

El ferro, la llaminadura i el verí dels bacteris

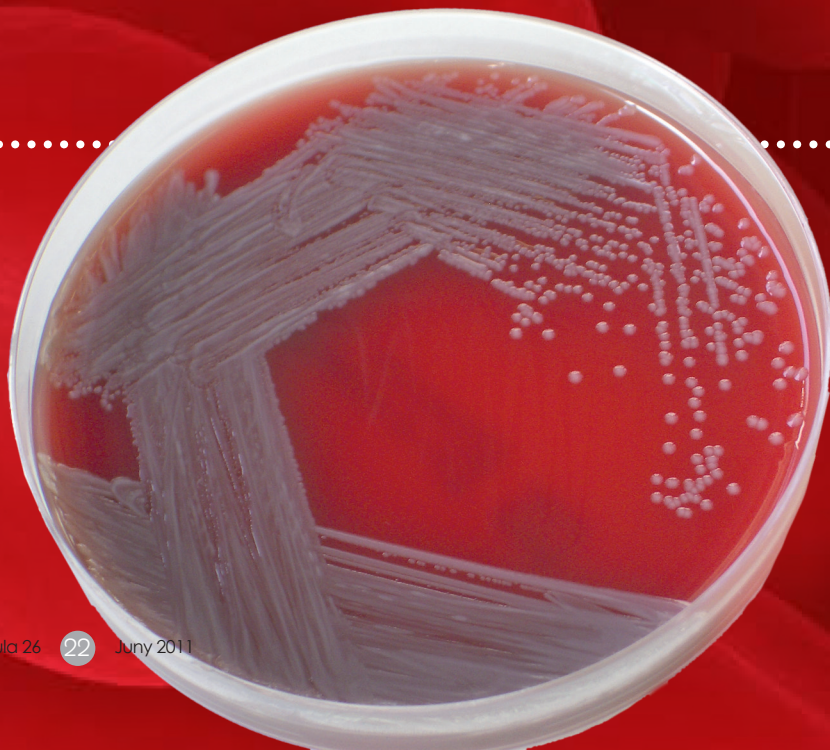
..... Escrit per

Susana Campoy, Montserrat Llagostera i Jordi Barbé
Grup de Microbiologia Molecular, Departament de Genètica i Microbiologia,
Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona

.....

El ferro és vital per a gairebé tots els organismes vius, atès el paper crucial que té en nombrosos processos biològics. Però, en concentracions inadequades, aquest element és un verí per a qualsevol cèl·lula. Per això, els éssers vius disposen de mecanismes que en controlen la concentració. Així, els vertebrats tenen sistemes que segresten ferro per evitar-ne l'efecte deleteri. A més, el segrest té un altre efecte positiu per a aquests animals, ja que el ferro no estarà disponible per al desenvolupament dels bacteris patògens que els puguin infectar. Com a resposta, els patògens bacterians han desenvolupat diverses estratègies de captura del ferro segrestat.

.....



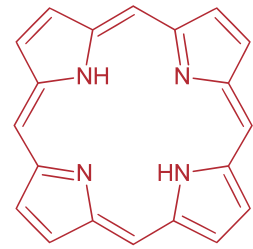
PRÀCTICAMENT tots els organismes vius necessiten ferro per als seus processos cel·lulars. La facilitat d'aquest element per guanyar o perdre electrons el converteixen en un cofactor ideal i versàtil per a nombroses proteïnes. Per aquest motiu, tret d'uns quants bacteris que l'han substituït per manganès —com *Borrelia burgdorferi*, responsable de la malaltia de Lyme, o alguns lactobacils no patògens—, els altres éssers vius necessiten incorporar ferro en petites quantitats per assegurar el funcionament de moltes funcions cel·lulars, que van des de la generació d'energia fins a la replicació del DNA.

