

Tesis Doctoral

# Caracterización de la vía de señalización de LOVHK implicada en mecanismos de respuesta a estrés y virulencia en *Brucella spp*

Sycz, Gabriela

2015-04-13

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sycz, Gabriela. (2015-04-13). Caracterización de la vía de señalización de LOVHK implicada en mecanismos de respuesta a estrés y virulencia en *Brucella spp*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sycz, Gabriela. "Caracterización de la vía de señalización de LOVHK implicada en mecanismos de respuesta a estrés y virulencia en *Brucella spp*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-04-13.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Caracterización de la vía de señalización de  
LOVHK implicada en mecanismos de  
respuesta a estrés y virulencia en *Brucella*  
spp**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

**Gabriela Sycz**

Director de tesis: Dr. Gastón Paris

Consejera de estudios: Dra. Ángeles Zorreguieta

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir – IIBBA – CONICET

Buenos Aires, 2015

# Caracterización de la vía de señalización de LOVHK implicada en mecanismos de respuesta a estrés y virulencia en *Brucella* spp

## Resumen

*Brucella* spp. son bacterias Gram-negativas que pertenecen al grupo de las  $\alpha$ -2-proteobacterias. Son el agente causal de la brucelosis, una enfermedad zoonótica que produce abortos e infertilidad en animales, y fiebre en humanos. *Brucella* es un patógeno intracelular facultativo, el cual reside en un nicho replicativo derivado del retículo endoplásmico. Su capacidad de sobrevivir dentro de las células hospedadoras se debe a los diversos mecanismos que ha desarrollado para tolerar las distintas condiciones de estrés presentes en el proceso de infección. Las bacterias pueden detectar y responder a cambios en el ambiente por medio de los sistemas de dos componentes, los cuales están formados por una Histidina Quinasa sensora (HK) y un Regulador de Respuesta (RR). Previo al inicio de este trabajo, se caracterizó en *Brucella abortus* 2308 una proteína histidina quinasa (LOVHK), la cual posee un dominio LOV sensible a la luz azul, un dominio PAS, seguido de un dominio HK. Cuando la proteína es iluminada con luz azul, el dominio LOV inicia un fotociclo, el cual promueve la autofosforilación del dominio HK iniciando una cascada de transducción de señales que culmina con un incremento en la virulencia de *Brucella*. En el presente trabajo se ha estudiado la vía de señalización iniciada por LOVHK en *Brucella abortus* 2308. Por medio de ensayos de doble híbrido y experimentos de fosfotransferencias, se identificaron dos RRs como compañeros de interacción de LOVHK: PhyR y LovR. Los resultados *in vitro* sugieren que LovR podría funcionar como un sink de fosfato de LOVHK. Ensayos realizados *in vivo* sugieren que LOVHK, por medio de PhyR, contribuye a la activación del sistema de Respuesta General a Estrés (GSR- por sus siglas en inglés). Además, en ausencia de LOVHK la expresión de *virB* se encuentra alterada. Estos resultados sugieren que LOVHK podría participar en más de una vía de señalización intracelular. En resumen, los hallazgos del presente trabajo contribuyen al conocimiento del mecanismo de señalización de LOVHK y el efecto de dicha vía en la virulencia de *Brucella*.

**Palabras clave:** Sistemas de dos componentes, histidina-quinasa, LOVHK, Respuesta General a Estrés (GSR por sus siglas en inglés), *Brucella abortus*.

# Characterization of the LOVHK signaling pathway involved in stress response mechanisms and virulence in *Brucella* spp

## Abstract

*Brucella* spp. are Gram-negative bacteria that belong to the  $\alpha$ -2-proteobacteria group. They are the causative agent of brucellosis, a zoonotic infection that causes miscarriage and infertility in animals, and a febrile disease in humans. *Brucella* is a facultative intracellular pathogen, which resides in a replicative niche derived from the endoplasmic reticulum. Its ability to survive inside its host is due to the different mechanisms that it has developed in order to cope with the different stress conditions that it encounters during the infection process. Bacteria can detect and respond to environmental changes through two-component signalling systems (TCS), which consist of a sensor Histidine Kinase (HK) and its cognate Response Regulator (RR). Previously, it has been characterized in *Brucella abortus* 2308 a histidine kinase protein (LOVHK), which has a LOV domain sensible to blue-light, a PAS domain and a C-terminal HK domain. After exposure to blue-light, the LOV domain initiates a self-contained photocycle, which promotes autophosphorylation of the HK domain, initiating a signal transduction pathway that produces an increment in *Brucella* virulence. In the present work, the intracellular signalling pathway initiated by LOVHK in *Brucella abortus* 2308 is characterized. Using two-hybrid assays and phosphotransfer experiments we identified two RRs as interacting partners of LOVHK: PhyR and LovR. These *in vitro* results suggest that LovR could be functioning as a phosphate-sink for LOVHK. *In vivo* results suggest that LOVHK, through PhyR, contributes to the activation of the General Stress Response System (GSR). Furthermore, the expression of *virB* is altered in the absence of LOVHK. Altogether, these results suggest that LOVHK could be involved in more than one intracellular signaling pathway. In conclusion, the results obtained in the present work contribute to the understanding of the signaling mechanism initiated by LOVHK and the effect of this pathway on *Brucella* virulence.

**Keywords:** Two Component Systems (TCS), Histidine Kinase, LOVHK, General Stress Response (GSR), *Brucella abortus*.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Gastón Paris por dirigir mi tesis, y al Dr. Fernando Golbaum por permitirme trabajar en su laboratorio.

A todos mis compañeros de laboratorio 304 por la buena onda, por sus sugerencias y consejos tanto laborales como personales y por la ayuda diaria. A todos ellos: Mariel, Jime, Seba, Andrés, Hernán, Nacho, Ine, Pau, Paulita, Lau, Santi, Vani, Lisandro, Gise, Darío, Javi y Ana.

A Marielita Carrica por su amistad, los viajes de regreso a casa, la ayuda, y mucho más.

A Piku por su amistad, el aguante, las discusiones tanto científicas como personales.

A todo el laboratorio 204 y Estela Galván por la buena onda.

A mis compañeros en el instituto.

A mi familia por el apoyo afectivo.

Al Dr. Rodrigo Sieira por sus sugerencias.

A todo el personal de mantenimiento, administración, droguero y biblioteca de la FIL porque facilitan el trabajo diario.

A CONICET por haber financiado mi trabajo durante estos 5 años por medio de las becas de posgrado Tipol y Tipoll.

**a mi familia y amigos**

## Publicaciones

1) El siguiente manuscrito ha sido recientemente aceptado para su publicación en PLOS ONE (marzo 2015):

***LOV histidine kinase modulates the General Stress Response system and affects the virB operon expression in Brucella abortus.*** Gabriela Sycz, Mariela Carmen Carrica, Tong-Seung Tseng, Roberto A. Bogomolni, Winslow R. Briggs, Fernando A. Goldbaum and Gastón Paris.

2) El presente proyecto también dio lugar a la resolución de la estructura tridimensional de PhyR por cristalografía de rayos-X, cuyos datos han sido depositados en la base de datos Protein Data Bank. PDB ID 4G9: ***Crystal structure of the response regulator PhyR from Brucella abortus.*** Klinke, S., Sycz, G., Rinaldi, J.J., Paris, G., Goldbaum, F.A.

# Índice

Abreviaturas .....	1
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<i>Brucella</i> spp y brucelosis .....	4
Generalidades .....	4
Brucelosis en animales .....	5
Brucelosis en humanos.....	5
Brucelosis en Argentina .....	6
Proceso de infección .....	6
Etapas iniciales de la infección y tráfico intracelular de <i>Brucella</i> .....	7
Condiciones del Brucelosoma.....	8
Factores de virulencia .....	8
Sistema de Secreción Tipo IV: el operón <i>virB</i> .....	10
LOVHK de <i>Brucella</i> .....	10
Sistemas de señalización intracelular en bacterias .....	13
Sistemas de un componente.....	13
Sistema de dos componentes.....	14
Sistemas que involucran factores sigma alternativos de la transcripción .....	15
Sistemas de dos componentes y factores $\sigma$ .....	16
Sistema de Respuesta General a Estrés (GSR) en $\alpha$ -proteobacterias .....	16
Características del sistema GSR en <i>Brucella</i> .....	19
Dominios LOV y la respuesta a estrés.....	21
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
Hipótesis de trabajo .....	24
Objetivos.....	24
Objetivo general .....	24
Objetivos particulares .....	24
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
Cepas bacterianas y medios de cultivo .....	26
<i>Escherichia coli</i> .....	26
<i>Brucella</i> .....	26
Condiciones de oscuridad .....	27
Manipulación de ADN.....	27
Reacciones de PCR con las distintas ADN polimerasas .....	27
Ensayo de doble híbrido bacteriano .....	28
Clonado de <i>lovhk</i> y <i>pdhS</i> para los ensayos de doble híbrido .....	28
Clonado del dominio REC de los RRs para el ensayo de doble híbrido .....	28
Ensayo de doble híbrido .....	29
Cuantificación de la interacción proteína-proteína por doble híbrido.....	30
Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....	30
Clonado de genes de <i>Brucella</i> para la expresión de proteínas recombinantes .....	30
Expresión y purificación de proteínas .....	31

Determinación del PM de PhyR por SLS.....	38
Ensayos de autofosforilación y fosfotransferencia .....	39
Ensayos de autofosforilación .....	39
Ensayos de fosfotransferencia.....	39
Obtención de REC-PhyR~P.....	39
Construcción de cepas mutantes en <i>Brucella abortus</i> 2308 .....	40
Construcción de la complementada de LOVHK.....	42
Ensayo de aglutinación con acriflavina.....	43
Extracción de ARN total de <i>Brucella</i> .....	43
PCR en tiempo real cuantitativos (qRT-PCR).....	45
Ensayos de estrés.....	46
Inducción de estrés por falta de una fuente de carbono en la cepa wt .....	46
Inducción de estrés por falta de una fuente de carbono y concentraciones crecientes de NaCl en la cepa wt.....	46
Inducción de estrés por falta de una fuente de carbono en las cepas wt, <i>lovhk::km</i> y $\Delta lovR$ .....	46
Producción de anticuerpos policlonales en ratones.....	46
Análisis por Western Blot .....	47
Ensayo de estabilidad de PhyR .....	47
Ensayos de infección en macrófagos murinos J774A.1 .....	48
Determinación de la actividad del promotor <i>virB</i> .....	48
Resolución de la estructura tridimensional de PhyR .....	49
Colección de datos de difracción.....	49
Resolución, refinamiento, modelado y validación.....	49
Representación gráfica .....	50
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>Capítulo 1: Identificación de los compañeros de interacción de LOVHK. ....</b>	<b>52</b>
Búsqueda de compañeros de interacción de LOVHK .....	52
Cuantificación de la interacción por doble híbrido.....	60
Confirmación de la interacción entre LOVHK/RRs por medio de ensayos de fosfotransferencia.....	61
Ensayo de determinación de actividad fosfatasa .....	68
Nuevo sistema de purificación de proteínas recombinantes libre de etiquetas.....	68
Ensayo de actividad fosfatasa sobre PhyR .....	70
<b>Capítulo 2: LOVHK modula el sistema de Respuesta General a Estrés y altera la expresión del operón <i>virB</i>.....</b>	<b>72</b>
El sistema GSR es activo en <i>Brucella abortus</i> 2308 .....	72
Construcción de cepas mutantes y complementadas en <i>Brucella</i> .....	75
Caracterización del crecimiento de las distintas cepas en medio líquido .....	76
LOVHK modula el sistema GSR .....	76
El sistema GSR no se induce por luz.....	79
LOVHK contribuye a la activación del sistema GSR .....	80
Estabilidad de PhyR.....	81
PhyR y LovR no afectan la capacidad de infección en macrófagos murinos .....	82

La delección de <i>lovhk</i> afecta la expresión de operón <i>virB</i> .....	83
<b>Capítulo 3: Resolución de la estructura tridimensional de PhyR .....</b>	<b>85</b>
Predicción bioinformática de la cristalizabilidad de PhyR .....	85
Obtención de cristales iniciales y optimización .....	86
Resolución de la estructura de PhyR.....	87
Comparación con PhyR de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	88
<b>DISCUSIÓN &amp; CONCLUSIONES.....</b>	<b>91</b>
Discusión .....	92
Compañeros de interacción de LOVHK en distintos microorganismos .....	92
El sistema GSR es activo en <i>Brucella</i> y LOVHK contribuye a su activación .....	94
Función de LovR <i>in vivo</i> .....	95
Otras HKs asociadas al sistema GSR .....	96
LOVHK y el operón <i>virB</i> .....	98
Señales detectadas por LOVHK.....	98
La estructura tridimensional de PhyR .....	99
Modelo propuesto para la vía de señalización de LOVHK .....	100
Conclusiones.....	102
<b>Firmas .....</b>	<b>103</b>
<b>Apéndice 1: Lista de cepas y plásmidos empleados en esta tesis.....</b>	<b>104</b>
<b>Apéndice 2: Lista de oligonucleótidos empleados en esta tesis .....</b>	<b>108</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>112</b>

## Abreviaturas

<b>3-AT</b>	3-amino-1,2,4-triazole
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido Desoxirribonucleico copia
<b>Amp<sup>R</sup></b>	Resistente a Ampicilina
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BCV</b>	<i>Brucella</i> -Containing Vacuole – Vacuola contenedora de <i>Brucella</i>
<b>CBB</b>	Coomassie Brilliant Blue
<b>Cn<sup>R</sup></b>	Resistente a Cloranfenicol
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECF</b>	Extracytoplasmic Factor – Factor extracitoplasmático
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FMN</b>	Flavín Mononucleótido
<b>GSR</b>	General Stress Response – Sistema de Respuesta General a Estrés
<b>His<sub>6</sub>-Tag</b>	<i>Tag</i> de 6 Histidinas
<b>HK</b>	Histidina Kinasa
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography - Cromatografía Líquida de alta eficiencia
<b>Ins6P</b>	Inositol-6-fosfato
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b>kb</b>	Kilo bases
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>km<sup>R</sup></b>	Resistente a Kanamicina
<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>LOV</b>	Light-Oxygen-Voltage, Luz-Oxígeno Voltaje
<b>MM</b>	Medio Mínimo
<b>MOI</b>	Multiplicidad de Infección
<b>NaI<sup>R</sup></b>	Resistente a Ácido Nalidíxico
<b>ONPG</b>	orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
<b>PAS</b>	(Per, Arnt y Sim), dominio sensor
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline – Buffer Fosfato Salino
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction – Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>qRT-PCR</b>	Retrotranscripción y posterior PCR en tiempo real
<b>RE</b>	Retículo Endoplásmico

<b>REC</b>	Dominio receptor del fosfato en el Regulador de Respuesta
<b>RR</b>	Regulador de Respuesta
<b>RT</b>	Retrotranscripción, síntesis de la primera cadena de ADNc
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate - Dodecil sulfato de sodio
<b>SST4</b>	Sistema de Secreción Tipo IV
<b>Str<sup>R</sup></b>	Resistente a Estreptomicina
<b>Tet<sup>R</sup></b>	Resistente a Tetraciclina
<b>TCS</b>	Two Component System – Sistemas de dos componentes
<b>TSA</b>	Medio <i>Tryptic Soy Broth</i> sólido
<b>TSB</b>	Medio <i>Tryptic Soy Broth</i>
<b>u.f.c</b>	Unidades Formadoras de Colonias

# INTRODUCCIÓN

## ***Brucella* spp y brucelosis**

### **Generalidades**

*Brucella* spp son bacterias Gram-negativas, que pertenecen al grupo  $\alpha$ -2-proteobacteria. Las mismas son el agente causal de la brucelosis, una de las enfermedades zoonóticas más ampliamente distribuidas en el mundo. En algunos países la prevalencia de la brucelosis excede los 10 casos por cada 100.000 habitantes y, en todo el mundo, se reportan alrededor de medio millón de casos de brucelosis por año [1,2]. Esta enfermedad produce abortos e infertilidad en animales, y fiebre en humanos. *Brucella* spp es un patógeno intracelular, el cual puede establecer interacciones a largo plazo con una gran número de mamíferos (cita)[3]. La habilidad que poseen estas especies para habitar células fagocíticas y no fagocíticas facilita la evasión del sistema inmune y finalmente le permite establecer una infección crónica. Hasta el momento no existe una vacuna efectiva contra la dicha enfermedad y el tratamiento consiste en la administración de varios antibióticos por un período prolongado. Si la infección no es tratada adecuadamente puede volverse crónica, afectando varios tejidos.

Las bacterias del género *Brucella* son aerobias facultativas, no móviles, no esporuladas y no contienen plásmidos. Este género incluye diversas especies, las cuales se han clasificado en función del hospedador de preferencia, patogenicidad y características microbiológicas, bioquímicas y antigénicas. Las más caracterizadas hasta el momento son: *B. abortus* y *B. melitensis* que infectan preferentemente vacas y cabras respectivamente, *B. suis* y *B. canis* cerdos y perros respectivamente, *B. ovis* que infecta carneros causándoles epididimitis y, finalmente, *B. neotomae* que sólo fue encontrada en ratas del desierto. De este grupo, sólo las primeras cuatro son patógenas para el hombre: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* y *B. canis*, mencionadas en orden decreciente de virulencia [4-6]. Estas 6 especies de *Brucella* poseen una alta identidad de secuencia (>90%) y, en particular, los genomas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* comparten una identidad mayor al 98% en más del 90% de los genes [6,7]. Por otro lado, dentro de cada especie, se pueden reconocer distintos biotipos dependiendo de las diferencias de preferencia de hospedador y patogenicidad, distintas tinciones y aglutinación con antisueros monoespecíficos entre otras características fenotípicas. *Brucella* posee dos cromosomas. El cromosoma I tiene un tamaño aproximado de 2 Mpb y codifica para genes involucrados en el mantenimiento celular, mientras que el cromosoma II tiene un tamaño aproximado de 3,3 Mpb y contiene la secuencia correspondiente a la mayoría de los factores de virulencia [8,9].

Si bien estas bacterias son de vida intracelular, las mismas pueden ser cultivadas *in vitro*, lo cual permite su estudio en el laboratorio y además tienen la capacidad de sobrevivir por grandes períodos de tiempo en el suelo y lácteos no pasteurizados.

### Brucelosis en animales

Los signos de la brucelosis en animales pueden variar según la especie animal infectada y la especie y cepa de *Brucella* involucrada. La infección raramente es letal; suele tener desde síntomas suaves y subclínicos hasta manifestaciones más severas, principalmente en animales preñados. Tanto los animales de granja como los animales salvajes pueden ser infectados por *Brucella*, siendo estos últimos un reservorio natural para la bacteria. En los animales *Brucella* se localiza en los órganos reproductivos produciendo abortos y esterilidad. La brucelosis bovina, caprina, porcina y ovina tienen un alto impacto en la industria ganadera, siendo *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* los principales responsables de pérdidas millonarias en todo el mundo. Se estima que sólo la brucelosis bovina causa pérdidas anuales por u\$s 600 millones en América Latina.

En el caso de la brucelosis bovina, *B. abortus* puede ser encontrada en la leche, fluidos vaginales, orina, excrementos y tejido placentario. En los animales, la infección puede causar abortos durante el último trimestre de gestación, nacimiento de terneros débiles, infertilidad en hembras y machos, disminución o interrupción de la lactancia y disminución de peso. Luego del primer aborto, las hembras pueden volver a quedar preñadas y dar a luz, aunque su fertilidad puede verse reducida. La cría puede infectarse por transmisión vertical de la enfermedad. La bacteria permanece en los fluidos de la madre perpetuando la infección en el rodeo.

En la actualidad, las vacunas más comercializadas para la prevención de la brucelosis en animales están basadas en las cepas *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev1. En bovinos se utilizan las cepas S19 y RB51 mientras que en caprinos y ovinos, la cepa Rev1. Sin embargo, no existen vacunas disponibles para otros animales o para humanos.

### Brucelosis en humanos

La adquisición de la enfermedad por los seres humanos ocurre por el consumo de productos lácteos derivados de animales infectados sin pasteurización, a partir del contacto directo con animales infectados y por medio de aerosoles. Las vías más comunes de entrada de *Brucella* suelen ser a través de las mucosas, la vía oral y nasal, por laceraciones en la piel, y también a través de las membranas conjuntival y vaginal. Si bien el ser humano es susceptible a la infección con algunas especies de *Brucella*, no constituye su reservorio natural, ya que el contagio humano-humano es muy raro.

La fiebre alta es una de las manifestaciones más evidentes de los primeros estadios de la infección, por ello se la denominada fiebre de Malta o fiebre ondulante. Esto se debe a que la fiebre aparece de forma cíclica a lo largo del día, incrementándose durante la noche. También se puede presentar sudoración nocturna, fatiga, anorexia, pérdida de peso, jaqueca, mialgia o artralgia. El tiempo de incubación puede durar entre 7 a 60 días, siendo lo más usual experimentar síntomas desde el día 14 al 30. El tratamiento de la enfermedad requiere de una combinación de antibióticos por períodos prolongados de tiempo. Sin embargo, es común un 5-

10% de recaídas luego de haber completado el tratamiento debido a que, muchas veces, los pacientes interrumpen el tratamiento antes de tiempo, aunque la tasa de mortalidad es menor al 0.1% de los infectados. Cada año aparecen 500.000 nuevos casos de brucelosis humana en todo el mundo y las tasas de prevalencia en algunos países excede los 10 casos cada 100.000 personas [1,2]. La brucelosis humana es endémica en muchas regiones del mundo, con excepción de algunos países europeos y Australia. En zonas endémicas, la falta de diagnósticos y tratamientos adecuados puede resultar en serias complicaciones que a menudo llevan a la muerte, tales como: espondiolitis, endocarditis infecciosa y encefalitis [10].

### Brucelosis en Argentina

En nuestro país la brucelosis bovina es un problema sanitario importante. En un estudio realizado en el 2002 se estimó que entre el 10 a 13% de los rodeos se encuentran infectados con *B. abortus*, siendo la tasa individual en los bovinos del 4-5%. Sólo en Argentina dicha enfermedad produce pérdidas por 60 millones de dólares al año debido al número de vacas infectadas. También se ha reportado brucelosis en cabras, ovejas, cerdos y perros. En el caso de la brucelosis humana se detectaron 212 casos entre 1993 y 1995 en Argentina, y la mayoría ocurre en zonas rurales que carecen de control sobre la enfermedad en los animales. Además se considera que la incidencia de esta enfermedad en regiones aisladas está subestimada, siendo su incidencia mayor a lo reportado [11]. Debido a que nuestro país es un gran productor gandero, esta enfermedad conlleva a grandes pérdidas económicas cada año.

