



# VNiVERSiDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

Función de las metalochaperonas COG0523 en la adaptación  
del patógeno humano *Aspergillus fumigatus* a la carencia  
de zinc y en virulencia

Clara Inés Sánchez Suárez  
2019





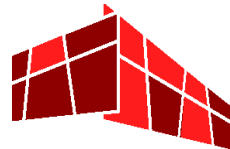
VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



ibfg

INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA  
CENTRO MIXTO

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Función de las metalochaperonas COG0523 en la adaptación del  
patógeno humano *Aspergillus fumigatus* a la carencia  
de zinc y en virulencia

Clara Inés Sánchez Suárez  
Junio, 2019



**D. José Antonio Calera Abad**, Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada “Función de las metalochaperonas COG0523 en la adaptación del patógeno humano *Aspergillus fumigatus* a la carencia de zinc y en virulencia”, presentada por Dña. Clara Inés Sánchez Suárez para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), en el marco del **Programa de Doctorado de “Microbiología y Genética Molecular”** del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, a 4 de junio de 2019

Fdo: José Antonio Calera Abad

---

**D. Pedro F. Mateos**, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética y director del Programa de Doctorado en “Microbiología y Genética Molecular” de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada “Función de las metalochaperonas COG0523 en la adaptación del patógeno humano *Aspergillus fumigatus* a la carencia de zinc y en virulencia”, presentada por Dña. Clara Inés Sánchez Suárez para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. José Antonio Calera Abad** en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), en el marco del **Programa de Doctorado de “Microbiología y Genética Molecular”** del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, a 4 de junio de 2019

Fdo: Pedro F. Mateos



*A Gabriela, todo esto es por ti y para ti.*

## AGRADECIMIENTOS

---

Con el paso de los años he aprendido que la vida es un sinfín de oportunidades y que dependen de la suerte de cuna que hayas tenido. En mi caso tuve la fortuna de nacer en un hogar en el que se privilegió el conocimiento y aunque mis padres no tuvieron una formación académica más allá de la secundaria, soñaban con que sus hijos pudieran acceder a un nivel mayor. Por eso, a ellos les debo mi primer gracias. No me alcanzará la vida para retornarles todo el bienestar, el amor, el acompañamiento, las oraciones, TODO. Gracias padres queridos.

A mi hermana Nelly, me has brindado tu apoyo sin condiciones. Te doy gracias por la comunicación, la alegría, las oraciones, la preocupación. Todos los días me acercaste a mis padres, si no estuvieras con ellos sería más difícil. A mis hermanos y sus familias, mil gracias. A mi hermano pequeño, gracias. A mis tíos Emma y José, ya que sin su confianza y su firma no estaría aquí. A mi principito, quién fue el que más sufrió mi lejanía.

A mi princesa, mi pequeña Gaby. Te he transformado tu vida con cada decisión que he tomado, eres mi compañera de viajes. Sin tu apoyo y tu compromiso esto no habría sido posible, tienes mi total admiración. Para mi eres una valiente, eres una luchadora y eres muy inteligente. Te agradezco todo, sabes que te quiero y que este logro es todo tuyo.

Aproveché esta oportunidad porque en Colombia el acceso a la universidad pública o privada es un lujo y yo lo tuve. Por fortuna seleccioné un pregrado científico que me permitió conocer este mundillo y que sembró en mí las ganas de seguir aprendiendo, de conocer más, de saber más. Pero esa oportunidad la aplacé por motivos personales y ese aplazamiento determinó que para lograr esta meta tuviera que conseguir recursos o un trabajo estable que me facilitara el seguir adelante con mi formación.

Gracias a mi trabajo en la Universidad Industrial de Santander y al programa de formación estoy aquí. Es el mejor trabajo del mundo y lo que más me gusta es que me pagan por estudiar.

Les agradezco a mis compañeros de trabajo de Colombia. Sin su apoyo no estaría aquí, porque asumieron mi carga académica y aliviaron la presión de no estar allí. A mis amigos en Bucaramanga, a Luz, Carolina, Laura, Inés, Andrés, Daniel, Giovanna sin que me cubrieran para poder venir no lo hubiera logrado, son los mejores. A mis amigos por el mundo, Oscar, Mónica, Arturo, Andrés de nuevo, Martín, Vicente. Gracias por su casa, sus consejos, su apoyo, los artículos, sus visitas, hicieron que esta estancia fuera más corta. A Yenny, a Luis y a Carlitos quienes garantizaron que mi llegada fuera más suave y en todos estos años han sido mi soporte, mi familia en España. A mi amiga Amanda, quien al igual que yo vivió esta experiencia durante este tiempo. Gracias por escuchar y gracias por recibirnos y acompañarnos en todo momento.

Darle las gracias a mi Director, José Antonio Calera. Si no me hubiera aceptado, es probable que se hubiera postergado aún más esa necesidad de seguir mi formación. Agradecerle por darme esta oportunidad, por abrir las puertas de su laboratorio a una desconocida, mujer, con hija, proveniente del otro lado del charco, sin ninguna certidumbre de que esto funcionara. Por fortuna, logramos una relación Director/doctorando bastante idónea. He aprendido mucho y es la primera vez que me siento acompañada en este proceso. Es una persona que tiene un conocimiento del metabolismo del zinc y de *Aspergillus fumigatus* excelente, pero lo que más valoro es su capacidad para darle respuesta a los resultados, aunque sean negativos y su facilidad para encontrar artículos que nos ayudaran a dar respuesta a nuestros interrogantes. También agradecerle porque me



facilitó un lugar precioso para vivir. Mi estancia en su laboratorio fue tranquila, sin limitaciones y con todo el apoyo para poder realizar mi trabajo.

Gracias a esa vinculación conocí a mis amigos del laboratorio P1.10: Héctor, Laura, Rocío, Isa y Diana. Sin Héctor habría sido complicado, porque fue divertido y lo experimental requiere un toque de humor; fue relajado, porque para aprender cosas nuevas hay que estar tranquilos. Estoy segura que sin ti la habría pasado fatal. Estabas en el momento y en el lugar adecuado, me diste la pauta para tranquilizarme, y me diste el teatro, muchas gracias. A Laura, mi amiga, mi maestra, mi compañera, qué nivel de conocimientos, mi total admiración y mi cariño, me has acompañado en las duras y las maduras, me has dado la fuerza para seguir y entender las cosas, me has dado confianza en todo, eres una persona muy inteligente, con un valor inconmensurable. Gracias por tus conocimientos y por toda la paz que me regalaste. A Rocío, gracias por el cariño hacia *Aspergillus* y por todo lo que me enseñaste al inicio de esta etapa. A Isabel, gracias por permitir que te enseñara y por siempre estar pendiente, por escucharme, por compartir, por la alegría, a veces eso es lo que hace falta, al fin y al cabo *“la vida es mucho mejor con amigas como tú alrededor”*. A Diana, un tiempo corto pero sustancioso.

A Ramón y Marga mil gracias. Mi laboratorio no sólo era el P1.10 creo que del P1.9 tomé prestadas muchas cosas, parecía un miembro más de ese laboratorio. Quiero enaltecer esa simbiosis tan bonita de esos dos laboratorios. Ramón, gracias por hacerme sentir parte de tu equipo, gracias por la cámara y por todo lo que me ayudaste. A Sergio, Ricardo, Ana y a todos tus pupilos, de verdad que me ayudaron un montón e hicieron aún más agradable mi estancia.

A mis amigos de los otros laboratorios. Rosana, vaya que te moleste, gracias infinitas por ayudarme y apoyarme; Facundo, la alegría en todo momento, el interesarte por mi día a día, otro Panchito en el IBFG; Vanesa, gracias por escuchar y por compartir, por esa sonrisa que me hacía sonreír; Mar, otro tesoro invaluable de este centro. A mis compañeros de las comidas, Marta, Sara, Alicia, Laura<sup>2</sup>, Loreto, Bea, Paula, Miguel, Noelia, Esmeralda, Esperanza, Antonio... El quedarse en un lugar durante tanto tiempo requiere momentos de esparcimiento y vaya que la pasé muy bien, escuchándolo todo porque mi manera de ser es la de Buho *“no habla, pero pone un cuidado”*. De verdad, muchas gracias. En muchos momentos aliviaron tensiones e hicieron que el día a día no se hiciera tan largo.

Al personal técnico y administrativo. ¡Qué sería de este centro sin su valioso apoyo! Gracias infinitas.

A todos los miembros de los otros laboratorios, siempre conté con su apoyo y su ayuda. Mil gracias.

El IBFG tiene muchas fortalezas, pero la más importante es su gente. Les agradezco hacer de mi estancia una etapa inolvidable.

¡Muchísimas gracias!



# ÍNDICE

---

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Adquisición de metales por metaloproteínas.....	3
2. Metalochaperonas.....	8
3. Características estructurales de las proteínas COG0523.....	12
4. Relación de las proteínas COG0523 con homeostasis de zinc.....	13
5. Funciones biológicas del zinc.....	16
5.1. Mecanismos generales de homeostasis del zinc en eucariotas.....	18
5.2. Homeostasis del zinc en <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	19
6. Importancia del mantenimiento de homeostasis del zinc para la virulencia de <i>A. fumigatus</i> .....	21
7. Hipotesis de trabajo y objetivos.....	24
RESULTADOS.....	25
1. Características estructurales de las proteínas de la subfamilia COG0523 de <i>Aspergillus fumigatus</i> y de sus genes codificantes.....	27
2. Perfil de expresión de los genes <i>mch</i> de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	32
3. Análisis funcional de las proteínas MchA-C mediante ensayos de complementación en levaduras.....	34
4. Análisis funcional de los genes <i>mch</i> de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	42
4.1. Tasas de crecimiento de las cepas $\Delta mch$ .....	44
4.2. Capacidad de crecimiento de las cepas $\Delta mch$ en medio líquido.....	44
4.3. Capacidad de crecimiento de las cepas $\Delta mch$ en medios sólidos en diferentes condiciones de cultivo y frente a diferentes tipos de estrés.....	47
4.3.1. Efecto de los metales de transición biogénicos.....	47
4.3.2. Efecto del estrés térmico.....	48
4.3.3. Efecto del estrés salino y osmótico.....	54
4.3.4. Efecto del estrés oxidativo.....	54
4.3.5. Efecto del daño de membrana sobre el crecimiento de las cepas $\Delta mch$ .....	58
5. Identificación de proteínas que interactúan con MchB y MchC.....	59
6. Investigación de la posible relación de las proteínas Mch con la función de Ydj1 utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	62
6.1. Influencia de MchB sobre la función de Ydj1 en la respuesta a estrés oxidativo, térmico y daño de membrana.....	63
6.2. Relación entre la expresión de MchB y el desarrollo del fenotipo <i>petite</i> .....	66
7. Efecto de la delección de <i>mchC</i> sobre la expresión génica.....	68
8. Relación de las proteínas Mch con la función mitocondrial en <i>A. fumigatus</i> .....	72
8.1. Efecto del zinc y hierro sobre la ratio ADNmt/ADNn en las cepas $\Delta mchC$ .....	72
8.2. Producción de ROS en las cepas $\Delta mch$ según la disponibilidad de $Zn^{2+}$ .....	72
8.3. Morfología de las mitocondrias en la cepa $\Delta mchC$ .....	74
8.4. Localización subcelular de GFP-MchC.....	76
9. Relevancia de los genes <i>mch</i> en la virulencia de <i>A. fumigatus</i> .....	77
DISCUSIÓN.....	79
1. La estructura de las proteínas Mch de <i>A. fumigatus</i> y el perfil de expresión de sus genes codificantes sugieren que MchA y MchC desempeñan funciones similares pero diferentes de la desempeñada por MchB.....	81
2. Zch1 podría regular negativamente la síntesis de ergosterol en <i>S. cerevisiae</i> en función de la disponibilidad de hemo.....	84
3. La actividad de las proteínas Mch podría estar relacionada con la función mitocondrial.....	90
4. Las proteínas COG0523 de <i>A. fumigatus</i> no son esenciales para la virulencia.....	94
CONCLUSIONES.....	97

MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
1. Microorganismos y medios de cultivo empleados.....	103
1.1. Medios empleados para el cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	104
1.2. Medios empleados para el cultivo de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	104
1.3. Medios empleados para el cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	106
1.4. Preparación y limpieza de recipientes para medios y cultivos.....	106
2. Obtención de esporas y determinación de crecimiento neto de <i>A. fumigatus</i> .....	107
3. Obtención y análisis de ácidos nucleicos.....	107
3.1. Reacciones de PCR.....	108
3.2. Clonación de fragmentos de PCR.....	108
3.3. Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> .....	110
3.4. Obtención de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> y análisis de restricción.....	110
3.5. Obtención de ADNg de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	111
3.6. Análisis de ADNg por Southern-blot.....	111
3.7. Obtención de ARN total de <i>Aspergillus fumigatus</i> y análisis por Northern-blot.....	113
3.8. Cuantificación de ARN mediante RT-qPCR.....	114
3.9. Determinación de la relación ADNmt/ADNn mediante qPCR.....	115
4. Plásmidos usados para generar cepas mutantes de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	117
5. Transformación de <i>Aspergillus fumigatus</i> y selección de cepas mutantes.....	121
5.1. Obtención de protoplastos de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	121
5.2. Transformación de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	122
5.3. Aislamiento y selección de mutantes de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	123
5.4. Minipreparación de ADNg a partir de protoplastos para análisis por PCR.....	123
5.5. Obtención de cepas PyrG <sup>-</sup> a partir de cepas mutantes PyrG <sup>+</sup> .....	123
6. Obtención de cepas mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	124
6.1. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	124
6.2. Plásmidos utilizados para transformar <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	125
6.3. Obtención de ADN de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para analizar por PCR.....	127
7. Obtención y análisis de proteínas.....	128
7.1. Obtención de proteínas de micelio de <i>Aspergillus fumigatus</i> en condiciones desnaturalizantes....	128
7.2. Obtención de proteínas de micelio de <i>Aspergillus fumigatus</i> en condiciones nativas.....	129
7.3. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a IgG-Sepharosa.....	130
7.4. Análisis de las proteínas por Western-blot.....	131
7.5. Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata.....	131
7.6. Determinación de huella peptídica mediante LC-MS/MS.....	132
8. Cuantificación relativa de ROS ( <i>Reactive Oxygen Species</i> ).....	132
9. Ensayos de virulencia en un modelo murino de aspergilosis invasora.....	133
FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	135
BIBLIOGRAFÍA.....	149

## INTRODUCCIÓN

---



## 1. Adquisición de metales por metaloproteínas

Las metaloproteínas son proteínas que para cumplir su función requieren la presencia de un ion metálico. En algunos casos, el metal es parte del sitio activo; en otros, el metal parece tener una función estructural (Harding, 2004).

La distribución y disponibilidad de los elementos metálicos en el suelo está condicionada por su abundancia relativa en el ambiente y factores físico-químicos, principalmente el pH y el potencial redox. La disponibilidad de los elementos metálicos debida a estos factores ha cambiado a lo largo de la historia geológica del planeta. Por ejemplo, las condiciones anóxicas y reductoras de los océanos primitivos favorecieron que la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  fuera mucho más alta que en los océanos actuales, mientras que la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  en los océanos primitivos eran mucho más baja que en los actuales (Williams, 2006). Aunque los mecanismos de distribución de los metales en las células es mucho más compleja que en los suelos, debido a que las células deben ser capaces de controlar las interacciones de los distintos iones metálicos entre ellos mismos y con los diferentes componentes celulares orgánicos, los cambios geológicos ocurridos en la Tierra han quedado reflejados durante la evolución biológica en el metaloproteoma de los organismos actuales. De hecho, esto explica que metales como el  $\text{Fe}^{2+}$  sean más frecuentes en el metaloproteoma de procariontes, mientras que el  $\text{Zn}^{2+}$  es mucho más frecuente en metaloproteoma de eucariotas (Dupont *et al.*, 2006). El 5-6% de las proteínas de los proteomas procariontes y el 9% de los proteomas eucariotas corresponden a metaloproteínas que requieren zinc (Andreini *et al.*, 2006; Andreini *et al.*, 2009).