Tot i que el ferro és un dels elements més abundants a l'escorça terrestre, la disponibilitat per als éssers vius no és tan gran com es podria pensar. Així, en ambients aeròbics i amb pH neutre, el ferro es troba en forma oxidada (Fe^{3+}), i dóna lloc a precipitats insolubles d'hidròxid fèrric. Només en ambients anòxics o de baix pH, el ferro està en forma reduïda (Fe^{2+}), que és soluble i, per tant, disponible per als éssers vius. D'altra banda, en solució aquosa a l'interior dels organismes, i mitjançant diverses reaccions, el ferro pot generar radicals i produir importants

lesions als éssers vius. Aquests radicals són altament reactius amb diferents biomolècules (àcids nucleics i lípids, entre d'altres). Per això, tots els organismes han desenvolupat tant sistemes per obtenir quantitats suficients de ferro per al seu desenvolupament com mecanismes d'emmagatzematge i de control de la concentració d'aquest element per evitar-ne els efectes deleteris (taula 1).

Quan els bacteris patògens infecten organismes superiors es troben en un ambient amb una concentració de ferro lliure extraordinàriament baixa. De fet, una de les primeres línies de defensa contra la infecció bacteriana és la retenció o segrest de nutrients, en especial de ferro (taula 1), per part de l'hoste en un procés anomenat *immunitat nutricional*.

En la majoria de vertebrats, el ferro intracel·lular està associat a proteïnes d'emmagatzematge, com ara la ferritina i l'hemosiderina, o bé acomplexat en l'anell de porfirina del grup hemo com un cofactor de l'hemoglobina o la mioglobina. En l'àmbit extracel·lular, la major part de ferro es troba associat a proteïnes i el poc ferro lliure circulant està en forma de Fe^{3+} , atès que



▼ **Taula 1.** Mecanismes de l'hoste per controlar la concentració del ferro lliure.

SEGREST DE FERRO PER PART DE PROTEÏNES DE L'HOSTE

Nivell extracel·lular

- Transferrina, present en el plasma, la limfa i el líquid cefaloraquídi.
- Lactoferrina, present en les secrecions de les glàndules mamàries i lacrimals i en els tractes respiratori, genital i gastrointestinal.

Nivell intracel·lular

- Ferritina o hemosiderina com a proteïnes d'emmagatzematge.
- Hemoglobina o mioglobina.

MECANISMES INDUÏTS DURANT UN PROCÉS INFECTIU

Reducció de l'absorció de ferro de la dieta i de la seva concentració en sèrum

- Disminució de la ferroportina per suprimir l'alliberament de ferro per part de macròfags i enteròcits duodenals.
- Increment de la ferritina de macròfags per estimular l'emmagatzematge.

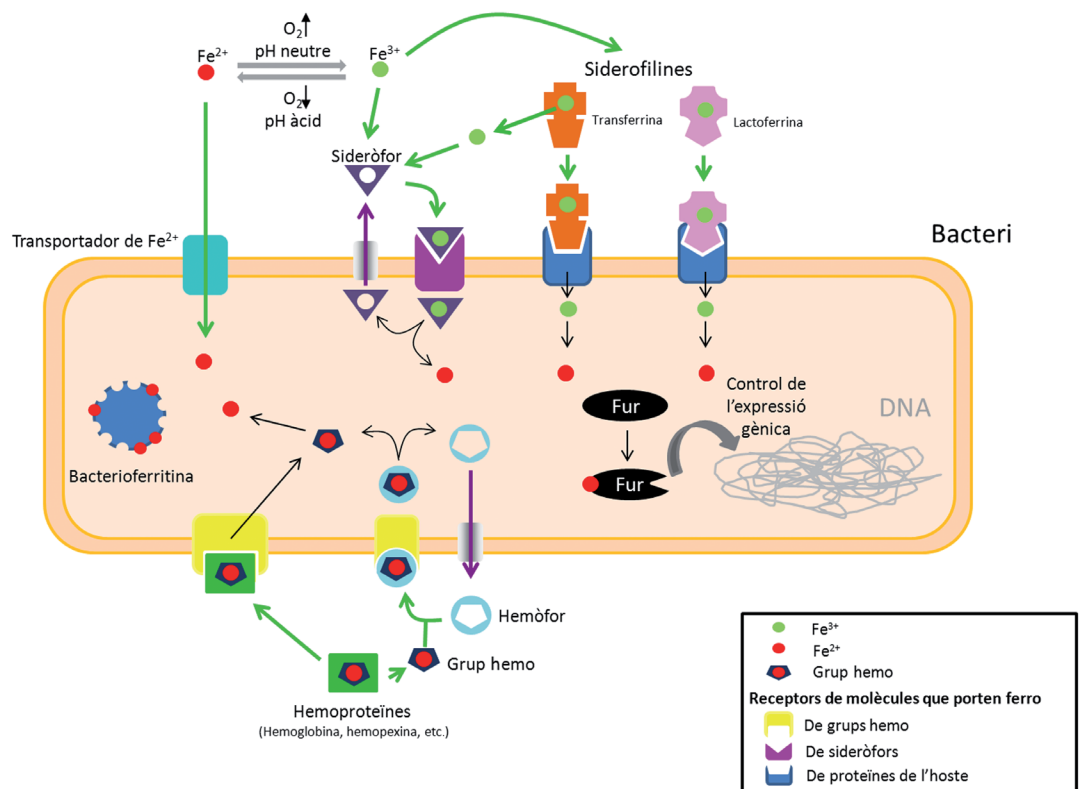
Disminució de ferro en els llocs d'infecció

