

Sistemas de adquisición de hierro en *Salmonella enterica*

María Elisa Drago-Serrano

Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, CP 04960, México, D.F., México

RESUMEN

Objetivo. Exponer los sistemas de adquisición de hierro descritos actualmente en *Salmonella enterica* cuyos componentes, en ciertos casos, están implicados en el crecimiento, sobrevivencia y virulencia bacteriana.

Resultados. El hierro en forma de ión férrico (Fe^{3+}) o ferroso (Fe^{2+}) tiene un papel esencial como cofactor de enzimas involucradas en reacciones de óxido-reducción, vitales para bacterias enteropatógenas como *Salmonella enterica*. En fluidos biológicos, el hierro libre en forma iónica es tóxico; por ello, es secuestrado por transferrinas que disminuyen su disponibilidad para los requerimientos nutricionales de *Salmonella enterica*. Bajo condiciones restrictivas de hierro, *Salmonella enterica* secreta sideróforos endógenos o utiliza sideróforos exógenos para captar e incorporar Fe^{3+} . Al formarse, los complejos ferrisideróforos se unen a receptores proteicos de la membrana bacteriana externa, para ser transportados al espacio periplásmico por el complejo transperiplásmico Ton, y después al citoplasma, por permeasas ABC de membrana citoplásmica. *Salmonella enterica* cuenta con otras permeasas de membrana interna para obtener cationes metálicos divalentes en una ruta sideróforo independiente; estas permeasas incluyen al transportador tipo ABC Feo para importar Fe^{2+} y a las permeasas de tipo ABC y Nramp1, SitABCD y MntH respectivamente, que actúan primariamente como transportadores de cationes manganeso (Mn^{2+}) y en forma secundaria transportan Fe^{2+} .

Conclusión. Un mejor entendimiento de los sistemas de adquisición de hierro en *Salmonella enterica* podría sentar las bases para el desarrollo de antibióticos, vacunas y métodos de aislamiento, destinados para propósitos terapéuticos, profilácticos y diagnósticos.

Palabras clave: sideróforos, transportadores bacterianos de cationes divalentes, crecimiento bacteriano, *Salmonella enterica*

ABSTRACT

Iron Acquisition Systems in *Salmonella enterica*

Objective. The components for the iron-acquisition systems currently described in *Salmonella enterica* in some cases are involved in growth, survival and bacterial virulence.

Results. Iron as ferric ion (Fe^{3+}) or ferrous (Fe^{2+}) has an essential role as a cofactor for enzymes involved in oxidation-reduction reactions, which are crucial for enteropathogenic bacteria such as *Salmonella enterica*. In biological fluids, free iron is toxic in its ionic form; therefore, it is sequestered by transferrins that reduce the availability for nutritional requirements of *Salmonella enterica*. Under iron-limiting conditions, *Salmonella enterica* produces endogenous siderophores or uses exogenous siderophores to uptake Fe^{3+} . After being formed, the ferrisiderophore complexes bind to the receptor proteins on the bacterial outer membrane to be then transported to the periplasmic space by the

Solicitud de sobretiros: María Elisa Drago Serrano, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, CP 04960, México, D.F., México. E-mail: mdrago@correo.xoc.uam.mx, dragome@yahoo.com

Recibido: el 9 de febrero de 2009. **Aceptado para publicación:** el 18 de mayo de 2009

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb092016.pdf>

Drago-Serrano

transperiplasmic complex Ton and then to the cytoplasm by ABC type inner membrane permeases. *Salmonella enterica* has other inner membrane permeases to capture divalent metal cations in a siderophore independent pathway, these include the ABC type transporter Feo to acquire Fe^{2+} and the ABC type and Nramp1 like permeases SitABCD and MntH which act primarily as transporters of manganese cations (Mn^{2+}) but transport Fe^{2+} as a secondary effect.

Conclusion. A better understanding of iron uptake systems in *Salmonella enterica* could help for the development of antibiotics, vaccines and methods of isolation intended for therapeutic purposes, prophylactics and diagnostics.

Key words: siderophores, bacterial transporters of divalent cations, bacterial growth, *Salmonella enterica*

INTRODUCCIÓN

Para una amplia variedad de organismos, el hierro es un elemento esencial como cofactor de enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción, implicadas en la respiración y en la biosíntesis de macromoléculas como ADN. En mamíferos, las condiciones fisiológicas de pH y oxígeno influyen en los niveles de hierro disponible para las funciones requeridas. En presencia de oxígeno y a pH 7.4, la solubilidad del hierro en medio acuoso es baja pues predomina como ión férrico [Fe^{3+}], el cual tiende a formar sales insolubles; en condiciones anaerobias y pH ácido, el hierro predomina como ión ferroso [Fe^{2+}] altamente soluble. Aunque en fluidos biológicos la concentración de iones libres $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ es baja, resultan en extremo tóxicos pues favorecen la generación de especies reactivas de oxígeno altamente nocivas por sus efectos oxidativos sobre macromoléculas (1). Para reducir su toxicidad, los mamíferos captan el Fe^{3+} libre por medio de proteínas como la transferrina sérica, la lactoferrina (1) y la ferritina (2). Al captar el hierro, dichas proteínas restringen la disponibilidad para bacterias sean o no patógenas, las cuales

lo requieren para su crecimiento y proliferación (3). En diversas bacterias enteropatógenas como *Salmonella enterica*, la expresión de componentes moleculares que participan en mecanismos de adquisición de hierro en condiciones restrictivas de disponibilidad está asociada con su virulencia (4). En *Salmonella enterica*, la captura de Fe^{3+} se basa en la producción de sideróforos como la enterobactina (5) (descrita en *Escherichia coli* como “enteroquelina”) y salmoquelinas (6); *Salmonella enterica* puede captar Fe^{3+} de sideróforos exógenos como ferricromo (7), ferrioxaminas y coprógeno (8) producidos por otros microorganismos. Adicionalmente, *Salmonella enterica* cuenta con otros sistemas no dependientes de sideróforos como la permeasa de tipo ABC Feo (9), implicada en la adquisición de Fe^{2+} , y los transportadores de cationes manganeso (Mn^{2+}) de tipo Nramp1 y de tipo ABC, MntH (9) y SitABCD (10), respectivamente, que además transportan Fe^{2+} . El estudio de la adquisición de hierro, entendida como el proceso activo de su captura e incorporación, resulta de especial interés, debido a que sus efectos sobre la sobrevivencia y crecimiento de *Salmonella enterica* conllevan al daño tisular en el hospedero. El presente trabajo tiene como objetivo exponer los sistemas de adquisición de hierro cuyos componentes moleculares, en ciertos casos, han sido asociados con el crecimiento, sobrevivencia y virulencia de *Salmonella enterica*.