### Proceso de infección

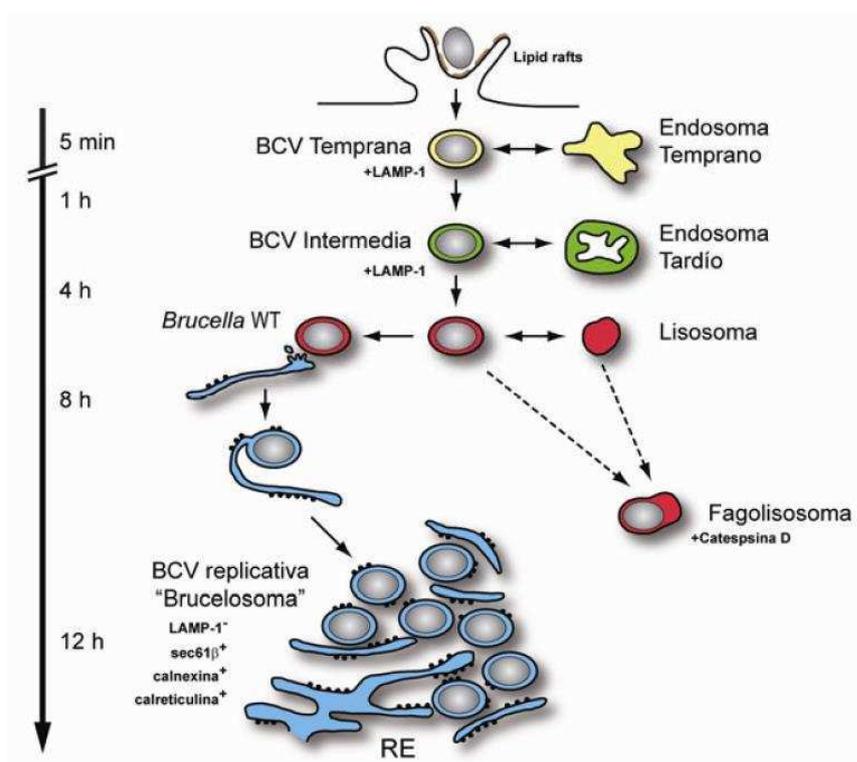
*Brucella* es un patógeno intracelular facultativo, el cual infecta células fagocíticas y no fagocíticas, incluyendo macrófagos, células dendríticas, células epiteliales y trofoblastos placentarios. La infección intracelular requiere de la interacción hospedador-patógeno, y comprende las etapas de adhesión, invasión, establecimiento de la infección y diseminación. En general, para poder sobrevivir y multiplicarse dentro del hospedador, el patógeno detecta diversas señales del medio ambiente que activan la expresión de genes específicos y la secreción de proteínas que le permiten a la bacteria adaptarse al nuevo ambiente. Las señales que disparan la expresión de factores de virulencia son en general señales físicas o factores químicos como el cambio en la temperatura, el pH, o la presencia de especies reactivas de oxígeno. Entre los mecanismos empleados se encuentran: la capacidad de sobrevivir en vesículas a pH ácido, inhibir la apoptosis de los macrófagos, prevenir la fusión con el fagolisosoma, y activar mecanismos de reparación y detoxificación.

Para poder invadir y sobrevivir dentro de las células que infecta, *Brucella* modifica el proceso de maduración de los fagosomas inhibiendo la fusión de lisosomas a la vacuola que la contiene, y redirige la vía endocítica para evitar la muerte por los mecanismos bactericidas de la misma. De este modo, logra establecerse en su nicho replicativo intracelular, el cual es un compartimento membranoso derivado de retículo endoplásmico (RE).

### **Etapas iniciales de la infección y tráfico intracelular de *Brucella***

*Brucella* puede ingresar a un organismo por medio de las vías digestivas y respiratorias. Una vez que la bacteria entra en contacto con la célula a infectar, las bacterias se adhieren a la membrana plasmática del hospedador, y se acumulan formando micro-colonias. Luego ingresan a la célula hospedadora por macropinocitosis, lo cual requiere de la presencia de balsas lipídicas (o *lipid rafts*) presentes en la membrana. De este modo, se forma una vacuola que contiene a *Brucella* denominada BCV (Brucella Containing Vacuole, por sus siglas en inglés). Una vez dentro de la célula, *Brucella* inhibe la fusión de la BCV con lisosomas. Sin embargo, la BCV interactúa transitoriamente con endosomas tempranos adquiriendo el marcador lisosomal LAMP-1 pero sin fusionarse a estos. Posteriormente, por la interacción transitoria con lisosomas y la acción de una ATPasa vacuolar de H<sup>+</sup>, la BCV se acidifica llegando a un pH de 4-5. La disminución del pH es un paso clave y esencial para la activación de los genes de virulencia de *Brucella*, como el Sistema de Secreción Tipo IV (SST4) [12]. La acción de la bacteria redirecciona a la BCV inhibiendo la interacción con lisosomas, y por ende escapando de la vía endocítica normal. El escape a la fusión lisosomal por parte de *Brucella* es dependiente del SST4 VirB, entre otros factores. Luego, las BCVs intermedias interactúan con los sitios de salida del RE (ERES), captando las vesículas de transporte recubiertas de COPII y fusionándose al RE. Allí forman BCVs multimembranosas con marcadores de RE (como sec61 $\beta$ , calnexina y calreticulina) y no presentan marcadores lisosomales típicos, como LAMP-1. Este es el nicho replicativo de *Brucella*, que se denomina BCV replicativa o brucelosoma [3,13-15].

Durante las primeras etapas de la infección se produce una rápida disminución en el número de bacterias intracelulares, debido a que no todas las bacterias que ingresan logran escapar de la vía endocítica. Sin embargo, aquellas que logran establecerse en el brucelosoma, al cabo de las 12 horas de haber ingresado en la célula que infecta, *Brucella* comienza una rápida tasa de replicación intracelular, sin producirle un daño aparente al hospedador. Las BCVs replicativas se multiplican, dando origen a nuevas BCVs hijas individuales. Probablemente este sea un proceso de fisión de una BCV madre en dos BCVs hijas luego de tomar membranas derivadas de RE. Finalmente, estas bacterias que logran escapar de la vía endocítica, quedan protegidas del sistema inmune y proliferan. Cuando el número de bacterias dentro de la célula hospedadora es muy elevado (entre la 1er y 7ma semana post infección), se produce la ruptura de las células eucariotas y las bacterias se liberan a la sangre circulante produciéndose una bacteremia. De este modo *Brucella* se disemina, pudiendo infectar el hígado, el bazo, la médula ósea, las glándulas mamarias, los órganos sexuales y las glándulas salivales [16]. Finalmente, esto puede dar lugar a la cronicidad de la infección.



**Figura 1. Esquema del proceso de infección intracelular de *Brucella*.** Las bacterias entran a la células mediante interacción con *lipid rafts* (raft lipídicos) presentes en la membrana celular. Por invaginación de la membrana celular, se forma una vacuola conteniendo a *Brucella*, la cual pasa a denominarse *Brucella Containing Vacuoles* (BCVs por sus siglas en inglés) que circulan por la vía endocítica. Las BCVs interactúan secuencialmente con los compartimentos tempranos (amarillo) donde la vacuola adquiere marcadores como LAMP-1 que maduran en endosomas tardíos (verde) y lisosomas (rojo). Si el proceso de maduración de los fagosomas no puede ser modificado y éstos derivan en fagolisosomas como ocurre con algunas mutantes, las bacterias son eliminadas. Las BCVs intermedias interactúan con los sitios de salida del RE (ERES) para luego fusionarse al RE (azul) y generar BCVs replicativas derivadas de RE (brucelosoma). Figura adaptada de Star *et al.*, 2008 [17].

### Condiciones del Brucelosoma

La BCV consiste en un nicho replicativo con propiedades inhóspitas. Durante el tránsito intracelular y dentro de la BCV, las células de *Brucella* están sometidas a diversos factores de estrés como baja tensión de oxígeno, bajo pH, especies reactivas de oxígeno, especies nitrogenadas y privación de nutrientes. Para ello, *Brucella* ha desarrollado diversos mecanismos que le permiten detectar las condiciones de estrés que encuentra dentro de las células que infecta y adaptarse a ellas por medio de una adecuada modificación de la expresión de genes y proteínas [3,14,15,18]. Por ende, su éxito como patógeno reside en su capacidad de sobrevivir a estas condiciones extremas y persistir por largos períodos dentro de la BCV (Figura 1).

### Factores de virulencia

A diferencia de otros patógenos, en *Brucella* no se han descrito factores de virulencia clásicos, como exotoxinas, cápsula, fimbrias, plásmidos, inductores apoptóticos ni fagos lisogénicos [19]. Sin embargo, a pesar de que *Brucella* no posee factores de virulencia "clásicos", posee una

batería de mecanismos fisiológicos y adaptaciones metabólicas que, en definitiva, son los que le permiten sortear las defensas del hospedador y adaptarse a la vida intracelular. El principal factor de virulencia en *Brucella* consiste en el sistema VirB, el cual se describe en la siguiente sección. Algunos de estos factores se describen a continuación.

El LPS (Lipopolisacárido) liso de *Brucella* es un débil inductor de la respuesta inflamatoria, de la activación del complemento y tiene baja actividad endotóxica. El lípido-A del LPS, cuyas modificaciones son moduladas por el sistema de dos componentes BvrR/BvrS y BacA, tiene ácidos grasos más extensos que los lípidos-A clásicos. Este componente del LPS sería el responsable de evitar que *Brucella* genere una respuesta inflamatoria a escala general en el hospedador. Por otro lado, la cadena-O del LPS es resistente a la degradación por los macrófagos y se transporta a los MHC-II formando macrodominios que disminuyen la capacidad de activar células T CD4+. Además, la cadena-O es inusualmente larga, con aproximadamente 100 repeticiones del antígeno-O. La cadena-O es la que le confiere a *Brucella* la capacidad de entrar a la célula usando *lipid rafts*, inhibir la fusión fagosoma-lisosoma y prevenir la apoptosis del macrófago.

En el periplasma de *Brucella* se encuentran glucanos cíclicos  $\beta$ -1,2 (C $\beta$ G), el cual es necesario para el establecimiento de la infección. Los C $\beta$ G le permite interactuar con sus respectivos hospedadores eucariotas por un mecanismo aún desconocido, pero se cree que estos compuestos desestabilizan los *lipid rafts* de las BCVs durante el tráfico para evitar la fusión extensiva con lisosomas y la correcta maduración de los mismos [20].

El sistema de dos componentes BvrR/BvrS dirige la expresión de varios genes, entre ellos genes relacionados con la envoltura celular y la membrana externa: proteínas de membrana externa, chaperonas, lipoproteínas, enzimas de síntesis de LPS y ácidos grasos, sistemas de transporte y genes flagelares [21,22]. También regula la expresión del opéon VirB [23].

*Brucella* posee una Cu/Zn superóxido dismutasa en el espacio periplásmico denominada SodC, que la protege del O<sub>2</sub><sup>-</sup> exógeno proveniente del ataque del macrófago [24]. SodA, una Mn-superóxido dismutasa citoplasmática, protege a la bacteria del O<sub>2</sub><sup>-</sup> de origen endógeno, generado por la respiración aeróbica [25].

En las BCVs replicativas, los complejos Citocromo c oxidasa tipo-cbb3 y Citocromo bd ubiquinol oxidasa son necesarios para mantener la respiración de las bacterias a bajas concentraciones de O<sub>2</sub>. El óxido nítrico (NO) producido por la iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) del macrófago tiene efectos microbicidas sobre *Brucella*. La enzima óxido nítrico reductasa NorD de *Brucella* es un elemento clave en la detoxificación de NO. Además, debido a que la bacteria puede reducir nitrato, nitrito y óxido nitroso, *Brucella* podría usar NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en lugar de O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones en la respiración [26].

Si bien *Brucella* es una bacteria no móvil, en *B. melitensis* 16M se ha demostrado que bajo ciertas condiciones de cultivo se forma una estructura similar a un flagelo, el cual es importante para la virulencia, pero del cual aún se desconoce su función [27].

### **Sistema de Secreción Tipo IV: el operón *virB***

El factor de virulencia más caracterizado de *Brucella* es el operón *virB* que codifica para un Sistema de Secreción de Tipo IV (SST4) [28-31]. Este sistema está codificado por un operón que contiene 12 genes, recibe dicho nombre por homología al sistema homónimo de *A. tumefaciens* responsable de la translocación del complejo-T a la célula hospedadora. Este sistema es indispensable para el correcto tráfico intracelular de la bacteria ya que está involucrado en la maduración de la BCV. Recientemente, se ha descrito que este sistema transloca diversas proteínas efectoras desde el citoplasma de la bacteria, hacia el citoplasma de la célula eucariota que infecta, modificando de este modo la respuesta del hospedador. Sin embargo aún se desconoce la función de dichas proteínas. Los primeros sustratos identificados fueron VceA y VceC. Recientemente se determinó que VceC induce inflamación a través de la inducción de estrés del retículo endoplásmico; RicA interactúa con GDP y Rab2 evitando el reclutamiento de Rab a la BCV, afectando el tráfico intracelular; SepA también estaría involucrado en el tráfico celular [32-35]. La regulación de la expresión del operón *virB* es compleja, en la cual se ven involucrados un gran número de factores transcripcionales [36]. La interrupción del operón *virB* da lugar a una completa pérdida de la capacidad de infección tanto en líneas celulares como en ratones [37]. Por tanto, la expresión del operón *virB* es crucial para la infección, la supervivencia y el establecimiento del nicho replicativo en las células que *Brucella* infecta.

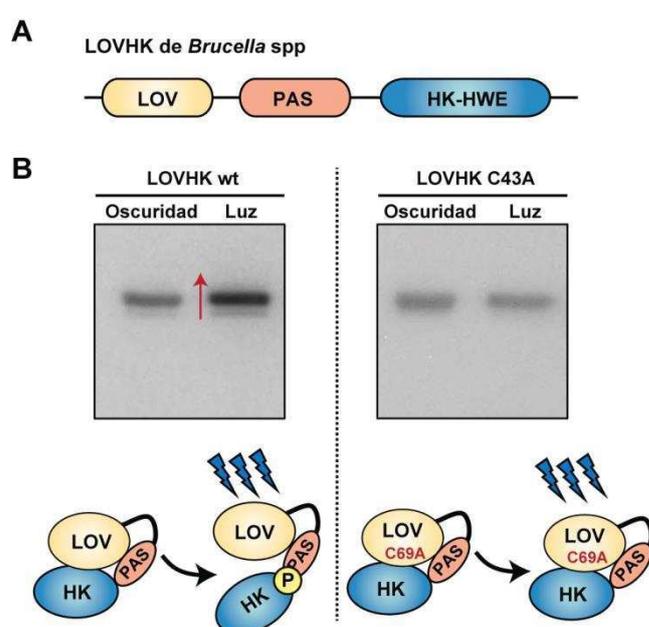
### **LOVHK de *Brucella***

Los dominios PAS (Per, Arnt y Sim) son módulos sensores que pueden detectar distintas señales ambientales, y se encuentran conservados en los distintos reinos de la vida [38-40]. En particular, los dominios LOV (Luz-Oxígeno-Voltaje) son un tipo de dominio PAS, los cuales se caracterizan por sensor luz azul (450 nm), y han sido caracterizados en plantas, hongos y algas [41]. Los dominios LOV unen como cofactor una molécula de flavina. Cuando el dominio LOV es iluminado, se forma una unión covalente entre el azufre de un residuo Cys conservado en el dominio LOV y el carbono C(4a) de la flavina. En la oscuridad este enlace se rompe espontáneamente completando el fotociclo [42-47].

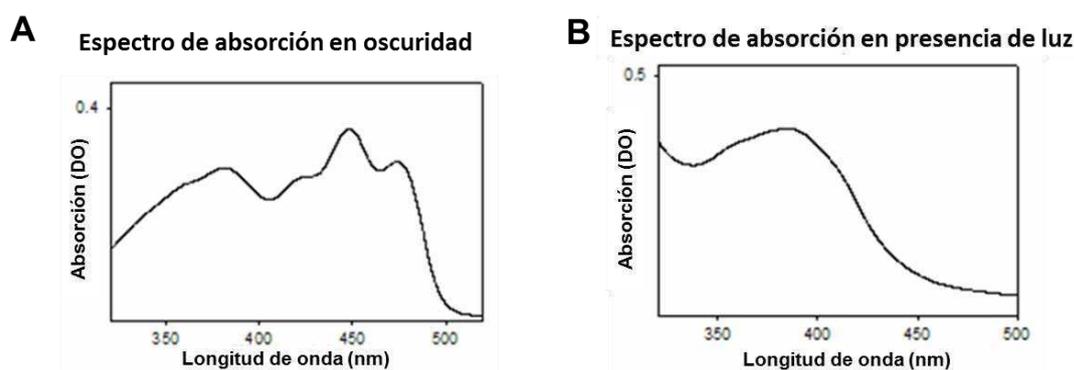
A su vez, estos dominios se encuentran presentes en el genoma de muchas bacterias, y en general se ubican hacia el extremo N-terminal de proteínas histidina kinasas sensoras (HKs). Los genes que se predice codifican para LOVHKs se encuentran conservadas en un amplio rango de grupos taxonómicos de bacterias, incluyendo tanto bacterias fotosintéticas como bacterias quimiotróficas no fotosintéticas [48,49]. Actualmente se conoce que algunas

de estas proteínas son capaces de modular diferentes procesos celulares como la fototaxis, formación de biofilms y virulencia [50-52]. Sin embargo, aún se desconoce el rol de la mayoría de los fotorreceptores putativos en los procesos mediados por luz en procariontas no fotosintéticas.

El genoma de todas las especies de *Brucella* codifica para un fotorreceptor denominado LOVHK, cuya secuencia se encuentra muy conservada entre las diversas especies de *Brucella*. Esta proteína es una proteína citoplasmática, la cual posee tres dominios: un dominio LOV en el extremo N-terminal, seguido de un dominio PAS y un dominio HK en el extremo C-terminal que pertenece a la familia HWE (estas HK no poseen una Fbox, y poseen un motivo HWE en el dominio catalítico/ATPasa) (Figura 2A) [53]. En el caso de *Brucella*, LOVHK está asociada a una molécula de FMN (Flavín Mononucleótido) como cofactor en el dominio LOV. En condiciones de oscuridad, la proteína posee un espectro de absorción con un pico en 450 nm correspondiente al FMN no unido covalentemente a la proteína (Figura 3A). Cuando LOVHK es iluminada con luz azul *in vitro*, ocurre un fotociclo similar al descrito para las fototropinas (proteínas receptoras de plantas) como el previamente mencionado: se forma un aducto covalente entre el C(4a) de la flavina y la Cys 69 en del dominio LOV, lo cual se evidencia en un espectro de absorción por la desaparición de la banda 450 nm y la aparición de una banda a 390 nm (Figura 3B). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en las fototropinas, la proteína no retorna rápidamente al estado basal cuando es incubada nuevamente en oscuridad. Cuando LOVHK es iluminada *in vitro*, la formación del aducto covalente produce un cambio conformacional, lo cual da lugar a un aumento en la tasa de autofosforilación respecto de cuando la proteína es mantenida en oscuridad. Al reemplazar la Cys 69 por un residuo de Ala, se impide la formación del aducto covalente ante la exposición a la luz azul, por lo que el grado de autofosforilación no cambia entre las condiciones de luz y oscuridad [54,55] (Figura 2B).



**Figura 2. La actividad de autofosforilación de LOVHK aumenta en presencia de luz y es dependiente de la Cys 69.** **A.** Esquema de la composición de dominios de LOVHK de *Brucella* spp. **B.** Las proteínas LOVHK wt y LOVHK C69A de *Brucella* fueron irradiadas con luz blanca por un minuto (Luz) o se mantenidas en oscuridad, y luego se adicionó [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP. La incubación se continuó por 4 min en oscuridad y las muestras se sometieron a un SDS-PAGE. El esquema muestra un posible modelo de activación de LOVHK: en oscuridad los dominios de LOVHK se encuentran en una conformación cerrada inhibiendo la autofosforilación. La luz induce un cambio conformacional en el dominio LOV, liberando a la HK e incrementando su actividad enzimática. La mutación C69A bloquea la formación del aducto covalente con el FMN lo cual impide la activación de LOVHK.

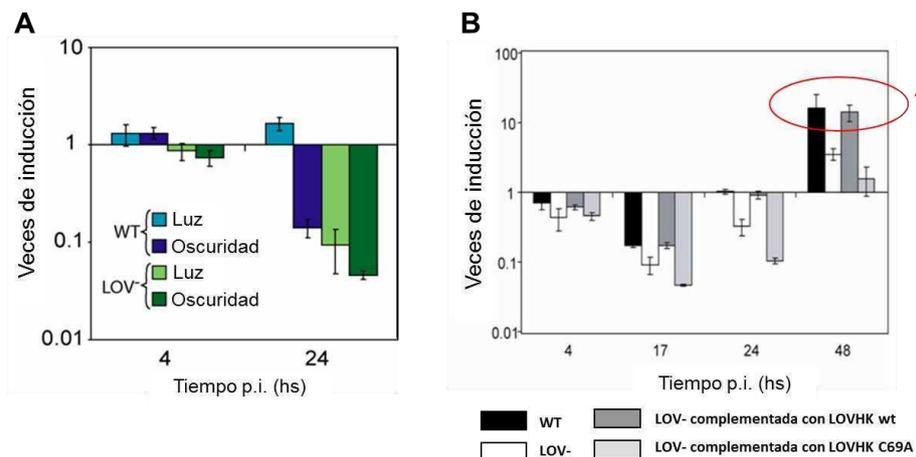


**Figura 3. Fotociclo de LOVHK de *Brucella*.** **A.** Espectro de absorción de la proteína recombinante purificada en oscuridad, la cual presenta un máximo de absorción a 450nm correspondiente al FMN sin unión covalente con la proteína. **B.** Espectro de absorción al iluminar con luz azul (450 nm): la banda de 450 nm desaparece, y al mismo tiempo se forma una aparece una banda de absorción a 390 nm. Este comportamiento es similar a otros dominios LOV de plantas, indicando la formación de un aducto covalente entre el C4a del cofactor FMN y la Cys 69 de la proteína.

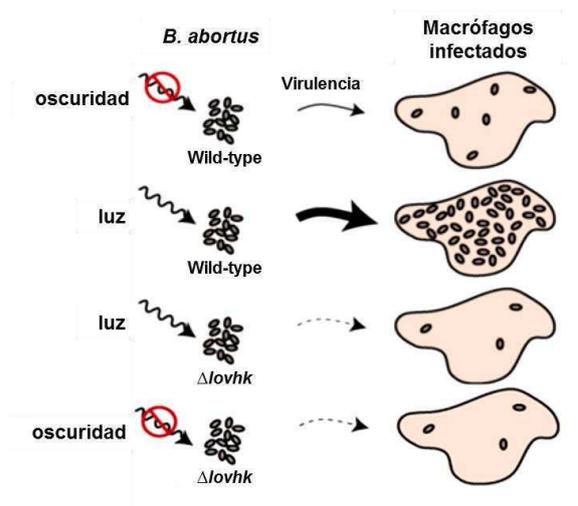
En ensayos de infección en macrófagos murinos realizados con la cepa wt en condiciones de luz u oscuridad se observó que la misma presenta una mayor tasa de replicación intracelular cuando es iluminada respecto de cuando en mantenida en oscuridad. En el caso de una cepa mutante en el gen que codifica para LOVHK se observó que la tasa de replicación no varía entre las condiciones de luz u oscuridad y la tasa es similar a la observada en el caso de la cepa wt en condiciones de oscuridad [54] (Figura 4A). Al complementar la mutante de *lovhk* con el gen wt, se restituye la capacidad de replicación intracelular en condiciones de luz, mientras que si se complementa con una copia del gen en el cual el residuo de Cys fue mutado a un residuo de Ala no se logra recuperar la capacidad de replicación (Figura 4B). Por ende, *B. abortus* wt es más infectiva cuando es incubada en condiciones de luz respecto de oscuridad y, este efecto, es mediado por la proteína LOVHK. De este modo, LOVHK constituye un factor de virulencia. En la Figura 5 se resumen estos resultados a modo de esquema.