- Alliberament de lactoferrina per part de granulòcits en els punts d'infecció.
- Segrest de la hemoglobina i hemina extracel·lulars mitjançant l'alliberament d'haptoglobina hepàtica i hemopexina.

Bloqueig del metabolisme del ferro bacterià

- Alliberament de siderocalines que inactiven sideròfors.
- Secreció d'àcid nítric per generar estrès oxidatiu i bloquejar la captació de ferro.
- Síntesi d'anticossos específics contra receptors de superfície associats al transport d'alta afinitat de ferro.

► **Figura 1.** Esquema dels diferents sistemes bacterians de captació de ferro.



l'ambient és aeròbic i el pH, neutre. Així, en sèrum, limfa i líquid cefaloraquídi, el ferro està associat a la transferrina, una proteïna d'elevada afinitat per aquest element encarregada de transportar-lo fins a les cèl·lules. A les mucoses del tracte digestiu, urinari i genital, així com a la resta de fluids corporals, excepte a l'orina, el ferro lliure és segrestat eficientment per la lactoferrina, proteïna secretada per neutròfils i per cèl·lules epitelials, i que, com la transferrina, té una elevada afinitat pel ferro. Tots aquests factors asseguren que la concentració de ferro disponible pels bacteris patògens sigui molt més baixa de la que necessiten per desenvolupar-se a l'interior de l'hoste. A més, quan aquest detecta la presència de patògens dispara, mitjançant citocines i altres molècules, un seguit de respostes encaminades a disminuir encara més la concentració del ferro existent al lloc de la infecció i a transportar-lo cap a zones menys accessibles per als patògens (taula 1).

La importància de la immunitat nutricional, i la del ferro en particular, es fa palesa per la susceptibilitat més elevada a les infeccions bacterianes que tenen els individus amb una major concentració de ferro lliure en l'organisme, provocada per algunes malalties genètiques humanes, com la talassèmia o l'hemocromatosi. Igualment, l'administració d'un excés de ferro augmenta la virulència de molts patògens en models animals.

La captació de ferro per bacteris

El poc Fe^{2+} lliure que hi ha a l'interior de l'hoste pot arribar al citoplasma bacterià a través de transportadors inespecífics, però és del tot insuficient per al bacteri. Per això, i malgrat els mecanismes de segrest de ferro dels hostes, la majoria de patògens bacterians superen l'escassetat d'aquest oligoelement gràcies al desenvolupament de diversos mecanismes d'alta afinitat de captació de ferro (MCF). Aquests mecanismes es basen en la producció de sideròfors, l'adquisició de grups hemo i la síntesi de receptors de determinades proteïnes de l'hoste (fig. 1).