Se ha estimado que el 40% de las proteínas con estructura 3D conocida requieren un ión metálico (Rosato *et al.*, 2016). Los metales se unen a las apoproteínas (metaloproteínas sin su cofactor metálico) mediante interacciones electrostáticas o enlaces de coordinación para formar metaloproteínas maduras y funcionales. Este tipo de interacción de los metales con ciertos grupos químicos o ligandos de las metaloproteínas puede resultar en geometrías de coordinación muy variadas, por lo que las células han desarrollado mecanismos más o menos elaborados para garantizar la adquisición del metal correcto en cantidad suficiente para satisfacer sus necesidades (Waldron and Robinson, 2009; Waldron *et al.*, 2009).

La adquisición del metal correcto por las apoproteínas depende de factores relacionados con las proteínas y con los metales. Entre los factores relacionados con las proteínas se pueden mencionar los siguientes:

### 1. Accesibilidad al sitio de unión del metal después del plegamiento de la proteína.

Los sitios de unión del metal pueden ser ocultos, si dificultan el intercambio de metales,

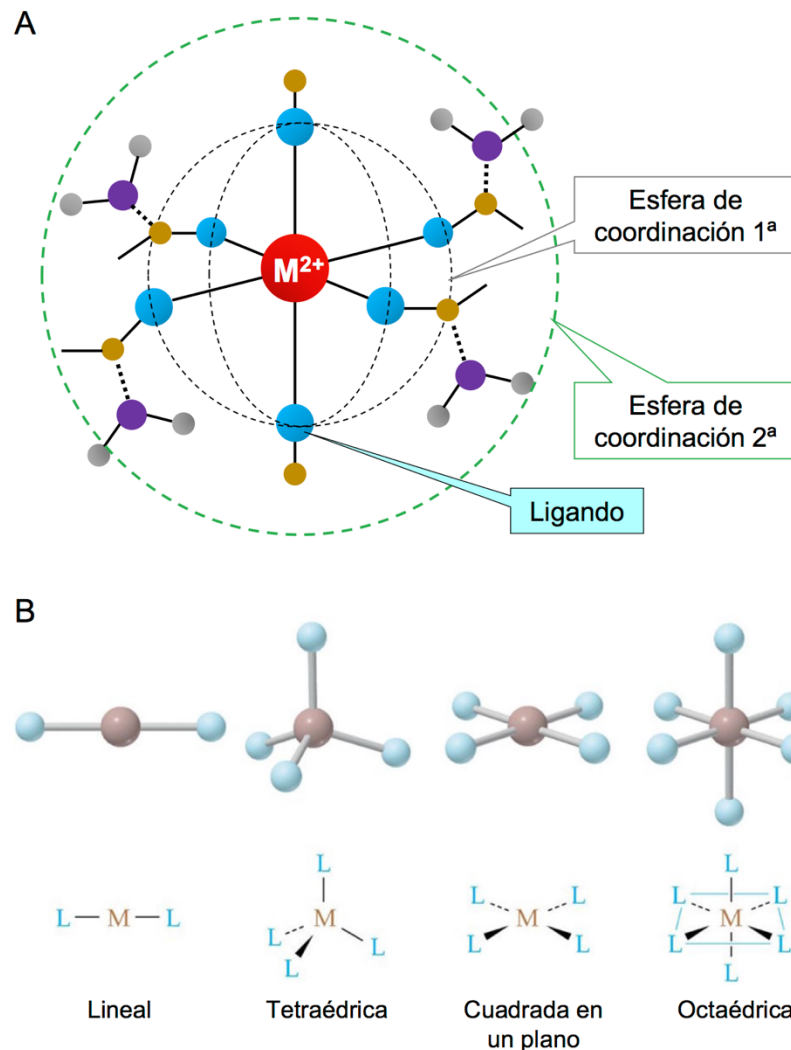
o accesibles, si permiten el intercambio de metales. Los accesibles suelen estar presentes en proteínas implicadas directamente en homeostasis de metales.

2. **Los ligandos donadores que forman las esferas de coordinación primaria y secundaria.** Los ligandos que coordinan al metal forman la esfera de coordinación primaria del complejo, mientras que los contra-iones que la rodean forman la esfera de coordinación secundaria (Figura 11.A) (Harding, 2004; Laitaoja *et al.*, 2013). El conjunto puede ser neutro, catiónico o aniónico. Los ligandos donadores son el O, N y S siendo los menos estables los ligandos de O y los más estables los de S (Andreini *et al.*, 2008; Waldron *et al.*, 2009). Los ligandos que forman la esfera de coordinación primaria pueden favorecer la inserción del metal correcto, la formación de la esfera de coordinación secundaria y la geometría de coordinación que mejor se ajusta al metal (Figura 11.B). Esto puede ocurrir en proteínas ya plegadas (si la geometría de la esfera de coordinación es relativamente rígida) o durante el plegamiento (si la formación de la geometría de coordinación correcta no tiene restricciones termodinámicas que lo impidan). No obstante, debido a que las proteínas son flexibles, es posible que ocurran plegamientos imperfectos que permitan la formación de esferas de coordinación primarias alternativas y la selección incorrecta de metales, especialmente durante su síntesis o en apoproteínas recién sintetizadas que aún no han completado su plegamiento (Totter *et al.*, 2008).

Entre los factores relacionados con los metales se pueden mencionar el **tamaño (radio)** y **carga** de los metales y la **afinidad relativa** de éstos por las proteínas. Debido a que las proteínas son flexibles, ofrecen una selección estérica imperfecta de los metales, especialmente durante las primeras etapas de su biosíntesis en el ribosoma y antes de su plegamiento. Precisamente, es en este momento cuando la afinidad relativa de los metales por las proteínas obedece a un orden de preferencia universal que, para los metales de transición divalentes, se denomina **serie Irving-Williams** ( $Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+}$ ) (Irving and Williams, 1953). De acuerdo a este criterio, el metal que se une con menos afinidad a las proteínas es el  $Mn^{2+}$  mientras que el que se une con más afinidad es el  $Cu^{2+}$  (aunque todos estos metales, excepto el zinc, pueden tener varios estados de oxidación, a lo largo de la memoria se aludirá, salvo indicación expresa, únicamente a la forma divalente de sus cationes,  $M^{2+}$ ).

Durante la síntesis de metaloproteínas, con frecuencia el mayor desafío para las células no es seleccionar el metal correcto que debe incorporarse a una determinada metaloproteína, sino prevenir la incorporación del metal incorrecto en dicha metaloproteína (Waldron *et al.*, 2009).



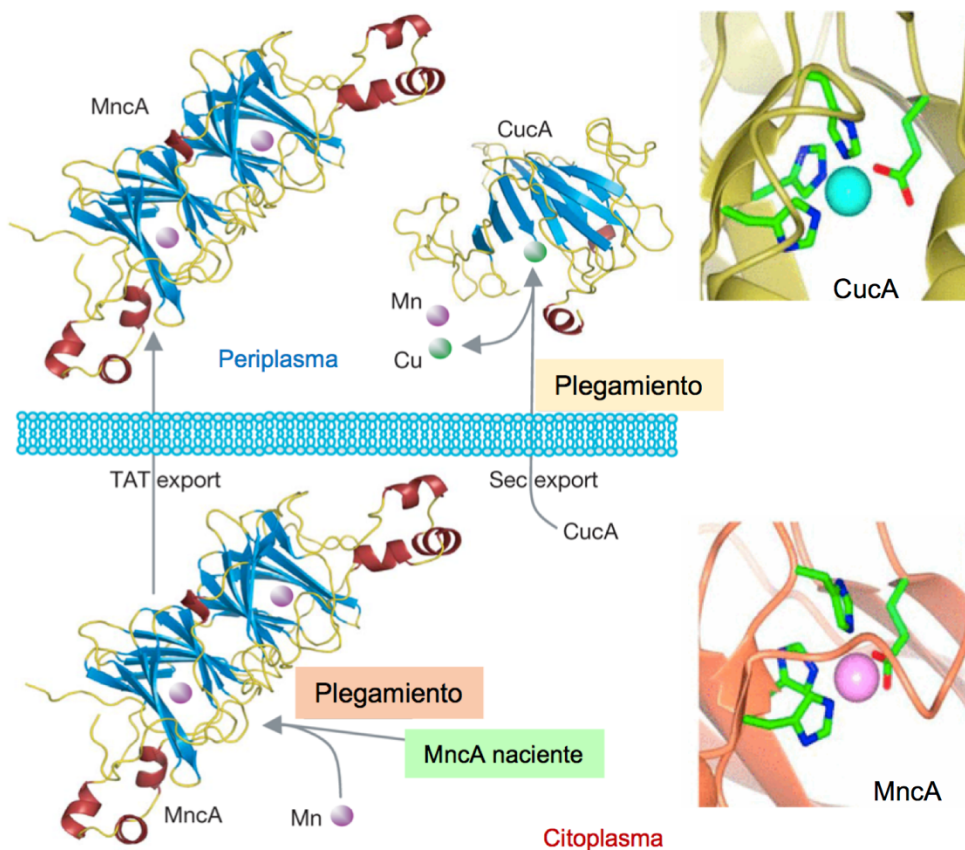


**Figura 11. Enlaces de coordinación entre metales y proteínas. (A)** Esfera de coordinación primaria y secundaria. **(B)** Geometrías de coordinación más comunes.

Para garantizar la incorporación del metal correcto en una metaloproteína, las células utilizan diferentes estrategias entre las que se encuentran:

- 1. Selección condicionada por la localización subcelular donde se encuentran los metales.** La compartimentalización de los metales, especialmente los de alta afinidad como  $Zn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , previene que las proteínas nacientes no tengan acceso a estos metales.
- 2. Selección condicionada por el sitio donde se pliega la proteína.** En este caso la proteína naciente se pliega donde se encuentra el metal adecuado. El ejemplo mejor conocido para ilustrar de qué manera el sitio de plegamiento de las proteínas determina la selección del metal correcto es el caso de las proteínas MncA y CucA de *Synechocystis PCC6803* (Totter et al., 2008). Estas proteínas están localizadas en el periplasma de esta cianobacteria y tienen sitios idénticos de unión del metal (Foster et

al., 2014) (Figura 2I). Sin embargo, en el periplasma la proteína CucA sólo une  $\text{Cu}^{2+}$  mientras que MncA sólo une  $\text{Mn}^{2+}$ , aunque *in vitro* MncA une  $\text{Cu}^{2+}$  en vez de  $\text{Mn}^{2+}$  siendo necesario incrementar  $10^4$  veces la relación molar Cu:Mn ( $1:10^4$ ) para que MncA adquiera  $\text{Mn}^{2+}$ . La razón por la cual MncA une  $\text{Mn}^{2+}$  en vez de  $\text{Cu}^{2+}$  es que MncA se exporta al periplasma por el sistema *Tat* (*twin-arginine translocase*), que exporta proteínas ya plegadas que han adquirido el  $\text{Mn}^{2+}$  previamente en el citoplasma (Figura 2I). Por el contrario, CucA se exporta al periplasma por el sistema *Sec* (*general secretory pathway*), donde adquiere el  $\text{Cu}^{2+}$  a la vez que se produce el plegamiento. Esto también demuestra que los metales más competitivos no se encuentran libres en el citoplasma celular. Además, el análisis cristalográfico de la holoproteína MncA reveló que el sitio de unión del metal se encuentra oculto dentro de ella (Tottey *et al.*, 2008). Precisamente, esto evita el intercambio del  $\text{Mn}^{2+}$  por otro metal más competitivo, de manera que una vez que la proteína ha unido el  $\text{Mn}^{2+}$  (en ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$ ), restricciones cinéticas impiden que un metal tan competitivo como  $\text{Cu}^{2+}$  pueda reemplazar al  $\text{Mn}^{2+}$ . Esto también nos dice que el metal correcto siempre debe quedar atrapado en primer lugar, especialmente si es poco competitivo.



**Figura 2I.** Estrategia de adquisición de Mn y Cu por las proteínas MncA y CucA de *Synechocystis*, respectivamente. Modificados a partir de Tottey *et al* (2008) y Foster *et al* (2014).

- 3. Selección condicionada por la afinidad relativa de proteínas homeostáticas.** Las proteínas reguladoras de homeostasis de metales, particularmente la de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , tienen alta afinidad por los metales. En procariotas, la proteína reguladora de cobre CueR tiene una sensibilidad zeptomolar ( $10^{-21}$ ) por el  $\text{Cu}^{2+}$ , lo que representa menos de un átomo de  $\text{Cu}^{2+}$  por célula (Changela *et al.*, 2003), mientras que la concentración que desencadena la transcripción de la maquinaria de absorción o eflujo de  $\text{Zn}^{2+}$  es del orden femtomolar ( $10^{-15}$ ) (Outten and O'Halloran, 2001). La función de los sensores/reguladores homeostáticos de metales es cuantificar con precisión la cantidad de átomos de los correspondientes metales que se encuentran dentro de las células, para procurar que el número de átomos de cada metal (especialmente de los más competitivos) presentes en el citoplasma (u otros compartimentos celulares) se ajuste a su demanda en virtud del nº de proteínas que realmente los necesitan, de manera que éstas puedan competir eficazmente con otras proteínas con menor afinidad relativa por el metal.
- 4. Discriminación de metales mediada por cambios alostéricos.** La selección de metales basada en cambios alostéricos inducidos por metales específicos se basa en que, aunque las proteínas homeostáticas (generalmente sensores y/o reguladores) puedan unir diversos metales con órdenes de afinidades acordes a lo que dicta la serie *Irving-Williams*, sólo la unión del metal correcto permite que se adquiera la conformación óptima para alterar alostéricamente la unión al sustrato. Por ejemplo, el represor NmtR de *Mycobacterium tuberculosis* detecta *in vivo* el exceso de  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  (Cavet *et al.*, 2002). Sin embargo, según lo esperado de acuerdo a la serie *Irving-Williams*, NmtR tiene más afinidad por  $\text{Zn}^{2+}$  (que no detecta *in vivo*) que por  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ . En la unión de  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$  por NmtR participan 6 residuos, mientras que en la unión del  $\text{Zn}^{2+}$  sólo participan 4 de los 6 residuos implicados en la unión de  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ . Sin embargo, aunque el  $\text{Zn}^{2+}$  se une más fuertemente a NmtR que el  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ , lo hace de una manera diferente a como se unen estos últimos: la unión de  $\text{Co}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$  (geometría de coordinación octaédrica) causa un cambio conformacional en NmtR que impide su unión al DNA, mientras que la unión del  $\text{Zn}^{2+}$  (geometría de coordinación tetraédrica) no altera la conformación de NmtR y permite su unión al DNA (Cavet *et al.*, 2002).
- 5. Discriminación de metales mediada por interacciones proteína-proteína.** La especificidad mediada por contactos entre proteínas se basa en que cuando una proteína homeostática interacciona específicamente con otra (ej. un sensor al que cede el metal o un transportador del que lo recibe) previene que terceras proteínas tengan acceso al metal. Además, algunos metales son tan competitivos (ej.  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ) que no pueden ser simplemente liberados en el citoplasma por sus transportadores para que sean incorporados por las relativamente pocas proteínas que los necesitan, sino que

deben ser conducidos y transferidos directamente a ellas mediante unas proteínas accesorias denominadas **metalochaperonas** (Waldron and Robinson, 2009; Waldron *et al.*, 2009). Por ejemplo, Atx1 es una metalochaperona de  $\text{Cu}^{2+}$  que interacciona específicamente con el transportador de cobre PacS pero no con el transportador de zinc ZiaA de *Synechocystis PCC6803*, cuyo dominio de unión de zinc une  $\text{Cu}^{2+}$  más fuertemente que  $\text{Zn}^{2+}$ . Precisamente, la gran especificidad de la interacción Atx1-PacS es lo que evita que ZiaA tenga acceso al  $\text{Cu}^{2+}$  de Atx1 (Borrelly *et al.*, 2004).