Recientemente Kim *et al.* 2014 también observaron que en infecciones de macrófagos humanos THP-1 que la una cepa mutante de *lovhk* en *B. abortus* 2308 no presenta deficiencias en la entrada, pero sí tiene un defecto de supervivencia dentro de 1 h a 24 hs p.i. Luego de las 24 hs replica a una tasa equivalente a la cepa wt (independientemente de las condiciones de luz u oscuridad). A su vez, Gourley *et al.*, 2014 y Kim *et al.* 2014 han demostrado que una cepa mutante en *lovhk* es menos infectiva en ratones a tiempos cortos de infección, tanto en *B. melitensis* 16 M y como en *B. abortus* 2308 respectivamente [56,57], y que LOVHK de *B. abortus* 2308 es requerida para el establecimiento de la infección en ratones a largo plazo.

Las proteínas HK sensoras en bacterias se encuentran asociadas a un tipo de señalización intracelular denominado Sistema de dos componentes, el cual se describe a continuación.



**Figura 4. LOVHK de *Brucella* es un factor de virulencia.** **A.** Se infectaron macrófagos J774A.1 con *B. abortus* 2308 crecidas en luz (azul claro) u oscuridad (azul oscuro) y la cepa LOV- crecida en luz (verde claro) u oscuridad (verde oscuro). **B.** Se infectaron macrófagos J774A.1 con la cepas *B. abortus* 2308 (negro), LOV- (blanco), LOV-complementada con un plásmido con el gen LOV-HK (gris oscuro), LOV complementada con el gen LOV-HK C39A (gris claro). Los datos están relativizados a los valores de 1 hora de infección correspondientes al número de bacterias que efectivamente entraron en las células. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de tres réplicas. El experimento A es representativo de tres repeticiones independientes y el B de dos repeticiones independientes [54].



## Sistemas de señalización intracelular en bacterias

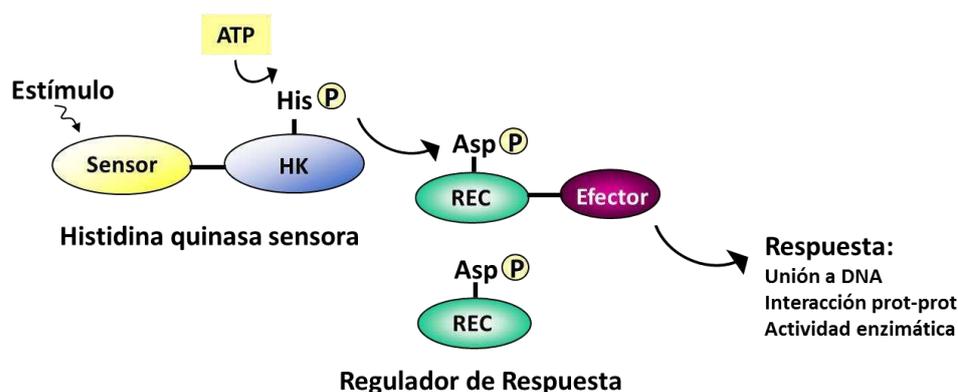
### Sistemas de un componente

Las bacterias han desarrollado una variedad de mecanismos tanto físicos como químicos para adaptarse a cambios ambientales y en el microambiente celular. Una de las principales respuestas de adaptación a los cambios ambientales consiste en una regulación diferencial de la expresión génica. Los sistemas de un componente son uno de los sistemas regulatorios más comunes en bacterias. Los mismos están formados por una sola proteína citoplasmática, la cual posee un dominio sensor fusionado a un dominio efector. Estos simples sistemas de

señalización constituyen los progenitores evolutivos de un sistema más complejo denominado sistema de dos componentes [58].

### Sistema de dos componentes

Los sistemas de dos componentes (TCS por sus siglas en inglés – Two Component System) le permiten a las bacterias sentir y responder a los cambios en el medio ambiente. Estos sistemas están formados por dos proteínas: una histidina quinasa sensora (HK) y un Regulador de Respuesta (RR). Usualmente, las HK sensoras consisten en un dominio sensor en el extremo N-terminal y un dominio HK en el extremo C-terminal. Cuando el dominio sensor detecta un estímulo particular, la proteína sufre un cambio conformacional dando lugar a la activación del dominio HK, el cual se autofosforila en un residuo histidina (His) conservado en el dominio HK. Posteriormente, el fosfato de la His es transferido a un residuo Aspártico (Asp) conservado en el dominio receptor (REC) del RR [59,60]. En general, los RRs son proteínas que poseen un dominio receptor del fosfato (REC) en el extremo N-terminal y un dominio efector en el extremo C-terminal. Este último dominio puede ser un dominio de unión a ADN que activa la transcripción de genes específicos en respuesta al estímulo inicial, un dominio de unión a proteínas o puede tener actividad enzimática (Figura 6). De este modo, a través del dominio efector, los RRs dan lugar a una respuesta celular, modificando la expresión génica y la fisiología bacteriana. Sin embargo, también existen RRs que poseen sólo un dominio REC [59,61,62]. Estos RRs de dominio único no afectan directamente la expresión génica, sino que pueden funcionar como moduladores en diversos procesos moleculares [63].



**Figura 6. Representación esquemática los sistemas de dos componentes.** Sistema de dos componentes bacteriano. Ante un estímulo específico una histidina quinasa (HK) se activa, se autofosforila en una histidina conservada y luego transfiere el fosfato a un aspartato conservado presente en el dominio fosfoaceptor (REC) de una segunda proteína denominada regulador de respuesta (RR). Esta última desarrolla una respuesta específica en la célula: puede interactuar con el ADN (factores de transcripción), interactuar con otras proteínas, o desarrollar alguna actividad enzimática.

La importancia de los TCSs se ve reflejada en en la amplia distribución que este tipo de sistema tiene a lo largo de los distintos grupos de bacterias. En algunos microorganismos pueden llegar a tener hasta 250 sistemas de dos componentes, aunque en promedio existen entre 50 a 100 por genoma. Conociendo el genoma de una determinada especie, la identificación de genes que codifiquen para posibles HKs y RRs se puede realizar fácilmente por medio de homología de secuencia. En muchos casos, una HK y su correspondiente RR se encuentran codificados en un mismo operón, lo cual sugiere que ambos forman parte de un par de interacción específico [64]. Sin embargo, muchos de los genes que codifican para estos componentes son genes huérfanos, por lo que la identificación de su correspondiente compañero de interacción no es fácilmente predecible. Por otro lado, existen HKs que pueden fosforilar a más de un RR, o varias HKs que pueden fosforilar a un mismo RR, agregando un mayor grado de complejidad a estos sistemas. En estos casos, la interacción entre los distintos componentes ya no se desprende de la ubicación en el genoma [65].

Dada la gran cantidad de TCSs presentes en una misma célula, es muy probable que exista *cross-talk* indeseado entre los distintos pares de señalización. Como consecuencia, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para evitar este efecto. Por un lado, *in vivo*, la cantidad fisiológica de las HKs es mucho más baja que la de los RRs, lo cual evita la amplificación inespecífica de la señal detectada por una determinada HK. Por otro lado, hay mecanismos que permiten inactivar a la HK y RR correspondientes, de modo tal que el sistema retorne al estado basal ante la ausencia de estímulo. Las HKs bacterianas están formadas por un dominio N-terminal denominado DHpt (dominio de dimerización y de fosfotransferencia de histidina) el cual posee el residuo de His conservado, y un dominio C-terminal CA (catalítico) el cual posee la capacidad de unir ATP y la actividad ATPasa [66]. Muchas de estas HKs puede ser bifuncionales, es decir que además de la actividad kinasa pueden tener actividad fosfatasa sobre el mismo RR con el cual interactúan. La actividad fosfatasa requiere de Mg<sup>2+</sup>, y en reacciones *in vitro* la presencia de ADP, ATP o análogos no hidrolizables de ATP aumentan la actividad fosfatasa [67]. En otros casos, los RRs poseen una actividad auto-fosfatasa intrínseca, es decir que ellos pueden catalizar su propia defosforilación, logrando disminuir el grado de activación.

### **Sistemas que involucran factores sigma alternativos de la transcripción**

Un tercer mecanismo de regulación de la expresión génica, es por medio de factores sigma ( $\sigma$ ) alternativos que se activan ante determinados estímulos. Los factores  $\sigma$  bacterianos funcionan como subunidades de la ARN polimerasa (ARNP), facilitando el reconocimiento del promotor y la iniciación de la transcripción. Dentro de la familia de proteínas  $\sigma$ , el subgrupo ampliamente conservado ECF (Extracitoplasmic function  $\sigma$  factors - Factor extracitoplasmático) juegan un papel principal en la adaptación a los cambios en las condiciones ambientales [68,69]. En ausencia de un estímulo, los factores  $\sigma$  se encuentran inactivos unidos a un factor anti-sigma (anti- $\sigma$ ), el cual impide que el factor  $\sigma$  se una a la ARNP. Ante un estímulo determinado como cambios en el potencial redox, señales de stress o la privación de nutrientes, el factor  $\sigma$  se

libera del factor anti- $\sigma$ , permitiendo que el factor  $\sigma$  se una a la ARNP y de este modo pueda activar la transcripción de genes específicos.

### Sistemas de dos componentes y factores $\sigma$

En general los sistemas de un componente, dos componentes y los sistemas que emplean factores  $\sigma$  alternativos de la transcripción en general actúan modificando la expresión génica por medio de mecanismos moleculares independientes. Sin embargo, existen casos en los cuales un TCS junto con un factor  $\sigma$  pueden regular la expresión génica de forma coordinada. Un ejemplo es el caso de la cascada de señalización CseBC/ $\sigma$ E de *Streptomyces coelicolor*, el cual no posee un factor anti- $\sigma$ , sino que la regulación está dada por el sistema de dos componentes CseB-CseC [70]. Otro ejemplo es el caso de la proteína PhyR, un RR que ha sido caracterizado en los últimos años en diversas  $\alpha$ -proteobacterias [71], el cual participa de un mecanismo de regulación de la expresión génica combinando un TCS y un factor  $\sigma$ ECF. Las características particulares de este sistema se describen en la siguiente sección.

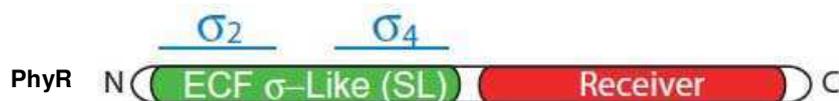
### Sistema de Respuesta General a Estrés (GSR) en $\alpha$ -proteobacterias

El sistema de Respuesta General a Estrés (GSR por sus siglas en inglés: General Stress Response) en un sistema característico de  $\alpha$ -proteobacterias, altamente conservado en el mismo y ausente en otros grupos bacterianos [71]. Este sistema que le permite a la bacteria responder ante diversos factores de estrés, ambientales e intracelulares, permitiéndole adaptarse a las nuevas condiciones del ambiente a través de la regulación de la transcripción de genes de respuesta a estrés. En los últimos años este sistema ha sido descrito en varias especies del grupo, entre ellos: *Methylobacterium extorquens* AM1 [72,73], *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 [74], *C. crescentus* CB15 [75-77], *Sphingomonas* sp. Fr1 [78], *Sinorhizobium meliloti* [79,80], *Bartonella quintana* [81], *Methylosinus* sp. B4S [82], *Rhizobium etli* [83], *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 [84], y *Brucella abortus* 2308 [85].

Este sistema forma parte de un sistema de señalización híbrido, que incluye un sistema de dos componentes y un factor sigma ( $\sigma$ ) alternativo de la transcripción. Los componentes principales del sistema GSR en  $\alpha$ -proteobacterias son: un factor anti-anti-sigma denominado PhyR, un factor anti-sigma denominado NepR, y un factor sigma ( $\sigma$ ) alternativo de la transcripción perteneciente a la familia ECF, el cual puede adoptar distintos nombres en las distintas especies.

PhyR (Phyllosphere induced Regulator) es el componente clave de este sistema en  $\alpha$ -proteobacterias que fue inicialmente descrito en *M. extorquens* AM1. PhyR es un RR que, a diferencia de la mayoría de los RRs, posee un dominio efector en el extremo N-terminal y un dominio REC en el extremo C-terminal [72,86]. El dominio efector es un dominio similar factor sigma ECF alternativo de la transcripción, con regiones  $\sigma$ 2 y  $\sigma$ 4 característicos de los factores

$\sigma$ ECF. Sin embargo, varios de los residuos invariantes de las regiones  $\sigma_2$  y  $\sigma_4$  de los factores  $\sigma$ ECF clásicos no se encuentran conservados en PhyR y tampoco se encuentra conservada la región de unión -10 en el  $\sigma_2$ . Como consecuencia, al no poseer los residuos clave involucrados en la interacción con el DNA, PhyR no puede funcionar como un factor sigma regulando directamente la expresión de genes (Figura 7) [68]. Por otro lado, el dominio REC de PhyR posee un residuo Asp conservado, el cual puede ser fosforilado por una HK específica. La regulación principal de este sistema se basa en el grado de fosforilación de PhyR, el cual da lugar a la activación del sistema.

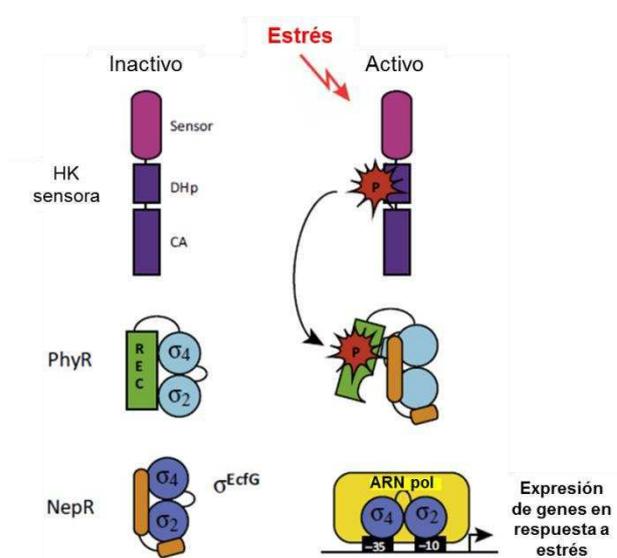


**Figura 7. Representación esquemática de PhyR.** PhyR es un RR que posee un dominio REC C-terminal, y un dominio simil- $\sigma$  hacia el extremo N-terminal. Una particularidad de este dominio, es que posee las regiones  $\sigma_2$  y  $\sigma_4$  características de los factores  $\sigma$ ECF, pero los residuos involucrados en la interacción con el ADN se encuentran mutados, por lo que no puede funcionar regular directamente la expresión génica.

En ausencia de estrés, NepR se encuentra unido al factor  $\sigma$ ECF, manteniendo el sistema en estado inactivo. En presencia de un determinado factor de estrés como peróxido de hidrógeno, aumento en la presión osmótica, luz UV, desecación, o ausencia de nutrientes, una HK sensora fosforila a PhyR, la cual sufre un cambio conformacional dejando expuestas las regiones  $\sigma_2$  y  $\sigma_4$ , aumentando la afinidad por NepR. De este modo, NepR es secuestrado por PhyR por medio del dominio simil-sigma, liberando de este modo al  $\sigma$ ECF, el cual puede ahora asociarse a la ARN polimerasa y dirigir la expresión de genes específicos en respuesta a estrés (Figura 8). A este mecanismo se lo denomina *partner-switching*, ya que se basa en un intercambio del compañero de interacción de NepR ( $\sigma$ ECF por PhyR).

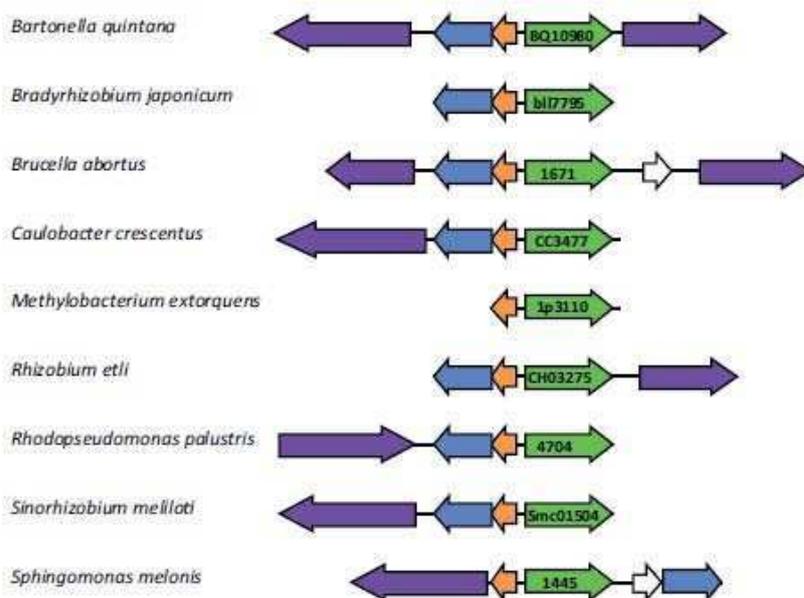
En varias especies de  $\alpha$ -proteobacterias se ha demostrado que la fosforilación *in vitro* del Asp conservado en el dominio REC de PhyR por medio de acetil-fosfato es requerida para que NepR pueda interactuar con PhyR. Entre estas especies se encuentran *M. extorquens* [73], *B. japonicum* [74], *C. crescentus* [75,87], *Sphingomonas* sp. Fr1 [78,88], *S. meliloti* [79], y *B. quintana* [81].

En cuanto a los tres componentes principales del sistema GSR, *phyR* y *ecf* no son genes esenciales, ya que se ha logrado contruir cepas mutantes en estos genes en varios microorganismos. Por el contrario, el principal regulador negativo de este sistema, *nepR*, sí constituye un gen esencial, el cual no ha podido ser deletado en una cepa wt en varias  $\alpha$ -proteobacterias [77,78,88].



**Figura 8. Esquema del sistema GSR estudiado en *Methylobacterium extorquens* AM1.** En ausencia de estrés el ECF  $\sigma$  factor es secuestrado por NepR (factor anti- $\sigma$ ). Ante un agente estresante PhyR (factor anti-anti- $\sigma$ ) es fosforilado, se activa e interacciona con NepR. Así el ECF  $\sigma$  factor es liberado y puede asociarse con la ARN Polimerasa para dirigir la expresión de genes de respuesta a estrés. Este esquema básico puede adaptarse a las diversas especies de  $\alpha$ -proteobacterias, con algunas modificaciones según la especie. Figura adaptada de Francez-Charlotte *et al.*, 2015 [89].

Una particularidad, es que la organización genómica de los genes correspondientes a este sistema se encuentra muy conservada en los diversos microorganismos (Figura 9). Sin embargo, las proteínas codificadas por estos genes pueden tener distintos nombres en algunas especies de  $\alpha$ -proteobacterias. En la mayoría de los casos, tanto *phyR* como  $\sigma$ Ecf se encuentran codificados en sentido divergente, pero en la secuencia intergénica entre ambos genes se encuentran dos promotores con sitios de unión al mismo factor sigma, lo cual permite una regulación coordinada de ambos operones pertenecientes al mismo sistema. Por otro lado, en general, el gen que codifica para *nepR* no se encuentra anotado en los genomas de  $\alpha$ -proteobacterias y posee baja homología entre con los genes *nepR* de otras especies. En varios microorganismos se encuentran codificadas posibles HKs en la región adyacente a los genes que codifican a los principales componentes de este sistema, las cuales pertenecen a la familia de las HWE [71]. Algunos de estos genes han sido ya estudiados, como *PhyK* de *C. crescentus* [75], *PhyP* de *Sphingomonas* sp. Fr1 [78] y *RsiC* de *S. meliloti* [90]. Se propone que estas proteínas pueden actuar como HKs y/o fosfatasa de *PhyR* regulando de este modo su grado de fosforilación. Por otro lado, en algunas  $\alpha$ -proteobacterias, existen genes parálogos a *phyR*, *nepR* y *ecfG*, los cuales se encuentran localizados en otras regiones del genoma y participan también de este sistema de señalización, agregando un mayor grado de complejidad al sistema.



**Figura 9. La organización genómica del sistema GSR se encuentra muy conservada en diversas alfaproteobacterias.** Cada color corresponde a un tipo de gen distinto: *ecfG* en azul, *nepR* en naranja, *phyR* en verde, genes que codifican para HKs/fosfatasa en violeta, y en blanco se representan las proteínas hipotéticas. Se indica el nombre del gen correspondiente a *phyR* para cada especie. Los nombres completos del gen para algunas especies son: Bab1\_1671 para *Brucella abortus*, MexAM1\_META1p3110 para *Methylobacterium extorquens*, RHE\_CH03275 para *Rhizobium etli*, Rpa1\_4704 para *Rhodopseudomonas palustris*, y Sphme2DRAFT\_1445 para *Sphingomonas melonis*.

Río arriba de los genes que son regulados directamente por el sistema GSR, se encuentra una secuencia consenso de reconocimiento por el factor  $\sigma$ ECF [68,71]. La identificación de esta secuencia río arriba de la secuencia codificante de diversos genes permite determinar qué genes podrían estar siendo regulados por el sistema GSR.