Sintetitzats i excretats pels bacteris, els sideròfors són molècules de baix pes molecular capaces de quelar ferro amb una elevadíssima constant d'associació. L'avidesa pel ferro els permet competir eficientment amb la transferrina i la lactoferrina de l'hoste i, fins i tot, robar el ferro segrestat per aquestes proteïnes. Quan els sideròfors han quelat ferro, són reconeguts per receptors específics de la paret bacteriana. Això permet la internalització del complex sideròfor-ferro i, un cop al citoplasma, s'allibera l'ió ferro. Es coneixen patògens bacterians que no sintetitzen sideròfors, i en canvi capten sideròfors sintetitzats per altres bacteris; això és possible perquè presenten receptors de superfície específics d'aquests sideròfors aliens.

Un altre MCF dels bacteris és la incorporació de molècules pròpies de l'hoste que continguin ferro. Així, l'adquisició de grups hemo per part dels bacteris es basa en la presència en la superfície bacteriana de receptors que reconeixen específicament el grup hemo o bé el grup hemo associat a hemoproteïnes. El grup hemo s'extreu de les hemoproteïnes i, mitjançant un transportador específic, es condueix fins al citoplasma bacterià, on s'allibera gràcies a l'acció d'oxigenases o ferroquelatases reverses. En alguns casos, els bacteris també produeixen els anomenats *hemòfors*, molècules anàlogues funcionalment als sideròfors, si bé tenen com a diana el grup hemo. Gràcies a un transportador específic, el poden captar directament des de les hemoproteïnes que el contenen i translocar-lo al citoplasma bacterià.

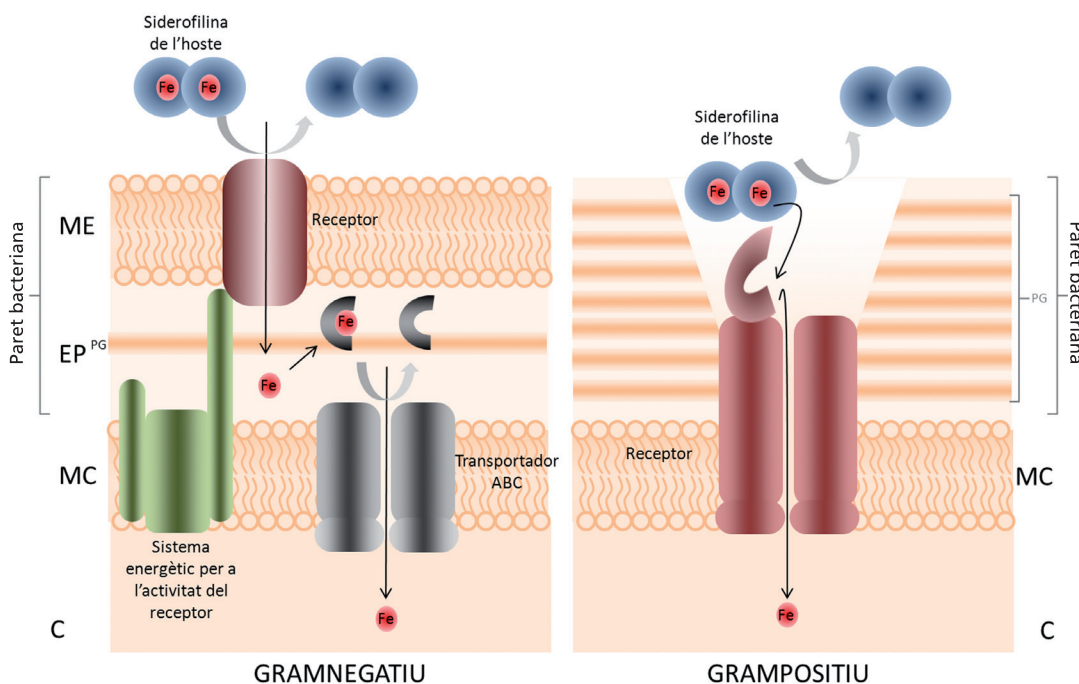
El tercer MCF, àmpliament distribuït entre els bacteris, es basa en la síntesi de receptors de superfície que reconeixen proteïnes pròpies de l'hoste segrestadores de ferro, com ara la lactoferrina, la transferrina o la ferritina. Aquest mecanisme és capaç d'extreure el ferro associat a aquestes proteïnes i translocar-lo al citoplasma bacterià. Cada patògen bacterià pot presentar un o diversos MCF, i deficiències en aquests mecanismes provoquen una disminució de la capacitat infectiva del patògen.