Mecanismo básico de adquisición de hierro mediado por sideróforos

A la fecha, el sistema de captura de hierro del sideróforo enterobactina (Ent) descrito en *Escherichia coli* es el mejor caracterizado (3); por ello, ha sido considerado como modelo de referencia para otras bacterias Gram negativas, incluida *Salmonella enterica* (4). El mecanismo básico consiste en que, tras ser secretada por la bacteria, la Ent capta el Fe^{3+} asociado a ferriproteínas del hospedero. El complejo ferri-Ent formado interacciona con su receptor FepA, expresado en la membrana bacteriana externa, para ser transportado contra gra-

Captura de hierro en *Salmonella enterica*

diente de concentración al espacio periplásmico. Este transporte activo de ferri-Ent hacia el espacio periplásmico está mediado por el complejo Ton, formado por las proteínas integrales de membrana citoplásmica TonB, ExbB y ExbD (11). TonB es una proteína trans-periplásmica anclada a la membrana celular interna, que provee la energía requerida para el transporte activo del ferrisideróforo. Esta energía deriva de la fuerza motriz de protones [H⁺] producida por la interacción del extremo carboxilo de TonB con una región del extremo amino del receptor del sideróforo. En el espacio periplásmico, el complejo ferri-Ent interacciona con proteínas periplásmicas como FepB (12). Esta última actúa como “chaperona” del complejo ferri-Ent, para favorecer su unión con proteínas integrales de membrana citoplásmica con actividad de permeasa de tipo ABC. Los transportadores ABC, como por ejemplo FepCDG, están involucrados en el transporte activo del complejo ferri-Ent al citosol a expensas de la hidrólisis de ATP. Al ser transportado al citosol, el complejo ferri-Ent es degradado por la enzima con actividad de esterasa Fes. Tras degradar al sideróforo, la esterasa Fes producida por *Escherichia coli* libera el Fe³⁺ en forma de Fe²⁺ (13).

La expresión de sideróforos, de receptores de sideróforos y de proteínas de transporte está regulada a nivel transcripcional por la proteína de 17 kDa Fur (Ferric uptake regulator) (14). Cuando los niveles de hierro son altos, Fur junto con el co-represor Fe²⁺, forman un complejo que interacciona con promotores, para reprimir la transcripción de genes que codifican componentes de adquisición de hierro mediado por sideróforos. En condiciones limitantes de hierro, no se forma el complejo Fur-Fe²⁺ que bloquea a los promotores y, por ende, se favorece la expresión génica (14). Las mutaciones en el gen *fur* que causaron la expresión constitutiva de componentes involucrados en la captura de hierro vía sideróforos, en presencia de altas concentraciones de este elemento, fueron descritas por vez primera en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (15).

Adquisición de hierro vía sideróforos en *Salmonella enterica*

A diferencia de otras bacterias patógenas Gram negativas, que captan hierro de hemoproteínas mediante proteínas de secreción conocidas como hemóforos (16), *Salmonella enterica* adquiere hierro de ferriproteínas como la transferrina mediante la secreción de sideróforos (17-18). *Salmonella enterica* posee genes homólogos a los descritos en *Escherichia coli* que codifican componentes implicados en la adquisición de hierro vía sideróforos (19-20), los cuales están bajo el control de Fur (19). En *Salmonella enterica*, el hallazgo de los componentes de sistemas de captura e incorporación de hierro mediados por sideróforos se ha basado, en ciertos casos, en la secuenciación génica (19-20); por ello, en el presente trabajo se hace referencia a los genes más que a sus productos proteicos de expresión. En el **Cuadro 1** se señalan los genes y productos de expresión de algunos componentes de sistemas de captura de Fe³⁺ mediados por sideróforos.

Aunque *Salmonella enterica* puede utilizar como sideróforos alfa-cetoácidos y alfa hidroxiaácidos (21-22) e incluso fenolatos (23), los sistemas de captura de Fe³⁺ por sideróforos de tipo catecolato e hidroximato (**Figura 1**) descritos a continuación han sido los mejor caracterizados.

a) Componentes implicados en la adquisición de Fe³⁺ mediado por catecolatos

Al igual que otras enterobacterias, *Salmonella enterica* produce Ent, un sideróforo primario de tipo catecolato (5) cuyo precursor, el ácido 2,3 dihidroxibenzoico (DHBA), actúa también como sideróforo. La Ent es un trímero cíclico de N-(2,3-dihidroxibenzoil)-L-serina (DHBS) sintetizado por enzimas codificadas en el locus *ent* cromosomal (19-20, 24) (**Cuadro 1**). La Ent es precursora de productos lineales de rompimiento con afinidad por Fe³⁺ en forma de monómeros (DHBS1), dímeros (DHBS2) (25-26) y trímeros

Cuadro 1

(A) Algunos genes y productos de expresión descritos en *Salmonella enterica* de componentes que forman parte de sistemas de adquisición de Fe^{3+} mediados por sideróforos de tipo catecolato (enterobactina, salmoquelinas) o hidroximatos (ferricromo, ferrioxamina y coprógeno)

(B) Genes de transportadores metálicos de cationes divalentes (Mn^{2+} , Fe^{2+}) descritos en *Salmonella enterica*

(A) Componentes de transporte de Fe^{3+} mediado por sideróforos		
	Productos de expresión	Ref
locus <i>ent</i>	Componentes de sistemas de adquisición de Fe^{3+} vía catecolatos	Ref
<i>entC</i>	sintetasa de isocorismato*	20
<i>entB</i>	sintetasa de 2,3-dihidro-2,3-dihidrobenzoato*	19
<i>fepA</i>	receptor de Ent	19
<i>fes</i>	esterasa citosólica de Ent	19
locus <i>iroA</i>		
<i>iroN</i>	receptor de salmoquelinas	6
<i>iroB</i>	glucosil transferasa de salmoquelinas	25
<i>iroD</i>	esterasa citosólica de salmoquelinas	31
genes	Componentes de sistemas de adquisición de Fe^{3+} vía hidroximatos	
<i>fhuA</i>	receptor de ferricromo	19
<i>foxA</i>	receptor de ferrioxaminas	19
<i>fhuE</i>	receptor de coprógeno	19
<i>fhuB</i>	componente B de la permeasa tipo ABC FhuBC	19
<i>fhuF</i>	reductasa citosólica de ferri-hidroximatos	20
(B) Transportadores metálicos de cationes divalentes (Mn^{2+} , Fe^{2+})		
	Productos de expresión	Ref
locus <i>feoABC</i>	Feo, transportador de Fe^{2+} de tipo ABC	48
locus <i>mntH</i>	MntH transportador de Mn^{2+} (Fe^{2+}) de tipo Nramp1	51
locus <i>sitABCD</i>	SitABCD transportador de Mn^{2+} (Fe^{2+}) de tipo ABC	56

* precursor de Enterobactina (Ent)

(DHBS3) (25). La Ent también es precursora de derivados glucosilados producidos por *Salmonella enterica* y cepas uropatógenas de *Escherichia coli* (6), conocidos como salmoquelinas. Estas últimas están codificadas en el locus *iroA*, compuesto por los operones *iroN* e *iroBCDE* (6). Las salmoquelinas S1 y S2 están formadas por 2 y 3 unidades, respectivamente, de DHBS ligadas por glucosa (6, 25), mientras que la S4 deriva de la doble glucosilación de DHBS (25). La glucosilación enzimática de las salmoquelinas la lleva a cabo *iroB*, una glucosiltransferasa codificada por *iroB* (25).

b) Captura y transporte de Fe^{3+} mediado por catecolatos

Tras ser producidos por *Salmonella enterica*, la Ent así como sus derivados lineales y glucosilados interaccionan con el Fe^{3+} , para formar ferricomplejos que son captados por receptores proteicos expresados en la membrana externa bacteriana. En *Salmonella enterica*, las salmoquelinas son reconocidas por el receptor *iroN* (6), la Ent es captada por el receptor *FepA* e *iroN* (27-28), mientras que los derivados lineales de la Ent son reconocidos por *FepA*, *Cir* e *IroN* (28-29) (Figura 1).