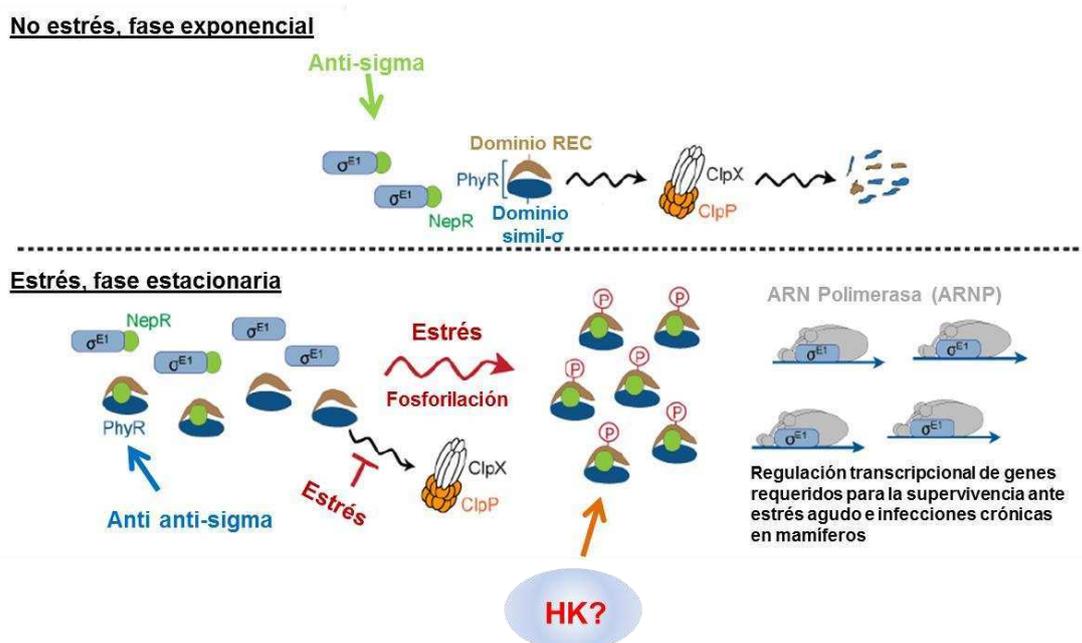
### Características del sistema GSR en *Brucella*

Al comenzar el presente trabajo de tesis, el sistema GSR aún no había sido descrito en *Brucella*. Sin embargo, al comenzar el cuarto año de beca, Kim *et al.*, 2013 caracterizaron parte de este sistema en *Brucella abortus* 2308 [85]. La proteína correspondiente al factor  $\sigma$ -ECF se denomina RpoE1 y *Brucella* posee una sola copia en el genoma de cada uno de los genes del sistema GSR: *phyR*, *nepR* y *rpoE1*. Como se observa en la Figura 9, la organización genómica de los genes correspondientes a este sistema también está conservada en *Brucella*, con la particularidad de que la secuencia codificante de *NepR* se superpone en 29 pb con la de *RpoE1*.

El sistema GSR en *B. abortus* 2308 posee algunas diferencias respecto del modelo general previamente descrito (Figura 8). *In vitro*, *NepR* posee una afinidad similar por *RpoE1* y *PhyR* no fosforilado, por lo que se supone que *in vivo* y en ausencia de estrés, *NepR* tendría la capacidad de unirse a ambas proteínas. Sin embargo, la fosforilación de *PhyR* aumenta la afinidad por *NepR*, estabilizando los complejos *PhyR-NepR in vitro*. *In vivo*, otra diferencia de este sistema respecto de otras  $\alpha$ -proteobacterias, es que en *Brucella* en ausencia de estrés los

niveles de proteína de PhyR son controlados por una proteasa denominada ClpXP, la cual reconoce una secuencia de tres aminoácidos (VAA) presente en el extremo C-terminal del PhyR. En presencia de estrés por peróxido de hidrógeno, los niveles de PhyR se estabilizan o aumentan debido a una inactivación de ClpXP y/o a la fosforilación de PhyR [85] (Figura 10). Este sistema de regulación por proteólisis permitiría contrarrestar el hecho de que NepR pueda unirse a PhyR no fosforilado, y de este modo evitar la activación del sistema GSR en ausencia de estrés. Kim *et al.*, 2013 también demostraron que los niveles de PhyR a nivel de proteína en fase estacionaria son mayores que en fase exponencial, probablemente debido a que la falta de nutrientes en fase estacionaria constituye un factor de estrés que finalmente da lugar a la estabilización de los niveles de proteína de PhyR.

El sistema GSR en *Brucella* responde a estrés por exposición a peróxido de hidrógeno en fase exponencial y estacionaria, y a pH ácido en fase estacionaria, donde una cepa mutante en el gen *rpoE1* presenta una menor supervivencia respecto de la cepa wt. Por otro lado, ellos realizaron un ensayo de microarreglos comparando la cepa mutante en *rpoE1* y la cepa wt bajo condiciones de estrés por peróxido de hidrógeno y encontraron una serie de genes que se expresan diferencialmente entre ambas cepas. Algunos de estos genes (*phyR*, *rpoE1*, *rpoH1*, *dps* y *ba14K* entre otros) poseen río arriba de la secuencia codificante, la secuencia de reconocimiento del RpoE1, lo cual sugiere que son directamente regulados por RpoE1. Por otro lado, hay otros genes cuya expresión también se ve modificada ante la ausencia de *rpoE1*, pero no presentan la secuencia de reconocimiento río arriba de la secuencia codificante (por ejemplo *lovR*), lo cual sugiere que estos genes no son directamente regulados por el RpoE1, sino que se activan de forma indirecta ante la activación del sistema GSR. Si bien se sabe que el sistema GSR responde a varias señales y por ende se espera que PhyR integre las señales percibidas por diversas HKs, al momento de comenzar con esta tesis no se conocía una HK que pudiese fosforilar y así regular la actividad de PhyR en *Brucella* (Figura 10).



**Figura 10. Esquema del sistema GSR en *Brucella abortus* 20308.** A diferencia del mecanismo previamente mencionado, en ausencia de estrés o en fase exponencial NepR tiene una afinidad similar por el factor  $\sigma$  y por PhyR no fosforilado. Sin embargo, para evitar la activación del sistema, los niveles de PhyR son controlados por la acción de la proteasa ClpXP. Ante la presencia de un factor de estrés o cuando la bacteria llega a fase estacionaria, la proteasa se inactiva, los niveles de PhyR se estabilizan y a su vez es fosforilada por una HK sensora. Esto contribuye a estabilizar los complejos NepR/PhyR liberando de este modo al factor  $\sigma$ , el cual puede asociarse a la ARNP y dirigir la expresión de genes en respuesta a estrés. Por otro lado, al momento de comenzar la tesis no se conocía qué HK podría fosforilar a PhyR de *Brucella*. Figura adaptada de Kim *et al.*, 2013 [85].

## Dominios LOV y la respuesta a estrés

La luz es la principal fuente de energía de la biósfera, pero también posee varios efectos dañinos sobre diversas moléculas biológicas. Muchas bacterias poseen proteínas sensoras de luz (fotorreceptores), y en particular de luz azul, las cuales les permite desarrollar una respuesta adaptativa a este factor de estrés. En los últimos años, la percepción de luz azul a través de proteínas que contienen un dominio LOV ha sido asociado a la activación de respuestas de stress en algunas bacterias. Por ejemplo, en las bacterias Gram-positivas *Bacillus subtilis* [91] y *Listeria monocytogenes* [92] se ha demostrado que la luz azul activa un sistema de respuesta genera a estrés asociado al factor sigma SigB característico de bacterias Gram-positivas [93], a través de la detección de esta señal por medio de proteínas que contienen dominios LOV.

Dentro del grupo  $\alpha$ -proteobacterias, en los últimos años se ha descrito una relación entre proteínas con dominios LOV y el RR PhyR en dos miembros del grupo: *C. crescentus* CB15 y *Erythrobacter litoralis* HTCC2594. En *C. crescentus* la relación entre una proteína conteniendo el dominio LOV y PhyR ha sido demostrado mediante una aproximación genética *in vivo* [94], mientras que en *E. litoralis* esta relación ha sido demostrada mediante ensayos de fosfotransferencia *in vitro* [95]. En ambos casos, las proteínas que contienen un dominio LOV

no sólo interactúan con PhyR, sino que también interactúan con otro RR de dominio único denominado LovR [95,96].

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **Hipótesis de trabajo**

La hipótesis del presente trabajo es que la luz inicia una cascada de señalización intracelular en *Brucella abortus* 2308, incrementando el nivel de actividad histidina quinasa de LOVHK, culminando con cambios en la virulencia de *Brucella*.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

El objetivo del presente trabajo consiste en caracterizar los componentes moleculares de esta vía de señalización iniciada por LOVHK, y estudiar los cambios en la expresión génica y virulencia inducidos ante la iluminación con luz azul. **Este estudio permitirá descubrir un nuevo mecanismo de adaptación a las condiciones ambientales en *Brucella*.** El descubrimiento de un nuevo mecanismo de adaptación en *Brucella* puede generalizarse a otras especies de bacterias relacionadas.

### **Objetivos particulares**

- 1) Caracterizar los componentes de la vía de transducción iniciada por LOVHK en *Brucella abortus*. El objetivo particular es identificar los RRs que interaccionan con LOVHK utilizando una estrategia de doble híbrido y demostrar la especificidad de la interacción mediante ensayos bioquímicos.
- 2) Estudiar el o los metabolismos regulados por las vía de transducción de señales iniciada por LOVHK mediante la cuantificación de los cambios de expresión del ARNm y otros fenotipos.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **Cepas bacterianas y medios de cultivo**

### ***Escherichia coli***

Las manipulaciones genéticas fueron llevadas a cabo en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , a excepción de los clonados y el mantenimiento de los plásmidos pBT, pTRG y sus derivados correspondientes a los ensayos de doble híbrido, en los cuales se empleó la cepa DH5 $\alpha$  F'IQ Km<sup>R</sup> (Apéndice 1). Estas cepas fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB, Difco) a 37°C, en agitador a 250 r.p.m, con la adición de los antibióticos correspondientes. *E. coli* BL21(DE3)pLysS fue empleada para la expresión y purificación de proteínas recombinantes, y fue cultivada en LB, medio auto-inductor ZYM-5052 o MD-5052 [97], según corresponda. *E. coli* S17-1 fue empleada para introducir plásmidos por conjugación en *B. abortus*, también cultivada en LB. En los casos en los cuales se usó antibióticos, los mismos fueron empleados a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$ , kanamicina 35  $\mu\text{g/ml}$ , tetraciclina 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , cloranfenicol 25  $\mu\text{g/ml}$ , estreptomina 12,5  $\mu\text{g/ml}$ .

### ***Brucella***

En la presente tesis se realizaron varios estudios utilizando como base una cepa de *Brucella abortus* 2308 wt, la cual es resistente al ácido nalidíxico [98]. Las correspondientes cepas mutantes y complementadas derivan de esta cepa. En los diversos ensayos, *Brucella* fue cultivada en medio líquido a 37°C en agitación a 250 r.p.m, en medio rico Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) o en medio mínimo MM (medio Gerhardt-Wilson modificado: NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 7,6 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 33 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60,3 mM, citrato de Na 1,7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, extracto de levadura 0,1% p/v, glucosa 10 mM, vitamina B6 2  $\mu\text{g/ml}$ , vitamina B1 2  $\mu\text{g/ml}$  y biotina 1,22  $\mu\text{g/ml}$ , pH 7,0) [99], o en medio sólido en placa en Tryptic Soy Agar (TSA, Difco). Los correspondientes antibióticos fueron empleados a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 40-50  $\mu\text{g/ml}$ , kanamicina 25  $\mu\text{g/ml}$ , ácido nalidíxico 5-10  $\mu\text{g/ml}$ , y cloranfenicol 20  $\mu\text{g/ml}$  en para en placas TSA y 5  $\mu\text{g/ml}$  en medio líquido. En la Apéndice 1 de indica una lista de todas las cepas de *E. coli* y *Brucella* empleadas en este estudio.

*Brucella* es un patógeno clasificado dentro del nivel de bioseguridad 3, por lo que toda manipulación de estas especies fue llevada a cabo en un laboratorio de bioseguridad acondicionado para tal fin, presente en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires, Fundación Instituto Leloir (FIL). Dicho laboratorio cuenta con el equipamiento básico necesario para estas tareas. Asimismo, todos los procedimientos han sido evaluados y aprobados por una comisión de bioseguridad de la institución.

### **Condiciones de oscuridad**

Todos los experimentos realizados en “condiciones de oscuridad” fueron llevados a cabo empleando LEDs rojos, ya que la proteína LOVHK no absorbe a esa longitud de onda. Los cultivos fueron cubiertos con dos capas de aluminio y/o una bolsa plástica de color negro.

### **Manipulación de ADN**

Todas las manipulaciones de ADN fueron realizadas siguiendo técnicas estándares. Las reacciones de PCR en las cuales se empleó ADN genómico de *B. abortus* 2308 como template fueron realizadas con Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos amplificados, fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, y clonados en vectores digeridos con las mismas enzimas. Los clonados fueron corroborados por colony-PCR empleando Taq DNA Polymerase (Invitrogen), miniprep y liberación del fragmento clonado por digestión con ER, y finalmente secuenciación de los clones positivos. Para ello se empleó el sistema de secuenciación de la FIL o MacroGen Korea. En la Apéndice 1 se indica una lista de las construcciones empleadas en este trabajo, y en la Apéndice 2 una lista de los oligonucleótidos.

En *E. coli* los plásmidos fueron introducidos por electroporación (200 Ω; 25 μF; 2,5 V, en cubetas de electroporación de 2 mm Bio-Rad) o por shock térmico usando bacterias competentes químicas. En *Brucella* los plásmidos fueron introducidos por electroporación (400 Ω; 25 μF; 2,5 V, en cubetas de electroporación den 2 mm Bio-Rad) o por conjugación.

### **Reacciones de PCR con las distintas ADN polimerasas**

1. Taq DNA Polymerase (Invitrogen) (colony PCR)

#### **Mezcla de reacción:**

Buffer AND polimerasa	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Oligonucleótido sentido	0,4 μM
Oligonucleótido antisentido	0,4 μM
Taq DNA Polymerase	0,5 Unidades
Molde	colonia de bacterias
Agua mili-Q	25 μl volumen final

#### **Ciclado:**

94 °C x 5 min	} x35
93 °C x 30 seg	
55 °C x 30 seg	
72 °C x 30 seg/kb	
72 °C x 10 min	
25 °C ∞	

2. Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen)

**Mezcla de reacción:**

Buffer de Amplificación	1,5X	<b><u>Ciclado:</u></b>	
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	94°C x 3 min	
dNTPs	0,3 mM	93°C x 30 seg	} x35
Oligonucleótido sentido	0,3 µM	55°C x 30 seg	
Oligonucleótido antisentido	0,3 µM	68°C x 1 min/kb	
Platinum Pfx DNA Polymerase	1,25 Unidades	68°C x 10 min	
Enhancer	1X	25°C ∞	
Molde	ADN genómico de <i>Brucella</i> o producto de PCR		
Agua mili-Q	50 µl volumen final		

**Ensayo de doble híbrido bacteriano**

Los ensayos de doble híbrido fueron llevados a cabo empleando el sistema BacterioMatchII two-hybrid system (Stratagene), siguiendo las indicaciones del fabricante. En los ensayos de doble híbrido se analiza la interacción entre dos proteínas: la primera se denomina carnada y la segunda presa. Este sistema usa el plásmido pBT como carnada y el plásmido pTRG como presa.

**Clonado de *lovhk* y *pdhS* para los ensayos de doble híbrido**

El gen *lovhk* (BAB2\_0652) fue amplificado usando los oligonucleótidos Full\_LOV\_forward y Full\_LOV\_reverse (Apéndice 2). El producto de PCR obtenido de 1,4 Kb fue clonado en el vector pBT (BacterioMatchII Two-Hybrid System Kit, Stratagene), usando las enzimas de restricción NotI y XhoI. El plásmido resultante expresa el gen *lovhk* en marco de lectura con el gen  $\lambda$ cl. El gen *pdhS* fue clonado en el plásmido pBT para ser usado como control positivo de interacción, usando los oligonucleótidos PdhS\_c-ter\_forward y PdhS\_c-ter\_reverse [100]. Las proteínas de fusión generadas a partir de los plásmidos pBT-LOVHK y pBT-PdhS fueron empleadas como carnada.

**Clonado del dominio REC de los RRs para el ensayo de doble híbrido**

El genoma de *B. abortus* 2308 posee 24 genes que codifican para proteínas con posibles dominios REC (Tabla 3). Se clonó el dominio REC de todos los RRs, excepto el de aquellos genes que correspondían a una HK híbrida (BAB1\_0346) y un pseudogen ( $\Psi$ BAB1\_1059). Los oligonucleótidos empleados para amplificar cada gen se listan en la Apéndice 2. En todos los casos, el oligonucleótido sentido posee el sitio de corte para NotI, excepto el oligonucleótido BAB2\_0630\_forward que tiene un sitio de corte para EcoRI. Todos los oligonucleótidos antisentido poseen un sitio de corte para XhoI. Los productos de PCR fueron digeridos con las correspondientes enzimas de restricción, y clonados en el plásmido pTRG (BacterioMatchII Two-Hybrid System Kit, Stratagene), obteniendo construcciones en marco de lectura con el

dominio  $\alpha$  de la ARN Polimerasa ( $\alpha$ -ARNP). Finalmente, se creó una mini-biblioteca de genes conteniendo los 23 dominios REC al mezclar cantidades iguales de todas las construcciones en pTRG, y una segunda mini-biblioteca mezclando los mismos plásmidos a excepción de pTRG-LovR (siendo un total de 22 plásmidos). Las proteínas de fusión generadas a partir de los plásmidos derivados del plásmido pTRG fueron empleadas como presa.

### Ensayo de doble híbrido

El sistema BacterioMatchII two-hybrid system (Stratagene) usa una cepa reportera de *E. coli* (BacterioMatchII Two-Hybrid System Reporter Cells), la cual posee dos genes reporteros: HIS3 y *aadA* ( $\text{Str}^R$ ). La interacción proteína-proteína se detecta por medio de la activación transcripcional del gen HIS3 y se corrobora por la activación del gen *aadA* ( $\text{Str}^R$ ). Se realizaron dos ensayos de doble híbrido. Para ello, la cepa reportera fue co-transformada por electroporación con el plásmido pBT-LOVHK y una mini-biblioteca de dominios REC clonados en el plásmido pTRG. Ambos plásmidos pBT y pTRG son compatibles entre sí, y poseen un promotor inducible por IPTG, el cual está presente en los medios empleados e induce la expresión de las proteínas de fusión. La selección de colonias conteniendo un plásmido pBT ( $\text{Cn}^R$ ) y un plásmido pTRG ( $\text{Tet}^R$ ) se realizó en placas con medio no selectivo y medio selectivo conteniendo cloranfenicol 25  $\mu\text{g/ml}$ , y tetraciclina 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , y se incubó en estufa a 28°C por 24 a 48 hs hasta la visualización de colonias. El medio no selectivo (medio M9 sin histidina) permite determinar la cantidad de clones iniciales, conteniendo ambos plásmidos. El medio selectivo contiene el medio M9 sin histidina, 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) 5 mM, cloranfenicol 25  $\mu\text{g/ml}$ , y tetraciclina 12,5  $\mu\text{g/ml}$  (clones positivos) y permite seleccionar aquellos clones donde se produjo una interacción positiva. Para validar las interacciones observadas, los clones positivos fueron estriados en placas con medio selectivo dual, el cual contiene medio M9 sin histidina, cloranfenicol 25  $\mu\text{g/ml}$ , y tetraciclina 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , 3-AT 5 mM y estreptomycin 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , y se incubó en estufa a 28°C por 24 a 48 hs hasta la visualización de colonias (clones doble positivos). Los clones doble positivos fueron analizados por colony PCR empleando los oligonucleótidos pTRG\_forward y pTRG\_reverse. Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa, purificados y secuenciados.

### Composición de los distintos medios de cultivo

- Medio no selectivo: sales M9 1X (Qbiogene:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  95 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  44 mM, NaCl 17 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  37 mM); glucosa 0,4%; 0,2 mM adenina-HCl; suplemento aminoacídico His Dropout 1X (BD/Clontech);  $\text{MgSO}_4$  1 mM; Tiamina-HCl 1 mM;  $\text{ZnSO}_4$  10  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ ; IPTG 50  $\mu\text{M}$ ; cloranfenicol 25  $\mu\text{g/ml}$ , tetraciclina 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , bacto agar 15%.
- Medio selectivo: sales M9 1X (Qbiogene:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  95 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  44 mM, NaCl 17 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  37 mM); glucosa 0,4%; 0,2 mM adenina-HCl; suplemento aminoacídico His Dropout 1X (BD/Clontech);  $\text{MgSO}_4$  1 mM; Tiamina-HCl 1 mM;  $\text{ZnSO}_4$  10  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CaCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ ; IPTG 50  $\mu\text{M}$ ; 3-AT 5 mM, cloranfenicol 25  $\mu\text{g/ml}$ , tetraciclina 12,5  $\mu\text{g/ml}$  bacto agar 15%.

- **Medio selectivo dual:** sales M9 1X (Qbiogene: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 95 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 44 mM, NaCl 17 mM, NH<sub>4</sub>Cl 37 mM); glucosa 0,4%; 0,2 mM adenina-HCl; suplemento aminoacídico His Dropout 1X (BD/Clontech); MgSO<sub>4</sub> 1 mM; Tiamina-HCl 1 mM; ZnSO<sub>4</sub> 10 μM; CaCl<sub>2</sub> 100 μM; IPTG 50 μM; 3-AT 5 mM, cloranfenicol 25 μg/ml, tetraciclina 12,5 μg/ml, estreptomicina 12,5 μg/ml, bacto agar 15%.

### Cuantificación de la interacción proteína-proteína por doble híbrido

Las interacciones obtenidas en el ensayo de doble híbrido fueron cuantificadas utilizando la cepa reportera de *E. coli* FW102 O<sub>L</sub>2-62 Km<sup>R</sup> [101,102], la cual posee el gen reportero *lacZ* bajo la regulación de un promotor Lac no inducible por IPTG, el cual posee la secuencia del operador λ. Utilizando los mismos plásmidos del sistema BacterioMatchII Two-Hybrid System de Stratagene, esta cepa permite cuantificar la intensidad de las interacciones carnada-presa observadas en los ensayos de doble híbrido anteriores. La cuantificación de las interacciones proteína-proteína se basan en la activación transcripcional del gen *lacZ*, y posterior determinación de actividad β-galactosidasa.

Para ello, la cepa *E. coli* FW 102 O<sub>L</sub>2-62 fue co-transformada por electroporación con dos plásmidos: uno conteniendo la construcción correspondiente a la carnada (plásmido pBT) y otro conteniendo la presa (plásmido pTRG). Se realizó una co-transformación para cada una de las interacciones a evaluar. Las colonias conteniendo ambos plásmidos fueron seleccionadas en placas LB agar conteniendo kanamicina 35 μg/ml, cloranfenicol 25 μg/ml y tetraciclina 12,5 μg/ml. De cada co-transformación se tomaron dos colonias y se inocularon en medio LB con los mismos antibióticos. Los cultivos fueron incubados con agitación a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, los cultivos saturados se diluyeron 1/100 en medio LB con los mismos antibióticos, se agregó IPTG (isopropil-thio-β-D-galactopiranosido) 100 μM final, y se incubó con agitación a 37°C. Ambos plásmidos poseen un promotor inducible por IPTG, lo cual induce la expresión de las proteínas correspondientes. Al cabo de 3 hs o hasta llegar a una DO<sub>600nm</sub> de 0,3-0,7 se determinó la actividad β-galactosidasa de cada cultivo por duplicado siguiendo un protocolo de Miller estándar. Las Unidades Miller fueron calculadas como =  $[A_{420nm} - (1,75 \times A_{550nm})] / (t \times v \times DO_{600nm}) \times 1.000$ , donde  $t$  = tiempo de reacción en minutos;  $v$  = volumen de cultivo utilizado en el ensayo en ml; DO<sub>600nm</sub> = la determinada para cada cultivo. El ensayo se realizó bajo condiciones normales de luz.