L'estructura i els components dels MCF estan relacionats amb el tipus de paret bacteriana (fig. 2). Els bacteris gramnegatius necessiten MCF molt sofisticats, formats normalment per

un receptor ancorat a la membrana externa, una proteïna que facilita el pas a través de l'espai periplasmàtic, un sistema d'aportació d'energia i un complex transportador, situat a la membrana cel·lular, que s'encarrega de la translocació final del ferro al citoplasma. En canvi, en bacteris grampositius els complexos transportadors són estructuralment més senzills, ja que no cal travessar cap membrana externa.

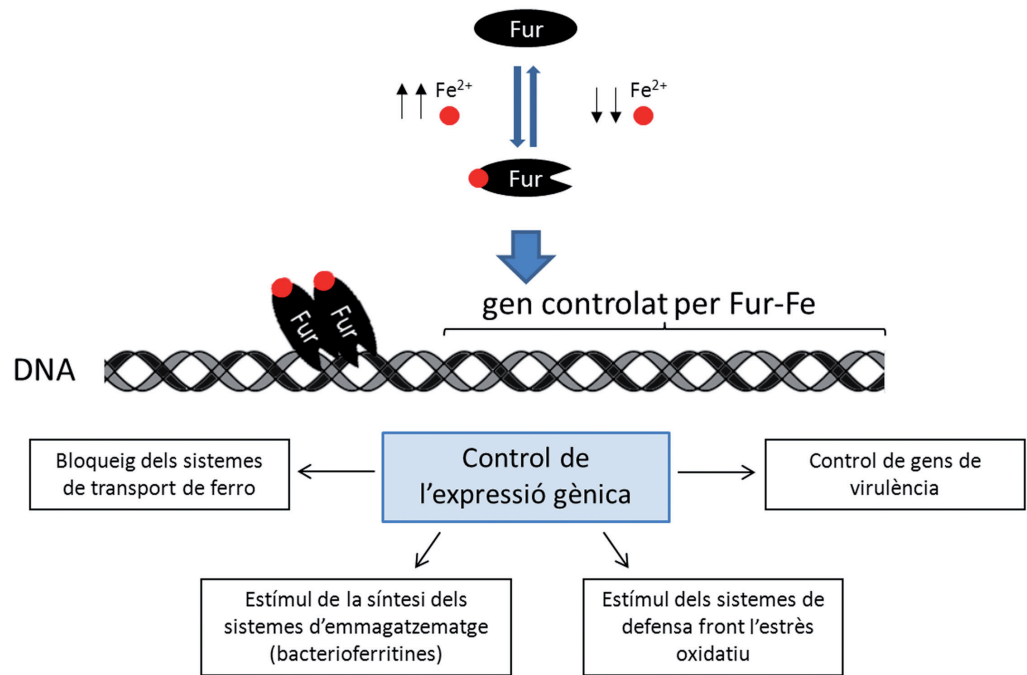
Regulació de la concentració intracel·lular de ferro en bacteris

En termes energètics, la síntesi i manteniment dels MCF és molt costosa per als bacteris, per això sembla raonable que disposin d'algun mecanisme que els permeti la síntesi dels components dels MCF només si els necessiten. D'altra banda, una elevada concentració intracel·lular de ferro lliure és molt perillosa, ja que pot reaccionar amb H_2O_2 o peròxids lipídics presents en el citoplasma cel·lular (reacció de Fenton/Haber-Weiss) i generar radicals altament reactius com OH^* , LO^* i LOO^* . Aquestes formes reactives d'oxigen provoquen lesions en diverses molècules i també en el material genètic. Per això, els bacteris controlen estretament la concentració intracel·lular de ferro, tot modulant els sistemes d'emmagatzematge al citoplasma cel·lular i sintetitzant els components de captació de ferro només quan són estrictament necessaris. Aquest control, l'exerceixen reguladors transcripcionals: proteïnes que interaccionen amb el DNA i que controlen l'expressió gènica ajustant-la a les necessitats de cada moment.



