemolisina	<p>El operón de aerobactina del plásmido de virulencia pColV-K30 de <i>E. coli</i> (Waters y Crosa, 1991) está constituido por 4 genes para la biosíntesis del sideróforo y otro para su transporte. La transcripción del operón para aerobactina está regulada transcripcionalmente por Fur-Fe (Neilands JB 1992). El gen estructural para la toxina SLT-I (Shiga-like toxin) se localiza en un profago lambdaoide (Allison, 2007). SLT-I es multimérica, con dos subunidades A centrales unidas por un puente disulfuro y cinco subunidades B idénticas que median la unión de la holotoxina a su receptor específico, el glicolípido Gb3 presente en la superficie de las células. Una de las subunidades A posee actividad de N-glicosilasa: elimina una adenina del rRNA 28S, de la subunidad ribosomal 60S, con lo que inhibe la síntesis de proteínas de las células, epiteliales del intestino y de las endoteliales del riñón, provocando su muerte posterior (O'Brien y Holmes, 1996). Las cepas de <i>E. coli</i> productoras de SLT causan colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico.</p> <p>La transcripción de SLT-I está regulada negativamente por Fur-Fe (Calderwood y Mekalanos, 1987).</p> <p>La α-hemolisina de <i>E. coli</i> es una exotoxina que lisa glóbulos rojos y es letal para ratones; su transcripción está regulada por hierro (Cavalieri et al, 1984).</p>
<i>Shigella dysenteriae</i>	Toxina Shiga	<p>El operón para la toxina shiga (<i>stx</i>) está formado por los genes que codifican las subunidades A y B, los cuales se transcriben como un RNAm bicistrónico a partir de un promotor regulado por hierro localizado río arriba del gen <i>stxA</i> (Habib y Jackson, 1992). La holotoxina tiene la estequiometría 1A:5B</p>

<i>Serratia marcescens</i>	Hemolisina	La hemolisina de <i>S. marcescens</i> (ShIA) es una toxina formadora de poros que lisa eritrocitos y células eucariontes nucleadas. La transcripción de la hemolisina está bajo el control de un promotor Fur-like y su síntesis solo ocurre en condiciones de bajo hierro (Hertle R. 2005).
<i>Vibrio anguillarum</i>	Anguibactina	<i>V. anguillarum</i> es patógeno de peces; produce septicemia hemorrágica fatal en Salmónidos. Las cepas virulentas poseen el plásmido de virulencia pJM1; este plásmido posee genes que codifican para la síntesis del sideróforo anguibactina, así como para el transporte del complejo Fe-anguibactina, incluido el receptor membranal. La expresión de la anguibactina está controlada por hierro. Los genes para la biosíntesis de anguibactina, pero no los que participan en su transporte, también están presentes en el cromosoma de <i>V. anguillarum</i> . (López CS, Crosa JH, 2007).
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	TBP1 TBP2	TBP1 y TBP2 son receptores para transferrina (Transferrin-binding protein). Las mutantes de <i>N. gonorrhoeae</i> carentes de una de estas proteínas son menos virulentas (Genco et al., 1991).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Exotoxina A Elastasa Proteasa alcalina	La exotoxina A, codificada por el gen <i>toxA</i> , inhibe la síntesis de proteínas del hospedero por ADP-ribosilación del factor de elongación 2 EF-2, lo que causa la muerte celular (Iglewski et al., 1977); su síntesis es reprimida por Fur-Fe (Prince et al., 1993) vía la represión de la transcripción del factor sigma alternativo PvdS, que se requiere para transcribir al gen <i>toxA</i> (Ochsner et al., 1996). La elastasa. Codificada por <i>lasB</i> , es una metaloproteasa que hidroliza varios sustratos, entre ellos elastina e IgG (Doring et al., 1981) e inactiva componentes del complemento (Schultz y Miller, 1974). Para una revisión aún actual sobre el papel del hierro en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> , favor de leer Vasil y Ochsner, 1999.
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Toxina diftérica	Esta toxina está codificada por el gen <i>tox</i> , presente en algunos corinebacteriófagos lisogénicos; inhibe la síntesis de proteínas del hospedero por ADP-ribosilación de EF-2. La transcripción de <i>tox</i> es reprimida por hierro (Tai et al., 1990).

Bibliografía

1. Abdhul-Therani H, Hudson AJ, Chang YS, Timms AR, Hawkins C, Williams JM, Harison PM, Guest JR, Andrews SC, 1999. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J Bacteriol* 181:1415-1428
2. Adams TJ, Vartivarian S & Cowart RE, 1990. Iron acquisition systems of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 58:2715-2718
3. Aisen P, 1998. Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. pp. 585–6318. En: Sigel A, Sigel H, eds. 1999. *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 35, Iron Transport and Storage in Microorganisms, Plants, and Animals*. New York: Marcel Dekker. 775 pp.
4. Aisen P, Wessling-Resnick M & Leibold EA, 1999. Iron metabolism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:200-206
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Garland Science
6. Alderton G, Ward WH & Fevold HL. 1946. Identification of the bacteria-inhibiting iron-binding protein of egg white as conalbumina. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 11:9-13.
7. Allison HE. 2007. Stx-phages: drivers and mediators of the evolution of STEC and STEC-like pathogens. *Future Microbiol.* 2:165-174.
8. Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ & Frazer DM, 2007. Regulation of systemic iron homeostasis: How the body responds to changes in iron demand. *Biometals* 20:665-674