### Expresión y purificación de proteínas recombinantes

#### Clonado de genes de *Brucella* para la expresión de proteínas recombinantes

El gen *lovhk* (BAB2\_0652) fue amplificado con los oligonucleótidos LOVHK\_Full\_NheI\_Fw y LOVHK\_Full\_XhoI\_Rev, conteniendo los sitios de corte para las enzimas de restricción NheI y XhoI respectivamente. El dominio *hk* del gen *lovhk* fue amplificado con los oligonucleótidos BaLOV\_5Dhpt\_NheI y BaLOV\_3CAL\_Sall. El gen *lovR* (BAB1\_0099) fue amplificado con los

oligonucleótidos LovR\_FWD\_NheI y LovR\_REV\_XhoI. El gen *phyR* (BAB1\_1671) fue amplificado con los oligonucleótidos 1671\_NdeI\_FWD y 1671\_His\_Stop\_REV. El dominio REC de *phyR* (*rec-phyR*) fue amplificado con los oligonucleótidos PhyR\_REC\_NdeI\_FW y PhyR\_REC\_XhoI\_REV. El gen *divK* (BAB2\_0628) fue amplificado con los oligonucleótidos DivK\_F\_Myc\_NheI y DivK\_Rev\_XhoI. La secuencia de todos estos oligonucleótidos se indica en la Apéndice 2.

Las secuencias correspondientes a *lovhk* y el dominio *hk* fueron clonados en el plásmido de expresión pET24a (Novagen), usando las respectivas enzimas de restricción. Las secuencias correspondientes a *phyR*, *rec-phyR* y *divK* fueron inicialmente clonadas en pGEM-T Easy (Promega) generando los plásmidos pGEM-PhyR, pGEM-REC-PhyR y pGEM-DivK. Posteriormente, dichas secuencias fueron subclonadas en pET24a (Novagen), empleando las enzimas NdeI y NotI en el caso de *phyR*, NdeI y XhoI en el caso de *rec-phyR* y NheI y XhoI en el caso de *divK*. La secuencia correspondiente a *lovR* fue clonada en el plásmido de expresión pTrcHisB (Invitrogen), usando las correspondientes enzimas de restricción.

Para el clonado de pET24a-HK-CPD primero se subclonó el dominio CDP del plásmido pET22b-CPD<sub>Sall</sub> [103] en el plásmido pET24a (Novagen) empleando las enzimas de restricción Sall y XhoI, generando el plásmido pET24a-CPD-His<sub>6</sub>-tag. A continuación, se amplificó la secuencia del dominio *hk* de *lovhk* con los oligonucleótidos BaLOV\_5Dhpt\_NheI y BaLOV\_3CAL\_Sall, y se clonó el producto de PCR obtenido en el plásmido pET24a-CPD-His<sub>6</sub>-tag utilizando las enzimas de restricción NheI y Sall, obteniendo el plásmido pET24a-HK-CPD-His<sub>6</sub>-tag.

Todas las construcciones fueron secuenciadas para corroborar la ausencia de mutaciones. La característica de los distintos plásmidos generados se indica en la Apéndice 2. Los plásmidos para la expresión de las distintas proteínas recombinantes fueron transformados por electroporación en la cepa BL21 (DE3) pLysS, y las colonias conteniendo cada plásmido fueron seleccionadas en placas LB agar conteniendo los antibióticos correspondientes.

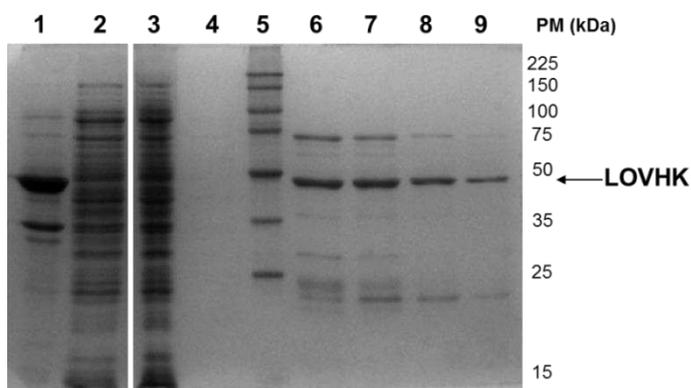
## Expresión y purificación de proteínas

### 1- Purificación de LOVHK, HK, PhyR y DivK

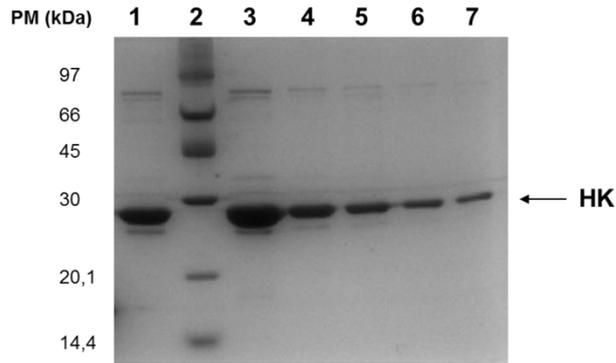
Para la producción de LOVHK, la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS conteniendo el plásmido correspondiente fue cultivada en medio mínimo auto-inductor (MD-50529), y todas las manipulaciones de cultivos, y posterior purificación fueron realizadas en condiciones de oscuridad o bajo una luz roja tenue. Composición de MD-50529: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, FeCl<sub>3</sub> 10 μM, glicerol 0,5%, glucosa 0,05%, α-lactosa 0,2%, aspartato 0,25%, pH 7,0.

Los clones de *E. coli* BL21(DE3)pLysS que expresan las proteínas HK, PhyR o DivK fueron cultivados en medio rico auto-inductor (ZYM-5052). Composición de ZYM-5052: bacto triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, FeCl<sub>3</sub> 10 µM, glicerol 0,5%, glucosa 0,05%, α-lactosa 0,2%, pH 7,0.

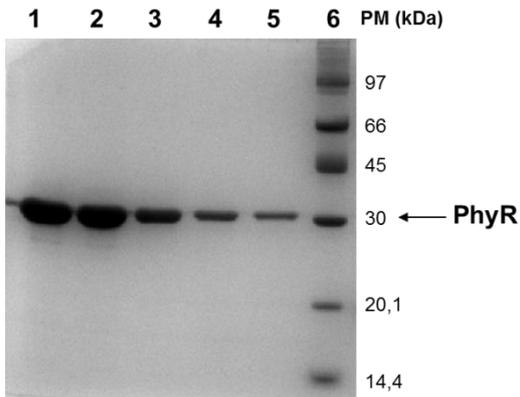
A partir de una colonia de *E. coli* transformada con los plásmidos que expresan cada una de las proteínas se inocularon 5-20 ml de medio LB y se cultivaron a 37°C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se realizó una dilución 1:100 en el medio de expresión correspondiente, y los cultivos fueron incubados a 37°C con agitación por 3 hs, y luego transferidos a 18°C con agitación durante toda la noche. En el caso de LOVHK se utilizaron 2 L de cultivo, mientras que para HK, PhyR y DivK se utilizaron 500 ml de cultivo cada uno. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 8.000 x g por 20 min, y resuspendidas en buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, Tritón X-100 0,05% and fluoruro de fenilmetilsulfonilo – PMSF 1 mM, DTT 0,5 mM). Luego, las bacterias fueron sonicadas con, al menos, 10 pulsos de 30 seg cada uno e intervalos de 30 seg en hielo, empleando el equipo QSonica, LLC, Misonix XL-2000 series. El total de los lisados celulares fue centrifugado a 35.000 x g por 15 min y los sobrenadantes obtenidos fueron incubados con 1 ml de resina de agarosa derivatizada con ácido nitriloacético-Ni (Ni-NTA agarose, Quiagen) previamente equilibrada en buffer de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, DTT 0,25 mM). Se incubó con agitación suave a 4°C por 1 h. Luego la resina fue empaquetada en una columna (Bio-Rad), lavada dos veces con 10 ml buffer de lavado, y las proteínas fueron eluidas con 5-6 ml de buffer de elución (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 200 mM, DTT 0,5 mM), recogiendo fracciones de a 1 ml. La purificación fue monitoreada por SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie Brilliant Blue (CBB) (Figuras 11-14). Las fracciones conteniendo proteína fueron dializadas contra buffer de diálisis (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, DTT 0,5 mM) y almacenadas a 4°C hasta su uso.



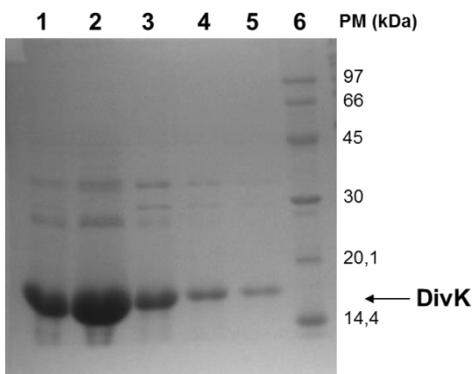
**Figura 11. Monitoreo de la purificación de LOVHK por medio de SDS-PAGE.** Se monitoreó la purificación de LOVHK (52 kDa) por medio de un SDS-PAGE 12,5% y posterior tinción con CBB. Orden de siembra: 1) Pellet (luego de sonicar y centrifugar). 2) sobrenadante 1 (luego de sonicar y centrifugar). 3) Percolado. 4) Lavado. 5) Marcador de PM: Broad Range (Promega). 6) Fracción 2 (elución). 7) Fracción 3 (elución). 8) Fracción 4 (elución). 9) Fracción 5 (elución).



**Figura 12. Monitoreo de la purificación del dominio HK de LOVHK por medio de SDS-PAGE.** Se monitoreó la purificación del dominio HK de LOVHK (26 kDa) por medio de un SDS-PAGE 15% y posterior tinción con CBB. Se muestran las fracciones de elución con imidazol. Orden de siembra: 1) Fracción 1. 2) Marcador de PM: Low Molecular Weight (GE). 3) Fracción 2. 4) Fracción 3. 5) Fracción 4. 6) Fracción 5. 7) Fracción 6.



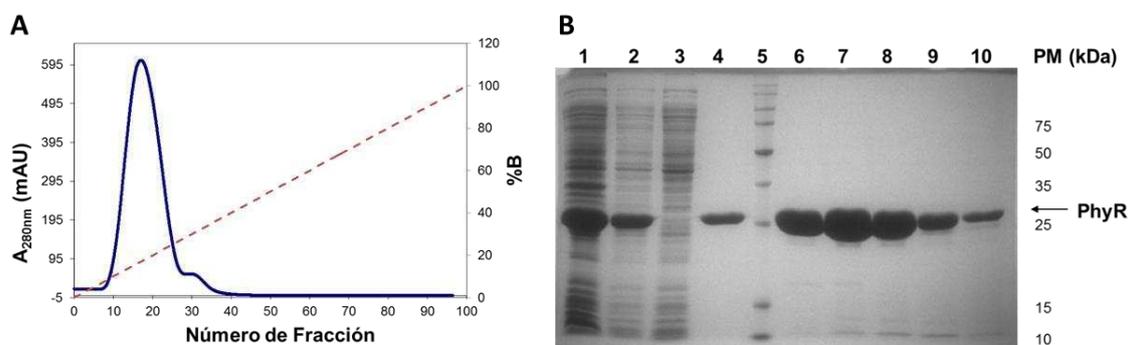
**Figura 13. Monitoreo de la purificación de PhyR por medio de SDS-PAGE.** Se monitoreó la purificación de PhyR (30 kDa) por medio de un SDS-PAGE 15% y posterior tinción con CBB. Se muestran las fracciones de elución con imidazol. Orden de siembra: 1) Fracción 1. 2) Fracción 2. 3) Fracción 3. 4) Fracción 4. 5) Fracción 5. 6) Marcador de PM: Low Molecular Weight (GE).



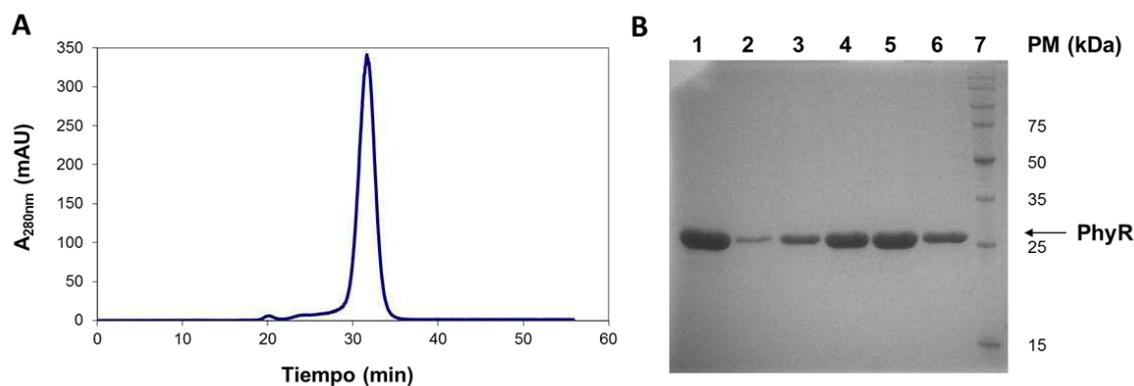
**Figura 14. Monitoreo de la purificación de DivK por medio de SDS-PAGE.** Se monitoreó la purificación de DivK (16,4 kDa) por medio de un SDS-PAGE 15% y posterior tinción con CBB. Se muestran las fracciones de elución con imidazol. Orden de siembra: 1) Fracción 1. 2) Fracción 2. 3) Fracción 3. 4) Fracción 4. 5) Fracción 5. 6) Marcador de PM: Low Molecular Weight (GE).

**2- Purificación de PhyR con calidad de cristalización**

A diferencia del esquema de purificación previamente descrito, para obtener PhyR con calidad de cristalización se empleó una columna de Ni<sup>2+</sup> His-Trap (GE Healthcare) en un equipo de HPLC. La elución se realizó con un gradiente de imidazol, empleando los buffers A (Tris-HCl pH 8 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, PMSF 1 mM, DTT 0,25 mM) y B (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 0,25 mM), desde 0% B hasta 100% B. La purificación fue monitoreada por A<sub>280nm</sub>, obteniéndose un único pico (Figura 15A). Se analizaron algunas alícuotas por SDS-PAGE y posterior tinción con CBB (Figura 15B). Se juntaron las fracciones correspondientes a 11-23% B, y se dializó contra buffer de diálisis (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM, PMSF 0,4 mM, DTT 0,5 mM). Subsecuentemente, se realizó una segunda purificación en una columna de tamiz molecular Superdex-75 gel (GE healthcare) en buffer de corrida (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM, PMSF 0,4 mM, DTT 0,25 mM). La purificación fue monitoreada por A<sub>280nm</sub> (Figura 16A), y la pureza de las fracciones colectadas fue evaluada en un gel SDS-PAGE 12,5%, y posterior tinción con CBB (Figura 16B). Se juntaron las fracciones 29,5-33,5 min, se concentró por centrifugación en un dispositivo Amicon Ultra-4 (Millipore) y finalmente se guardó a -80°C en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, PMSF 0,1 mM, DTT 0,1 mM, a una concentración de 28 mg/ml. Esta muestra fue empleada para cristalografía y para la producción de anticuerpos policlonales anti-PhyR.



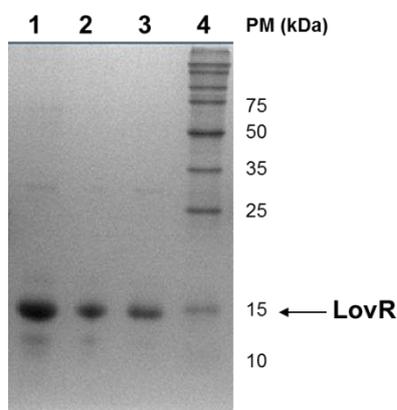
**Figura 15. Evaluación de la purificación de PhyR por His-Trap. A.** Perfil de elución de PhyR en la columna His-Trap. Se representa la A<sub>280nm</sub> en función del número de fracción del número de elución. La línea punteada en rojo indica en gradiente de imidazol, representado en %B. **B.** Se monitoreó la purificación de PhyR por medio de un SDS-PAGE 12,5% y posterior tinción con CBB. Orden de siembra: 1) Fracción total (luego de sonicar). 2) Input (lo que se sembró en la columna, SN luego de ultracentrifugar). 3) Percolado. 4) Fracción 9. 5) Marcador de PM: Broad Range (Promega). 6) Fracción 13. 7) Fracción 17. 8) Fracción 21. 9) Fracción 25. 10) Fracción 30.



**Figura 16. Evaluación de la purificación de PhyR por S-75.** **A.** Perfil de elución de PhyR en la columna S-75. Se representa la  $A_{280nm}$  en función del tiempo de retención en la columna. **B.** Se monitoreó la purificación de PhyR por medio de un SDS-PAGE 12.5% y posterior tinción con CBB. Orden de siembra: 1) Input (lo que se sembró en la columna). 2) Fracción 29,5 min. 3) Fracción 30,5 min. 4) Fracción 31,5 min. 5) Fracción 32,5 min. 6) Fracción 33,5 min. 7) Marcador de PM: Broad Range (Promega).

### 3- Purificación de LovR

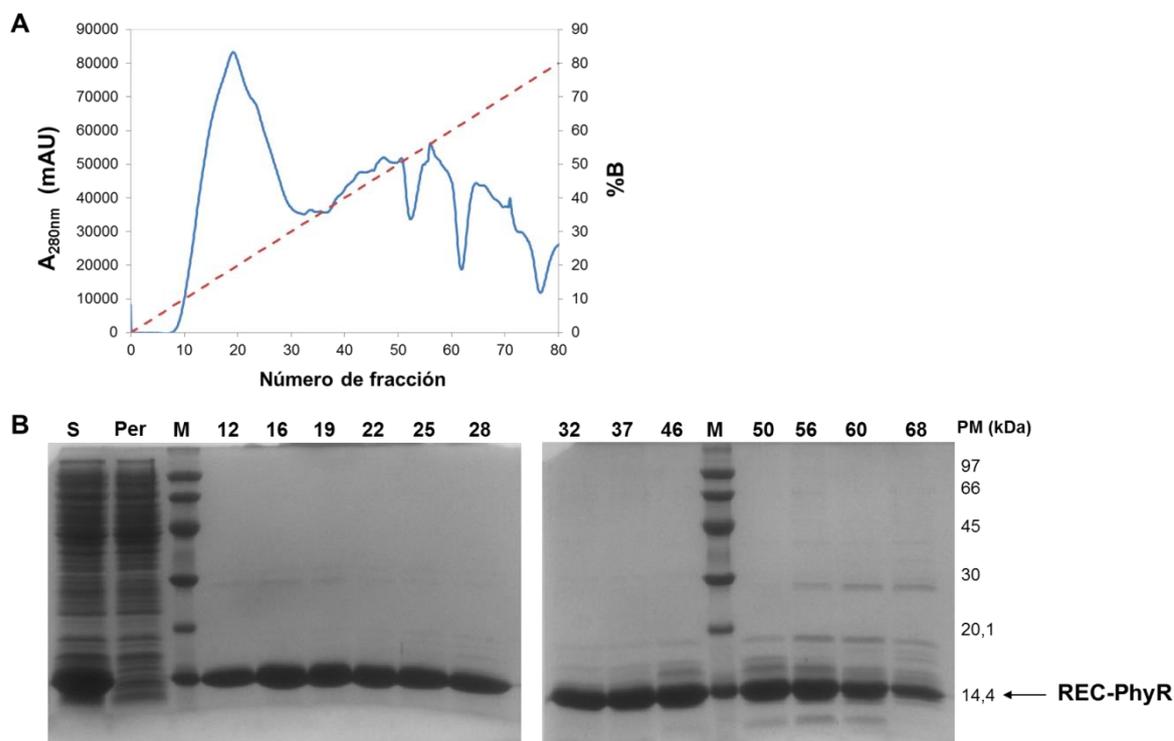
LovR fue purificada bajo condiciones desnaturalizantes. Se inocularon 5 ml de medio LB con células de *E. coli* BL21 DEpLysS transformadas con el vector pTrcHisB-LovR y se incubaron a 37°C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se realizó una dilución 1:100 en 500 ml de medio LB a 37°C con agitación. Al cabo de 3 hs se adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM, y la incubación se continuó a 18°C con agitación durante toda la noche. El proceso de purificación fue igual al anterior, con la diferencia de que los buffers de lisis, de lavado y de elución contenían urea 8 M. La purificación fue monitoreada por SDS-PAGE 15% y posterior tinción con Coomassie Brilliant Blue (Figura 17). Una vez purificada, LovR fue replegada mediante diálisis a temperatura ambiente contra buffer de diálisis en ausencia de urea, y luego guardada a 4°C hasta su uso.



**Figura 17. Monitoreo de la purificación de LovR por SDS-PAGE.** Se monitoreó la purificación de LovR (14 kDa) por medio de un SDS-PAGE 15% y posterior tinción con CBB. Se muestran las fracciones de elución con imidazol. Orden de siembra: 1) Fracción 1. 2) Fracción 2. 3) Fracción 3. 4) Marcador de PM: Broad Range (Promega).

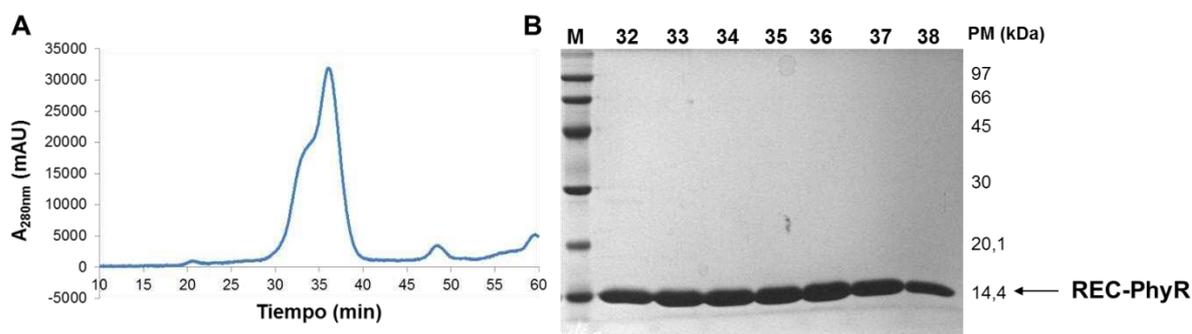
4- Purificación de REC-PhyR

Se inocularon 30 ml de medio LB con células de *E. coli* BL21 DEpLysS transformadas con el vector pET24a-REC-PhyR, y se incubaron a 37°C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se realizó una dilución 1:100 en 3 L de medio LB a 37°C con agitación. Al cabo de 3 hs se adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM, y la incubación se continuó a 28°C con agitación durante toda la noche. Luego de cosechar las bacterias y sonicar, se purificó REC-PhyR utilizando una columna de Ni<sup>2+</sup> His-Trap (GE Healthcare). La elución se realizó con un gradiente de imidazol, empleando los buffers A (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 1 mM, pH 7,4) y B (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 1 mM, pH 7,4), desde 0% B hasta 80% B. La purificación fue monitoreada por A<sub>280nm</sub> (Figura 18A). Se analizaron algunas alícuotas por SDS-PAGE 15% y posterior tinción con CBB (Figura 18B). Se juntaron las fracciones correspondientes a 12-68% B, y se dializó contra buffer de diálisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 250 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 0,5 mM). Subsecuentemente, se realizó una segunda purificación en una columna de tamiz molecular Superdex-75 gel (GE healthcare) en buffer de corrida (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 250 mM, PMSF 0,5 mM). La purificación fue monitoreada por A<sub>280nm</sub> (Figura 19A), y la pureza de las fracciones colectadas fue evaluada en un gel SDS-PAGE 15%, y posterior tinción con CBB (Figura 19B). Se juntaron las fracciones 35,5-37 min, se concentró por centrifugación en un dispositivo Amicon Ultra-4 (Millipore) y finalmente se guardó a -80°C en buffer Tris-HCl 15 mM pH 8, NaCl 50 mM, pH 8 a una concentración de 10 mg/ml.