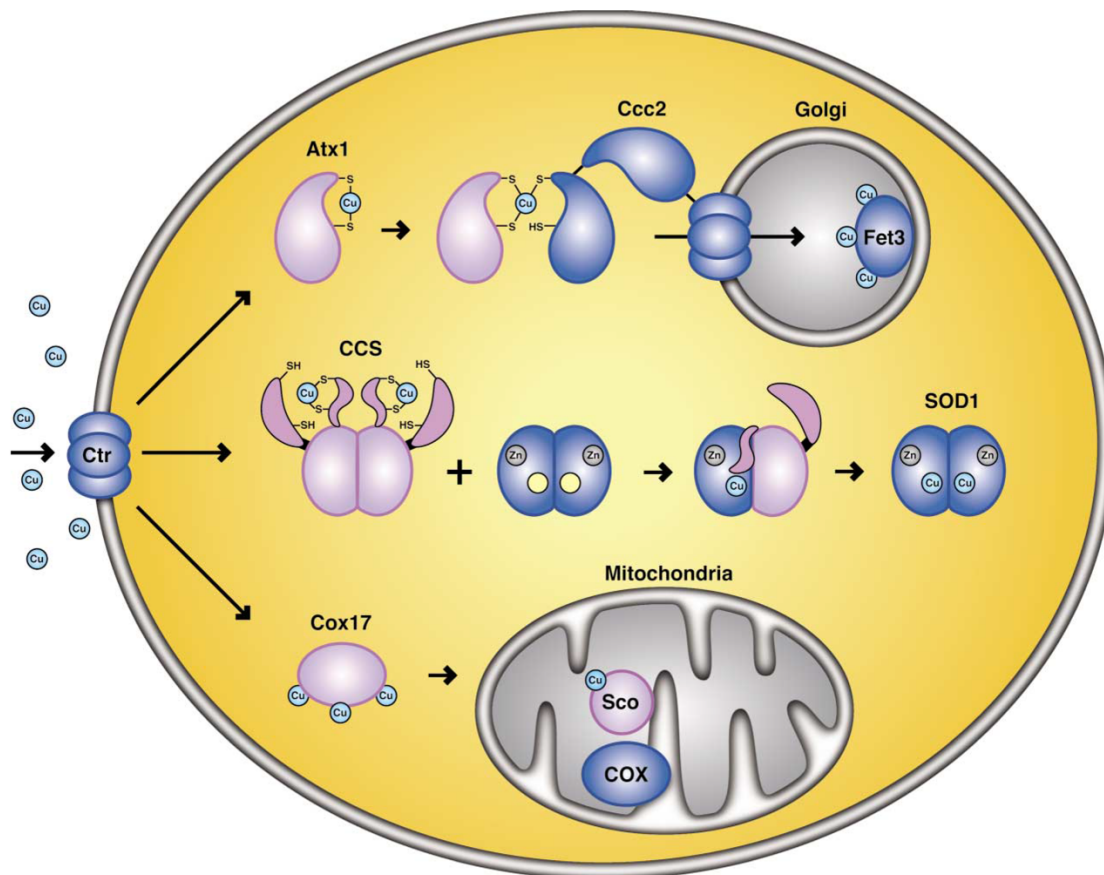
## 2. Metalochaperonas

Las **metalochaperonas** son proteínas receptoras de metales que actúan en el tráfico intracelular de iones metálicos, protegiendo y conduciendo a los iones metálicos hasta las apoproteínas adecuadas y facilitando la transferencia de los metales a las apoproteínas diana mediante interacciones específicas proteína-proteína (O'Halloran and Culotta, 2000).

El  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Ni}^{2+}$  son metales tan competitivos que normalmente no se encuentran libres en el citoplasma celular para evitar su unión inespecífica a cualquier proteína que necesite metales menos competitivos y su inactivación. Además, el número de proteínas celulares que requieren  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$  es muy bajo tanto en términos relativos como absolutos. De hecho, tan sólo se conocen ~25 enzimas distintas (procariotas y eucariotas) que requieren  $\text{Cu}^{2+}$  (Tishchenko *et al.*, 2016) y 9 que requieren  $\text{Ni}^{2+}$  (Ragsdale, 2009), de las cuales tan sólo tres (*glioxilasa*, *acirreductona dioxigenasa* y *ureasa*) se encuentran en células eucariotas. Por tanto, no es sorprendente que las proteínas que requieren  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$  tengan metalochaperonas específicas. De hecho, las mejor caracterizadas son las metalochaperonas de cobre de *Saccharomyces cerevisiae* y las metalochaperonas de níquel bacterianas.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee al menos tres metalochaperonas de cobre que toman directamente el cobre a partir del transportador de membrana Ctr1 (Atx1, CCS y Cox17) (Rosenzweig and O'Halloran, 2000; Rosenzweig, 2002; Robinson and Winge, 2010) (Figura 3I). La **metalochaperona Atx1** transfiere el  $\text{Cu}^{2+}$  a la ATPasa Ccc2 transportadora de  $\text{Cu}^{2+}$  situada en la membrana del trans-Golgi y lo transloca dentro del Golgi, donde se inserta por un mecanismo desconocido en la oxidoreductasa Fet3 dependiente de cobre que está destinada a la superficie de la membrana plasmática (Fet3 está implicada en la reducción de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  durante la incorporación de  $\text{Fe}^{3+}$  por el transportador de hierro de alta afinidad Ftr1). De hecho, Ccc2 también se podría considerar una metalochaperona de cobre. Se han encontrado dos formas ortólogas de Ccc2 en humanos (ATP7A y ATP7B). Mutaciones en estos genes son responsables de

enfermedades relacionadas con alteraciones en el metabolismo del cobre como el síndrome de Menkes (deficiencia de cobre) y la enfermedad de Wilson (acumulación excesiva de cobre) (Hatori *et al.*, 2017). La **metalochaperona CCS** es un homodímero con tres dominios: el dominio N-terminal tiene un motivo MxCxxC que une el metal; un dominio central que es estructuralmente similar a su diana, la proteína Sod1 (*Cu/Zn superóxido dismutasa*), pero no tiene los residuos esenciales para la actividad SOD; un dominio C-terminal que tiene un motivo CxC cuyos residuos de cisteína forman el sitio de unión del cobre. La **metalochaperona Cox17** se encuentra en el citosol y une tres átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  mediante los motivos de unión CCxC. Esta implicada en la síntesis del enzima *citocromo c oxidasa*. Cuando accede al espacio intermembrana de la mitocondria transfiere los iones  $\text{Cu}^{2+}$  a Sco1 y Cox11, que son proteínas integrales de la membrana interna de la mitocondria.



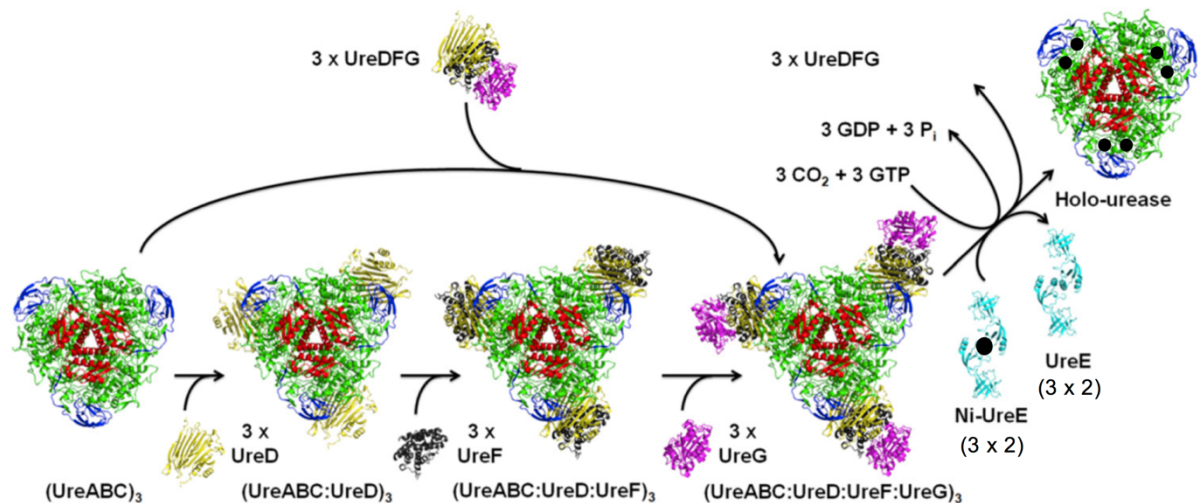
**Figura 31.** Función de las metalochaperonas de cobre de *Saccharomyces cerevisiae*. Tomado de Rosenzweig (2002).

Respecto a las metalochaperonas de níquel, las mejor conocidas son las que llevan y transfieren  $\text{Ni}^{2+}$  a los sitios activos de las [NiFe]-hidrogenasas y ureasas bacterianas. Las

**[NiFe]-hidrogenasas** suelen estar asociadas típicamente con la oxidación del  $H_2$  y se encuentran en bacterias aerobias y anaerobias y en arqueas, pero no en eucariotas. Requieren una serie de proteínas accesorias (SlyD y HypA-F) para el correcto ensamblaje del grupo catalítico (Peters *et al.*, 2015). **SlyD** es una *peptidil-prolil cis/trans isomerasa* (PPIasa) del tipo FKBP (FK506 *binding protein*) con propiedades de chaperona molecular. Se piensa que *in vivo* puede acumular iones  $Ni^{2+}$  mediante su región C-terminal rica en residuos de His y una de sus funciones es proporcionar  $Ni^{2+}$  a HypB durante la maduración de la [NiFe]-hidrogenasa (Cheng *et al.*, 2013). **HypB** es una GTPasa de la familia G3E que une un  $Ni^{2+}$  con alta afinidad mediante el motivo CXXCGC de su extremo amino, mientras que **HypA** funcionaría a modo de muelle de descarga del  $Ni^{2+}$  de HypB para después conducirlo e insertarlo en su sitio en la enzima. La transferencia del  $Ni^{2+}$  de HypB hacia HypA sólo se acelera cuando HypB está cargado con GDP (Douglas *et al.*, 2013).

La **ureasa** es una enzima dependiente de níquel que cataliza la hidrólisis de la urea para formar amonio y bicarbonato. La mayoría de las *ureasas* bacterianas (ej. *Klebsiella aerogenes*) están formadas por heterotrímeros (UreA/UreB/UreC) que a su vez se agrupan en trímeros formando una estructura tipo  $(UreABC)_3$  con tres centros catalíticos. No obstante, algunas *ureasas* bacterianas (ej. *Helicobacter pylori*) están formadas por dos tipos de subunidades, UreA y UreB que forman homodímeros (UreA/UreB) agrupados en trímeros  $(UreAB)_3$  que a su vez se agrupan formando un tetramero de trímeros  $[(UreAB)_3]_4$  que tiene 12 centros catalíticos (Ha *et al.*, 2001). El sitio activo de todas las *ureasas* se encuentra formado por 2 iones  $Ni^{2+}$  unidos por una lisina carbamilada y una molécula de  $H_2O$ . Por tanto, la *ureasa* de *K. aerogenes*  $(UreABC)_3$  contiene 6  $Ni^{2+}$  (3 sitios  $\times$  2  $Ni^{2+}$ ) y la de *H. pylori*  $[(UreAB)_3]_4$  24  $Ni^{2+}$  (12 sitios  $\times$  2  $Ni^{2+}$ ). Para el ensamblaje correcto de la *ureasa* se precisan 4 proteínas accesorias: UreE, UreF, UreG y UreD/UreH (UreH de *Helicobacter pylori* es el ortólogo de UreD en *K. aerogenes* y otras especies) (Figura 4I). Se ha propuesto que tanto UreG (GTPasa de la familia G3E) como UreE podrían funcionar como metalochaperonas encargadas de entregar los iones  $Ni^{2+}$  a la apoproteína en un proceso de activación dependiente de GTP (Farrugia *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015; Yuen *et al.*, 2017).

El  $Zn^{2+}$  es el metal más competitivo después del  $Cu^{2+}$ . Además, como en el caso del  $Cu^{2+}$ , la concentración de iones  $Zn^{2+}$  libres en el citoplasma celular es prácticamente cero (en procariontes) o extremadamente baja (en eucariotas), aunque la concentración intracelular de zinc total se encuentre entre 0,2-0,5 mM (Outten and O'Halloran, 2001; Eide, 2006; Maret, 2013). Por esta razón, resulta sorprendente que hasta ahora tan sólo se hayan descrito algunas proteínas (procariontes) que podrían actuar como metalochaperonas de  $Zn^{2+}$ .



**Figura 4I.** Representación esquemática del modelo de activación de la ureasa de *Klebsiella aerogenes*. La apoureasa es un trímero de trómeros que necesita 6 iones Ni<sup>2+</sup> para ser activa. Las proteínas UreD, UreF y UreG se unen secuencialmente a cada trómero. UreD actúa a modo de muelle de descarga de UreG por mediación de UreF. UreG es una GTPasa de la familia G3E que no exhibe actividad GTPasa hasta que se une a un dímero de UreE cargado de Ni<sup>2+</sup> en presencia de GTP y Mg<sup>2+</sup>. Cuando UreG se une al complejo Ni[UreE]<sub>2</sub> se hidroliza el GTP que se acopla a la carbamitación de la Lys del sitio activo de la ureasa y la transferencia e inserción de los iones Ni<sup>2+</sup> en el centro catalítico. El proceso se repite de nuevo hasta insertar todos los iones Ni<sup>2+</sup> que necesita la ureasa. Modificado a partir de [Farrugia et al \(2013\)](#).

Entre las metalochaperonas de zinc procariontas estudiadas hasta ahora figuran **ZntA** de *E. coli* (una ATPase tipo P de la clase MxCxxC) ([Shoshan and Tshuva, 2011](#)), algunas P-loop GTPasas de la subfamilia COG0523 tales como **YeiR** y **YjiA** de *E. coli* ([Blaby-Haas et al., 2012](#); [Sydor et al., 2013](#)), **ZigA** de *Acinetobacter baumannii* ([Nairn et al., 2016](#)) y **YciC/ZagA** de *B. subtilis* ([Chandrangsu et al., 2019](#)), y varias proteínas periplásmicas tales como:

- ✓ **ZnuA** de *E. coli*, que es el componente periplásmico del sistema ABC ZnuABC de captación y transporte de Zn<sup>2+</sup> ([Berducci et al., 2004](#); [Chandra et al., 2007](#)).
- ✓ **ZinT (YodA)** de *E. coli*, que es una proteína periplásmica que se expresa en condiciones muy limitantes en zinc y facilita la transferencia del Zn<sup>2+</sup> a ZnuA ([Graham et al., 2009](#); [Petarca et al., 2010](#)).
- ✓ **AztD** de *Paracoccus denitrificans*, que es una proteína periplásmica análoga a ZinT que transfiere Zn<sup>2+</sup> a AztC (componente periplásmico del sistema AztABC de *P. denitrificans*) ([Handali et al., 2015](#)).
- ✓ **ZraP (Yjal)** de *E. coli* y *Salmonella*, que es una proteína periplásmica que une Zn<sup>2+</sup> y reprime la expresión del sistema de los dos componentes ZraSR en medios repletos de zinc ([Appia-Ayme et al., 2012](#)).