Captura de hierro en *Salmonella enterica*

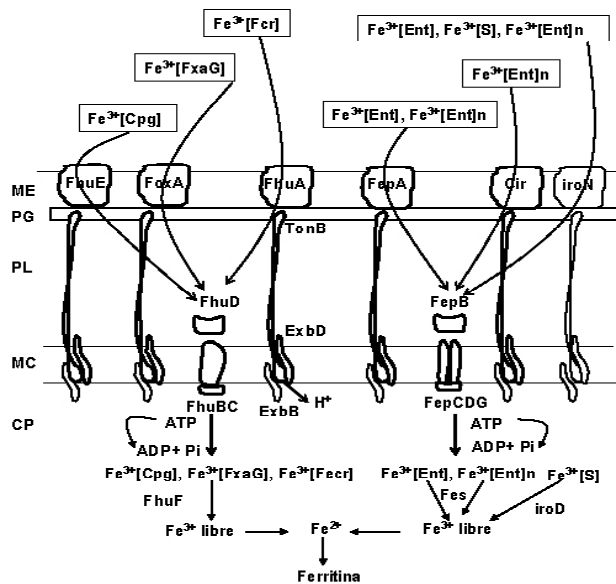


Figura 1. Sistemas de adquisición de Fe^{3+} mediados por sideróforos en *Salmonella enterica*

Salmonella enterica puede captar Fe^{3+} mediante la secreción de sideróforos endógenos de tipo catecolato y la utilización de sideróforos exógenos del grupo de los hidroximatos. Los sideróforos catecolatos incluyen a la Enterobactina [Ent] y sus productos lineales de hidrólisis [Ent]n, así como sus derivados glucosilados las Salmoquelinas [S]. Dentro de los sideróforos hidroximatos figura el Ferricromo [Fcr], Ferrioxamina G [FxaG] y Coprógeno [Cpg]. Al captar Fe^{3+} , los sideróforos forman ferri-complejos que interactúan con receptores proteicos de la membrana externa (ME) sobre la cual subyace el peptidoglicano (PG) de la pared celular. FepA, Cir e IroN son los receptores de Fe^{3+} [Ent]n, mientras que los receptores FepA e IroN interactúan con Fe^{3+} [Ent]; iroN es el receptor de Fe^{3+} [S]; FhuA, FxA y FhuE son los receptores de Fe^{3+} [Fcr], Fe^{3+} [FxaG] y Fe^{3+} [Cpg], respectivamente. Tras su interacción con receptores, los ferricomplejos llegan al espacio periplásmico (PL) mediante un proceso activo de transporte dependiente del complejo Ton [TonB, ExbD y ExbB]. En el PL, los ferriccatecolatos y ferrihidroxiimatos se unen a las proteínas periplásmicas FepB y FhuD respectivamente, para ser transportados activamente hacia el citoplasma (CP) por las permeasas correspondientes, FepCDG y FhuBC ubicadas en la membrana citoplásmica (MC). En el CP, la esterasa Fes hidroliza a los complejos Fe^{3+} [Ent] y Fe^{3+} [Ent]n, iroD hidroliza al complejo Fe^{3+} [S]. Los ferrihidroxiimatos son hidrolizados por la esterasa FhuF. Tras la hidrólisis de ferrisideróforos, el Fe^{3+} liberado puede ser utilizado para las funciones vitales de la bacteria o bien, almacenado en la ferritina en su estado ferroso (Fe^{2+}) reducido.

Con excepción del DHBA, cuya internalización es Ton independiente (21), los complejos ferriccatecolatos son transportados vía receptor al espacio periplásmico, mediante un mecanismo de transporte activo que depende del complejo Ton (28-30). En *Salmonella enterica*, los ferricomplejos Ent y sus derivados lineales translocados al espacio periplásmico interactúan con la proteína periplásmica FepB (6), homóloga a FepB descrita en *Escherichia coli* (12). Aunque no está claro si FepB u otras proteínas periplásmicas actúan como chaperonas de ferrisalmoquelinas (6), los ferricomplejos de tipo catecolato, incluidas las ferrisalmoquelinas, son transportados activamente a través de la membrana citoplásmica por la permeasa de tipo ABC FepCDG (26). En el citoplasma, la ferri-Ent y derivados lineales son degradados por la esterasa citosólica Fes para liberar el Fe^{3+} , mientras que las ferrisalmoquelinas son degradadas por la esterasa iroD (31-32). Dependiendo de los requerimientos nutricionales, en *Salmonella enterica* el Fe^{3+} libre puede ser almacenado en forma de Fe^{2+} por las ferritinas, que tienen un papel esencial en el aporte de hierro necesario para las funciones bacterianas vitales (33). Además, las ferritinas tienen un efecto protector para *Salmonella enterica*, al evitar que los iones libres Fe^{3+}/Fe^{2+} favorezcan la generación de especies reactivas de oxígeno, causantes de daño oxidativo sobre macromoléculas como ácidos nucleicos (33).

c) Componentes implicados en la adquisición de Fe^{3+} mediado por hidroximatos

En el grupo de los hidroximatos figura el citrato de 1,6-di (N⁶-acetil-N⁶-hidroxilserina), mejor conocido como aerobactina (16). Sólo ciertas cepas, como *Salmonella* Wien, producen aerobactina (34); en cambio, una proporción mayoritaria de cepas de *Salmonella enterica* practican la "piratería" de hierro, al captarlo de sideróforos de tipo hidroximato de origen fúngico o bacteriano. En este grupo de sideróforos exógenos figuran el ferricromo y coprógeno, derivados de los hongos

Drago-Serrano

Ustilago sphaerogena (7) y *Neurospora crassa* (35), respectivamente, así como ferrioxaminas producidas por la bacteria *Hafnia alvei* (36).

Para la adquisición de ferrihidroximatos, *Salmonella enterica* cuenta con los genes *fhuA*, *foxA* y *fhuE* (19) (**Cuadro 1**), implicados en la expresión de receptores Ton dependientes de ferricromo, ferrioxaminas y coprógeno, respectivamente (**Figura 1**); en *Salmonella* la captura de aerobactina ocurre mediante un receptor homólogo al receptor IutA de *Escherichia coli* (37). Otro gen como *fhuB* (**Cuadro 1**) codifica el componente proteico B de la permeasa tipo ABC FhuBC (19), mientras que *fhuF* (20) (**Cuadro 1**), homólogo al descrito en *Escherichia coli*, codifica a FhuF, una reductasa citosólica de hidroximatos (38). Aunque *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* poseen receptores homólogos para la captura de hidroximatos, como el receptor de ferricromo FhuA (denominado anteriormente Sid) (7, 39), algunos receptores de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* muestran divergencias en cuanto a la especificidad del hidroximato de captura. En *Salmonella enterica* la captura de ferrioxaminas (B, E y G) ocurre a través del receptor FoxA (8), homólogo al de *Yersinia enterocolitica* y *Erwinia herbicola* (*Pantoea agglomerans*) (40); en *Escherichia coli*, la ferrioxamina B es captada por el receptor FoxB (41) Ton independiente (42) y por el receptor FhuE Ton dependiente (43-44); en *Salmonella enterica*, el gene *fhuE* (19) está implicado en la expresión del receptor FhuE de coprógeno; en *Escherichia coli*, el receptor homólogo FhuE actúa como receptor de ferrioxamina B, coprógeno y otros sideróforos, como el ácido rodotorúlico (43-44). La interacción diferencial de hidroximatos vía receptor en *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* tiene, por tanto, efectos nutricionales divergentes entre ambas especies bacterianas.

d) Captura y transporte de Fe³⁺ mediado por hidroximatos

Con excepción del transporte Ton-independiente de la ferrioxamina B y E (8) en

Salmonella enterica, el transporte activo de ferrihidroximatos hacia el espacio periplásmico depende del complejo Ton, al igual que en *Escherichia coli* (45). En el espacio periplásmico los ferrihidroximatos son captados por la proteína periplásmica FhuD (46), que facilita su interacción con la permeasa de tipo ABC FhuBC para ser transportados activamente hacia el citosol (45) (**Figura 1**). Aunque en *Salmonella enterica* el destino de los ferrihidroximatos citosólicos no ha sido estudiado con detalle, el gen *fhuF* de *Salmonella enterica* (20) podría estar implicado en la expresión de la enzima FhuF, homóloga a la descrita en *Escherichia coli*. La enzima FhuF es la reductasa involucrada en la degradación de ferrihidroximatos en el citosol (38). Una vez libre, el Fe³⁺ citosólico captado en forma de Fe²⁺ es almacenado por ferritinas (33).