◀ **Figura 2.** Components dels sistemes de captació de ferro dels bacteris grampositius i gramnegatius. Llegenda: Membrana externa (ME), espai periplasmàtic (EP), peptidoglicà (PG), membrana cel·lular (MC) i citoplasma (C).

► **Figura 3.** Acció del regulador transcripcional Fur sobre el control de l'homeòstasi de ferro en bacteris.



El regulador transcripcional més conegut de captació de ferro és la proteïna Fur (*ferric uptake regulator*). Aquest regulador incorpora Fe^{2+} , per formar el complex Fur- Fe^{2+} , que és capaç d'interaccionar amb determinades regions del DNA per modular l'expressió dels gens bacterians (fig. 3). El regulador Fur és el sensor del nivell de ferro intracel·lular dels bacteris. Quan aquest nivell és elevat es forma el complex Fur- Fe^{2+} , que bloqueja la síntesi dels MCF i evita l'augment de ferro al citoplasma cel·lular. A més, el complex Fur- Fe^{2+} també activa la síntesi de proteïnes d'emmagatzematge, com la bacterioferritina, i la d'altres enzims destoxicadors, com la superòxid-dismutasa, i evita els efectes deleteris de l'excés de ferro. En canvi, quan el nivell de ferro és baix, no es forma el complex Fur- Fe^{2+} i, per tant, no es bloqueja la síntesi dels MCF ni s'activen els sistemes d'emmagatzematge o de protecció. Atesa l'escassetat de ferro lliure en els vertebrats, la disminució del nivell de ferro és per a molts patògens bacterians un senyal indicatiu que es troben a l'interior de l'hoste i que han d'activar els mecanismes del procés infectiu. En conseqüència, el regulador Fur no només controla l'expressió de gens implicats directament en la captació de ferro sinó que també modula processos associats al desenvolupament de la infecció (fig. 3), com ara els implicats en la colonització de teixits i la defensa enfront de la resposta immunitària de l'hoste.

Els sistemes de captació de ferro i el disseny de vacunes

La baixa disponibilitat de ferro als hostes origina que els patògens hagin d'expressar els MCF durant la major part del procés infectiu. Això significa que a la superfície bacteriana s'exposen un seguit de proteïnes dels MCF que són possibles dianes de la resposta immunitària humoral de l'hoste. De fet, la unió d'anticossos específics a aquestes proteïnes impedeix que el bacteri capturi ferro, tot evitant-ne el desenvolupament, i en molts casos també hi ha un efecte bactericida per l'acció addicional del complement.

L'augment del nombre de bacteris patògens resistents a antimicrobians és un problema seriós que afecta la lluita contra les malalties infeccioses, ja que disminueix l'arsenal de fàrmacs útils per combatre-les. Aquesta situació ha posat en evidència la necessitat de cercar noves estratègies per a la prevenció i el tractament d'aquestes malalties.

En aquest context, la immunogenicitat elevada de les proteïnes dels MCF les converteix en candidates idònies per ser usades com a diàna per dissenyar noves vacunes. En aquesta línia, una primera estratègia ha estat utilitzar transportadors de ferro o sideròfors com a elements de vacunació. Experimentalment, s'han provat amb èxit vacunes basades, per exemple,

en el transportador de ferro FetA de *Neisseria meningitidis*; en l'hemòfor Isd de *Staphylococcus aureus*; en els receptors de sideròfors IroN d'*Escherichia coli* i d'hemoglobina HgbA d'*Haemophilus ducreyi*, i en diferents proteïnes de superfície de *Streptococcus suis*. En canvi, aquesta estratègia no ha reeixit en altres patògens bacterians, en particular en aquells que tenen diferents MCF, atès que el bloqueig de només un d'aquests mecanismes no evita la incorporació de ferro. Aquesta situació s'ha superat en dissenyar vacunes basades en cèl·lules inactivades del patògen després d'haver crescut en condicions d'escassetat de ferro. En aquestes condicions, els bacteris presenten a la superfície tota la bateria de proteïnes de captació de ferro. Aquesta estratègia s'ha utilitzat amb èxit per al disseny de vacunes contra *Salmonella enterica*, si bé té limitacions ja que el creixement dels bacteris és molt limitat en les condicions de cultiu esmentades. El nostre grup de recerca ha desenvolupat una estratègia alternativa basada en