### 3. Características estructurales de las proteínas COG0523

La base de datos COG (*Clusters of Orthologs Groups of protein*) se desarrolló con el fin de clasificar las proteínas ortólogas (con misma función y origen filogenético) deducidas a partir de la secuenciación de genomas completos de toda clase de organismos (Tatusov *et al.*, 2000). Las proteínas COG0523 corresponden a P-loop NTPasas pertenecientes a la familia G3E de la clase SIMIBI de la superclase de GTPasas. Por tanto, exhiben en su región N-terminal un **dominio GTPasa o dominio G** al que se une 1 molécula de GDP/GTP y 1  $Mg^{2+}$  y en el que se distinguen los 4 motivos conservados (motivos o regiones G) en todas las GTPasas (Leipe *et al.*, 2002; Haas *et al.*, 2009):

- ✓ La **región G1, motivo Walker A o P-loop** (*Phosphate-binding loop*) es **GxxxxGKS/T**. El *P-loop* envuelve los fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$  de GDP y GTP y el residuo **S/T** contribuye a coordinar el  $Mg^{2+}$ . En el caso de las proteínas COG0523 el motivo *P-loop* es **GxxGxGKS/T**.
- ✓ La **región G2, switch I o región efectora** normalmente contribuye con un residuo **S/T** a coordinar el  $Mg^{2+}$ . La función de este residuo es promover la unión selectiva de la GTPasa al GTP en relación al GDP o prevenir la hidrólisis prematura del GTP unido a la GTPasa. Esta región con frecuencia exhibe grandes diferencias estructurales en función de si se encuentra unido GTP o GDP. Por eso, a esta región también se llama *switch I*.
- ✓ La **región G3, switch II o motivo Walker B** es **hhhhD/ExxG** (h = residuos hidrófobos). El residuo **D/E** coordina indirectamente el  $Mg^{2+}$  mediante una molécula de agua. Acomoda el  $\gamma$ -fosfato del GTP y es esencial para la reacción de hidrólisis del GTP. Esta región exhibe grandes diferencias estructurales en función de si a la GTPasa se encuentra unido GTP o GDP y por eso a esta región también se la llama *switch II*. En el caso de las proteínas de la familia G3E el motivo de la región **G3** es **hhhExxG** (de ahí el nombre de la familia, **G3E**).
- ✓ La **región G4** es **hhhhN/TKxD**. Determina la especificidad del nucleótido formando puentes de H con los anillos de guanina. Sólo se encuentra en P-loop NTPasas de la superclase de las GTPasas.

Las GTPasas de la familia G3E, a diferencia de otras GTPasas, típicamente funcionan como homodímeros. La homodimerización puede ser independiente o dependiente de nucleótido. Cuando la homodimerización es dependiente de nucleótido, unen un metal mediante un motivo de unión a metales situado en la región efectora. El metal contribuye a la homodimerización estableciendo un puente metálico en la interfaz entre los dos monómeros. Teniendo en cuenta el mecanismo de homodimerización, las GTPasas de la



familia G3E se clasifican en 4 subfamilias (Haas *et al.*, 2009): **MeaB/ArgK**, **UreG**, **HypB** y **COG0523**. Las proteínas pertenecientes a las 4 subfamilias se encuentran ampliamente distribuidas en el dominio Bacteria y de manera más limitada en los dominios Archaea y Eukarya. No obstante, las proteínas COG0523 en particular también están ampliamente distribuidas en la mayoría de los organismos eucariotas (microorganismos, plantas y animales, incluyendo la especie humana). De hecho, en la mayoría de los casos los eucariotas tienen entre 1-4 genes COG0523. Por ejemplo, el alga eucariota *Chlamydomonas reinhardtii* tiene 8; la especie humana tiene 6 (CBWD1-6; CBWD4 se considera un pseudogen por lo que sólo tiene 5 proteínas COG0523 distintas -CBWD1/2/3 y CBWD5/6- aunque con un grado de identidad entre ellas >97%) (Coneyworth *et al.*, 2012); la planta *Arabidopsis thaliana* y la levadura *Cryptococcus gattii* tienen tres, mientras que las levaduras *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* tienen tan sólo un gen COG0523 cada una.

De acuerdo a la clasificación de las proteínas COG0523 realizada por Haas *et al.* (2009), la mayoría de las proteínas COG0523 eucariotas conocidas pertenecen al grupo 5, incluyendo todas las proteínas COG0523 de *Homo sapiens*, *A. thaliana*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* y la mayoría (5/8) de las proteínas COG0523 de *C. reinhardtii*. Por otra parte, se ha demostrado que de los 8 genes COG0523 de *C. reinhardtii*, la expresión de dos de ellos (AHZ94341/ZCP1 y AHZ94342/ZCP2) se inducen fuertemente en medios limitantes en Zn<sup>2+</sup> (Haas *et al.*, 2009; Malasarn *et al.*, 2013). Los únicos estudios sobre las proteínas COG0523 en metazoos se han realizado en la especie humana. Se sabe que la expresión de toda la familia de genes CBWD humanos está reprimida por zinc (Coneyworth *et al.*, 2012), de lo que se deduce que las proteínas COG0523 humanas, igual que en procariontes, también parecen estar implicadas de alguna manera en homeostasis del zinc.

#### 4. Relación de las proteínas COG0523 con homeostasis de zinc

La primera proteína identificada perteneciente a la subfamilia COG0523 fue CobW de *Pseudomonas denitrificans*. Esta proteína está implicada en la síntesis aerobia de cobalamina. En consecuencia, todas las proteínas COG0523 que fueron surgiendo posteriormente como resultado de los proyectos de secuenciación de genomas procariontes y eucariotas quedaron anotadas errónea y sistemáticamente como proteínas implicadas en la síntesis de cobalamina. Sin embargo, tras un análisis filogenético y de genómica comparativa en el que se compararon las secuencias de proteínas COG0523 anotadas en la base de datos SEED (<http://pubseed.theseed.org/>) y codificadas en 282 operones de distintas especies de procariontes, con respecto a la función, regulación y sintenia de las

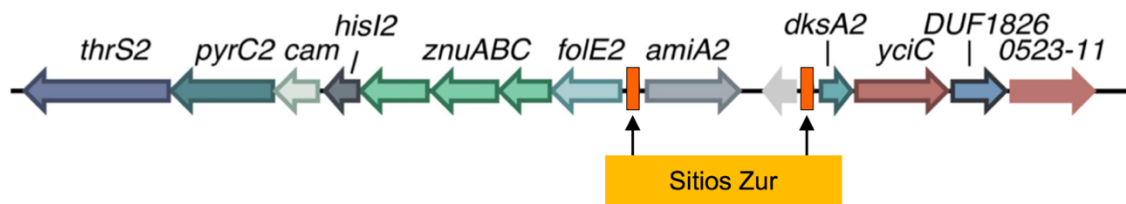
regiones codificantes presentes en dichos operones, permitió establecer 15 grupos de proteínas COG0523 (Haas *et al.*, 2009):

- ✓ Los **grupos 3, 4, 6, 7, 9, 13 y 15** representan el 58,5% de las proteínas COG0523 codificadas y están vinculadas a procesos desconocidos.
- ✓ El **grupo 2** representa tan sólo el 0,7% de las proteínas COG0523. Están vinculadas a la activación del enzima *nitrilo hidratasa* (NHasa), pero se desconoce su función exacta en el proceso. Las enzimas *nitrilo hidratasas* son importantes en la asimilación microbiana de nitrilos orgánicos y catalizan su conversión en las correspondientes amidas ( $R-CN \rightarrow R-CO-NH_2$ ). Se distinguen dos clases según el motivo conservado de unión del metal: el motivo CSLCSCT que une  $Fe^{3+}$  y el motivo CTLCSY que une  $Co^{2+}$ .
- ✓ El **grupo 12** representa el 12,5% de las proteínas COG0523. Están relacionadas de alguna manera con la síntesis de cobalamina (de ahí su denominación de proteínas Cob), pero se desconoce su función exacta en el proceso. En la mayoría de los casos los genes codificantes de estas proteínas COG0523 se encuentran adyacentes al gen codificante del enzima *cobalto quelatasa* (CobN) por lo que es posible que estén implicados en presentar el cobalto al enzima *cobalto quelatasa*. Sin embargo, también es posible que participen en la protección del  $CoB_{12}$  o bien en la inserción de un metal en alguna metaloenzima de la ruta (ej. Fe en CobG, un enzima dependiente de hierro).
- ✓ Los **grupos 1, 5, 8, 10, 11 y 14** representan el 28% de las proteínas COG0523. Están relacionadas de alguna manera con homeostasis del zinc, bien porque sus genes codificantes co-localizan con genes implicados en respuesta a escasez de  $Zn^{2+}$  (~20%) o porque se encuentran en **operones regulados por Zur** (~8%) (Zur es un sensor de  $Zn^{2+}$  y regulador transcripcional que cuando se satura de iones  $Zn^{2+}$  reprime la expresión de los genes *znuABC* del sistema ABC de adquisición de  $Zn^{2+}$ ).

Por tanto, las proteínas COG0523 de los grupos 1, 5, 8, 10, 11 y 14, que parecen estar ligadas de alguna manera con homeostasis del zinc, podrían ser auténticas metalochaperonas de zinc. En este sentido, el análisis del contexto genómico de varios genes COG0523 regulados por Zur en diferentes bacterias ha permitido identificar genes próximos o adyacentes también regulados por Zur que codifican enzimas parálogas de otras dependientes de  $Zn^{2+}$  que podrían ser las dianas de las correspondientes metalochaperonas de zinc (Figura 5I) (Haas *et al.*, 2009; Napolitano *et al.*, 2012). Entre estas figuran:

- ✓ **Enzimas independientes de zinc.** Su expresión se induce en medios limitantes en zinc. Son isoenzimas de otras dependientes de zinc (ej. FoIE, *GTP-ciclohidrolasa* de la síntesis del folato).
- ✓ **Proteínas ribosomales que no necesitan zinc.** Son parálogas de proteínas

ribosomales que unen zinc. Por ejemplo, las proteínas parálogas de L31 (designada L31\*, RpmEB), L33 (L33\*, RpmGC) o S14 (S14\*, RpsNB) de *Bacillus subtilis*.



**Figura 5l.** Cluster de operones Zur de *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 con genes COG0523. En uno de los operones de este cluster los genes *yciC* y *0523-11* (flechas rojas) codifican proteínas COG0523 pertenecientes a los grupos 1 y 11, respectivamente. Los posibles sitios de unión del regulador Zur se encuentran indicados con flechas. En el operón adyacente se encuentran genes que codifican FolE2 y parálogos de 6 de las 9 familias de enzimas descritas en la [Tabla 1l](#), concretamente los parálogos de AmiA (AmiA2), HisI (HisI2), Cam (Cam), PyrC (PyrC2), ThrS (ThrS2) y DksA (DksA2). Modificado a partir de [Haas et al \(2009\)](#).

- ✓ **Enzimas dependientes de zinc con parálogos codificados en un operón Zur.** Entre estas clase de enzimas, las que se encuentran con más frecuentes se hallan recopiladas en la [Tabla 1l](#). Los parálogos de [CysRS](#), [ThrRS](#), [AmiA](#), [HisI](#) y [QueD](#) conservan los sitios de unión de  $Zn^{2+}$ . Estas versiones alternativas podrían tener más afinidad por el  $Zn^{2+}$  y/o ser más activas que sus parálogos en condiciones de carencia de  $Zn^{2+}$  y/o su expresión podría servir para compensar la pérdida de actividad derivada de la escasez de  $Zn^{2+}$ . Los parálogos de [HemB](#) y [Cam](#) requieren metales alternativos distintos del  $Zn^{2+}$ . Los parálogos de [PyrC](#) y [DksA](#) han perdido los sitios de unión de  $Zn^{2+}$  lo que les permite funcionar incluso en ausencia de  $Zn^{2+}$ .

**Tabla 1l.** Enzimas dependientes de zinc con parálogos codificados en un operón Zur

Enzima	Proteína	Función	Paróloga	Características <sup>1</sup>
Cisteinil-tRNA sintetasa	CysRS	Síntesis Cys-tRNA	CysS2	Conserva el ZBS
Treonil-tRNA sintetasa	ThrRS	Síntesis Thr-tRNA	ThrS2	Conserva el ZBS
N-acetilmuramil-L-alanina amidasa	AmiA	Síntesis peptidoglicano	AmiA2	Conserva el ZBS
Fosforribosil-AMP ciclohrolasa	HisI	Metabolismo His	HisI2	Conserva el ZBS
6-piruvil-5,6,7,8-tetrahidropterina	QueD	Síntesis queuosina	QueD2	Conserva el ZBS
Porfobilinógeno sintetasa	HemB	Síntesis hemo	HemB2	Utiliza $Mg^{+}$ o $K^{+}$
$\gamma$ -anhidrasa carbónica	Cam	Síntesis bicarbonato	Cam	Utiliza $Fe^{2+}$
Dihidroorotato hidrolasa	PyrC	Síntesis pirimidinas	PyrC2	No une metales
Regulador C4-zinc finger	DksA	Factor transcripción	DksA2	No une metales

<sup>1</sup>ZBS, sitio de unión de zinc.

En resumen, las **GTPasas bacterianas de la subfamilia COG0523** podría ser necesarias en condiciones de carencia de zinc para incorporar  $Zn^{2+}$  en determinadas proteínas homeostáticas o bien para incorporar otro metal distinto del  $Zn^{2+}$  en proteínas estructurales o enzimas parálogas, alternativas a versiones dependientes de  $Zn^{2+}$ , con el fin de

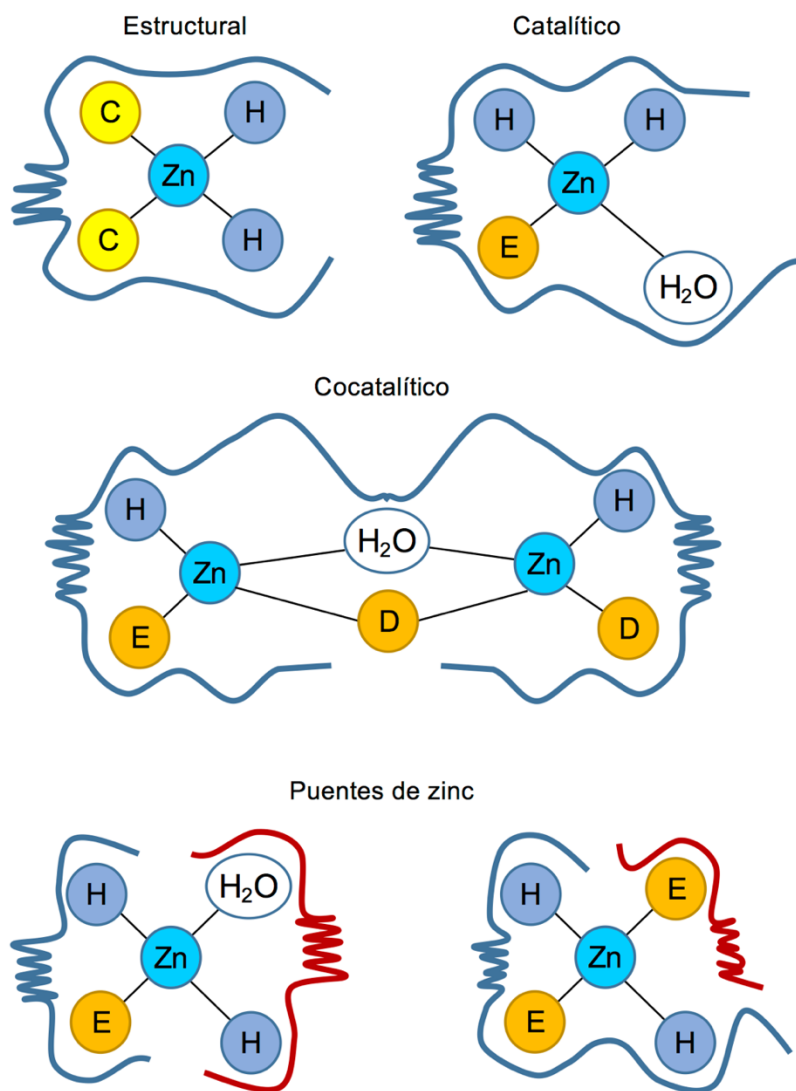
reemplazar o compensar el descenso de actividad de éstas últimas. Finalmente, otra posibilidad es que las proteínas COG0523 estén implicadas en la distribución y/o redistribución prioritaria del  $Zn^{2+}$  a favor de las proteínas más importantes y/o de las que no existen versiones alternativas (Haas *et al.*, 2009).