Sistemas de transporte de cationes metálicos divalentes

Aunque son menos conocidos, los transportadores metálicos de cationes divalentes (**Figura 2**) y los genes que los codifican (**Cuadro 1**) descritos en la actualidad en *Salmonella enterica* son:

a) Transportador Feo

En condiciones anaerobias, el hierro predomina en su forma reducida ferrosa Fe²⁺ altamente soluble; por ello, puede difundirse libremente a través de porinas de membrana externa de bacterias Gram negativas hasta llegar al espacio periplásmico (47). En bacterias Gram negativas (47), incluida *Salmonella enterica* (48), el Fe²⁺ presente en el espacio periplásmico puede ser transportado hacia el citosol contra gradiente de concentración, por el complejo proteico conocido como Feo (Ferrous iron transporter). Descrito por vez primera en *Escherichia coli* (49), el complejo Feo está codificado en el locus cromosomal *feoABC* y regulado por Fur (50). Feo es un transportador de tipo ABC altamente conservado en diversas bacterias, que consta de tres componentes: Feo B, una proteína integral de membrana cuyo

Captura de hierro en *Salmonella enterica*

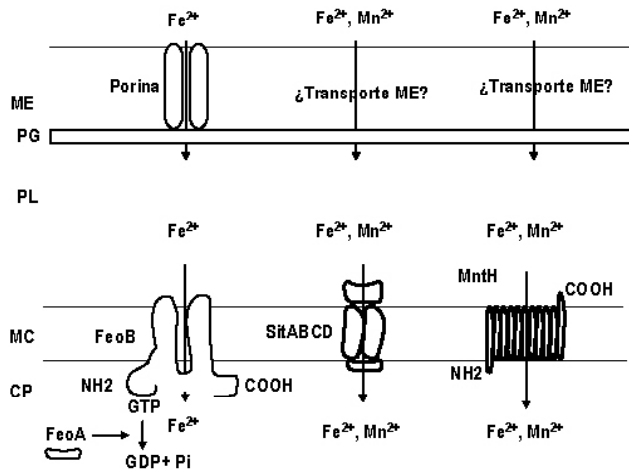


Figura 2. Sistemas de transporte de cationes metálicos divalentes en *Salmonella enterica*

En *Salmonella enterica* se han descrito permeasas de membrana citoplásmica involucradas en el transporte de cationes divalentes como iones Mn^{2+} y Fe^{2+} . En condiciones anaerobias los iones Fe^{2+} generados difunden a través de porinas de la membrana externa (ME) hacia el espacio periplásmico (PL), para ser transportados activamente hacia el CP por la permeasa Feo. Los iones Fe^{2+} pueden ser transportados contra-gradiente de concentración del PL hacia el CP por los transportadores de iones Mn^{2+} y Fe^{2+} SitABCD y MntH. Se desconoce si los iones Mn^{2+} y Fe^{2+} transportados por SitABCD y MntH son reconocidos por receptores de ME para ser transportados hacia el PL.

dominio citosólico amino terminal, con actividad de GTPasa, está involucrado en la generación de la energía para el transporte activo de Fe^{2+} a expensas de la hidrólisis de GTP; en el extremo carboxilo de FeoB se ubican los “pasajes” de entrada del Fe^{2+} . Un segundo componente, FeoC, funciona, al parecer, como represor transcripcional dependiente de complejos hierro-azufre (Fe-S). El tercer componente, FeoA, es una proteína soluble citosólica altamente catiónica cuya función se desconoce, pero se ha sugerido que favorece la actividad GTPasa de FeoB (47). Feo participa, junto con MntH y SitABCD, en el transporte de Fe^{2+} y Mn^{2+} necesarios para la replicación en medio de cultivo y sobrevivencia intracelular de *Salmonella enterica* (9).

b) Transportador MntH

Diversas bacterias Gram negativas como *Salmonella enterica* expresan MntH (51), una permeasa que es homóloga al transportador de cationes divalentes Nramp1 (Natural resistance associated macrophage protein1 = proteína 1 de macrófago asociada a la resistencia natural), expresado en la membrana de fagosomas de macrófagos en el proceso de fagocitosis. En *Salmonella enterica*, MntH actúa primariamente en el transporte de Mn^{2+} y en forma secundaria transporta Fe^{2+} (9, 51). La estructura detallada de MntH, descrita en *Escherichia coli*, muestra que es una proteína integral de membrana con 11 dominios transmembranales, con un extremo amino terminal citosólico y un extremo carboxilo terminal orientado hacia el periplasma (52). MntH induce un gradiente de $[H^+]$ en la membrana citoplásmica para generar la energía requerida en el transporte activo de cationes divalentes (52). En *Salmonella enterica*, MntH está codificada en el locus cromosomal *mntH*, cuya expresión está bajo el control de promotores regulados por los factores proteicos de transcripción Fur, MntR y OxyR. La expresión de *mntH* es reprimida por Fur y MntR en presencia de Fe^{2+} y Mn^{2+} , respectivamente, que actúan como cofactores primarios (53-54). Fur y MntR pueden usar Mn^{2+} o Fe^{2+} , respectivamente, como cofactores secundarios para reprimir la expresión de *mntH* (53-54); en contraste, la expresión de *mntH* es estimulada por OxyR en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (53). En *Salmonella enterica*, se ha sugerido que el Mn^{2+} podría tener un efecto protector contra la acción tóxica del H_2O_2 (9, 51). La protección podría radicar en favorecer la degradación de H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa con actividad Mn^{2+} dependiente o bien, en causar la dismutación no enzimática del H_2O_2 junto con el ión bicarbonato (51).

c) Transportador SitABCD

Al igual que MntH, SitABCD es una permeasa expresada en la membrana citoplásmica de *Salmonella enterica*, involucrada prioritariamente

Drago-Serrano

en el transporte de Mn^{2+} y, en forma secundaria, en el transporte de Fe^{2+} (9-10). SitABCD es un transportador de tipo ABC codificado en el locus *sitABCD* localizado en la isla de patogenicidad SPI-1 (*Salmonella* Pathogenicity Island-1 = isla de patogenicidad 1 de *Salmonella*) (55), la cual está implicada en la invasión del epitelio intestinal por *Salmonella enterica*. El locus *sitABCD* es homólogo al de otras permeasas ABC que derivan la energía para el transporte activo mediante la hidrólisis del ATP (10). Los genes *sitA* y *sitB* codifican una proteína periplásmica y una proteína de unión a ATP, respectivamente, mientras que *sitC* y *sitD* codifican dos proteínas integrales de membrana con actividad de permeasa (56). La expresión de *sitABCD* es reprimida por Fur (54, 56) y MntR (54) en presencia de Fe^{2+} y Mn^{2+} , respectivamente, como cofactores primarios.