9. Andrews N, 2000. Iron homeostasis: Insights from genetics and animal models. *Nature Rev Genet* 1:208-217
10. Andrews SC, Robinson AK & Rodríguez-Quiñones F, 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215-237
11. Archibald F, 1983. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol. Lett.* 19:29-32
12. Bergeron RJ, 1986. Iron: a controlling nutrient in proliferative processes. *Trends Biochem. Sci.* 11, 133–136.
13. Bezkorovainy A, 1987. Iron proteins. En: Bullen JJ, Griffiths E, eds. 1987. *Iron and Infection: Molecular, Physiological and Clinical Aspects*. Chichester, UK: John Wiley & Sons. Pp 27-67, 325.
14. Blanton KJ, Biswas GD, Tsai J, Adams J, Dyer DW, Davis SM, Koch GG, Sen PK, Sparling PF, 1990. Genetic evidence that *Neisseria gonorrhoeae* produces specific receptors for transferrin and lactoferrin. *J. Bacteriol.* 172:5225–5235
15. Braun V, 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:295-305
16. Bullen JJ, Rogers HJ & Griffiths E, 1978. Role of iron in bacterial infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 80:1-35
17. Bullen JJ, Rogers HJ & Griffiths E, 1978. Role of iron in bacterial infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 80:1-35.
18. Byers BR & Arceneaux JEL, 1998, citados en Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F, 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215-237.

19. Calderwood SB, Mekalanos JJ. 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J. Bacteriol.* 169:4759-4764.
20. Carrol JA, Coleman SA, Smitherman LS, Minnick MF, 2000. Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infect. Immun.* 68:6750-6757.
21. Cavalieri SJ, Bohach GA, Zinder IS. 1984. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 48: 326–343.
22. Chasteen ND, 1998. Ferritin, uptake, storage, and release of iron. pp. 479–541. En Sigel A, Sigel H, eds. 1999. *Metal Ions in Biological Systems, Vol. 35, Iron Transport and Storage in Microorganisms, Plants, and Animals*. New York: Marcel Dekker. 775 pp
23. Chipperfield JR & Ratledge C, 2000. Salicylate is not a bacterial siderophore: A theoretical study. *Biometals* 13: 165-168
24. Cowart RE, 2002. Reduction of iron by extracellular iron reductases: implications for microbial iron acquisition. *Arch. Biochem. Biophys.* 400: 273-281
25. Debarbieux L & Wandersman C, 2004. Hemophore-dependent heme acquisition systems. En: Crosa J, Mey A, Payne S. (eds) *Iron transport in bacteria*. ASM Press. pp. 38-47.
26. Doring G, Obernesser HJ, Botzenhart K. 1981. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. II. Effect of two protease on human human immunoglobulins IgG, IgA and secretory IgA. *Zentrabl. Bacteriol. A* 249:89-98.
27. Dhople AM, Ibañez MA & Poirier TC, 1996. Role of iron in the pathogenesis of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Microbios Lett.* 87:77–87

28. Ekins A, Khan AG, Shouldice SR, Schryvers AB, 2004. Lactoferrin receptors in gram-negative bacteria: insights into the iron acquisition process. *Biometals* 17:235-243
29. Forbes JR & Gros P, 2001. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host- pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 9: 397–403
30. Fuchs G, 1999. Assimilation of macroelements and microelements. En: Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG (eds) *Biology of the prokaryotes*. Blackwell Science.
31. Genco CA, Chen CY, Arko RJ, Kapeczynski DR, Morse SA. 1991. Isolation and characterization of a mutant of *Nesisseria gonorrhoeae* that is defective in the uptake of iron from transferrin and haemoglobin and is avirulent in mouse subcutaneous chambers. *J. Gen. Microbiol.* 137:1313-1321.
32. Gobin J & Horwitz MA, 1996. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *J. Exp. Med.* 183:1527–32
33. Goldberg, MB, DiRita VJ, Calderwood SB, 1990. Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using *TnphoA* mutagenesis. *Infect. Immun.* 58:55-60.
34. Gray-Owen SD & Schryvers AB, 1996 Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* 4, 185–191
35. Griffiths E, 1987. Iron in biological systems. pp. 1-25. En: Bullen JJ, Griffiths E, eds. 1987. *Iron and Infection: Molecular, Physiological and Clinical Aspects*. Chichester, UK: John Wiley & Sons. 325 pp.