## 5. Funciones biológicas del zinc

El zinc tiene la subcapa *d* de su penúltima capa completa, pero tiene 2 electrones en la subcapa *s* de su última capa  $[1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^2]$ . Aunque el zinc puede perder los 2 electrones de la última capa para formar cationes  $Zn^{2+}$ , no puede perder electrones de la subcapa *d*. Por esta razón, **el zinc sólo puede presentar un estado de oxidación ( $Zn^{2+}$ )** lo que no le permite experimentar reacciones redox, al contrario que el hierro que tiene una subcapa *d* incompleta en su penúltima capa  $[1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^6 4s^2]$ , o el cobre, que tiene una subcapa *s* incompleta en su última capa  $[1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^1]$ . Esto explica que el zinc sea más estable que el cobre y el hierro en medios oxigenados y que participe en una mayor diversidad de procesos biológicos que el hierro o el cobre. De hecho, el zinc afecta a la actividad de una gran variedad de moléculas, incluyendo factores de transcripción, enzimas de todas las clases, adaptadores, transportadores, factores de crecimiento y sus receptores. Tras el análisis de la función y distribución de iones metálicos en 1371 enzimas de estructura conocida y depositadas una base de datos (hasta febrero de 2008) se encontró que el 47,5% eran metaloenzimas con los metales implicados en catálisis (40,7%) o requeridos para otras funciones (6,8%), siendo el zinc el segundo metal más frecuente después del magnesio (Andreini *et al.*, 2008).

Las proteínas dependientes de zinc son las metaloproteínas más abundantes y estructuralmente diversas en la naturaleza. Se estima que aproximadamente el 10% del proteoma humano (~2800-3000 proteínas) requieren zinc como cofactor para su función catalítica o para mantener su estabilidad o determinar la estructura terciaria o cuaternaria de la proteína (Andreini *et al.*, 2006; Maret, 2013). El estudio de los sitios de coordinación del  $Zn^{2+}$  en las proteínas dependientes de zinc ha permitido identificar cuatro tipos de sitios de unión de zinc: catalíticos, cocatalíticos, estructurales y puentes de zinc (Figura 6I) (Auld, 2001; Patel *et al.*, 2007; Auld, 2009; Maret and Li, 2009). Los aminoácidos ligandos más frecuentes son His, Glu, Asp y Cys. Los sitios catalíticos están formados generalmente por una molécula de agua y tres ligandos. Los sitios cocatalíticos se encuentran en enzimas que unen dos o más iones  $Zn^{2+}$  muy cerca unos de otros y que funcionan como una unidad catalítica; los ligandos más frecuentes en este tipo de sitios son Asp y His. Los sitios estructurales suelen implicar la coordinación del ión  $Zn^{2+}$  con residuos de Cys para formar

diversos tipos de *zinc-fingers*. Los sitios implicados en la formación de puentes de zinc se suelen encontrar en la interfaz entre dos proteínas, de manera que cada una aporta la mitad del sitio de unión de  $Zn^{2+}$ . Este tipo de sitios pueden estar implicados en la formación de la estructura cuaternaria de una proteína.



**Figura 6l. Tipos de sitios de unión de zinc en metaloproteínas.** Modificado a partir de Auld (2001). Los puentes de zinc se establecen entre proteínas distintas (indicadas en azul y rojo).

El control de la disponibilidad celular y la redistribución de los iones de  $Zn^{2+}$  es esencial en homeostasis celular del zinc y prevenir las consecuencias perjudiciales tanto de su deficiencia como de su exceso (Maret, 2013). Uno de los aspectos más importantes de este mecanismo de control está relacionado con el hecho de que la concentración intracelular de iones  $Zn^{2+}$  siempre debe mantenerse al mínimo para prevenir reacciones químicas indeseadas, para lo que deben existir ciertos compuestos y/o proteínas que

actúen de almacén temporal hasta que son utilizados en la síntesis de las metaloproteínas dependientes de zinc por un mecanismo que debe implicar la participación de metalochaperonas que controlan la entrega adecuada del metal a las proteínas diana (O'Halloran and Culotta, 2000).

### 5.1. Mecanismos generales de homeostasis del zinc en eucariotas

La cuota de zinc se define como el contenido total de zinc que requiere una célula para su óptimo crecimiento (Outten and O'Halloran, 2001). La cuota de zinc para levaduras se ha estimado en  $10^7$  átomos por célula mientras que para células de mamífero es de  $10^8$  átomos por célula (MacDiarmid *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006). Cuando se ajusta la cantidad por el volumen dependiendo del tipo de célula, la cantidad de zinc requerido es, en todos los casos, del orden de 0,2 a 0,5 mM. En condiciones normales de crecimiento el zinc celular se encuentra unido mayoritariamente a proteínas, aunque también puede unirse débilmente con lípidos, ácidos nucleicos o compuestos de bajo peso molecular como aniones orgánicos, aminoácidos o glutatión. Por lo tanto, la cantidad de zinc libre intracelular se encuentra entre  $10^{-5}$  y  $10^{-12}$  M (Eide, 2006; Williams, 2006).

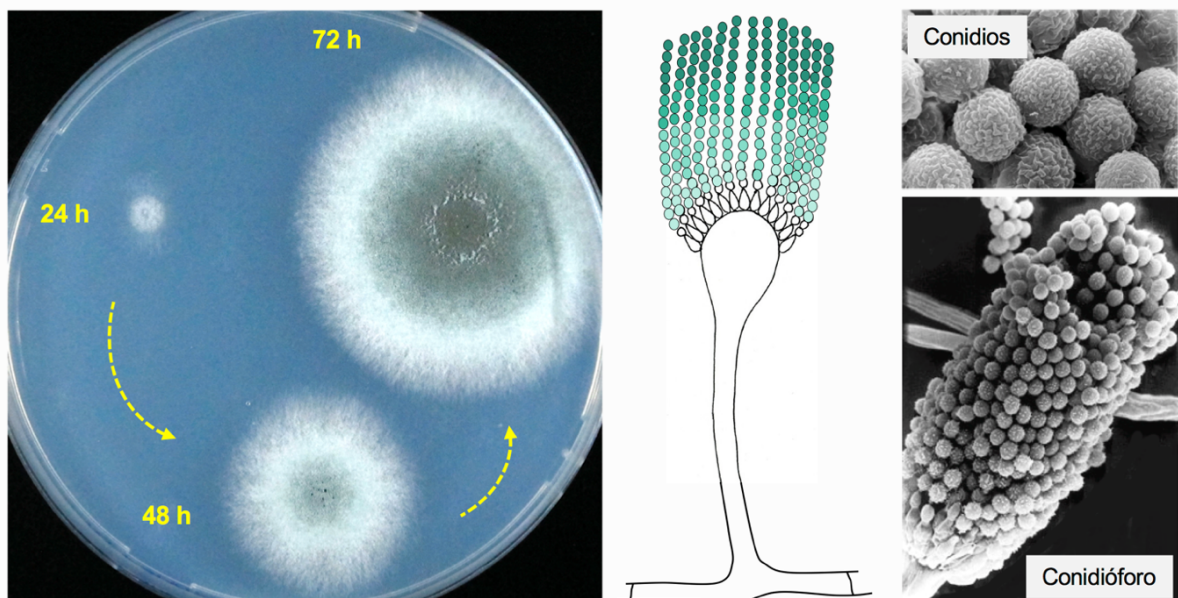
La mayoría de las metaloproteínas tienen una afinidad por el zinc en el rango nano o picomolar. Aunque los mecanismos intracelulares mediante los cuales el zinc se detecta, almacena, y/o incorpora como cofactor en las metaloproteínas son muy poco conocidos, las células controlan con precisión la concentración intracelular de iones  $Zn^{2+}$  con el fin de ajustar el balance entre la adquisición de nuevos iones  $Zn^{2+}$ , movilización de iones  $Zn^{2+}$  almacenados y eliminación de los iones en exceso a las necesidades celulares (Eide, 2009). Para ello, el control de homeostasis de zinc en las células depende de la acción concertada de:

1. Un **factor de transcripción principal** que suelen funcionar como sensor intracelular de zinc y que tiene una afinidad por el zinc en el rango pico-femtomolar. Además, otros factores de transcripción pueden modular la respuesta adaptativa a la disponibilidad de zinc en función de ciertas condiciones ambientales como el pH o la disponibilidad de otros metales (ej. Fe).
2. **Transportadores de zinc de la familia ZIP** (*Zrt-like proteins*). Estas proteínas transportan  $Zn^{2+}$  desde el espacio extracelular o el lumen de ciertos orgánulos (ej. vacuola) al citoplasma. Incrementan la concentración citoplásmica de zinc.
3. **Transportadores de zinc de la familia CDF** (*Cation diffusion facilitator*). Estas proteínas transportan  $Zn^{2+}$  desde el citoplasma al espacio extracelular o al lumen de los orgánulos. Reducen la concentración citoplásmica de zinc.

4. **Proteínas quelantes de zinc** tales como las metalotioneinas. Son una superfamilia de proteínas de bajo peso molecular con numerosos residuos de cisteína que pueden unir varios iones  $Zn^{2+}$  (Vasak, 2005).

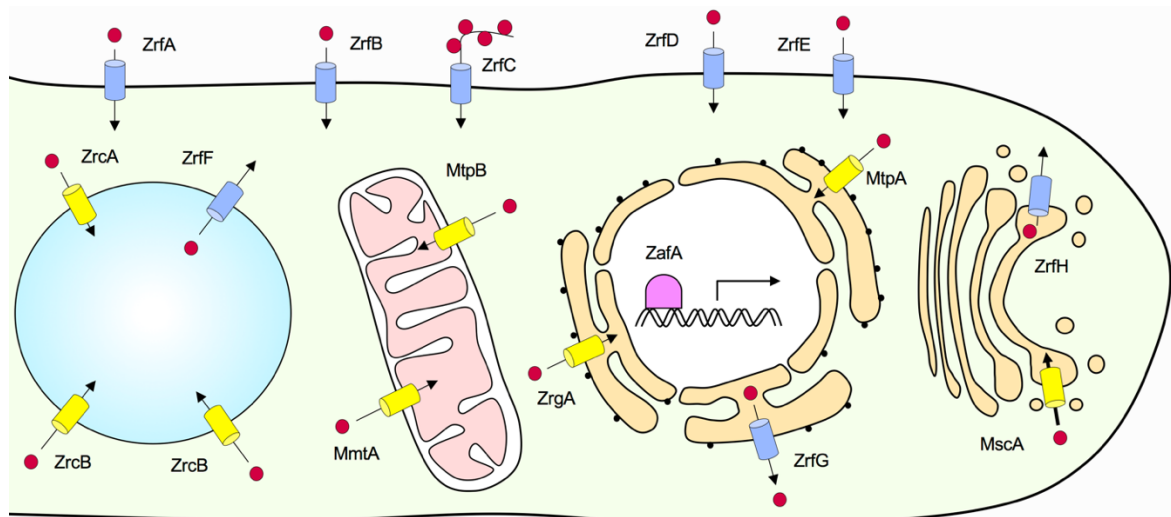
## 5.2. Homeostasis del zinc en *Aspergillus fumigatus*

*Aspergillus fumigatus* es un microorganismo eucariota que filogenéticamente se ubica entre los hongos filamentosos del *Phylum Ascomycota*, *Subphylum Pezizomycotina*, *Clase Eurotiomycetes*, *Orden Eurotiales* y *Familia Trichocomaceae* (Fitzpatrick *et al.*, 2006; Samson *et al.*, 2014). *Aspergillus fumigatus* se reproduce asexualmente mediante la formación de pequeñas esporas (2-4  $\mu\text{m}$ ) uninucleadas y haploides denominadas **conidios** (Figura 7).



**Figura 7.** Desarrollo de *Aspergillus fumigatus*. Esporas de *A. fumigatus* ( $10^3$ ) se cultivaron durante 24, 48 y 72 horas en la misma placa de medio mínimo a 37 °C. Ilustración de un conidióforo sobre el que se forman miles de conidios de color verde oscuro y detalle de los mismos observados mediante microscopía de barrido.

El regulador principal de homeostasis de zinc en *Aspergillus fumigatus* es el factor de transcripción ZafA, que también funciona como sensor de zinc. Además, *A. fumigatus* posee 8 genes que codifican transportadores de la familia ZIP (ZrfA-ZrfH) y 8 genes que codifican permeasas de la familia CDF (*zrcA*, *zrcB*, *zrcC*, *mScA*, *zrgA*, *mmtA*, *mtpA* y *mtpB*) (Figura 8) (Amich and Calera, 2014).



**Figura 8I.** Representación esquemática de los principales componentes de homeostasis de zinc en *A. fumigatus*. Tomada de Amich and Calera (2014).

El factor ZafA regula la respuesta homeostática y adaptativa de *A. fumigatus* en condiciones de escasez de zinc (Vicentefranqueira *et al.*, 2018). En condiciones limitantes de zinc ZafA regula directamente la expresión de aproximadamente 150 genes de *A. fumigatus* e indirectamente la de aproximadamente 110 genes (Vicentefranqueira *et al.*, 2018). El gen *zafA* tiene dos unidades transcripcionales (L y S) cuya transcripción genera dos clases de mRNAs: (1) S-mRNAs, cuyo primer AUG codifica el N-terminal de la proteína ZafA; (2) L-mRNAs, que tienen 3-5 AUGs fuera de fase antes del AUG en fase (Vicentefranqueira *et al.*, 2019). Cuando *A. fumigatus* crece en medios no limitantes en zinc, sintetiza una cantidad basal del factor ZafA que se encuentra saturado de iones  $Zn^{2+}$  y excluida del núcleo en una conformación transcripcionalmente inactiva. La síntesis de esta cantidad basal de ZafA en medios no limitantes en zinc es resultado de una traducción ineficiente de los transcritos L (Vicentefranqueira *et al.*, 2019). Sin embargo, en condiciones de carencia de zinc la pequeña cantidad de ZafA presente en el citoplasma pierde los iones  $Zn^{2+}$  y se transloca al núcleo en una conformación transcripcionalmente activa donde se une a los motivos de respuesta a zinc (ZR, 5'-DYYVYCARGGTVYYY-3') localizados en la región promotora de su propio gen codificante *zafA* y se induce fuertemente la expresión de la unidad transcripcional S, a la vez que reprime la expresión de la unidad transcripcional L. Como resultado de este proceso se incrementa dramáticamente la síntesis de ZafA, el cual se une a los motivos ZR presentes en las regiones promotoras de los genes *zrfA*, *zrfB*, *zrfC* y *zrfF* e induce su expresión (Vicentefranqueira *et al.*, 2018). Estos genes codifican los transportadores de zinc de la familia ZIP ZrfA, ZrfB y ZrfC, localizados en la membrana plasmática, y de ZrfF, localizado en la membrana de la vacuola. Adicionalmente, en



condiciones de carencia de zinc ZafA se une al motivo ZR del gen *zrcA*, que codifica el transportador de zinc de la familia CDF ZrcA localizado en la membrana de la vacuola, y reprime su expresión (Vicentefranqueira *et al.*, 2018). El nivel de expresión de los genes que codifican las restantes proteínas ZIP y CDF no está influenciado por ZafA. Por otra parte, mientras que la expresión de *zrff* es independiente del pH ambiental, el nivel de expresión de *zrfA*, *zrfB* y *zrfC* en condiciones de escasez de zinc está muy influenciado por el pH ambiental mediante un mecanismo modulado por el factor PacC de *A. fumigatus* (Amich *et al.*, 2009; Amich *et al.*, 2010; Toledo, 2017). El nivel de expresión de los genes *zrfA* y *zrfB* alcanza su máximo en medios ácidos limitantes en zinc (Vicentefranqueira *et al.*, 2005), mientras que *zrfC* se expresa sólo y exclusivamente en medios alcalinos limitantes en zinc, puesto que este gen codifica una proteína adaptada específicamente a secuestrar zinc de medios alcalinos (Amich *et al.*, 2010). Más recientemente hemos demostrado que la regulación de homeostasis del zinc y del hierro está interrelacionada, de manera que cuando el hongo crece en un medio no limitante en zinc en condiciones de carencia de hierro, el nivel basal de expresión de ZafA se reduce al máximo para prevenir la intoxicación por zinc durante la carencia de hierro y que este proceso parece depender del factor HapX (Vicentefranqueira *et al.*, 2019), que es uno de los reguladores más importante de homeostasis de hierro en *A. fumigatus* (Schrettl *et al.*, 2010).