d) Factores que influyen en la función de los transportadores MntH y SitABCD

Ensayos *in vitro* muestran que diversos factores físico-químicos pueden afectar la función MntH y SitABCD. A pH ligeramente alcalino, tanto MntH como SitABCD participan en el transporte de Mn^{2+} (10), pero a pH ácido el transporte de Mn^{2+} es mediado por MntH (10, 51); en presencia de oxígeno se favorece la expresión de SitABCD, pues se reduce la disponibilidad de Fe^{2+} necesario para que el complejo Fur- Fe^{2+} reprima su transcripción (54). En condiciones anaerobias, Fur reprime la expresión de SitABCD en mayor proporción que MntR. A diferencia del Fe^{2+} , el Mn^{2+} permanece en su forma reducida sin importar las condiciones de oxígeno, lo cual podría explicar por qué MntR tiene menor efecto que Fur sobre la represión anaeróbica de SitABCD (54). Estas evidencias sugieren que, dependiendo de las condiciones del microambiente, MntH y SitABCD podrían ser utilizados por *Salmonella enterica* para captar *in vivo* Mn^{2+} . El Mn^{2+} es el cofactor de la enzima superóxido dismutasa implicada en la eliminación de H_2O_2 ; por ello, su adquisición podría favorecer el crecimiento y sobrevivencia de *Salmonella enterica* (9).

Efectos de la adquisición de hierro sobre el crecimiento de *Salmonella enterica*

a) Componentes de sistemas mediados por sideróforos

Modelos murinos de infección oral con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium muestran que esta bacteria intracelular facultativa, tras llegar al estómago, coloniza e invade el intestino para diseminarse a nivel sistémico y sobrevivir dentro de los macrófagos establecidos en bazo e hígado; en el curso de la infección intestinal y extra-intestinal asociadas a daño tisular, *Salmonella enterica* requiere hierro para su crecimiento y sobrevivencia (4). Por lo anterior, diversos estudios han explorado el papel que tienen algunos componentes de sistemas de adquisición vía sideróforos sobre el crecimiento de *Salmonella enterica*. Algunos sideróforos, como las salmoquelinas, han sido involucrados en favorecer el crecimiento de *Salmonella enterica* (25-26). En medio de cultivo sólido adicionado con albúmina sérica, las salmoquelinas S2 y S4 fueron mejores fuentes de hierro que la Ent, pues estimularon en mayor magnitud el crecimiento de *Salmonella enterica* (25). Al parecer, la efectividad de las salmoquelinas sobre el crecimiento bacteriano radica en que, a diferencia de la Ent, son moléculas hidrofílicas cuya acción quelante sobre el hierro no se ve afectada en presencia de albúmina (25).

El efecto de la Ent sobre la estimulación del crecimiento bacteriano ha sido observado en cultivos de *Salmonella enterica* virulenta parental (silvestre) y en mutantes *ent* derivadas de la cepa parental (24). Ensayos *in vitro* muestran que, al captar el Fe^{3+} asociado a transferrina, la Ent causó el crecimiento de *Salmonella enterica* (17-18), el cual fue promovido por la norepinefrina (NE). La NE es una hormona neuroendocrina que facilita la remoción de hierro asociado a ferritoproteínas y su captura por parte de la Ent secretada por *Salmonella enterica*. El efecto de la NE sobre la estimulación *in vitro* del crecimiento bacteriano, en presencia de ferritoproteínas, dependió de la producción de Ent, TonB y de las esterasas Fes e

Captura de hierro en *Salmonella enterica*

iroD (57). Modelos de infección experimental en ratones mostraron que el efecto *in vivo* de la NE, sobre la estimulación de la colonización intestinal y diseminación sistémica de *Salmonella enterica*, involucró la participación de la esterasa Fes y la captura TonB independiente del 2,3 DHBA, precursor de la Ent (57). Estos resultados sugieren que *in vivo* subyacen mecanismos no conocidos, mediante los cuales algunos componentes de adquisición de sideróforos, junto con la NE, favorecen la colonización y diseminación de *Salmonella enterica*. En conjunción con TonB, la Ent ha sido involucrada en favorecer el crecimiento intracelular de *Salmonella enterica* en macrófagos humanos cultivados *in vitro* (58). La influencia de TonB y Feo sobre el crecimiento de *Salmonella enterica*, que participan en la adquisición de Fe³⁺ y Fe²⁺, respectivamente, ha sido valorada en ensayos de infección intragástrica mixta con *Salmonella enterica* virulenta parental y con las mutantes *tonB* y/o *feo* en ratones (48). En estos ensayos, se observó que la colonización intestinal de la mutante *feo* de *Salmonella enterica*, en presencia de la cepa silvestre, se redujo significativamente durante varios días post-infección y este defecto sobre la colonización intestinal fue mayor en la mutante doble de *Salmonella enterica*, *tonB feo* (48). Esto sugiere que Ton B podría potenciar la capacidad de Feo de contribuir en el crecimiento intestinal de *Salmonella enterica*, al transportar el Fe²⁺ generado por las condiciones anaerobias del microambiente intestinal (48).

b) Transportadores de cationes metálicos divalentes

En diversos ensayos *in vitro* y en modelos animales de infección experimental, se ha valorado la influencia de los transportadores de cationes metálicos divalentes en el crecimiento de *Salmonella enterica*. En medios de cultivo con niveles limitantes de hierro (9, 56) y manganeso (9), SitABCD, Feo y MntH favorecieron el crecimiento de *Salmonella enterica*. Otros estudios *in vitro* han explorado el efecto de mutaciones en *feo*,

mntH y *sitABCD* sobre la sobrevivencia bacteriana intracelular en macrófagos de la línea Raw con (+) o sin (-) el gen *Nramp1* funcional. *Nramp1* codifica una permeasa expresada en la membrana de los fagosomas de macrófagos, que actúa como una bomba que expulsa cationes divalentes del espacio fagosomal. En macrófagos *Nramp1*^{+/}, ni la cepa parental ni las mutantes fueron capaces de sobrevivir. Esto sugiere que *Nramp1* ejerce un efecto bacteriostático al eliminar los cationes divalentes de los fagosomas, que son necesarios para la sobrevivencia intracelular de *Salmonella enterica* (9). En los macrófagos *Nramp1*⁻, la proliferación de las mutantes de *Salmonella enterica*, *feo*, *mntH* y *sitABCD*, fue similar a la observada en la cepa parental. Otros ensayos en macrófagos *Nramp1*⁻, tratados con 2,2'-di-piridil para reducir el Fe²⁺ intracelular y ver su efecto en la proliferación bacteriana, mostraron que, en comparación con las mutaciones en *feo* y *mntH*, la mutación en *sitABCD* redujo sustancialmente la proliferación bacteriana intracelular; esto sugirió que la captura de Fe²⁺ mediada por SitABCD tiene un papel relevante en la sobrevivencia intracelular de *Salmonella enterica* (9). Otros ensayos de infección *in vitro*, en macrófagos de ratones que expresan *Nramp1*^{Gli169} funcional, muestran también la influencia de SitABCD en la sobrevivencia intracelular de *Salmonella enterica* (59). Lo anterior podría tener conexión con la expresión preferencial sistémica de SitABCD de *Salmonella enterica* en hígado y bazo (55), donde *Salmonella enterica* sobrevive intracelularmente dentro de los macrófagos establecidos en dichos órganos.