la construcció d'una soca vacunal defectiva per al regulador Fur. Per tant, les cèl·lules d'aquest mutant expressen totes les proteïnes superficials implicades en la captació de ferro encara que n'hi hagi al medi. Aquesta estratègia s'ha usat amb èxit per obtenir una vacuna contra *Pasteurella multocida*. La pasteurel·losi afecta diferents tipus d'animals salvatges i ramaders i és responsable de grans pèrdues econòmiques arreu del món.

De ben segur no es coneixen totes les interaccions hoste-patògen al voltant del ferro, ja que només s'han estudiat alguns dels senyals i part de l'armament de què disposen ambdós tipus d'organismes per captar-lo i, alhora, evitar-ne l'efecte nociu. Per això, aprofundir en l'estudi d'aquestes interaccions permetrà en el futur desenvolupar noves estratègies per dissenyar vacunes, i potser també descobrir noves dianes d'acció d'antibacterians per lluitar contra les malalties infeccioses. |

Referències bibliogràfiques

- ANDREINI, C. [et al.] (2008). «Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles». *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, núm. 13, p. 1205-1218.
- ARANDA, J. [et al.] (2008). «Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions». *Infection and Immunity*, núm. 76, p. 1590-1598.
- BOSCH, M. [et al.] (2002). «Characterization of the *Pasteurella multocida* hgbA gene encoding a hemoglobin-binding protein». *Infection and Immunity*, núm. 70, p. 5955-5964.
- BOSCH, M. [et al.] (2004). «*Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins». *Veterinary Microbiology*, núm. 99, p. 103-112.
- CARPENTER, B. M. [et al.] (2009). «This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis». *Infection and Immunity*, núm. 77, p. 2590-2601.
- GANZ, T.; NEMETH, E. (2006). «Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals». *Biochimica et Biophysica Acta*, núm. 1763, p. 690-699.
- GARRIDO, M. E. [et al.] (2003). «fur-independent regulation of the *Pasteurella multocida* hbpA gene encoding a haemin-binding protein». *Microbiology*, núm. 149, p. 2273-2281.
- GARRIDO, M. E. [et al.] (2008). «Heterologous protective immunization elicited in mice by *Pasteurella multocida* fur ompH». *International Microbiology*, núm. 11, p. 17-24.
- HANTKE, K. (1981). «Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant». *Molecular General Genetics*, núm. 182, p. 288-292.
- HENTZE, M. W. [et al.] (2010). «Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism». *Cell*, núm. 142, p. 24-38.
- TEIXIDÓ, L. [et al.] (2011). «Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the hilD operator *in vivo* and *in vitro*». *PLoS ONE*. [En premsa]
- RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. (2000). «Iron metabolism in pathogenic bacteria». *Annual Review of Microbiology*, núm. 54, p. 881-941.
- SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. (2004). «Iron and microbial infection». *Nature Reviews Microbiology*, núm. 2, p. 946-953.
- SKAAR, E. P. (2010). «The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts». *PLoS Pathogens*, núm. 6.
- WEINBERG, E. D. (2009). «Iron availability and infection». *Biochimica et Biophysica Acta*, núm. 1790, p. 600-605.

Jordi Barbé

(Barcelona, 1955)

Montserrat Llagostera

(Barcelona, 1954)

Susana Campoy

(Terrassa, 1975)



Jordi Barbé i Montserrat Llagostera són catedràtics de microbiologia de la UAB i coordinen el Grup de Microbiologia Molecular. Susana Campoy és profes-



sora agregada de la UAB i la coordinadora júnior del grup. Els seus camps d'interès són els mecanismes de reparació bacteriana i la seva relació en patogènia, els sistemes bacterians de captació de cations divalents i el desenvolupament de noves vacunes i la resistència a antibacterians i la teràpia fàgica. El grup ha publicat més de dos-cents articles internacionals i ha patentat i llicenciat una vacuna contra *P. multocida*, basada en els seus mecanismes de captació de ferro.