Además de los genes que codifican proteínas homeostáticas, ZafA induce directamente la expresión de otros genes, muchos de los cuales con función desconocida. Precisamente, uno de los genes con función desconocida más fuertemente inducido por ZafA en condiciones de carencia de zinc es AFUA\_8G02620, que codifica una proteína COG0523 (Vicentefranqueira *et al.*, 2018).

## **6. Importancia del mantenimiento de homeostasis del zinc para la virulencia de *Aspergillus fumigatus***

El pequeño tamaño de los conidios de *A. fumigatus* permite que estos puedan ser inhalados por las personas alcanzando fácilmente los alveolos pulmonares. En un hospedante inmunocompetente, los conidios son fagocitados y eliminados eficazmente por la acción de los macrófagos alveolares (Ibrahim-Granet *et al.*, 2003). Sin embargo, en individuos inmunosuprimidos los conidios pueden germinar e invadir el tejido pulmonar causando **aspergilosis pulmonar invasora (API)**. En una etapa posterior las hifas de *A. fumigatus* podrían invadir los vasos sanguíneos pulmonares permitiendo que fragmentos de hifas puedan alcanzar otros órganos, causando de esta manera la **aspergilosis diseminada (AD)**. Tanto la API como la AD son enfermedades muy graves y difíciles de combatir con

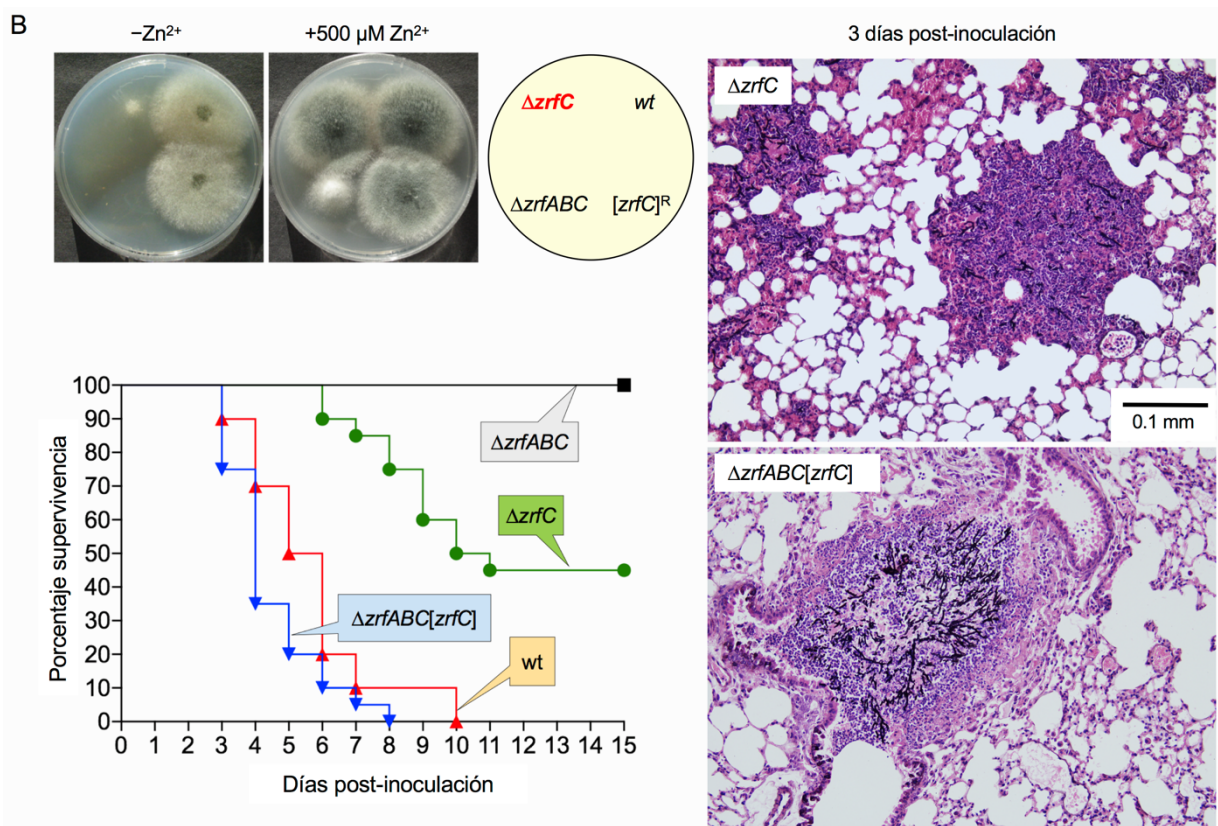
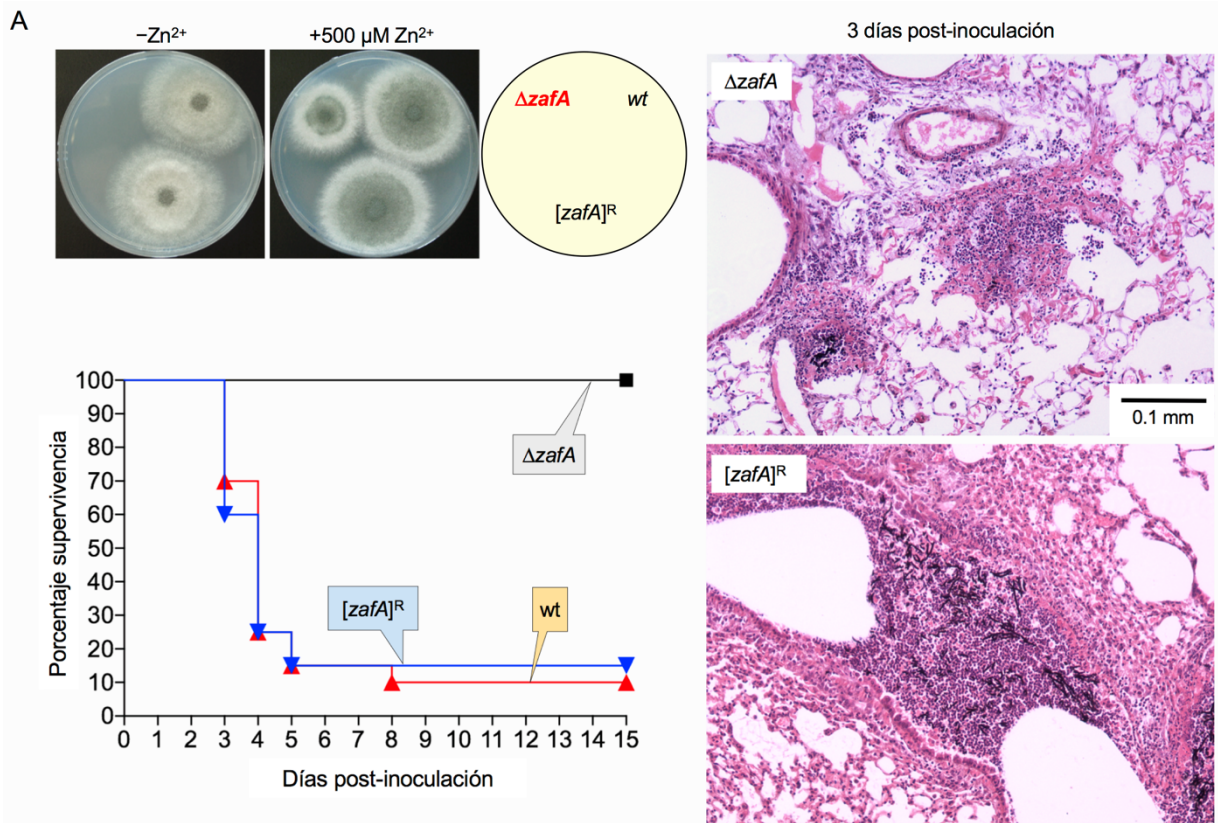
las terapias antifúngicas actuales, razón por la cual la tasa de mortalidad a causa de estas enfermedades continúa siendo muy alta (Taccone *et al.*, 2015).

La capacidad de *A. fumigatus* para crecer en los tejidos de pacientes y causar enfermedad es posible gracias a la termotolerancia natural de *A. fumigatus* (crece muy bien a 37 °C) (Bhabhra and Askew, 2005), a su versatilidad para adaptarse al pH fisiológico (7,2-7,5) y pO<sub>2</sub> de los tejidos y a su capacidad para obtener todos los nutrientes que necesita para crecer a partir de los tejidos vivos, incluyendo metales esenciales como el hierro y zinc.

La concentración de iones Zn<sup>2+</sup> en los tejidos del hospedador está en el rango nanomolar (Foote and Delves, 1988), la cual es considerablemente inferior a la que necesita *Aspergillus fumigatus* para poder crecer de manera óptima. Por esta razón, tanto una cepa mutante  $\Delta zafA$  de *A. fumigatus*, que carece del regulador principal de homeostasis de zinc (Figura 9I.A), como una cepa  $\Delta zrfA\Delta zrfB\Delta zrfC$ , que carece de los genes que codifican los componentes efectores principales para el mantenimiento de homeostasis del zinc (Figura 9I.B), son completamente avirulentas en modelos murinos de aspergilosis pulmonar invasora (Moreno *et al.*, 2007; Amich *et al.*, 2014). Más aún, *A. fumigatus* no sólo necesita mantener la regulación de homeostasis de zinc intacta para obtener zinc, sino que de ello también depende su capacidad para eludir la inmunidad nutricional impuesta por el hospedador. En este sentido, el transportador ZrfC capacita a *A. fumigatus* para competir con la calprotectina (Amich *et al.*, 2014), una proteína antimicrobiana liberada por los neutrófilos en los abscesos fúngicos que inhibe el crecimiento microbiano secuestrando Zn (Sohnle *et al.*, 2000; Urban *et al.*, 2009).

Por todas estas razones, se ha propuesto que el sistema de homeostasis de zinc en *Aspergillus fumigatus* es esencial para la virulencia de este hongo y que, concretamente, ZafA y ZrfC son dianas terapéuticas ideales para el desarrollo nuevos fármacos contra la aspergilosis (Vicente-franqueira *et al.*, 2015), como lo indican varios estudios realizados en colaboración con otros grupos (Clark *et al.*, 2016; Laskaris *et al.*, 2016; Cohrt *et al.*, 2018; Laskaris *et al.*, 2018).

**Figura 9I. Importancia de los principales genes de homeostasis del zinc en la virulencia de *A. fumigatus*.** (A) Efecto de la delección de *zafA* sobre el crecimiento de *A. fumigatus* en medio limitante en zinc y en virulencia. (B) Efecto de la delección de *zrfC* y de los genes *zrfA*, *zrfB* y *zrfC* sobre el crecimiento de *A. fumigatus* en medio limitante en zinc y en virulencia. Placas de SDNE-Zn (pH 7,5) sin suplemento de zinc (-Zn) o suplementadas con 500  $\mu$ M zinc (+Zn) inoculadas con 10<sup>3</sup> conidios/gota de las cepas indicadas e incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda durante 3 días. En todos los casos, los bioensayos de virulencia se realizaron en ratones no leucopénicos (inmunosuprimidos con cortisona) infectados con 10<sup>5</sup> conidios por ratón. Al tratarse de un tratamiento inmunosupresor que no causa neutropenia, se pueden observar numerosos infiltrados de neutrófilos en secciones del tejido pulmonar en ratones infectados con la cepa silvestre. Los detalles sobre el procedimiento para el análisis histopatológico se pueden consultar en Amich *et al.* (2014).



## 7. Hipótesis de trabajo y objetivos

La **hipótesis de partida** se puede formular de la siguiente manera: “La virulencia de los hongos patógenos, es decir, su capacidad para crecer dentro de un hospedador susceptible y causar enfermedad, no sólo depende en parte de su capacidad para obtener  $Zn^{2+}$  del hospedador, sino también de que el  $Zn^{2+}$  obtenido se incorpore correctamente en las proteínas que lo requieren, para dotarles de plena función catalítica y/o estructural y, de esta manera, que puedan contribuir al mantenimiento de homeostasis del zinc y/o a prevenir que ésta se vea alterada cuando la disponibilidad ambiental de  $Zn^{2+}$  es limitante”.

El **objetivo global** de este proyecto es: “*Determinar la función de las posibles metalochaperonas (Mchs) de la subfamilia COG0523 en la respuesta homeostática y/o adaptativa a la carencia de  $Zn^{2+}$  y su relevancia en la virulencia del hongo *Aspergillus fumigatus**”. Para alcanzar este objetivo global, los **objetivos específicos** de este trabajo fueron:

1. Identificar y caracterizar los genes COG0523 de *A. fumigatus*.
2. Realizar un estudio preliminar de la posible función de los genes COG0523 de *A. fumigatus* mediante un ensayo de complementación en *S. cerevisiae*.
3. Contrucción cepas mutantes de *A. fumigatus* para los genes COG0523 y realizar su análisis fenotípico.
4. Identificar las dianas de las proteínas COG0523 de *A. fumigatus* mediante espectrometría de masas.
5. Determinar la importancia de las proteínas COG0523 sobre la virulencia de *A. fumigatus* en un modelo murino de aspergilosis pulmonar invasora.