Efectos de la adquisición de hierro sobre la virulencia de *Salmonella enterica*

a) Componentes de sistemas mediados por sideróforos

Debido a su relevancia en la regulación de la transcripción de componentes que participan en la adquisición de hierro vía sideróforos, Fur ha sido involucrada en la virulencia de *Salmonella*

Drago-Serrano

enterica. Ensayos *in vitro* muestran que Fur participa en la regulación de la expresión génica de SPI-1, la cual codifica proteínas del sistema de secreción tipo III, que le confieren a *Salmonella enterica* la capacidad de invadir el epitelio intestinal (60). No obstante, falta aún explorar si la regulación de SPI-1, mediada por Fur, tiene un efecto sustantivo *in vivo* sobre la invasividad de *Salmonella enterica*.

Las evidencias experimentales sobre el papel de los sideróforos en la virulencia de *Salmonella enterica* han sido contradictorias. Los resultados obtenidos en ensayos de infección en ratones con cepas mutantes *ent* de *Salmonella enterica* indicaron que la Ent es un factor de virulencia (17, 61); sin embargo, otros autores confirmaron que la Ent no contribuye a la virulencia de *Salmonella enterica* (28, 62). Por otra parte, las salmoquelinas han sido implicadas en la capacidad de *Salmonella enterica* de evadir componentes del sistema innato de defensa, como la proteína lipocalina (Lcn)-2 producida por neutrófilos (63). A diferencia de la Ent, las salmoquelinas no son secuestradas por la Lcn-2, cuya función es prevenir la adquisición de hierro mediada por sideróforos y, así, proteger al hospedero de infecciones bacterianas. Modelos de infección muestran que la síntesis y secreción de salmoquelinas contribuyen a la virulencia de *Salmonella enterica* (26). No obstante, otros ensayos reportan que las salmoquelinas no tienen un papel en la virulencia de *Salmonella enterica* (28). Para intentar resolver estas aparentes discrepancias, otra estrategia experimental diseñada para evaluar virulencia ha sido construir mutantes de *Salmonella enterica* con receptores no funcionales para sideróforos de tipo hidroximato (8) y catecolato (17, 28).

Algunos receptores con potente actividad inmunogénica, como FepA (64), contribuyen a la virulencia de *Salmonella enterica*. En ratones infectados por inyección intraperitoneal, con cepas mutantes *Salmonella enterica fepA*⁻ con receptor FepA defectuoso, se observó que la mortalidad era menor en comparación con la obtenida con la cepa

silvestre (17). Para evaluar si la captura defectuosa de catecolatos reduce la virulencia bacteriana, se han realizado ensayos de infecciones mixtas, por vía intragástrica, en ratones con *Salmonella enterica* parental y con mutantes con receptores disfuncionales de catecolatos (28). En estos estudios, se observó que la cepa parental y la mutante doble *fepA*⁻ *iroN* de *Salmonella enterica* fueron similarmente virulentas, mientras que la mutante triple *fepA*⁻ *iroN*⁻ *cir*⁻ fue significativamente atenuada (28). Una marcada atenuación también se observó en ratones infectados con la mutante *Salmonella enterica foxA*⁻, cuya capacidad de colonizar el epitelio de asas intestinales de conejo se redujo sustancialmente (8). Al evaluar su efectividad como vacunas atenuadas, tanto la mutante triple *Salmonella enterica fepA*⁻ *iroN*⁻ *cir*⁻ (65) y *foxA* (8) abatieron la mortalidad en ratones, a los que se administraron previamente estas mutantes y que fueron retados después con cepa virulenta *Salmonella enterica* parental.

Por otra parte, en ensayos de infección intragástrica en ratones con mutantes *Salmonella enterica tonB*⁻ o *feo*⁻, se reportó que la mutación en *feo* no afectó su infectividad, mientras que la mutación en *tonB* redujo la virulencia de *Salmonella enterica*; sin embargo, la virulencia de *tonB*⁻ fue similar a la cepa parental al ser administrada por vía intraperitoneal (48). Esto indica que la mutante *tonB*⁻ tuvo menor capacidad de colonización tisular en el curso de la infección intragástrica, pero dicha capacidad no fue afectada durante la infección intraperitoneal. En otros ensayos de infección intragástrica mixta, se observó que la mutación *tonB*⁻ redujo la colonización en placas de Peyer y ganglios mesentéricos linfoides, pero no en bazo ni en hígado (48). Estos resultados sugieren que la captura de Fe³⁺ dependiente de TonB favorece la infectividad de *Salmonella enterica* a nivel intestinal; en tanto que otros sistemas de captura de hierro podrían favorecer su infectividad a nivel sistémico, como podrían ser los transportadores de cationes metálicos divalentes SitABCD y MntH (9, 55,59), que se describen a continuación.

b) Transportadores de cationes metálicos divalentes

La influencia de los transportadores de cationes metálicos divalentes en la virulencia de *Salmonella enterica* ha sido descrita en cepas mutantes *feo⁻*, *mntH* y *sitABCD⁻*; éstas fueron administradas intravenosamente a ratones 129/Sv *Nramp1* o *Nramp1^{-/-}* dotados o carentes, respectivamente, del gen *Nramp1* funcional (9). En este modelo, se observó que los ratones *Nramp1* controlaron la infección causada por la cepa silvestre o las mutantes. En contraste, los ratones *Nramp1^{-/-}* fueron altamente susceptibles a la infección con la cepa silvestre y la mutante *mntH*; pero fueron poco susceptibles a la infección causada por las mutantes sencillas o dobles *feo⁻* y/o *sitABCD⁻*. Esto indicó que, en ratones susceptibles *Nramp1^{-/-}*, el transporte de Fe^{2+} mediado por los transportadores tipo ABC Feo y/o SitABCD está asociado con la virulencia de *Salmonella enterica*. En ratones susceptibles *Nramp1^{-/-}*, el efecto de MntH sobre la atenuación de *Salmonella enterica* sólo se detectó en combinación con SitABCD y/o Feo; esto sugirió que la adquisición de Mn^{2+} era necesaria para la virulencia de *Salmonella enterica* (9). La relación entre el transporte de Mn^{2+} y la virulencia de *Salmonella enterica* también ha sido estimada en ratones C57BL/6^{Asp169} y en ratones congénicos^{Gli169}, con *Nramp1* disfuncional y funcional, respectivamente, infectados por vía intraperitoneal con mutantes sencillas o dobles *sitABCD⁻* y/o *mntH* de *Salmonella enterica* (59). En los ratones susceptibles C56BL/6^{Asp169}, las mutantes *mntH* y/o *sitABCD⁻* fueron igual de virulentas que la cepa parental. Sin embargo, en ratones resistentes C56BL/6^{Gli169}, la mutación sencilla *mntH* o *sitABCD⁻* atenuó su capacidad infecciosa, mientras que la doble mutación *mntH sitABCD⁻* generó una cepa de *Salmonella enterica* totalmente avirulenta. En contraste con el efecto secundario de MntH sobre la virulencia, reportado en ratones 129/Sv *Nramp1^{-/-}* (9), en tanto que en ratones resistentes C56BL/6^{Gli169}, MntH contribuyó a la virulencia igualmente que SitABCD; incluso,

los efectos de ambos transportadores sobre la virulencia de *Salmonella enterica* fueron aditivos (59). Estos resultados sugieren que el efecto de MntH sobre la virulencia necesita de *Nramp1* funcional expresado en ratones C56BL/6^{Gli169} (59).