**Figura 18. Evaluación de la purificación de REC-PhyR por His-Trap.** **A.** Perfil de elución de REC-PhyR en la columna His-Trap. Se representa la A<sub>280nm</sub> en función del número de fracción de elución. La línea punteada en rojo indica en gradiente de imidazol, representado en %B. **B.** Se monitoreó la purificación de REC-PhyR por medio de dos

SDS-PAGE 15% y posterior tinción con CBB. S: Siembra; P: Percolado; M: Marcador de PM: Low Molecular Weight (GE); el número arriba de cada calle corresponde al número de fracción colectado.



**Figura 19. Evaluación de la purificación de REC-PhyR por S-75.** **A.** Perfil de elución de REC-PhyR en la columna S-75. Se representa la  $A_{280nm}$  en función del tiempo de retención en la columna. **B.** Se monitoreó la purificación de REC-PhyR por medio de un SDS-PAGE 15% y posterior tinción con CBB. M: Marcador de PM: Low Molecular Weight (GE); el número arriba de cada calle corresponde al tiempo en min de elución de esa fracción.

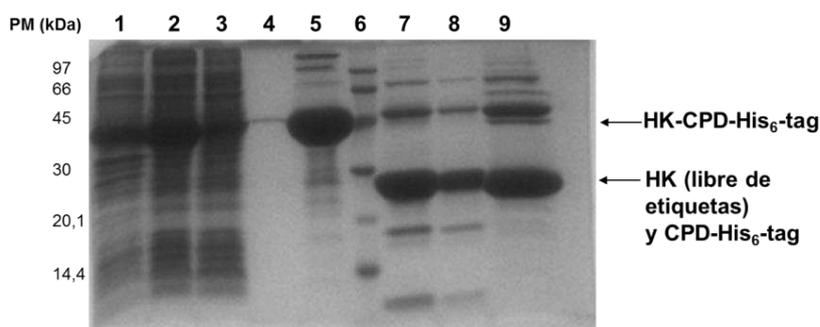
#### 5- Purificación de HK a partir de HK-CPD-His6-tag

Se inocularon 3 ml de medio LB con células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con el vector pET24a-HK-CPD-His<sub>6</sub>-tag y se incubaron a 37°C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se realizó una dilución 1:100 en 100 ml de medio rico auto-inductor (ZYM-5052), se incubó a 37°C con agitación por 3 hs, y luego se transfirió el cultivo a 18°C con agitación durante toda la noche. Se siguió un protocolo similar al previamente descrito para la cosecha y disrupción de bacterias en buffer de lisis: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 15 mM, PMSF 1 mM, y posterior incubación con resina de agarosa derivatizada con ácido nitriloacético-Ni (Ni-NTA agarose, Quiagen), previamente equilibrada con buffer de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 15 mM). Luego, los pasos de lavado y elución se realizaron en batch, no en columna. Se lavó la resina con buffer de lavado, y se separó 1/4 de la resina para purificar HK-CPD-His<sub>6</sub>-tag como control, y 3/4 de resina para purificar HK libre de etiquetas (o tags).

Para la elución de HK-CPD-His<sub>6</sub>-tag se lavó dos veces la resina con buffer de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 200 mM).

Para la purificación de HK libre de etiquetas, se incubó la resina con buffer de lisis conteniendo inositol-6-fosfato 50  $\mu$ M (Ins6P- Phytic acid sodium salt hydrate, Sigma) por 1,5 hs a temperatura ambiente con agitación, activando la actividad proteasa del dominio CPD. Luego se retiró el buffer conteniendo la proteína recombinante HK (Fracción 1), y se volvió a agregar buffer con Ins6P para recuperar mayor cantidad de HK (Fracción 2). Como control, se lavó dos veces la resina con buffer de lavado, y se eluyó el dominio CDP-His<sub>6</sub>-tag con buffer de elución (Fracción 3). La purificación fue monitoreada por SDS-PAGE 15% y posterior tinción con Coomassie Brilliant Blue (Figura 20). Se mezclaron las fracciones 1 y 2 conteniendo la proteína

HK libre de etiquetas, y la mezcla fue dializada contra buffer de diálisis (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 250 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 1 mM). Para eliminar la contaminación con HK-CPD-His<sub>6</sub>-tag, esta fracción fue nuevamente incubada con agitación por 1 h a 4°C con resina de agarosa derivatizada con ácido nitriloacético-Ni (Ni-NTA agarose, Quiagen), previamente equilibrada con buffer de diálisis. Finalmente se tomó el sobrenadante, siendo esta fracción la que contiene al dominio HK de LOVHK libre de etiquetas.



**Figura 20. Monitoreo de la purificación de HK libre de etiquetas.** Se monitoreó la purificación de HK libre de etiquetas por medio de un SDS-PAGE 15% y posterior tinción con CBB. Orden de siembra: 1) Pellet (luego de sonicar y centrifugar). 2) sobrenadante (luego de sonicar y centrifugar). 3) Percolado. 4) Lavado. 5) HK-CPD-His<sub>6</sub>-tag (PM: 50 kDa). 6)

Marcador de PM: Low Molecular Weight (GE). 7) Fracción 1 de HK (26 kDa). 8) Fracción 2 de HK (26 kDa). 9) CPD-His<sub>6</sub>-tag: Fracción 3 (24 kDa).

#### 6- NtrX y PAS-HK-NtrY

Las proteínas NtrX y PAS-HK de NtrY (PAS-HK-NtrY) fueron gentilmente cedidas por la Dra. Mariela Carrica y el Bioq. Ignacio Fernández, las cuales fueron expresadas y purificadas como se describe en Carrica *et al.*, 2012 [104]. Los PM (Pesos Moleculares) teóricos de cada proteína fueron determinados con el programa on-line ExPASy-ProtParam [105].

### **Determinación del PM de PhyR por SLS**

Se aplicó la técnica de dispersión estática de luz (SLS) para la determinación del PM de PhyR en solución. Las mediciones se llevaron a cabo en un dispositivo Precision Detectors PD2080 (Bellingham, MA, EEUU) conectado en tándem a un equipo FPLC y a un refractómetro diferencial LKB modelo 2142 (Bromma, Suecia) y un detector UV. Inicialmente se calibró el equipo con Seroalbúmina Bovina (BSA), la cual es empleada como estándar de PM (66,5 kDa). Luego Se inyectaron 500 µl de solución proteica de concentración 0,33 mM de PhyR en una columna Superdex S-75 (GE) y se eluyó en buffer de corrida Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 250 mM, DTT 0,5 mM. Se midieron simultáneamente las señales correspondientes a dispersión de luz a 90° ( $I_{LS}$ ,  $\lambda = 682$  nm) y variación en el índice de refracción (IR) durante toda la corrida. Los datos fueron luego procesados con el programa Discovery32 provisto por el fabricante del equipo de SLS. El programa calcula de PM promedio para cada punto del pico eluido.

## **Ensayos de autofosforilación y fosfotransferencia**

### **Ensayos de autofosforilación**

Para los ensayos de autofosforilación, LOVHK purificada fue iluminada por 1 min con 10 flases de luz blanca (a una fluencia de  $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  de una lámpara-flash de xenon) en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 50 mM y la reacción autofosforilación fue iniciada por agregado de una mezcla conteniendo ATP y  $\text{MgCl}_2$  (concentración final:  $\text{MgCl}_2$  5 mM, ATP 100  $\mu\text{M}$ , conteniendo 0,5-1  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP (111TBq/mmol, PerkinElmer Life Sciences) por cada 10  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción). La concentración final de LOVHK en la mezcla de reacción fue de 2,5  $\mu\text{M}$ . El tubo de reacción fue incubado en un baño termostático a  $37^\circ\text{C}$ , y se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  a distintos tiempos. La reacción se detuvo por agregado de 10  $\mu\text{l}$  de buffer Laemmli 2X. Para el ensayo de autofosforilación de HK se siguió el mismo protocolo, a excepción de que no fue necesario iluminar la proteína.

### **Ensayos de fosfotransferencia**

Los diferentes RRs fueron agregados en cantidades equimolares a 2,5  $\mu\text{M}$  de LOVHK purificada que fue previamente autofosforilada durante 15 min. A los tiempos indicados en las figuras, se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{l}$ , y la reacción se detuvo por el agregado de 10  $\mu\text{l}$  de buffer Laemmli 2X. Las incubaciones fueron llevadas a cabo bajo condiciones normales de iluminación del laboratorio. En los ensayos de fosfotransferencia utilizando el dominio HK de LOVHK o PAS-HK-NtrY, los ensayos fueron realizados bajo las mismas condiciones que las previamente descritas, a excepción de que ninguna de las dos HKs fue iluminada. La concentración de cada proteína empleada en cada experimento, se indica en la leyenda de las correspondientes figuras en la sección Resultados.

En todos los casos, las muestras fueron separadas en un SDS-PAGE 15%. Luego el gel se secó o fue colocado dentro de una bolsa plástica transparente, y se expuso en una pantalla Storage Phosphor Screen (GE Healthcare), y posteriormente analizada con un Storm 840 Molecular Imager (GE Healthcare). En algunos casos el gel fue expuesto a una placa radiográfica (Amersham Hyperfilm ECL-GE). La intensidad de cada banda fue estimada con el programa ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics) o el programa Quantity One 4.6.3 Bio-Rad. Luego se calculó la intensidad relativa de cada banda respecto de la intensidad total inicial.

### **Obtención de REC-PhyR~P**

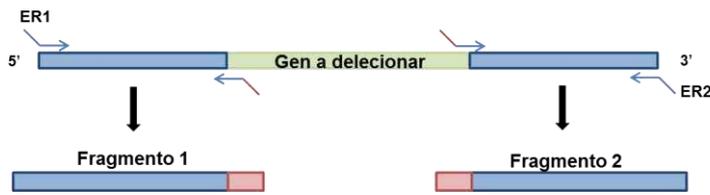
Para obtener REC-PhyR~P, inicialmente se incubó el dominio HK libre de etiquetas en buffer de autofosforilación conteniendo  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP a  $37^\circ\text{C}$  por 60 min. Luego se agregó REC-PhyR dando lugar a la reacción de fosfotransferencia. Al cabo de 20 min se procedió a separar REC-PhyR~P respecto de HK. La purificación se realizó en batch. Para ello, se agregó resina de agarosa derivatizada con ácido nitriloacético-Ni (Ni-NTA agarose, Qiagen) previamente equilibrada en buffer de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM) a la mezcla de reacción,

y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Debido a que REC-PhyR~P posee un His<sub>6</sub>-tag queda retenida a la resina, mientras que HK libre de etiquetas permanece en el sobrenadante. Luego se lavó la resina tres veces con buffer de lavado para eliminar la HK, y se eluyó REC-PhyR~P con dos lavados de la resina con buffer de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, imidazol 200 mM). Esta última fracción fue utilizada como sustrato en el ensayo de actividad fosfatasa.

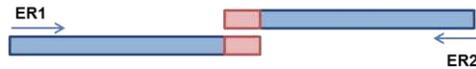
### **Construcción de cepas mutantes en *Brucella abortus* 2308**

Las mutantes  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  fueron obtenidas por delección de los genes BAB1\_0099 y BAB1\_1671 respectivamente en *B. abortus* 2308. Las regiones 5' y 3' flanqueantes a los respectivos genes fueron amplificadas por PCR empleando los primers mencionados en la Apéndice 2, obteniendo fragmentos de entre 400-600 pb cada uno. Ambos fragmentos conteniendo secuencias complementarias fueron ligados por "PCR Recombinante", usando los oligonucleótidos flanqueantes de cada fragmento (Figura 21). En ambos casos se empleó la enzima Platimun Pfx DNA Polymerase. El producto de PCR obtenido para la delección de cada gen fue clonado en el plásmido pk18mobSacB [106] utilizando las correspondientes enzimas de restricción, obteniendo así los plásmidos pk18mobSacB\_ $\Delta lovR$  y pk18mobSacB\_ $\Delta phyR$  respectivamente, los cuales no replican en *Brucella* y poseen resistencia a kanamicina. Estos plásmidos fueron transformados en *E. coli* S17-1 por electroporación y transferidos por conjugación a *B. abortus* 2308 wt. El gen *sacB* codifica para la enzima Levansacarasa de *B. subtilis* que es utilizada como un marcador de contraselección ya que confiere sensibilidad a la sacarosa. Las colonias simple recombinantes fueron seleccionadas en placas TSA agar con ácido nalidíxico, por ser resistentes a kanamicina y sensibles a sacarosa 10%. Posteriormente se tomó una colonia de cada transformación, y se inocularon en 2 ml de medio TSB en ausencia de antibióticos, y se incubó con agitación a 37°C durante toda la noche. Los eventos de doble recombinación fueron seleccionados en placas TSA agar por ser sensibles a kanamicina y resistentes a sacarosa 10%. La eliminación del plásmido y la generación de las cepas mutantes denominadas  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  respectivamente, fue corroborada por colony PCR y posterior secuenciación de los productos de PCR. La correcta ubicación en el genoma fue corroborada por PCR empleando primers a ambos lados del gen delecionado. Además, por medio de un ensayo de aglutinación con acriflavina se corroboró que las dos cepas mutantes forman colonias de borde liso, al igual que la parental wt.

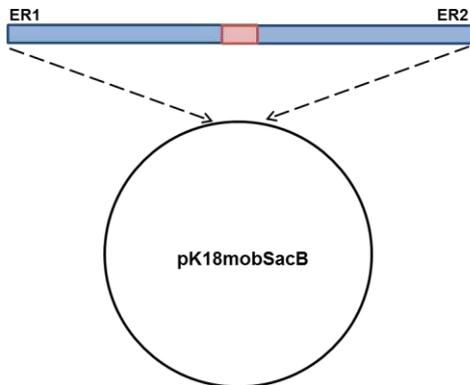
**Primera PCR**



**PCR recombinante**



**Ligación**



para la enzima de restricción 2 – ER2) se logra obtener un producto de PCR que es la suma de los fragmentos 1 y 2. Luego el producto de PCR obtenido se digiere con ER1 y ER2 y se clona en el plásmido de interés (pK18mobSacB en este caso) digerido con las mismas enzimas.

**Figura 21. Esquema de la PCR recombinante.**

En la primer PCR se amplifican dos fragmentos de ADN, cada uno a ambos lados del gen a deletar (fragmento 1 a la izquierda; fragmento 2 a la derecha), usando como molde ADN genómico de *Brucella*. Los dos fragmentos tienen una región de complementariedad de bases (rosa), presente en el extremo 3' del primer fragmento y en el extremo 5' del segundo fragmento. En la segunda PCR, se emplean los dos productos de PCR como molde los cuales luego de un ciclo de desnaturalización y reasociación, se asocian por complementariedad de bases por medio de la región de igual secuencia en ambos fragmentos. Utilizando el oligonucleótido sentido del primer fragmento (el que contiene la secuencia de corte para la enzima de restricción 1 –ER1) y el oligonucleótido antisentido del segundo fragmento (el que contiene la secuencia de corte

Protocolo general para conjugación en *Brucella*

- 1- Tomar una colonia de la cepa de *E. coli* S-17 conteniendo el plásmido a conjugar, e inocular en 2 ml de medio LB conteniendo los antibióticos correspondientes. Por otro lado, inocular 2 ml de medio TSB con la cepa de *Brucella* a conjugar en TSB con los antibióticos correspondientes. Incubar con agitación a 37°C durante toda la noche.
- 2- Al día siguiente tomar 500 µl de cada cultivo, y lavar cada uno 2 veces con PBS 1X para eliminar los antibióticos. Resuspender las bacterias de cada cultivo en 100 µl de PBS 1X.
- 3- Mezclar 10 µl de *Brucella* con 10 µl de *E. coli* S-17 conteniendo el plásmido a conjugar.
- 4- Colocar los 20 µl de la mezcla en forma de gota en una placa TSA agar (sin antibióticos). Incubar en estufa a 37°C durante toda la noche.
- 5- Al día siguiente, tomar bacterias del centro de la gota, resuspender en PBS 1X y plaquear en placas TSA agar conteniendo ácido nalidíxico 10 µg/ml para eliminar *E. coli* S-17 (la cual es sensible al ácido nalidíxico), y otros antibióticos y sustancias

necesarias para la selección. Incubar en estufa a 37°C hasta la aparición de colonias (4-5 días).

### **Construcción de la complementada de LOVHK**

La cepa mutante de *B. abortus* 2308 *lovhk::km* fue previamente obtenida por inserción de un cassette de kanamicina [54]. Para complementar esta cepa, la misma fue conjugada con el plásmido pMR10*cat\_lovhk*, el cual expresa *lovhk* bajo la regulación de su propio promotor, obteniendo así la cepa complementada *lovhk::km/pMR\_lovhk*. Este es un plásmido de bajo número de copias, replicativo en *Brucella* y resistente a cloranfenicol. El plásmido pMR10*cat\_lovhk* fue construido por el método de “restriction free cloning”, un método de clonado que no emplea enzimas de restricción [107]. Para ello, con la enzima Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) y los primers pMR10\_pLOVHK\_F y pMR10\_pLOVHK\_R (Apéndice 1), se amplificó por PCR un fragmento conteniendo la secuencia codificante del gen *lovhk* (BAB2\_0652) y 581 pb río arriba del codón de inicio de la traducción. El producto de PCR obtenido fue purificado y posteriormente usado como mega-primer en una segunda reacción de PCR, utilizando el vector pMR10*cat* como templado. Al finalizar la segunda PCR, la misma fue tratada con DpnI (NEB, esta enzima corta el ADN metilado proveniente de bacterias, pero no el recientemente sintetizado in vitro) y luego transformada en *E.coli* DH5α competentes químicas, obteniendo el plásmido pMR10*cat\_lovhk* vector. Posteriormente, este plásmido fue transformado por electroporación en *E. coli* S17-1 y transferido por conjugación a la cepa mutante *lovhk::km*. Las colonias conteniendo el plásmido de interés fueron seleccionadas en placas TSA agar conteniendo ácido nalidíxico, kanamicina y cloranfenicol. La presencia del plásmido fue corroborada por PCR.

#### Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)

1ra PCR (amplificación del fragmento a clonar)

#### **Mezcla de reacción:**

Buffer de Reacción Q5	1X	<b><u>Ciclado:</u></b>	
dNTPs	0,2 mM	98°C x 30 seg	
Oligonucleótido sentido	0,5 µM	98°C x 10 seg	] x35
Oligonucleótido antisentido	0,5 µM	58°C x 30 seg	
Q5 HF DNA Polymerase	1 Unidad	72°C x 30 seg/kb	
Enhancer	1X	72°C x 2 min	
Molde	ADN genómico de <i>Brucella</i>	25°C ∞	
Agua mili-Q	50 µl volumen final		

2da PCR (amplificación del vector utilizando el fragmento anterior como mega-oligonucleótido):

**Mezcla de reacción:**

Buffer de Reacción Q5	1X	<b><u>Ciclado:</u></b>	
dNTPs	0,2 mM	98°C x 30 seg	} x30
Mega-oligonucleótido: producto de PCR	100 ng	98°C x 10 seg	
Q5 HF DNA Polymerase	1 Unidad	58°C x 30 seg	
Enhancer	1X	72°C x 3-5 min	
Molde: plásmido cerrado	20 ng	72°C x 2 min	
Agua mili-Q	50 µl volumen final	25°C ∞	

**Ensayo de aglutinación con acriflavina**

Realizar una suspensión bacteriana a partir de una placa de cada una de las cepas a evaluar en 1 ml de una solución de acriflavina 0,1 % p/v en agua, y dejar reposar a temperatura ambiente. Al cabo de 30 min, evaluar la presencia o ausencia de un botón en el fondo del tubo y la turbidez de la solución.

**Extracción de ARN total de *Brucella***

Para la obtención de ARN total de *Brucella* se empleó alternativamente dos kits comerciales, siguiendo las indicaciones de los fabricantes con algunas modificaciones.

A- Extracción de ARN total con RNeasy mini kit (Quiagen)

- 1- Tomar como máximo  $7,5 \times 10^8$  bacterias por extracción, y colocar 2 volúmenes de la solución RNAprotect Bacteria Reagent (Quiagen). Merclar y dejar 5 min a temperatura ambiente. Centrifugar 2 min a 10.000 r.p.m. y resuspender en:
  - + 168 µl de TE (Tris-Cl 30 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 en agua libre de ARNasas)
  - + 30 µl SDS 10 % (en agua libre de ARNasas)
  - + 2 µl proteinasa K 10 mg/ml (en agua libre de ARNasas)
- 2- Incubar a 37°C por 1h.
- 3- + 700 µl RLT + 7 µl β-mercaptoetanol, y agitar vigorosamente.
- 4- + 700 µl etanol 100% y agitar vigorosamente (los pasos siguientes pueden realizarse fuera del cuarto de bioseguridad). Y de aquí en adelante seguir los pasos de retención del ARN en la columna RNeasy spin, lavados y elución indicados por el fabricante.
- 5- Eluir el ARN total de la columna con 30 µl de agua mili-Q libre de ARNasas.

**B- Extracción de ARN total MasterPure™ RNA Purification Kit (Epicentre, Illumina)**

- 1- Tomar una alícuota de cultivo bacteriano y mezclar con 1/10 volúmenes de solución stop (etanol:fenol, 19:1). Mantener a temperatura ambiente por 2 min.
- 2- Centrifugar 2 min a 10.000 r.p.m, y remover el sobrenadante.
- 3- Resuspender las células en 500 µl de solución de lisis 1X T&C (conteniendo 1 µl de Proteinasa K 50 µg µl<sup>-1</sup> por cada 300 µl de buffer de lisis 1X T&C), e incubar a 65°C por 30 min, agitando cada 5 min.
- 4- Colocar en hielo 5 min.
- 5- Agregar 250 µl de solución MPC, agitar vigorosamente, colocar 5 min en hielo y centrifugar a 14.000 r.p.m a 4°C por 10 min.
- 6- Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo, agregar 750 µl de isopropanol y mezclar por inversión.
- 7- Pasar a -20°C por 16 hs a 3 días (los pasos siguientes pueden realizarse fuera del cuarto de bioseguridad).
- 8- Centrifugar 10 min a 14.000 r.p.m. a 4°C.
- 9- Secar el pellet y resuspender en 195 µl de Buffer DNAsa con 5 µl de DNaseI RNase-Free. Incubar a 37°C por 40 min.
- 10- Agregar 200 µl de solución de lisis 2X T&C y agitar vigorosamente.
- 11- Agregar 200 µl de solución MPC, agitar vigorosamente, colocar 5 min en hielo, y centrifugar 10 min a 14.000 r.p.m. a 4°C.
- 12- Pasar el sobrenadante a otro tubo, agregar 500 µl de isopropanol, mezclar por inversión y centrifugar 10 min a 14.000 r.p.m. a 4°C.
- 13- . Lavar el pellet dos veces con etanol 70%.
- 14- Secar el pellet y resuspender el ARN total en 30 µl mili-Q libre de ARNasas.