36. Griffiths E., 1999. Iron in biological systems pp. 1-26, En: Bullen JJ, Griffiths E, eds. 1999. Iron and Infection: Molecular, Physiological and Clinical Aspects. Chichester, UK: JohnWiley & Sons. 515 pp. 2nd de
37. Gunshin H, Allerson CR, Polycarpou-Schwarz M, Rofts A, Rogers JT, Kishi F, Hentze MW, Rouault TA, Andrews NC, Hediger MA, 2001. Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. FEBS Letters 509: 309–316
38. Gunshin H, Starr CN, Drenzo C, Fleming MD, Jin J, Greer EL, Sellers VM, Galica SM, Andrews NC, 2005. Cybrd1 (duodenal Cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. Blood 106, 2879–2883.
39. Habib NF, Jackson MP. 1992. Identification of a B Subunit Gene Promoter in the Shiga Toxin Operon of *Shigella dysenteriae* 1. J. Bacteriol. 174: 6498-6507.
40. Hantke K, 1987. Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K-12. FEMS Microbiol. Lett. 44, 53–57
41. Hantke K, 2001. Iron and metal regulation in bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 4, 172-177
42. Hantke K, 2003. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? Trends Microbiol. 11:192-195
43. Hantke K, 2004. Ferrous iron transport. En Crosa, JH, Mey AR, Payne SM. Iron transport in bacteria. ASM Press, Washington DC.
44. Hertle R. 2005. The family of *Serratia* pore forming toxins. Curr. Prot. Pept. Sci. 6:613-625.

45. Hubert N & Hentze MW, 2002. Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **99**:12345–12350
46. Iglewski BH, Liu PV, Kabat D. 1977. Mechanism of action of Pseudomonas exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 in vitro and in vivo. Infect. Immun. 15:138-144
47. Johnson W, Varner L & Poch M, 1991. Acquisition of iron by *Legionella pneumophila*: Role of iron reductase. Infect. Immun. 59:2376-2381
48. Lane N, 2002. Oxygen, the molecule that made the world. Oxford University Press, Oxford.
49. Litwin CM, Calderwood SB, 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. Clin. Microbiol. Rev. 6:137-149.
50. López CS, Crosa JH. Characterization of ferric-anguibactin transport in *Vibrio anguillarum*. Biometals 20:393-403.
51. Marlovits TC, Haase W, Herrmann C, Aller SG, Unger VM, 2002. The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16243-16248
52. Massé E, Gottesman S, 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:4620-4625
53. Massé E, Escorcía FE, Gottesman S, 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its targets in *Escherichia coli*. Genes Dev 17:2374-2383.
54. Neilands JB. 1992. Mechanism and regulation of synthesis of aerobactin in *Escherichia coli* K12 (pColV-K30). Can. J. Microbiol. 38:728-733

55. Neilands JB, 1995. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270:26723-26726.
56. O'Brien AD, Holmes RK. 1996. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*, pp. 2788–2802. In: Neidhardt FC; Curtiss III R; Ingraham JL; Lin ECC; Low KB; Magasanik B; Reznikoff WS; Riley M; Schaechter M; Umberger HE (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
57. Ochsner UA, Johnson Z, Lamont IL, Cunliffe HE, Vasil ML. 1996. Exotoxin A production in *Pseudomonas aeruginosa* requires the iron-regulated *pvdS* gene encoding an alternative sigma factor. *Mol. Microbiol.* 21:1019-1028.
58. Pantopoulos K, 2004. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system. An update. *Ann NY Acad Sci* 1012:1-13.
59. Prince RW, Cox CD, Vasil ML. 1993. Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: Molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J. Bacteriol.* 175:2589-2598.
60. Robey M & Cianciotto NP, 2002. *Legionella pneumophila feoAB* promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect. Immun.* 70:5659-5669
61. Rouault TA, 2005. Linking physiological functions of iron. *Nature Chemical Biology* 1:193-194
62. Schade AL & Caroline L. 1944. Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 100:14-15; Schade AL & Caroline L. 1946. An iron binding protein in human plasma. *Science* 104:340-341.

63. Schultz DR, Miller KD. 1974. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect. Immun.* 10:128-135.
64. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT, 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122, 789–801
65. Stojiljkovic I, Cobeljic M & Hantke K, 1993. *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* 108:111-115
66. Stugard CE, Daskaleros PA & Payne SM, 1989. A 101-Kilodalton Heme-binding protein associated with Congo Red binding and virulence of *Shigella flexneri* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 57:3534-3539
67. Tai SP, Kram AE, Nootheti P, Holmes RK, 1990. Coordinate regulation of siderophore and diphtheria toxin production by iron in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microb. Pathog.* 9:267-273.
68. Tsolis RM, Baumler AJ, Heffron F, Stojiljkovic I, 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect. Immun.* 64:4549-4556.
69. Vasil ML, Ochsner UA, 1999. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.* 34:399-413.

70. Velayudhan J, Hughes NJ, McColm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, Kelly DJ, 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* 37: 274-286
71. Wandersman C & Depelaire P, 2004. Bacterial iron sources : From siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:611-647.
72. Waters VL, Crosa JH. 1991. Coicin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.* 55:437-50.
73. Welch RA, 1995. Phylogenetic analyses of the RTX toxin family. En: Roth, JA, Bolin CA, Brogden KA, Minion FC, Wannemuehler MJ (eds) *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 2nd ed. ASM Press, pp. 195-206
74. Wikipedia.
75. Zheng M, Storz G, 2000. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem. Pharmacol.* 59:1-6