Perspectivas y conclusión

El estudio de los sistemas de adquisición de hierro en *Salmonella enterica* tiene implicaciones en el desarrollo de agentes antimicrobianos, para el control emergente de cepas que han desarrollado resistencia contra los antibióticos. Ensayos iniciales mostraron que, en condiciones restrictivas de hierro, el escandio (Sc^{3+}) en forma de complejo con la Ent inhibió el crecimiento de *Salmonella enterica*. La inhibición del crecimiento bacteriano se atribuyó a la capacidad del complejo $\text{Sc}^{3+}[\text{Ent}]$ para competir con el complejo $\text{Fe}^{3+}[\text{Ent}]$ por la captura vía receptor (66). Otros productos sintéticos, con potencial aplicación para el control del crecimiento bacteriano, son las sideromicinas formadas por un sideróforo conjugado con un antibiótico (67). El efecto antibacteriano de las sideromicinas se basa en que actúan como “caballos de Troya”, pues el antibiótico es internalizado cuando el sideróforo, en forma de complejo con Fe^{3+} , es captado vía receptor por la bacteria (67). La actividad antibacteriana de las sideromicinas, estimada en diversas especies bacterianas Gram negativas y positivas (68), podría ser aplicada para el control de *Salmonella enterica*.

Además de sus implicaciones terapéuticas, la exploración de sistemas de captura de hierro tiene repercusiones profilácticas. A nivel experimental, diversas cepas atenuadas de *Salmonella enterica*, con mutaciones en receptores de sideróforos (8, 65), mostraron un efecto protector, que podría ser optimizado para la preparación de vacunas contra infecciones causadas por *Salmonella enterica* en humanos y animales.

En áreas como la microbiología sanitaria, donde se requieren métodos de aislamiento sensibles y rápidos para confirmar seguridad

Drago-Serrano

bacteriológica, la preparación de agua peptonada suplementada con ferrioxamina E podría ser útil para monitorear la presencia *Salmonella enterica* en muestras clínicas, agua, suelo y alimentos (69).

En conjunción con la prueba de sensibilidad hacia antibióticos, la evaluación de la producción de Ent y aerobactina (34), así como la detección del gene *iroB* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (70), podrían ser incluidas como ensayos para la identificación de cepas de *Salmonella enterica* en estudios clínicos, epidemiológicos y filogenéticos.

Aunque se han obtenido avances sobre la influencia de algunos componentes de sistemas de captura de Fe³⁺ vía sideróforos sobre la virulencia a nivel intestinal y de algunos transportadores de cationes metálicos divalentes en la virulencia a nivel sistémico, es factible que *Salmonella enterica* cuente con sistemas redundantes de adquisición de hierro aún desconocidos, que participen, dependiendo de las condiciones ambientales, en la captura emergente de hierro. El estudio detallado de los sistemas de adquisición de hierro descritos en la actualidad, así como la búsqueda de otros no caracterizados, podría ser fundamental para resolver las aparentes discrepancias observadas en ensayos experimentales, y para la comprensión global de las bases moleculares del efecto del hierro sobre el crecimiento y la virulencia de *Salmonella enterica*.

REFERENCIAS

1. **Baker HM, Anderson BF, Baker EN.** Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100 :3579-83.
2. **Kaplan J.** Mechanisms of cellular iron acquisition: another iron in the fire. Cell 2002; 111:603-6.
3. **Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F.** Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol Rev 2003; 27:215-37.
4. **Foster JW, Spector MP.** How *Salmonella survive* against the odds. Annu Rev Microbiol 1995; 49:145-74.
5. **Raymond KN, Dertz EA, Kim SS.** Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:3584-8.
6. **Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelman G.** Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor ironN. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:3677-82.
7. **Luckey M, Pollack JR, Wayne R, Ames BN, Neilands JB.** Iron uptake in *Salmonella typhimurium*: utilization of exogenous siderochromes as iron carriers. J Bacteriol 1972; 111:731-8.
8. **Kingsley RA, Reissbrodt R, Rabsch W, Ketley JM, Tsolis RM, Everest P, et al.** Ferrioxamine mediated iron (III) utilization by *Salmonella enterica*. Appl Environ Microbiol 1999; 65:1610-8.
9. **Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P, Cellier MFM.** Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Infect Immun 2002; 70:6032-42.
10. **Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME.** SitABCD is the alkaline Mn²⁺ transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Bacteriol 2002; 184:3159-66.
11. **Ferguson AD, Deisenhofer J.** TonB-dependent receptors- structural perspectives. Biochim Biophys Acta 2002; 1565:318-32.
12. **Sprenzel C, Cao Z, Qi Z, Scott DC, Montage MA, Ivanoff N, et al.** Binding of ferric enterobactin by *Escherichia coli* periplasmic protein FepB. J Bacteriol 2000; 182:5359-64.
13. **Brickman TJ, McIntosh MA.** Overexpression and purification of ferric enterochelin esterase of *Escherichia coli*. J Biol Chem 1992; 267:12350-5.
14. **Crosa JH.** Genetics and molecular biology of siderophore mediated iron transport in bacteria. Microbiol Rev 1989; 53:517-30.
15. **Ernest JF, Bennett RL, Rothfield LI.** Constitutive expression of the iron enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 1978; 135:928-34.
16. **Ratledge C, Dover LG.** Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu Rev Microbiol 2000; 54:881-941.
17. **Furman M, Fica A, Saxena M, Di Fabio JL, Cabello FC.** *Salmonella typhi* iron uptake mutants are attenuated in mice. Infect Immun 1994; 62:4091-4.
18. **Kvach JT, Wiles TI, Mellenkamp MW, Kochan I.** Use of transferrin iron enterobactin complexes as the source of iron by serum exposed bacteria. Infect Immun 1977; 18:439-45.
19. **Tsolis RM, Bäumlér AJ, Stojiljkovic I, Heffron F.** Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron regulated genes. J Bacteriol 1995; 177:4628-37.
20. **Bjarnason J, Southward CM, Surette MG.** Genomic profiling of iron response genes in *Salmonella enterica*