En protocolos de purificación, se debe cuantificar el ARN obtenido con el equipo Nano-Drop spectrophotometer (ND-1000, Thermo Fisher Scientific), y visualizar en un gel de agarosa 1% (sembrar 2 µl). Guardar a -80°C hasta su uso. Posteriormente, el ARN debe ser tratado con RQ1 RNase-free DNase (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante, para eliminar posible contaminación con ADN genómico.

### **Síntesis de ADNc a partir de ARN total**

La síntesis de ADNc a partir de ARN se realizó empleando la enzima SuperScript III First Strand Synthesis System (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se empleó random decamer primers (Invitrogen) y RNasin ribonuclease inhibitor (Promega). Para cada muestra de ARN se realizó una reacción con enzima RT (retrotranscriptasa) y otra sin, obteniendo de este modo ADNc (+RT) y ADNc (-RT) respectivamente.

## **PCR en tiempo real cuantitativos (qRT-PCR)**

El ADNc obtenido fue empleado como molde en las reacciones de qRT-PCR. Los oligonucleótidos empleados fueron diseñados con el programa Primer Express v3.0.1 3 (Applied Technologies) o Primer3 y en algunos casos ajustados a mano (Apéndice 2). Los productos de PCR esperados tienen entre 100-180 pb. Se determinó que la eficiencia de cada par de oligonucleótidos empleado sea entre 90-100% antes de ser utilizados para la cuantificación. Las reacciones de qRT-PCR fueron realizadas utilizando FastStar SYBR Green Master 2X (Roche), o con una mezcla de reacción conteniendo Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), SYBR Green y Rox Reference Dye (Invitrogen). Las reacciones fueron realizadas en placas de 96-pocillos en el equipo Mx3005P (Stratagene) o en el equipo StepOnePlus (Applied Technologies). Los resultados fueron analizados con los programas MxPro3005P o StepOne respectivamente. Se empleó en el gen Translation Initiation Factor-1 (*if-1*, BAB1\_0282) como gen de referencia o normalizador [108] (Apéndice 2). Los resultados para cada gen son presentados como el  $\text{Log}_2$  de la división entre una condición determinada y la de referencia o calibrador, o como las veces de inducción en una condición determinada respecto de la de referencia o calibrador.

### 1- Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)

#### **Mezcla de reacción:**

Buffer de Reacción	1X	<b><u>Ciclado:</u></b>	
MgCl <sub>2</sub>	6 mM	95°C x 10 min	
dNTPs	0,4 mM	95°C x 20 seg	} x40
Oligonucleótido sentido	0,1-0,4 µM	55°C x 20 seg	
Oligonucleótido antisentido	0,1-0,4 µM	72°C x 20 seg	
SYBR Green		95°C x 1 min	
ROX	0,06	55°C x 30 seg	
Platinum Taq DNA Polymerase	0,625 Unidades	95°C x 30 seg	
Molde	ADNc	4°C ∞	
Agua mili-Q	25µl volumen final		

### 2- FastStar SYBR Green Master 2X (Roche)

#### **Mezcla de reacción:**

Master Mix	1X
Oligonucleótido sentido	0,4 µM
Oligonucleótido antisentido	0,4 µM
Molde	ADNc
Agua mili-Q	10 µl volumen final

## **Ensayos de estrés**

### **Inducción de estrés por falta de una fuente de carbono en la cepa wt**

Se cultivó *Brucella abortus* 2308 wt en medio MM a 37°C con agitación, hasta llegar a fase exponencial ( $DO_{600nm} \approx 0,6$ ). Se tomó una alícuota (tiempo 0 hs), se lavó y resuspendió el resto del cultivo en MM1 pH 7,0 ( $K_2HPO_4$  57,3 mM,  $KH_2PO_4$  35,9 mM, extracto de levadura 0,1% w/v, pH 7,0 [109]), y se incubó nuevamente a 37°C con agitación. Al cabo de 2 hs, se tomó una alícuota. Se purificó ARN total y se determinó los niveles de expresión de ARN de *phyR* y *rpoE1* por qRT-PCR.

En el medio mínimo MM1 [109] las bacterias no crecen (no duplican, lo cual fue monitoreado por  $DO_{600nm}$ ), pero sobreviven por al menos 24 hs (ver Figura 51 en la sección Resultados).

### **Inducción de estrés por falta de una fuente de carbono y concentraciones crecientes de NaCl en la cepa wt**

Se cultivó *Brucella abortus* 2308 wt en medio MM a 37°C con agitación, hasta llegar a fase exponencial ( $DO_{600nm} \approx 0,6$ ). Se tomó una alícuota (tiempo 0 hs), y se lavó el resto del cultivo una vez con MM1 pH 7,0, y luego se dividió en 4, y resuspendió en MM1 pH 7,0 con distintas concentraciones de NaCl: 0 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM. Se incubó nuevamente los cultivos a 37°C con agitación, y se tomó una alícuota de cada condición a los 30 min, 1 y 2 hs. Posteriormente, se purificó ARN total y se determinó los niveles de expresión de ARN de *phyR* y *rpoE1* por qRT-PCR.

### **Inducción de estrés por falta de una fuente de carbono en las cepas wt, *lovhk::km* y $\Delta lovR$**

Se cultivó *Brucella abortus* 2308 wt y las mutantes *lovhk::km* y  $\Delta lovR$  en medio TSB a 37°C con agitación, hasta llegar a fase exponencial ( $DO_{600nm} \approx 1-1,5$ ). Se tomó una alícuota de cada cultivo (tiempo 0 hs), y se lavó el resto del cultivo una vez con MM1 pH 7,0, y luego se resuspendió en el mismo medio. Se incubó nuevamente los cultivos a 37°C con agitación, y se tomó una alícuota de cada cepa a los 30 min, 1 y 2 hs. Posteriormente, se purificó ARN total y se determinó el nivel de expresión de ARN de *phyR* por qRT-PCR.

## **Producción de anticuerpos policlonales en ratones**

Se produjo suero policlonal en ratones contra la proteína PhyR, siguiendo protocolos aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Fundación Instituto Leloir (número de protocolo: 2009/08/41/FG). Para ello, cinco ratones fueron inmunizados con 100  $\mu$ g de proteína PhyR recombinante purificada, mezclada con adyuvante incompleto de Freundt (Sigma-Aldrich), a los 0, 15, 30 and 45 días. Luego de la cuarta dosis, los ratones fueron sacrificados y se extrajo sangre total. Se determinó

por ELISA el título de anticuerpos anti-PhyR en los antiseros correspondientes, y luego fueron guardados a -20°C hasta su uso.

### Análisis por Western Blot

Se cultivó *B. abortus* en medio rico TSB hasta llegar a fase exponencial, y las alícuotas correspondientes fueron cosechadas por centrifugación por 2 min at 10.000 r.p.m. y resuspendidas en buffer Laemmli 2X. En todos los casos se tomó la misma cantidad de bacterias para cada muestra y cepa ( $1 \times 10^{10}$  bacterias en 150  $\mu$ l de buffer Laemmli 2X). Posteriormente, las muestras fueron inactivadas por calor a 100°C por 20 min, congeladas y nuevamente incubadas a 100°C por 20 min. Las muestras fueron separadas en un SDS-PAGE 15% y transferidas a un filtro de nitrocelulosa (Millipore) o una membrana de PVDF (Amersham Hybond-P PVDF Membrane - GE). RibH1, una isoenzima de la lumazina sintasa (LS), fue empleada como control de carga, ya que ha sido demostrado que posee una expresión constitutiva en *B. abortus* (datos del laboratorio) [109,110]. Se incubó la membrana con el suero policlonal anti-PhyR hecho en ratón (1:5.000), o suero policlonal anti-RibH1 hecho en conejo (1:2.000) respectivamente, en PBS-Tween 20 0,05% y leche 1%, y se dejó en agitación suave a 4°C por 16 hs. Luego las membranas fueron incubadas, según corresponda, con el anticuerpo secundario anti-Fc IgG de ratón conjugado a HRP (Sigma A4416) a una dilución 1:3.000, o anti-Fc IgG de conejo conjugado a HRP (Sigma A4416) a una dilución 1:5.000, con agitación suave por 1-2 hs a temperatura ambiente. Las membranas fueron reveladas con el sustrato Pierce ECL Plus Western Blotting Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La intensidad de la señal fue determinada con el equipo Storm 840 Molecular Imager (GE Healthcare), y las imágenes fueron cuantificadas con el programa ImageQuant 5.2.

### Ensayo de estabilidad de PhyR

Este ensayo está basado en un experimento realizado por Kim *et al.*, 2013 [85], con algunas modificaciones. *Brucella abortus* 2308 wt, y las mutantes *lovhk::km* y  $\Delta$ *lovR* fueron cultivadas en medio TSB a 37°C hasta fase exponencial ( $DO_{600} \approx 1$ ). Se tomó una alícuota de cada cultivo (tiempo 0 hs) y luego, con el objetivo de inhibir por completo la síntesis proteica, se agregó cloranfenicol a una concentración final de 500  $\mu$ g  $ml^{-1}$ . Los cultivos fueron nuevamente incubados con agitación a 37°C, y se tomaron alícuotas a las 3 y 5 hs. Los niveles de proteína PhyR fueron determinados y cuantificados por western blot. Posteriormente se calculó para cada cepa, la intensidad relativa de cada tiempo respecto de las 0 hs.

## **Ensayos de infección en macrófagos murinos J774A.1**

Para el crecimiento y mantenimiento de la línea celular de macrófagos murinos J774A.1, se empleó como medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con SFB 5% (Suero Fetal Bovino - Gibco), penicilina-estreptomicina (Gibco) y glutamina 2 mM. La incubación se realizó en una atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. El pasaje de células se realizó empleando una solución conteniendo tripsina (Gibco) en PBS 1X - EDTA 0,5 mM. Para los ensayos de infección se cultivaron *B. abortus* wt y las mutantes  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  en medio rico TSB hasta fase exponencial ( $DO_{600nm} \approx 1$ ). Los ensayos se realizaron en placas de 24 pocillos, con una multiplicidad de infección (MOI) 100:1 bacterias:macrófagos (una monocapa de  $10^5$  células de macrófagos murinos J774A.1 fue infectada con  $10^7$  bacterias). Para asegurar el contacto entre las células y las bacterias, se centrifugaron las placas de 24 pocillos a 1000 r.p.m. por 10 min, y luego se las incubó a 37°C en estufa. Luego de 1 h de incubación se lavaron los pocillos con PBS 1X y se colocó medio de cultivo (RPMI, SFB 5%, glutamina) con gentamicina 12,5 µg/ml para eliminar las bacterias que no ingresaron dentro de los macrófagos. Al cabo de 20 min se cambió el medio por RPMI SFB 5% gentamicina 5 µg/ml. Para determinar el número de bacterias intracelulares viables se lisaron los macrófagos de cada pocillo con en PBS 1X – Tritón X100 0,1%, a los tiempos correspondientes. Se plaquearon gotas de 10 ul de las diluciones seriadas por quintuplicado en placas TSA agar y se incubaron a 37°C. Se determinó la cantidad de u.f.c. (unidades formadoras de colonias)/ml. Cada tiempo de infección se realizó por duplicado y se grafica el Log10 del promedio u.f.c./ml

## **Determinación de la actividad del promotor *virB***

El promotor del operón *virB* fue amplificado usando los oligonucleótidos pvirbup y pvirbdown [111], y posteriormente clonado en el vector pBBR-*lacZ* utilizando las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, generando el plásmido pBBR-prom-*virB-lacZ*. Este plásmido posee el promotor del operón *virB* como fusión transcripcional al gen reportero *lacZ*. Este plásmido es replicativo en *Brucella* y fue incorporado en las cepas *B. abortus* wt, *lovhk::km*,  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  por electroporación o conjugación. Para lo ensayos de complementación, el plásmido pBBR-prom-*virB-lacZ* fue incorporado por conjugación a la cepa *lovhk::km/pMR\_lovhk*. Los plásmidos derivados de los vectores pMR10*cat* y pBBR1 son compatibles entre sí dentro de una misma bacteria ya que poseen orígenes de replicación de distintos grupos. El vector pBBR-*lacZ* vacío fue incorporado en la cepa wt 2308 y empleado como control negativo de expresión basal de *lacZ*.

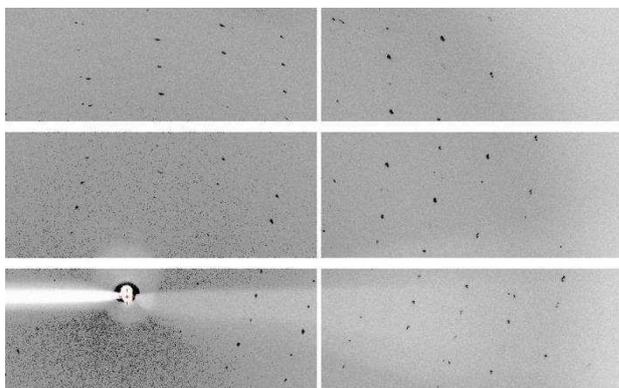
Para la determinación de la fuerza del promotor, se analizaron dos colonias de cada cepa. Las bacterias fueron cultivadas en medio TSB con agitación a 37°C desde una  $DO_{600nm}$  inicial de 0,05. Se tomaron dos alícuotas de cada cultivo en distintos puntos de la curva de crecimiento, desde fase exponencial hasta fase estacionaria. Luego se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa

de cada muestra por duplicado siguiendo un protocolo de Miller estándar, a excepción de que las muestras fueron centrifugadas 2 min a 10.000 r.p.m. previo a la determinación de  $A_{420nm}$ . Las Unidades Miller fueron calculadas como  $= [A_{420nm}/(t \times v \times DO_{600nm})] \times 1.000$ , donde  $t$  = tiempo de reacción en minutos;  $v$  = volumen de cultivo utilizado en el ensayo en ml;  $DO_{600nm}$  = la determinada para cada cultivo. El ensayo se realizó bajo condiciones normales de luz.

## **Resolución de la estructura tridimensional de PhyR**

### **Colección de datos de difracción**

Los cristales fueron congelados en la solución de cristalización PEG 4000 22%, isopropanol 11% y acetato de sodio 0,1 M adicionada con PEG 400 con la finalidad de evitar la formación de hielo. Las muestras fueron llevadas a la estación sincrotrón SOLEIL de Francia, la cual corresponde a una fuente de rayos X de tercera generación de altísima intensidad. Se colectaron datos de difracción de rayos X en la línea de cristalografía de macromoléculas PROXIMA-1. Se tomó un total de 600 imágenes de difracción ( $120^\circ$  de oscilación) utilizando un detector de pixel de última generación PILATUS 6M (Figura 22). Las mismas fueron procesadas luego con los programas XDS [112] y CCP4 [113], obteniéndose los estadísticos presentados en la Tabla 1. El mejor cristal difractó la radiación X a una resolución máxima de 2,05 Å con resultados promisorios.



**Figura 22.** Sección central de un patrón de difracción de PhyR. Se observan los spots de difracción característicos de una proteína.

### **Resolución, refinamiento, modelado y validación**

La estructura fue luego resuelta utilizando datos de difracción de rayos X a 2,05 Å de resolución con los estadísticos presentados en la Tabla 2. La estructura se resolvió por reemplazo molecular por medio del programa AMoRe [114] utilizando como modelo de búsqueda la estructura de PhyR de *C. crescentus* (PDB 3N0R) [77], y se refinó luego con el programa Buster [115]. El modelado fue realizado con el programa Coot [116]. Las

coordenadas finales fueron validadas con el programa MolProbity [117], y fueron luego depositadas en la base de datos del PDB bajo el código 4G97.

**Tabla 1. Estadísticos de la colección de datos y el refinamiento cristalográfico.**

<b>Colección de datos</b>		
Número de patrones de difracción		: 600
Ancho del patrón (°)		: 0,2
Longitud de onda (Å)		: 0,98011
Exposición por imagen (s)		: 0,2
Temperatura (K)		: 100
<b>Indexado y Escalado</b>		
Parámetros de la celda unitaria	a=b / c (Å)	: 53,37 / 177,30
	$\alpha=\beta=\gamma$ (°)	: 90
Grupo espacial		: $P4_32_12$
Límite de resolución (Å)		: 2,05
Número de reflexiones únicas		: 16947
Multiplicidad global (última capa)		: 8,3 (8,4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ global (última capa)		: 19,9 (1,9)
$R_{int}$ global % (última capa)		: 7,0 (105,5)
Completitud global (última capa)		: 99,9 (99,7)
Número de moléculas por unidad asimétrica		: 1
Contenido de solvente (%)		: 42

**Tabla 2. Estadísticos de la resolución de la estructura tridimensional de PhyR.**

<b>Resolución (Å)</b>		: <b>39,6 - 2,05</b>
Número de átomos de la proteína (sin H)		: 1.824
Número de moléculas de solvente		: 45
R / Rfree		: 0,212 / 0,247
R.m.s.d. distancias de enlace (Å) / ángulos (°)		: 0,010 / 1,09
Factor B promedio (Å <sup>2</sup> )		: 45,2
<b>Gráfico de Ramachandran</b>		
Favorables (%)		: 98,7
Permitidos (%)		: 1,3
No permitidos (%)		: -
Código PDB		: 4G97

## Representación gráfica

Los modelos tridimensionales presentados aquí fueron dibujados mediante el programa Pymol (Schroedinger).

# RESULTADOS

## Capítulo 1: Identificación de los compañeros de interacción de LOVHK.

### Búsqueda de compañeros de interacción de LOVHK

Los sistemas de dos componentes (TCS), están formados por dos proteínas: la primera posee un dominio sensor asociado a un dominio HK (histidina quinasa), y la segunda, denominada Regulador de Respuesta (RR), posee un dominio receptor y un dominio efector [59], (Figura 6). En varios casos, los genes correspondientes a las proteínas HK y RR se encuentran codificadas en el mismo operón, lo cual sugiere que ambas interactúan entre sí [64]. En otros casos, HK y RR forman parte de una misma proteína, denominada HK híbrida como es el caso de la proteína LOVHK-RR de *Pseudomonas syringae*, [118].

Por el contrario, en todos los genomas de *Brucella*, el gen correspondiente a *lovhk* se encuentra como una HK huérfana, si ningún RR en la misma región genómica, ya sea río arriba o río abajo de *lovhk*, por lo que no resulta evidente un posible compañero de interacción de LOVHK (Figura 23). Por ende, con el objetivo de identificar un RR que interactúe con LOVHK, se realizó un análisis bioinformático en las bases de datos de los genomas de diversas especies de *Brucella*, buscando genes que tuviesen un posible dominio REC, característico de los RRs.

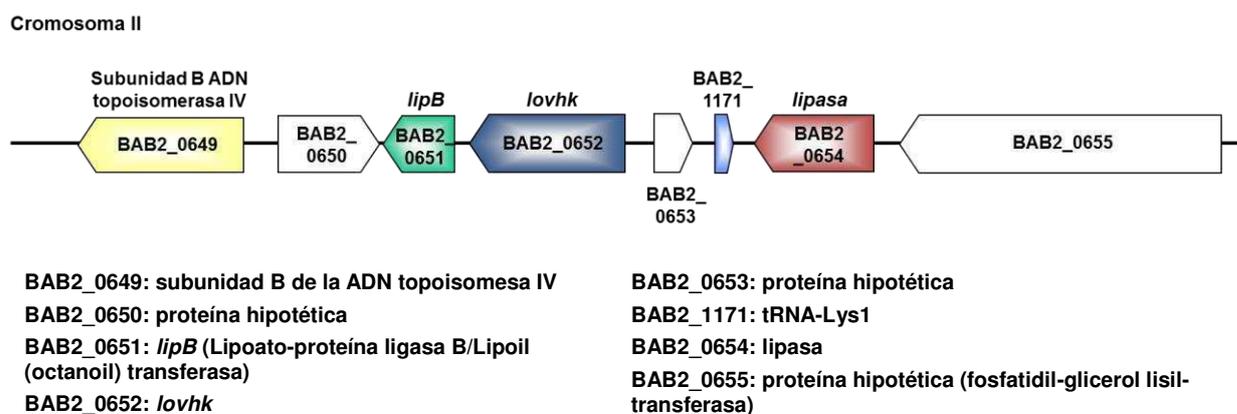


Figura 23. Esquema de la región genómica en la cual se encuentra codificado *lovhk* de *B. abortus* 2308. En *B. abortus* 2308 el gen la proteína LOVHK se encuentra codificada por el gen BAB2\_0652. Los nombres de los genes fueron tomados de la base de datos KEGG.

Se identificaron 24 genes que codifican para proteínas y un pseudogen ( $\Psi$ BAB1\_1059) con posibles dominios REC en *B. abortus* 2308 (Tabla 3). Dentro de estos genes, uno de ellos corresponde a una HK híbrida (BAB1\_0346); tres corresponden a un RR de dominio único, es decir que sólo poseen un dominio REC y no poseen dominio efector (BAB1\_0099, BAB2\_0628 y BAB2\_0042); 18 genes poseen un dominio efector de unión a ADN; y de los dos restantes uno está asociado a un dominio GGDEEF (BAB2\_0630), y el otro a un dominio perteneciente a la

familia de factores sigma de la transcripción (BAB1\_1671). Estos resultados se resumen en la Tabla 3 junto con un resumen de la información disponible para cada uno de los RRs en *Brucella* spp al momento de presentar esta tesis.