## RESULTADOS

---



DISCUSIÓN

---





## CONCLUSIONES

---



## MATERIALES Y MÉTODOS

---



FIGURAS SUPLEMENTARIAS

---



## BIBLIOGRAFÍA

---





- Aanen, D.K., Spelbrink, J.N., Beekman, M. (2014) What cost mitochondria? The maintenance of functional mitochondrial DNA within and across generations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**: 20130438.
- Abe, F., Hiraki, T. (2009) Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1788**: 743-752.
- Amich, J., Calera, J.A. (2014) Zinc Acquisition: A Key Aspect in *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Mycopathologia* **178**: 379-385.
- Amich, J., Leal, F., Calera, J.A. (2009) Repression of the acid ZrfA/ZrfB zinc-uptake system of *Aspergillus fumigatus* mediated by PacC under neutral, zinc-limiting conditions. *Int Microbiol* **12**: 39-47.
- Amich, J., Vicentefranqueira, R., Leal, F., Calera, J.A. (2010) *Aspergillus fumigatus* survival in alkaline and extreme zinc-limiting environments relies on the induction of a zinc homeostasis system encoded by the *zrfC* and *asf2* genes. *Eukaryot Cell* **9**: 424-437.
- Amich, J., Vicentefranqueira, R., Mellado, E., Ruiz-Carmuega, A., Leal, F., Calera, J.A. (2014) The ZrfC alkaline zinc transporter is required for *Aspergillus fumigatus* virulence and its growth in the presence of the Zn/Mn-chelating protein calprotectin. *Cell Microbiol* **16**: 548-564.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A. (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* **5**: 196-201.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A. (2006) Zinc through the three domains of life. *J Proteome Res* **5**: 3173-3178.
- Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G.L., Thornton, J.M. (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* **13**: 1205-1218.
- Andreini, C., Bertini, I., Rosato, A. (2009) Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Acc Chem Res* **42**: 1471-1479.
- Appia-Ayme, C., Hall, A., Patrick, E., Rajadurai, S., Clarke, T.A., Rowley, G. (2012) ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR. *Biochem J* **442**: 85-93.
- Atkinson, A., Smith, P., Fox, J.L., Cui, T.Z., Khalimonchuk, O., Winge, D.R. (2011) The LYR protein Mzm1 functions in the insertion of the Rieske Fe/S protein in yeast mitochondria. *Mol Cell Biol* **31**: 3988-3996.
- Auld, D.S. (2001) Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biomaterials* **14**: 271-313.
- Auld, D.S. (2009) The ins and outs of biological zinc sites. *Biomaterials* **22**: 141-148.
- Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., Pringle, J.R. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 943-951.
- Barker, K.S., Pearson, M.M., Rogers, P.D. (2003) Identification of genes differentially expressed in association with reduced azole susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1131-1140.
- Baudry, K., Swain, E., Rahier, A., Germann, M., Batta, A., Rondet, S., Mandala, S., Henry, K., Tint, G.S., Edlind, T., Kurtz, M., Nickels, J.T., Jr. (2001) The effect of the *erg26-1* mutation on the regulation of lipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 12702-12711.
- Berducci, G., Mazzetti, A.P., Rotilio, G., Battistoni, A. (2004) Periplasmic competition for zinc uptake between the metallochaperone ZnuA and Cu,Zn superoxide dismutase. *FEBS Lett* **569**: 289-292.
- Bhabhra, R., Askew, D.S. (2005) Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Med Mycol* **43 Suppl 1**: S87-93.
- Blaby-Haas, C.E., Flood, J.A., Crecy-Lagard, V., Zamble, D.B. (2012) YeiR: a metal-binding GTPase from *Escherichia coli* involved in metal homeostasis. *Metallomics* **4**: 488-497.
- Borrelly, G.P., Rondet, S.A., Tottey, S., Robinson, N.J. (2004) Chimeras of P-type ATPases and their transcriptional regulators: contributions of a cytosolic amino-terminal domain to metal specificity. *Mol Microbiol* **53**: 217-227.

- Braymer, J.J., Lill, R. (2017) Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J Biol Chem* **292**: 12754-12763.
- Caplan, A.J., Cyr, D.M., Douglas, M.G. (1992) Ydj1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* **71**: 1143-1155.
- Caplan, A.J., Tsai, J., Casey, P.J., Douglas, M.G. (1992) Farnesylation of Ydj1p is required for function at elevated growth temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **267**: 18890-18895.
- Cappelli, G., Volpe, E., Grassi, M., Liseo, B., Colizzi, V., Mariani, F. (2006) Profiling of *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during human macrophage infection: upregulation of the alternative sigma factor G, a group of transcriptional regulators, and proteins with unknown function. *Res Microbiol* **157**: 445-455.
- Caspeta, L., Chen, Y., Ghiaci, P., Feizi, A., Buskov, S., Hallstrom, B.M., Petranovic, D., Nielsen, J. (2014) Biofuels. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science* **346**: 75-78.
- Cavet, J.S., Meng, W., Pennella, M.A., Appelhoff, R.J., Giedroc, D.P., Robinson, N.J. (2002) A nickel-cobalt-sensing ArsR-SmtB family repressor. Contributions of cytosol and effector binding sites to metal selectivity. *J Biol Chem* **277**: 38441-38448.
- Chandra, B.R., Yogavel, M., Sharma, A. (2007) Structural analysis of ABC-family periplasmic zinc binding protein provides new insights into mechanism of ligand uptake and release. *J Mol Biol* **367**: 970-982.
- Chandrangsu, P., Huang, X., Helmann, J.D. (2019) Activation of a zincmetallochaperone by the alarmone ZTP.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C.E., O'Halloran, T.V., Mondragon, A. (2003) Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* **301**: 1383-1387.
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., Wang, Y. (2010) 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res* **44**: 587-604.
- Cheng, T., Li, H., Yang, X., Xia, W., Sun, H. (2013) Interaction of SlyD with HypB of *Helicobacter pylori* facilitates nickel trafficking. *Metallomics* **5**: 804-807.
- Cheng, T., Xia, W., Wang, P., Huang, F., Wang, J., Sun, H. (2013) Histidine-rich proteins in prokaryotes: metal homeostasis and environmental habitat-related occurrence. *Metallomics* **5**: 1423-1429.
- Chou, C.C., Wang, A.H. (2015) Structural D/E-rich repeats play multiple roles especially in gene regulation through DNA/RNA mimicry. *Mol Biosyst* **11**: 2144-2151.
- Chung, D., Barker, B.M., Carey, C.C., Merriman, B., Werner, E.R., Lechner, B.E., Dhingra, S., Cheng, C., Xu, W., Blosser, S.J., Morohashi, K., Mazurie, A., Mitchell, T.K., Haas, H., Mitchell, A.P., Cramer, R.A. (2014) ChIP-seq and *in vivo* transcriptome analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP SrbA reveals a new regulator of the fungal hypoxia response and virulence. *PLoS Pathog* **10**: e1004487.
- Cirigliano, A., Macone, A., Bianchi, M.M., Oliaro-Bosso, S., Balliano, G., Negri, R., Rinaldi, T. (2019) Ergosterol reduction impairs mitochondrial DNA maintenance in *S. cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1864**: 290-303.
- Clark, H.L., Jhingran, A., Sun, Y., Vareechon, C., de Jesus Carrion, S., Skaar, E.P., Chazin, W.J., Calera, J.A., Hohl, T.M., Pearlman, E. (2016) Zinc and Manganese Chelation by Neutrophil S100A8/A9 (Calprotectin) Limits Extracellular *Aspergillus fumigatus* Hyphal Growth and Corneal Infection. *J Immunol* **196**: 336-344.
- Cohrt, K.A.O., Marin, L., Kjellerup, L., Clausen, J.D., Dalby-Brown, W., Calera, J.A., Winther, A.L. (2018) Novel Zinc-Attenuating Compounds as Potent Broad-Spectrum Antifungal Agents with In Vitro and In Vivo Efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* **62**: e02024-02017.
- Coneyworth, L.J., Jackson, K.A., Tyson, J., Bosomworth, H.J., van der Hagen, E., Hann, G.M., Ogo, O.A., Swann, D.C., Mathers, J.C., Valentine, R.A., Ford, D. (2012) Identification of the human

- zinc transcriptional regulatory element (ZTRE): a palindromic protein-binding DNA sequence responsible for zinc-induced transcriptional repression. *J Biol Chem* **287**: 36567-36581.
- Cove, D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **113**: 51-56.
- d'Enfert, C. (1996) Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker. *Curr Genet* **30**: 76-82.
- Davis, K., Pateman, C., Davey, J. (1999) Gene disruption in *Schizosaccharomyces pombe* using a temperature-sensitive Ura4p. *Yeast* **15**: 1231-1236.
- de Jesus Ferreira, M.C., Bao, X., Laize, V., Hohmann, S. (2001) Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature. *Curr Genet* **40**: 27-39.
- Deegan, B.J., Bona, A.M., Bhat, V., Mikles, D.C., McDonald, C.B., Seldeen, K.L., Farooq, A. (2011) Structural and thermodynamic consequences of the replacement of zinc with environmental metals on estrogen receptor alpha-DNA interactions. *J Mol Recognit* **24**: 1007-1017.
- Dolz-Edo, L., Rienzo, A., Poveda-Huertes, D., Pascual-Ahuir, A., Proft, M. (2013) Deciphering dynamic dose responses of natural promoters and single cis elements upon osmotic and oxidative stress in yeast. *Mol Cell Biol* **33**: 2228-2240.
- Douglas, C.D., Ngu, T.T., Kaluarachchi, H., Zamble, D.B. (2013) Metal transfer within the *Escherichia coli* HypB-HypA complex of hydrogenase accessory proteins. *Biochemistry* **52**: 6030-6039.
- Dupont, C.L., Yang, S., Palenik, B., Bourne, P.E. (2006) Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17822-17827.
- Dupont, S., Lemetals, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., Beney, L. (2012) Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution* **66**: 2961-2968.
- Duvezin-Caubet, S., Rak, M., Lefebvre-Legendre, L., Tetaud, E., Bonnefoy, N., di Rago, J.P. (2006) A "petite obligate" mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: functional mtDNA is lethal in cells lacking the delta subunit of mitochondrial F1-ATPase. *J Biol Chem* **281**: 16305-16313.
- Eide, D.J. (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 711-722.
- Eide, D.J. (2009) Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **284**: 18565-18569.
- Eide, D.J. (2011) The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics* **3**: 1124-1129.
- Farrugia, M.A., Macomber, L., Hausinger, R.P. (2013) Biosynthesis of the urease metallocenter. *J Biol Chem* **288**: 13178-13185.
- Fitzpatrick, D.A., Logue, M.E., Stajich, J.E., Butler, G. (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* **6**: 99.
- Flattery-O'Brien, J., Collinson, L.P., Dawes, I.W. (1993) *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J Gen Microbiol* **139**: 501-507.
- Foote, J.W., Delves, H.T. (1988) Determination of non-protein-bound zinc in human serum using ultrafiltration and atomic absorption spectrometry with electrothermal atomisation. *Analyst* **113**: 911-915.
- Foster, A.W., Osman, D., Robinson, N.J. (2014) Metal preferences and metallation. *J Biol Chem* **289**: 28095-28103.
- Gabriel, S.E., Miyagi, F., Gaballa, A., Helmann, J.D. (2008) Regulation of the *Bacillus subtilis* *yciC* gene and insights into the DNA-binding specificity of the zinc-sensing metalloregulator Zur. *J Bacteriol* **190**: 3482-3488.
- Gan, Y.H., Chua, K.L., Chua, H.H., Liu, B., Hii, C.S., Chong, H.L., Tan, P. (2002) Characterization of *Burkholderia pseudomallei* infection and identification of novel virulence factors using a *Caenorhabditis elegans* host system. *Mol Microbiol* **44**: 1185-1197.

- Germann, M., Gallo, C., Donahue, T., Shirzadi, R., Stukey, J., Lang, S., Ruckenstuhl, C., Oliaro-Bosso, S., McDonough, V., Turnowsky, F., Balliano, G., Nickels, J.T., Jr. (2005) Characterizing sterol defect suppressors uncovers a novel transcriptional signaling pathway regulating zymosterol biosynthesis. *J Biol Chem* **280**: 35904-35913.
- Gitan, R.S., Luo, H., Rodgers, J., Broderius, M., Eide, D. (1998) Zinc-induced inactivation of the yeast Zrt1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J Biol Chem* **273**: 28617-28624.
- Graham, A.I., Hunt, S., Stokes, S.L., Bramall, N., Bunch, J., Cox, A.G., McLeod, C.W., Poole, R.K. (2009) Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins. *J Biol Chem* **284**: 18377-18389.
- Grahl, N., Dinamarco, T.M., Willger, S.D., Goldman, G.H., Cramer, R.A. (2012) *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. *Mol Microbiol* **84**: 383-399.
- Ha, N.C., Oh, S.T., Sung, J.Y., Cha, K.A., Lee, M.H., Oh, B.H. (2001) Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol* **8**: 505-509.
- Haas, C.E., Rodionov, D.A., Kropat, J., Malasarn, D., Merchant, S.S., de Crecy-Lagard, V. (2009) A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC Genomics* **10**: 470.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In "DNA Cloning: A Practical Approach". Glover DM. IRL Press, McLean, Virginia, USA
- Handali, M., Roychowdhury, H., Neupane, D.P., Yukl, E.T. (2015) AztD, a Periplasmic Zinc Metallochaperone to an ATP-binding Cassette (ABC) Transporter System in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* **290**: 29984-29992.
- Harding, M.M. (2004) The architecture of metal coordination groups in proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 849-859.
- Hatori, Y., Inouye, S., Akagi, R. (2017) Thiol-based copper handling by the copper chaperone Atox1. *IUBMB Life* **69**: 246-254.
- Hickman, M.J., Winston, F. (2007) Heme levels switch the function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between transcriptional activator and transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* **27**: 7414-7424.
- Hon, T., Lee, H.C., Hach, A., Johnson, J.L., Craig, E.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Zhang, L. (2001) The Hsp70-Ydj1 molecular chaperone represses the activity of the heme activator protein Hap1 in the absence of heme. *Mol Cell Biol* **21**: 7923-7932.
- Hon, T., Lee, H.C., Hu, Z., Iyer, V.R., Zhang, L. (2005) The heme activator protein Hap1 represses transcription by a heme-independent mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **169**: 1343-1352.
- Hortschansky, P., Haas, H., Huber, E.M., Groll, M., Brakhage, A.A. (2017) The CCAAT-binding complex (CBC) in *Aspergillus* species. *Biochim Biophys Acta* **1860**: 560-570.
- Hughes, A.L., Powell, D.W., Bard, M., Eckstein, J., Barbuch, R., Link, A.J., Espenshade, P.J. (2007) Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metab* **5**: 143-149.
- Ibrahim-Granet, O., Philippe, B., Boleti, H., Boisvieux-Ulrich, E., Grenet, D., Stern, M., Latge, J.P. (2003) Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun* **71**: 891-903.
- Imlay, J.A. (2014) The mismetallation of enzymes during oxidative stress. *J Biol Chem* **289**: 28121-28128.
- Irving, H., Williams, R.J.P. (1953) The stability of transition-metal complexes. *J Chem Soc* 3192-3210.
- Jamieson, D.J. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J Bacteriol* **174**: 6678-6681.