Captura de hierro en *Salmonella enterica*

- serovar Typhimurium by high throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol* 2003; 185:4973-82.
21. **Kingsley R, Rabsh W, Roberts M, Reissbrodt R, Williams PH.** TonB dependent iron supply in *Salmonella* by alpha ketoacids and alpha hidroxyacids. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 140:65-70.
 22. **Reissbrodt R, Kingsley R, Rabsch W, Beer W, Roberts M, Williams PH.** Iron regulated excretion of alpha ceto acids by *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1997; 179:4538-44.
 23. **Ismail A.** Siderophore production by *Salmonella typhi*. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 150:18-24.
 24. **Pollack JR, Ames BN, Neilands JB.** Iron transport in *Salmonella typhimurium*: mutants blocked in the biosynthesis of enterobactin. *J Bacteriol* 1970; 104:635-9.
 25. **Bister B, Bischoff D, Nicholson GJ, Valdebenito M, Schneider K, Winkelmann G, et al.** The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals* 2004; 17:471-81.
 26. **Crouch ML, Castor M, Karlinsey JE, Kalthorn T, Fang FC.** Biosynthesis and IroC dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 2008; 67:971-83.
 27. **Rabsch W, Voight W, Reissbrodt R, Tsois RM, Bäumler AJ.** *Salmonella typhimurium* iroN and FepA proteins mediated uptake of enterobactin but differ in their specificity for other siderophores. *J Bacteriol* 1999; 181:3610-2.
 28. **Rabsch W, Methner U, Voigt W, Tschäpe H, Reissbrodt R, Williams PH.** Role of receptor proteins for enterobactin and 2,3 dihydroxybenzoylserine in virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 2003; 71:6953-61.
 29. **Bäumler AJ, Norris TL, Lasco T, Voight W, Reissbrodt R, Rabsch W, Heffron F.** IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 1998; 180:1446-53.
 30. **Rabsch W, Ma L, Wiley G, Najjar FZ, Kaserer W, Schuerch DW, et al.** FepA and Ton B dependent bacteriophage H8: receptor binding and genomic sequence. *J Bacteriol* 2007; 189:5658-74.
 31. **Lin H, Fischbach MA, Liu DR, Walsh CT.** *In vitro* characterization of Salmochelin and enterobactin tri-lactone hydrolases iroD, iroE and Fes. *J Am Chem Soc* 2005; 127:11075-84.
 32. **Zhu M, Veldebenito M, Winkelmann G, Hantke K.** Functions of the siderophore esterases iroD and iroE in iron salmochelin utilization. *Microbiol* 2005; 151:2363-72.
 33. **Velayudhan J, Castor M, Richardson A, Main-Hester KL, Fang FC.** The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role of ferritin B in iron sulfur cluster repair and virulence. *Mol Microbiol* 2007; 63:1495-1507.
 34. **Visca P, Filetici E, Anastasio MP, Vetriani C, Fantasia M, Orsi N.** Siderophore production by species isolated from different sources. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 79:225-32.
 35. **Charlang G, NG B, Horowitz HN, Horowitz RM.** Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *Mol Cell Biol* 1981; 1:94-100.
 36. **Reissbrodt R, Rabsch W, Chapeaurouge A, Jung G, Winkelmann G.** Isolation and identification of ferrioxamine G and E in *Hafnia alvei*. *Biol Met* 1990; 3:54-60.
 37. **Braun V.** *Escherichia coli* cells containing the plasmid ColV produce the iron ionophore aerobactin. *FEMS Microbiol Lett* 1981; 11:225-8.
 38. **Matzanke BF, Anemüller S, Schünemann V, Trautwein AX, Hantke K.** FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochem* 2004; 43:1386-92.
 39. **Killmann H, Herrmann C, Wolff H, Braun V.** Identification of a new site for ferrichrome transport by comparison of the FhuA proteins of *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* B, *Salmonella typhimurium* and *Pantoea agglomerans*. *J Bacteriol* 1998; 180:3845-52.
 40. **Deiss K, Hantke K, Winkelmann G.** Molecular recognition of siderophores: a study with cloned ferrioxamine receptors (FoxA) from *Erwinia herbicola* and *Yersinia enterocolitica*. *Biometals* 1998; 11:131-7.
 41. **Nelson M, Carrano CJ, Szaliszlo PJ.** Identification of the ferrioxamine B receptor, FoxB, in *Escherichia coli* K12. *Biometals* 1992; 5:37-46.
 42. **Nelson M, Szaliszlo PJ.** Ton-independent ferrioxamine B mediated iron transport in *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 79:191-6.
 43. **Sauer MR, Hantke K, Braun V.** Sequence of the *fhuE* outer membrane receptor gene of *Escherichia coli* K12 and properties of mutants. *Mol Microbiol* 1990; 4:427-37.
 44. **Hantke K.** Identification of an iron uptake system specific for coprogen and rhodotorulic acid in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 1983; 191:301-6.
 45. **Köster W.** Iron (III) hydroximate transport across the cytoplasmic membrane in *Escherichia coli*. *Biol Met* 1991; 4:23-32.
 46. **Köster W, Braun V.** Iron (III) hydroximate transport into *Escherichia coli*. Substrate binding to the periplasmic FhuD protein. *J Biol Chem* 1990; 265:21407-10.
 47. **Cartron ML, Maddocks S, Gillinham P, Craven CJ, Andrews SC.** Feo transport of ferrous iron to bacteria.

Drago-Serrano

- Biometals 2006; 19:143-57.
48. **Tsolis RM, Bäumlér AJ, Heffron F, Stojiljkovic I.** Contribution of TonB and Feo mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun* 1996; 64:4549-56.
 49. **Hantke K.** Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* 1987; 44:53-7.
 50. **Kammler M, Schön C, Hantke K.** Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993; 175:6212-9.
 51. **Kehres DG, Zaharik ML, Finlay BB, Maguire ME.** The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol* 2000; 36:1085-1100.
 52. **Courville P, Chaluopka R, Veyrier F, Cellier MFM.** Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance associated macrophage protein (Nramp) ortholog. *J Biol Chem* 2004; 279:3318-26.
 53. **Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME.** Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H₂O₂, Fe²⁺ and Mn²⁺. *J Bacteriol* 2002; 184:3151-8.
 54. **Ikeda JS, Janakiraman A, Kehres DG, Maguire ME, Slauch JM.** Transcriptional regulation of *sitABCD* of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by MntR and Fur. *J Bacteriol* 2005; 187:912-22.
 55. **Janakiraman A, Slauch JM.** The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2000; 35:1146-55.
 56. **Zhou D, Hardt WD, Galan JE.** *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system with the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* 1999; 67:1974-81.
 57. **Methner U, Rabsch W, Reissbrodt R, Williams PH.** Effect of norepinephrine on colonisation and systemic spread of *Salmonella enterica* in infected animals: role of catechol siderophore precursors and degradation products. *Int J Med Microbiol* 2008; 298:429-39.
 58. **Gorbacheva VY, Faundez G, Godfrey HP, Cabello FC.** Restricted growth of *ent⁻* and *tonB* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human Mono Mac 6 monocytic cells. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 196:7-11.
 59. **Zaharik ML, Cullen VL, Fung AM, Libby SJ, Choy SLK, Coburn B, et al.** The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an *Nramp1^{G169}* murine typhoid model. *Infect Immun* 2004; 72:5522-5.
 60. **Ellermeier JR, Slauch JM.** Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through Hild. *J Bacteriol* 2008; 190:476-86.
 61. **Yancey RJ, Breeding SAL, Lankford CE.** Enterochelin (enterobactin): virulence factor for *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1979; 24:174-80.
 62. **Benjamin WH, Turnbough CL, Posey BS, Briles DE.** The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. *Infect Immun* 1985; 50:392-7.
 63. **Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, et al.** The pathogen associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:16502-7.
 64. **Fernandez-Beros ME, Gonzalez C, McIntosh ME, Cabello FC.** Immune response to the iron deprivation induced proteins of *Salmonella typhi* in typhoid fever. *Infect Immun* 1989; 57:1271-5.
 65. **Williams PH, Rabsch W, Methner U, Voigt W, Tschäpe H, Reissbrodt R.** Catechol receptor proteins in *Salmonella enterica*: role in virulence and implications for vaccine development. *Vaccine* 2006; 24:3840-4.
 66. **Plaha DS, Rogers HJ.** Antibacterial effect of the scandium complex of enterochelin studies of the mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1983; 760:246-55.
 67. **Miethke M, Marahiel MA.** Siderophore based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71:413-51.
 68. **Diarra MS, Lavoie MC, Jacques M, Darwish I, Dolence EK, Dolence JA, et al.** Species selectivity of new siderophore drug conjugates that use specific iron uptake for entry into bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2610-7.
 69. **Reissbrodt R, Heier H, Tschäpe H, Kingsley RA, Williams PH.** Resuscitation by ferrioxamine E of stressed *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from soil and water microcosms. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:4128-30.
 70. **Bäumlér AJ, Heffron F, Reissbrodt R.** Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1224-30.