- Jan, Y.H., Richardson, J.R., Baker, A.A., Mishin, V., Heck, D.E., Laskin, D.L., Laskin, J.D. (2015) Vitamin K3 (menadione) redox cycling inhibits cytochrome P450-mediated metabolism and inhibits parathion intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol* **288**: 114-120.
- Kodedova, M., Sychrova, H. (2015) Changes in the Sterol Composition of the Plasma Membrane Affect Membrane Potential, Salt Tolerance and the Activity of Multidrug Resistance Pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **10**: e0139306.
- Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., Liautard, J.P. (2002) The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15711-15716.
- Krezel, A., Maret, W. (2016) The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Arch Biochem Biophys* **611**: 3-19.
- Laitaoja, M., Valjakka, J., Janis, J. (2013) Zinc coordination spheres in protein structures. *Inorg Chem* **52**: 10983-10991.
- Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J., Kaderbhai, M.A., Kelly, S.L. (1999) Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome b5/NADH cytochrome b5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Lett* **462**: 283-288.
- Lan, C., Lee, H.C., Tang, S., Zhang, L. (2004) A novel mode of chaperone action: heme activation of Hap1 by enhanced association of Hsp90 with the repressed Hsp70-Hap1 complex. *J Biol Chem* **279**: 27607-27612.
- Laskaris, P., Atrouni, A., Calera, J.A., d'Enfert, C., Munier-Lehmann, H., Cavaillon, J.M., Latge, J.P., Ibrahim-Granet, O. (2016) Administration of Zinc Chelators Improves Survival of Mice Infected with *Aspergillus fumigatus* both in Monotherapy and in Combination with Caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* **60**: 5631-5639.
- Laskaris, P., Vicentefranqueira, R., Helynck, O., Jouvion, G., Calera, J.A., du Merle, L., Suzenet, F., Buron, F., de Sousa, R.A., Mansuy, D., Cavaillon, J.M., Latge, J.P., Munier-Lehmann, H., Ibrahim-Granet, O. (2018) A Novel Polyaminocarboxylate Compound To Treat Murine Pulmonary Aspergillosis by Interfering with Zinc Metabolism. *Antimicrob Agents Chemother* **62**:
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* **317**: 41-72.
- Lipinski, K.A., Kaniak-Golik, A., Golik, P. (2010) Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome--from genetics to evolution and systems biology. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 1086-1098.
- Luk, E., Carroll, M., Baker, M., Culotta, V.C. (2003) Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires *MTM1*, a member of the mitochondrial carrier family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10353-10357.
- Luk, E., Yang, M., Jensen, L.T., Bourbonnais, Y., Culotta, V.C. (2005) Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**: 22715-22720.
- MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A., Eide, D. (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**: 2845-2855.
- Maciag, A., Dainese, E., Rodriguez, G.M., Milano, A., Provvedi, R., Pasca, M.R., Smith, I., Palu, G., Riccardi, G., Manganeli, R. (2007) Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J Bacteriol* **189**: 730-740.
- Macomber, L., Hausinger, R.P. (2011) Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics* **3**: 1153-1162.
- Macomber, L., Imlay, J.A. (2009) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 8344-8349.
- Malasarn, D., Kropat, J., Hsieh, S.I., Finazzi, G., Casero, D., Loo, J.A., Pellegrini, M., Wollman, F.A., Merchant, S.S. (2013) Zinc deficiency impacts CO<sub>2</sub> assimilation and disrupts copper homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **288**: 10672-10683.

- Mallory, J.C., Crudden, G., Johnson, B.L., Mo, C., Pierson, C.A., Bard, M., Craven, R.J. (2005) Dap1p, a heme-binding protein that regulates the cytochrome P450 protein Erg11p/Cyp51p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **25**: 1669-1679.
- Maret, W. (2013) Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr* **4**: 82-91.
- Maret, W., Li, Y. (2009) Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev* **109**: 4682-4707.
- Martínez-Montañés, F., Pascual-Ahuir, A., Proft, M. (2010) Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmostress in yeast. *OMICS* **14**: 619-627.
- Martínez-Montañés, F., Pascual-Ahuir, A., Proft, M. (2011) Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Mol Microbiol* **79**: 1008-1023.
- Matouschek, A., Pfanner, N., Voos, W. (2000) Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep* **1**: 404-410.
- Mitchell, P.C.H. (1997) Metal Complexes of EDTA: An Exercise in Data Interpretation. *Journal of Chemical Education* **74**: 1235-1237.
- Miyazono, Y., Hirashima, S., Ishihara, N., Kusukawa, J., Nakamura, K.I., Ohta, K. (2018) Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. *Sci Rep* **8**: 350.
- Moreno, M.A., Amich, J., Vicentefranqueira, R., Leal, F., Calera, J.A. (2007) Culture conditions for zinc- and pH-regulated gene expression studies in *Aspergillus fumigatus*. *Int Microbiol* **10**: 187-192.
- Moreno, M.A., Ibrahim-Granet, O., Vicentefranqueira, R., Amich, J., Ave, P., Leal, F., Latge, J.P., Calera, J.A. (2007) The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mol Microbiol* **64**: 1182-1197.
- Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**: 1-13.
- Nairn, B.L., Lonergan, Z.R., Wang, J., Braymer, J.J., Zhang, Y., Calcutt, M.W., Lisher, J.P., Gilston, B.A., Chazin, W.J., de Crecy-Lagard, V., Giedroc, D.P., Skaar, E.P. (2016) The Response of *Acinetobacter baumannii* to Zinc Starvation. *Cell Host Microbe* **19**: 826-836.
- Napolitano, M., Rubio, M.A., Santamaria-Gomez, J., Olmedo-Verd, E., Robinson, N.J., Luque, I. (2012) Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **194**: 2426-2436.
- Neiman, M., Taylor, D.R. (2009) The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes. *Proc Biol Sci* **276**: 1201-1209.
- Neubauer, M., Zhu, Z., Penka, M., Helmschrott, C., Wagener, N., Wagener, J. (2015) Mitochondrial dynamics in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*: therapeutic and evolutionary implications. *Mol Microbiol* **98**: 930-945.
- Nofiani, R., de Mattos-Shiple, K., Lebe, K.E., Han, L.C., Iqbal, Z., Bailey, A.M., Willis, C.L., Simpson, T.J., Cox, R.J. (2018) Strobilurin biosynthesis in Basidiomycete fungi. *Nat Commun* **9**: 3940.
- North, M., Steffen, J., Loguinov, A.V., Zimmerman, G.R., Vulpe, C.D., Eide, D.J. (2012) Genome-wide functional profiling identifies genes and processes important for zinc-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **8**: e1002699.
- O'Halloran, T.V., Culotta, V.C. (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* **275**: 25057-25060.
- Opalinski, L., Song, J., Priesnitz, C., Wenz, L.S., Oeljeklaus, S., Warscheid, B., Pfanner, N., Becker, T. (2018) Recruitment of Cytosolic J-Proteins by TOM Receptors Promotes Mitochondrial Protein Biogenesis. *Cell Rep* **25**: 2036-2043 e2035.
- Outten, C.E., O'Halloran, T.V. (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**: 2488-2492.
- Pastor, M.M., Proft, M., Pascual-Ahuir, A. (2009) Mitochondrial function is an inducible determinant of osmotic stress adaptation in yeast. *J Biol Chem* **284**: 30307-30317.

- Patel, K., Kumar, A., Durani, S. (2007) Analysis of the structural consensus of the zinc coordination centers of metalloprotein structures. *Biochim Biophys Acta* **1774**: 1247-1253.
- Peters, J.W., Schut, G.J., Boyd, E.S., Mulder, D.W., Shepard, E.M., Broderick, J.B., King, P.W., Adams, M.W. (2015) [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochim Biophys Acta* **1853**: 1350-1369.
- Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P., Battistoni, A. (2010) The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *J Bacteriol* **192**: 1553-1564.
- Proft, M., Struhl, K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell* **9**: 1307-1317.
- Ragsdale, S.W. (2009) Nickel-based Enzyme Systems. *J Biol Chem* **284**: 18571-18575.
- Robinson, N.J., Winge, D.R. (2010) Copper metallochaperones. *Annu Rev Biochem* **79**: 537-562.
- Rosato, A., Valasatava, Y., Andreini, C. (2016) Minimal Functional Sites in Metalloproteins and Their Usage in Structural Bioinformatics. *Int J Mol Sci* **17**: 671.
- Rosenzweig, A.C. (2002) Metallochaperones: bind and deliver. *Chem Biol* **9**: 673-677.
- Rosenzweig, A.C., O'Halloran, T.V. (2000) Structure and chemistry of the copper chaperone proteins. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 140-147.
- Sahi, C., Kominek, J., Ziegelhoffer, T., Yu, H.Y., Baranowski, M., Marszalek, J., Craig, E.A. (2013) Sequential duplications of an ancient member of the DnaJ-family expanded the functional chaperone network in the eukaryotic cytosol. *Mol Biol Evol* **30**: 985-998.
- Saito, H., Posas, F. (2012) Response to hyperosmotic stress. *Genetics* **192**: 289-318.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Journal:2100.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsube, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C. (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* **78**: 141-173.
- Schiestl, R.H., Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**: 339-346.
- Schneider, R.O., Fogaca, N., S., Kmetzsch, L., Schrank, A., Vainstein, M.H., Staats, C.C. (2012) Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* **7**: e43773.
- Schrettl, M., Beckmann, N., Varga, J., Heinekamp, T., Jacobsen, I.D., Jochl, C., Moussa, T.A., Wang, S., Gsaller, F., Blatzer, M., Werner, E.R., Niermann, W.C., Brakhage, A.A., Haas, H. (2010) HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* **6**: e1001124.
- Schrettl, M., Carberry, S., Kavanagh, K., Haas, H., Jones, G.W., O'Brien, J., Nolan, A., Stephens, J., Fenelon, O., Doyle, S. (2010) Self-protection against gliotoxin--a component of the gliotoxin biosynthetic cluster, GliT, completely protects *Aspergillus fumigatus* against exogenous gliotoxin. *PLoS Pathog* **6**: e1000952.
- Schrettl, M., Kim, H.S., Eisendle, M., Kragl, C., Nierman, W.C., Heinekamp, T., Werner, E.R., Jacobsen, I., Illmer, P., Yi, H., Brakhage, A.A., Haas, H. (2008) SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* **70**: 27-43.
- Sertil, O., Kapoor, R., Cohen, B.D., Abramova, N., Lowry, C.V. (2003) Synergistic repression of anaerobic genes by Mot3 and Rox1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **31**: 5831-5837.
- Shekhova, E., Kniemeyer, O., Brakhage, A.A. (2017) Induction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production by Itraconazole, Terbinafine, and Amphotericin B as a Mode of Action against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **61**:
- Shoshan, M.S., Tshuva, E.Y. (2011) The MXCXXC class of metallochaperone proteins: model studies. *Chem Soc Rev* **40**: 5282-5292.

- Sikorski, R.S., Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27.
- Sohnle, P.G., Hunter, M.J., Hahn, B., Chazin, W.J. (2000) Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J Infect Dis* **182**: 1272-1275.
- Sydor, A.M., Jost, M., Ryan, K.S., Turo, K.E., Douglas, C.D., Drennan, C.L., Zamble, D.B. (2013) Metal binding properties of *Escherichia coli* YjiA, a member of the metal homeostasis-associated COG0523 family of GTPases. *Biochemistry* **52**: 1788-1801.
- Taccone, F.S., Van den Abeele, A.M., Bulpa, P., Misset, B., Meersseman, W., Cardoso, T., Paiva, J.A., Blasco-Navalpotro, M., De Laere, E., Dimopoulos, G., Rello, J., Vogelaers, D., Blot, S.I., Asp, I.C.U.S.I. (2015) Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care* **19**: 7.
- Tatusov, R.L., Galperin, M.Y., Natale, D.A., Koonin, E.V. (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* **28**: 33-36.
- Thorpe, G.W., Reodica, M., Davies, M.J., Heeren, G., Jarolim, S., Pillay, B., Breitenbach, M., Higgins, V.J., Dawes, I.W. (2013) Superoxide radicals have a protective role during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. *Mol Biol Cell* **24**: 2876-2884.
- Tishchenko, K.I., Beloglazkina, E.K., Mazhuga, A.G., Zyk, N.V. (2016) Copper-containing enzymes: Site types and low-molecular-weight model compounds. *Review Journal of Chemistry* **6**: 49-82.
- Toledo, H. (2017) Estudio de la regulación por pH de la expresión de genes inducidos por la carencia de zinc en *Aspergillus fumigatus*. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Tottey, S., Waldron, K.J., Firbank, S.J., Reale, B., Bessant, C., Sato, K., Cheek, T.R., Gray, J., Banfield, M.J., Dennison, C., Robinson, N.J. (2008) Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature* **455**: 1138-1142.
- Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., Zychlinsky, A. (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5**: e1000639.
- Vallieres, C., Holland, S.L., Avery, S.V. (2017) Mitochondrial Ferredoxin Determines Vulnerability of Cells to Copper Excess. *Cell Chem Biol* **24**: 1228-1237 e1223.
- Vasak, M. (2005) Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol* **19**: 13-17.
- Vicente-franqueira, R., Amich, J., Laskaris, P., Ibrahim-Granet, O., Latge, J.P., Toledo, H., Leal, F., Calera, J.A. (2015) Targeting zinc homeostasis to combat *Aspergillus fumigatus* infections. *Front Microbiol* **6**: 160.
- Vicente-franqueira, R., Amich, J., Marín, L., Sánchez, C.I., Leal, F., Calera, J.A. (2018) The Transcription Factor ZafA Regulates the Homeostatic and Adaptive Response to Zinc Starvation in *Aspergillus fumigatus*. *Genes* **9**: 318.
- Vicente-franqueira, R., Leal, F., Marin, L., Sanchez, C.I., Calera, J.A. (2019) The interplay between zinc and iron homeostasis in *Aspergillus fumigatus* under zinc-replete conditions relies on the iron-mediated regulation of alternative transcription units of zafA and the basal amount of the ZafA zinc-responsiveness transcription factor. *Environ Microbiol* doi: **10.1111/1462-2920.14618**:
- Vicente-franqueira, R., Moreno, M.A., Leal, F., Calera, J.A. (2005) The *zrfA* and *zrfB* genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. *Eukaryot Cell* **4**: 837-848.
- Waldron, K.J., Robinson, N.J. (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol* **7**: 25-35.
- Waldron, K.J., Rutherford, J.C., Ford, D., Robinson, N.J. (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**: 823-830.
- Walsh, P., Bursac, D., Law, Y.C., Cyr, D., Lithgow, T. (2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep* **5**: 567-571.



- Wang, Z., Feng, L.S., Matskevich, V., Venkataraman, K., Parasuram, P., Laity, J.H. (2006) Solution structure of a Zap1 zinc-responsive domain provides insights into metalloregulatory transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **357**: 1167-1183.
- Warringer, J., Ericson, E., Fernandez, L., Nerman, O., Blomberg, A. (2003) High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15724-15729.
- Williams, R.J.P. (2006) The Biodistribution of Metal Ions. In "Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry". Kraatz HB, Metzler-Nolte N. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germany
- Wood, P.M., Hollomon, D.W. (2003) A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest Manag Sci* **59**: 499-511.
- Wu, C.Y., Bird, A.J., Winge, D.R., Eide, D.J. (2007) Regulation of the yeast Tsa1 peroxiredoxin by Zap1 is an adaptive response to the oxidative stress of zinc deficiency. *J Biol Chem* **282**: 2184-2195.
- Wu, C.Y., Steffen, J., Eide, D.J. (2009) Cytosolic superoxide dismutase (Sod1) is critical for tolerating the oxidative stress of zinc deficiency in yeast. *PLoS One* **4**: e7061.
- Xie, J.L., Bohovych, I., Wong, E.O.Y., Lambert, J.P., Gingras, A.C., Khalimonchuk, O., Cowen, L.E., Leach, M.D. (2017) Ydj1 governs fungal morphogenesis and stress response, and facilitates mitochondrial protein import via Mas1 and Mas2. *Microb Cell* **4**: 342-361.
- Yang, X., Li, H., Lai, T.P., Sun, H. (2015) UreE-UreG complex facilitates nickel transfer and preactivates GTPase of UreG in *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* **290**: 12474-12485.
- Yasmin, S., Alcazar-Fuoli, L., Grundlinger, M., Puempel, T., Cairns, T., Blatzer, M., Lopez, J.F., Grimalt, J.O., Bignell, E., Haas, H. (2011) Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E497-504.
- Yuen, M.H., Fong, Y.H., Nim, Y.S., Lau, P.H., Wong, K.B. (2017) Structural insights into how GTP-dependent conformational changes in a metallochaperone UreG facilitate urease maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: E10890-E10898.
- Zhao, H., Eide, D. (1996) The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2454-2458.
- Zhao, H., Eide, D.J. (1997) Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**: 5044-5052.