**Tabla 3. Lista de genes correspondientes a proteínas con dominios REC en el genoma de *B. abortus* 2308, y sus compañeros de interacción.**

Regulador de Respuesta <sup>1</sup>	Nombre <sup>2</sup>	Interacción <sup>2</sup>	Operón	Función
<b>Sólo REC</b>				
BAB1_0099	LovR	sí <sup>3</sup> (LOVHK)	no	Sink de fosfato de LOVHK <sup>3</sup> .
BAB2_0628	DivK	sí (PdhS, PleC, DivL, DivJ)	no	División asimétrica [100]
BAB2_0042	MdrR	desconocida	no	Desconocida
<b>Familia OmpR</b>				
BAB1_2006	OtpR/CenR	sí (TcbR)	no	Virulencia, tolerancia al estrés (temperatura, medio ácido, medio hiperosmótico), morfología celular, tolerancia a agentes $\beta$ -lactámicos, y es necesario para el crecimiento [119,120]
BAB1_2146	PhoB	sí (PhoR)	no	Desconocida
BAB1_0628	FeuP	no	<i>feuPQ</i>	Desconocida (no parece estar relacionado con la captación de hierro) [121]
BAB1_1614	CtrA	desconocida	no	Regulador transcripcional involucrado en la división celular; esencial para la viabilidad celular [122]
BAB1_0636	TccR	sí (TccS)	<i>tccSR</i>	Desconocida
BAB1_2092	BvrR	sí (BvrS)	<i>bvrRS</i>	Resistencia a policlones, virulencia, invasión celular, maduración vacuolar, transporte y replicación intracelular, modula la expresión de <i>virB</i> y de Omp (outer membrane protein) [21-23,123]
BAB1_1538	TcbR	sí (OtpR/CenR)	<i>tcbSR</i>	Desconocida
BAB2_0222	TcfR	sí (TcfS)	<i>tcfSR</i>	Desconocida
BAB2_0762	TceR	sí (TceS, TceR)	<i>tceSR</i>	Involucrado en invasión y supervivencia intracelular, y contribuye a la citotoxicidad generada por macrófagos en <i>B. melitensis</i> 16M. También contribuye a la colonización del bazo en ratones. Contribuye a la resistencia a estrés. [124]

BAB2_1099	FtcR	no	no	Regulador maestro de los genes del sistema flagelar, involucrado en virulencia. Carece de un sitio clásico de fosforilación [125]
<b>Familia NarL</b>				
BAB1_0345	PrIR	PrIS	no (ambos genes se encuentran en la misma región genómica, pero están codificados en direcciones opuestas)	Persistencia en ratones, y resistencia a la fuerza iónica [126]
BAB1_0370	TcdR	sí (TcdS)	<i>tcdSR</i>	Desconocida
BAB2_0041	NodW	sí (NodV)	<i>nodVW</i>	Desconocida
<b>Familia LuxR</b>				
BAB2_0806	BAB2_0806	no	no	Desconocida
<b>Familia NtrC</b>				
BAB1_1138	NtrX	sí (NtrY)	<i>ntrYX</i>	Sensor redox. Involucrado en la regulación de los genes de la vía de desnitrificación y de las citocromo oxidasas de alta afinidad. Importante en la infección en macrófagos [104].
BAB1_1140	NtrC	no	<i>ntrBC</i>	Probablemente involucrado en la regulación del metabolismo del nitrógeno [127]
BAB2_0081	StcA	no	no	Desconocida
<b>Familia PrrA</b>				
BAB1_0136	PrrA/RegA	sí (PrrB/RegB)	no	Sensor redox. Involucrado en la regulación de los genes de la vía de desnitrificación, genes de las citocromo oxidasas de alta afinidad, y genes involucrados en la adaptación a baja tensión de oxígeno en <i>B. abortus</i> [128]. Asociado a la persistencia en órganos target con concentraciones de oxígeno limitado en infecciones de ratones; regulación de la expresión de genes involucrados en la respiración oxidativa y desnitrificación en <i>B. suis</i> [129].
<b>REC-GGDEF</b>				
BAB2_0630	PleD	no	no	En <i>C. crescentus</i> está involucrado en la regulación del ciclo celular.

Familia sigma				
BAB1_1671	PhyR	sí (LOVHK) <sup>3</sup>	sí (BAB1_1669)	Principal componente del Sistema GSR; requerido en la infección crónica en mamíferos; regulado por fosforilación y proteólisis [85].
HK híbridas				
ψBAB1_1059 <sup>4</sup>	Pseudogen CckA	no	no	Este gen se está presente en otras especies de <i>Brucella</i> incluyendo <i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> 9-941, <i>B. suis</i> 1330 and <i>B. abortus</i> S-19, y codifica para CckA, una proteína involucrada en la regulación del ciclo celular en <i>C. crescentus</i> .
BAB1_0346	PrIS	PrIR	no	Involucrado en persistencia en ratones y resistencia a fuerza iónica [126]

<sup>1</sup> La clasificación en las familias de RR fue realizada según lo descrito por Galperin, 2006 [61].

<sup>2</sup> Los nombres de cada gen/proteína, así como los datos de interacción fueron tomados en la mayoría de los casos de Hallez *et al.*, 2007 [100].

<sup>3</sup> Descripto en el presente trabajo de tesis.

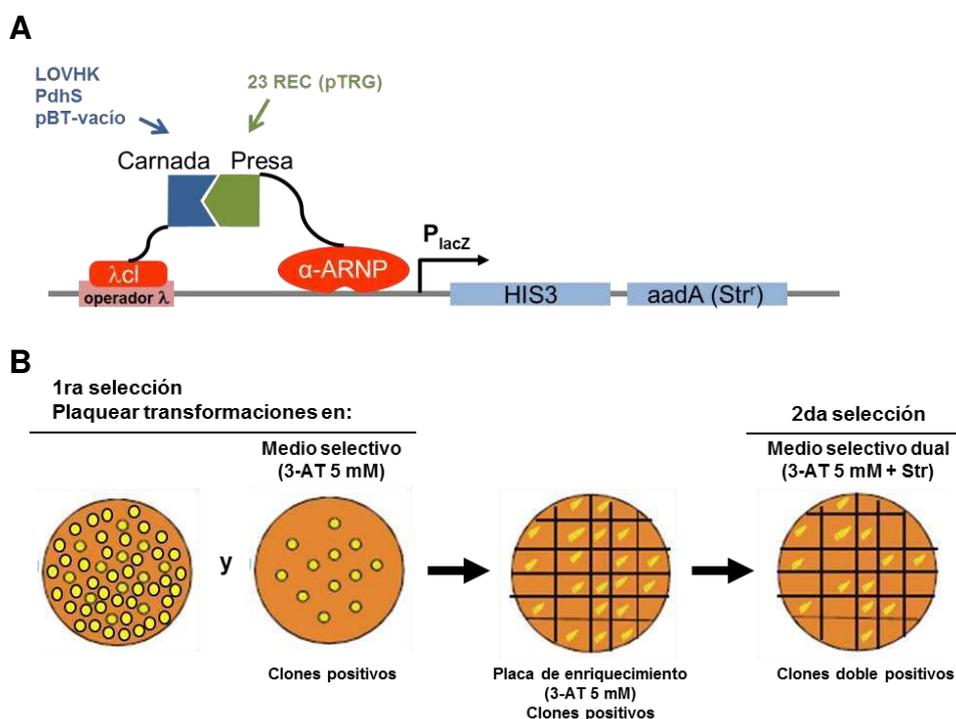
<sup>4</sup> Este gen no fue incluido en el análisis ya que no codifica para una proteína en *B. abortus* 2308.

Por ende, con el objetivo de encontrar los posibles compañeros de interacción de LOVHK, se decidió realizar un ensayo de doble híbrido bacteriano, utilizando el sistema BacterioMatch II de Stratagene. Este sistema permite evaluar la interacción *in vivo* entre dos proteínas denominadas carnada y presa, basándose en la activación transcripcional. Para ello se emplean dos plásmidos, uno para la carnada (plásmido pBT) y otro para la presa (plásmido pTRG), donde cada uno permite generar una proteína de fusión. En el primer plásmido, la proteína usada como carnada se fusiona al C-terminal de la proteína  $\lambda$ cl (secuencia completa del represor del bacteriófago  $\lambda$ , el cual posee el dominio N-terminal de unión al ADN y el dominio C-terminal de dimerización). El segundo plásmido permite clonar la secuencia correspondiente a la presa fusionada al C-terminal de la  $\alpha$ -ARNP (dominio N-terminal de la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa). Ambas proteínas son co-expresadas en una cepa reportera de *E. coli*, la cual tiene mutado el gen *hisB*, involucrado en la síntesis de histidina, y es sensible a estreptomycin en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, esta cepa posee en un episoma F' un cassette con dos genes reporteros, *HIS3* y *aadA* ( $Str^r$ ), bajo la regulación de un promotor *lac* modificado ( $P_{Lac}$ ) que incluye una copia del operador  $\lambda$ . *HIS3* codifica para una enzima de la vía de biosíntesis de histidina, y permite complementar la mutación *hisB* de la cepa reportera. La enzima His3 permite el crecimiento en un medio en ausencia de histidina y el crecimiento en presencia de 3-AT (un inhibidor competitivo de la enzima His3). El gen *aadA* confiere resistencia a estreptomycin.

Cuando las dos proteínas son co-expresadas en la cepa reportera, la carnada tiende a unirse al operador  $\lambda$  por medio del dominio de unión a ADN de la proteína  $\lambda$ cl. Si los fragmentos clonados expresan proteínas que interactúan entre sí, se recluta y estabiliza la unión de la  $\alpha$ -ARNP al promotor de los genes reporteros, activando de este modo la transcripción del gen *HIS3*. Esto se

evidencia por la aparición de colonias en medio selectivo conteniendo 3-AT y carente de histidina (clones positivos). Dicha interacción es validada por la transcripción del segundo reportero a través de la visualización de colonias en un medio selectivo dual que contiene estreptomicina y 3-AT, y carece de histidina (clones doble positivos). Este sistema permite hacer un screening de interacción de una biblioteca de expresión de proteínas con baja inespecificidad. En la Figura 24 se muestra una representación esquemática del sistema de doble híbrido bacteriano.

Se clonaron los dominios REC de todos los posibles RRs encontrados en *B. abortus* (excluyendo el dominio REC perteneciente a la HK híbrida) en el vector pTRG, formando así una mini-biblioteca de 23 posibles RRs como presa. Por otro lado, se clonó la secuencia completa del gen *lovhk* en el plásmido pBT. Para evaluar la interacción entre LOVHK como carnada y los 23 dominios REC como presa la cepa reportera fue co-transformada con el plásmido pBT-LOVHK y la mini-biblioteca. Con el fin de corroborar la funcionalidad de este sistema, se incluyó a la histidina kinasa PdhS de *B. abortus* que interacciona con el RR, DivK, como control positivo de interacción HK/RR [100]. El dominio REC de DivK se encuentra presente dentro de la mini-biblioteca. Por ende, el gen correspondiente a la HK PdhS fue clonado en el plásmido pBT, y la cepa reportera fue co-transformada con los plásmidos pBT-PdhS como carnada y la mini-biblioteca de 23 RRs como presa. Como control negativo se empleó como carnada al vector pBT vacío y la mini-biblioteca. En la Figura 24 se muestra un esquema representativo de las interacciones evaluadas, y en la Tabla 4 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en este ensayo.



**Figura 24. Representación esquemática del ensayo de doble híbrido bacteriano.** A. Esquema en el que se representan las interacciones ensayadas en el primer ensayo de doble híbrido. B. Inicialmente, se plaquea las bacterias co-transformadas con los plásmidos pBT y pTRG o sus derivados en medio no selectivo (donde crecen todas las bacterias que poseen ambos plásmidos) y en medio selectivo conteniendo 3-AT, permitiendo detectar interacciones débiles correspondientes a los clones positivos. Estos últimos se reestrian en una placa de enriquecimiento, y finalmente se seleccionan las interacciones más fuertes en medio selectivo dual conteniendo 3-AT y estreptomicina, obteniendo de este modo los clones doble positivos.

Tabla 4. Screening de una mini-biblioteca de proteínas conteniendo dominios REC en *Brucella abortus*.

Exp	Carnada	Presa	Clones iniciales <sup>1</sup>	Clones positivos <sup>2</sup>	Clones doble positivos <sup>3</sup>	Clones analizados <sup>4</sup>
1er doble híbrido	LOVHK	REC mini-biblioteca	39,800 (100)	>500 (1.3)	>500	20 (100% LovR)
	PdhS-HK		15,600 (100)	>500 (3.2)	>500	5 (100% DivK)
	Vector vacío		23,500 (100)	23 (0.1)	ND	ND
2do doble híbrido	LOVHK	REC mini-biblioteca (sin LovR)	57,000 (100)	>300 (0.52)	>60	10 (70% PhyR; 20% BAB1_1538; 10% BAB2_0041)
	Vector vacío		51,000 (100)	139 (0.27)	ND	ND

<sup>1</sup> Los clones iniciales fueron calculados a partir del número de colonias que crecieron en medio no selectivo correspondiente al ensayo de doble híbrido (detalles en Materiales y Métodos).

<sup>2</sup> Número de clones positivos que crecieron en medio selectivo. El porcentaje de clones positivos en relación al total de clones iniciales se indica entre paréntesis.

<sup>3</sup> Número de clones positivos que crecieron en medio selectivo dual.

<sup>4</sup> Número de clones positivos analizados por PCR y posterior secuenciación. Ente paréntesis se indica la identidad de cada RR obtenido y el porcentaje del mismo respecto del total analizado. ND: no determinado.

En ambos casos, empleando LOVHK o PdhS como carnada, se obtuvo un número similar de clones positivos (1,3% a 3,2% respecto de los clones iniciales, respectivamente), mientras que muy pocas colonias se obtuvieron usando el vector vacío (0,1%) (Tabla 4). Los clones doble positivos fueron analizados por PCR y posterior secuenciación de los mismos. En el caso del control positivo con PdhS se analizaron 5 clones mientras que en el caso de LOVHK se estudiaron 20 clones. En el caso de PdhS los 5 clones correspondieron a DivK, mientras que en el caso de LOVHK los 20 clones todos correspondieron al gen BAB1\_0099 de *B. abortus*. Este gen codifica para un RR de dominio único (Tabla 3).

Con el objetivo buscar información previa sobre el gen BAB1\_0099 se realizó un BLAST con la secuencia nucleotídica de dicho gen, y se observó que pertenece a la superfamilia CheY REC de proteínas. Se encuentra altamente conservada en diversas especies de *Brucella*, y hasta el momento no había sido estudiada. Basándose en otros trabajos, BAB1\_0099 fue nombrado LovR, por tratarse de un RR de dominio único que interactúa con una proteína HK que contiene un dominio LOV, como es el caso de LovR de *C. crescentus* [96] y EL\_LovR de *E. litoralis* [130], respectivamente. Sin embargo, hay poca similitud de secuencia aminoacídica entre ellos (Figura 25 y Tabla 5). Por ende, en este caso el nombre asignado a al gen BAB1\_0099 fue realizado siguiendo un criterio de similitud de función, y no por similitud de secuencia.

```

C. crescentus  --MSRPALDVLIVEDEMLLAIELEHLIEEAGFHSLGCAMSSDEAVTLARQLNPDALALIDV
B. abortus    MMNDLEHRRILVVEDEVFVALDVAATVEDANGTVVGPVGTVRQAIIDLINRQEVDAAILDV
E. litoralis  -----MPKVLVLEDEPLIAMNLQYAFEDEGAEEV--VAATCEQALKSLADNPIIDVAVLDV
              :*::*** :*::: .*: : . : :*: * *::**

C. crescentus  HLSDGPTGVDVARRIAKDCGGVALFMT-----ANVKRLPDDFAGACGVIGKPYSGHGPKS
B. abortus    NLAD-GDVEPVLDRLKSRNIFVVIHTGGGLPPRLAARYPE-----MPVFQKPIPPSVLTR
E. litoralis  NLGPKSHCGPVADALKQRAIPFILHTGDLDRHGELLRKID-----APVMAKPADTSDVAK
              .* . * : . . : . * : * : ** :

C. crescentus  ALSYLAICLTVGHAPGPAPAGLTLAPAYADRWGVVDTLT (152 aa)
B. abortus    T--LATAF---SSSV-----A----- (125 aa)
E. litoralis  R--ALEMC---GGDK-----EPA----- (121 aa)

```

**Figura 25. Comparación de las secuencias aminoacídicas de LovR en distintos microorganismos.** Alineamiento de las secuencias de LovR de *Brucella abortus* 2308, *Caulobacter crescentus* CB15 [94], y *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 [130]. Los alineamientos fueron realizados con Clustal-Omega2 (EMBL-EBI) [131]. El Aspártico fosforilable predicho de cada proteína se indica en amarillo. Referencias: '\*' residuo completamente conservado (celeste), ':' conservación entre grupos de propiedades similares fuertes '.' conservación entre grupos de propiedades similares débiles.

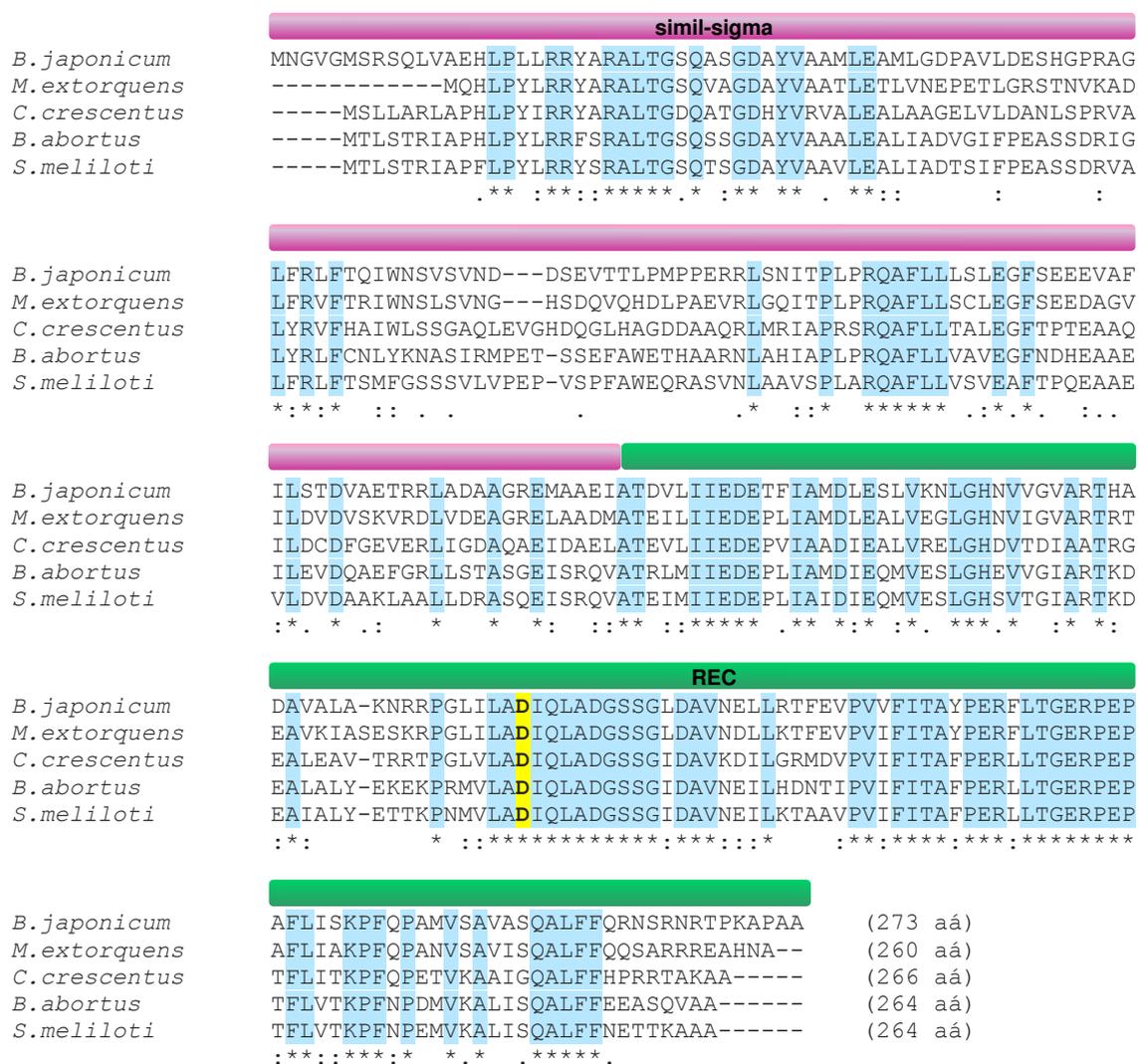
**Tabla 5. Porcentaje de identidad de secuencia, de a pares de secuencias, correspondiente a la proteína LovR en distintos microorganismos.**

	<i>C. crescentus</i> CB15	<i>B. abortus</i> 2308	<i>E. litoralis</i> HTCC2594
<i>C. crescentus</i> CB15	-	22,03	26,72
<i>B. abortus</i> 2308		-	30,51
<i>E. litoralis</i> HTCC2594			-

Se analizó la identidad de secuencia aminoacídica entre las proteínas LovR de *Brucella abortus* 2308, *Caulobacter crescentus* CB15 [94], y *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 [130]. Para ello se empleó el programa Clustal-Omega2 (EMBL-EBI) [131]. En la tabla se indica el porcentaje de identidad de a pares de secuencias, donde el valor se calcula teniendo en cuenta el número de residuos idénticos entre dos secuencias, dividido la longitud del alineamiento.

Posteriormente, con el objetivo de analizar si LOVHK podía interactuar con otro RR además de LovR, se volvió a realizar un nuevo ensayo de doble híbrido bacteriano. En este caso se empleó a LOVHK como carnada y la mini-biblioteca como presa, pero esta vez se eliminó de la mezcla al plásmido que contenía al gen BAB1\_0099. Como control negativo se analizó la interacción del vector pBT vacío con la mini-biblioteca de 22 dominios REC. En este segundo ensayo, el número de clones positivos fue menor que en el ensayo anterior, aunque mayor que en el control negativo (Tabla 4). Se analizaron 10 colonias por PCR y posterior secuenciación, habiéndose obtenido los siguientes resultados: 7 clones correspondían al gen BAB1\_1671, dos al gen BAB1\_1538, y un clon al gen BAB2\_0041. Resultados previos indican que tanto BAB1\_1538 como BAB2\_0041 interactúan con otras HKs (Tabla 3). Con el objetivo buscar información previa sobre el gen BAB1\_1671 se realizó un BLAST con la secuencia nucleotídica de dicho gen. En base a los resultados obtenidos, el gen BAB1\_1671 fue denominado PhyR debido a la homología de secuencia con la proteína PhyR caracterizada en *M. extorquens* AM1 [72], la cual forma parte del sistema de Respuesta General a Estrés (GSR) característico de alfa-proteobacterias. En la Figura 26 y Tabla 6 se muestra un alineamiento de secuencia entre PhyR de *Brucella* y PhyR de otras especies de alfa-proteobacterias, en las cuales esta proteína había sido caracterizada a este punto

de la tesis. Posteriormente, ya iniciada y avanzada mi tesis doctoral, se describió el sistema GSR en *Brucella abortus* 2308, siendo PhyR uno de los principales componentes de dicho sistema, como ya se ha descrito en la introducción [85].



**Figura 26. Comparación de las secuencias aminoácidas de PhyR en distintos microorganismos.** Se realizó un alineamiento múltiple de secuencia entre los homólogos de PhyR de *Brucella abortus* 2308, *M. extorquens* [72], *S. meliloti* [80], *C. crescentus* [77], y *B. japonicum* [74]. Para ello se empleó el programa Clustal-Omega2 (EMBL-EBI) [131]. Los alineamientos fueron realizados con Clustal-Omega2 (EMBL-EBI) [131]. El Aspártico fosforilable predicho se indica en amarillo. Referencias: “\*” residuo completamente conservado (celestes), “:” conservación entre grupos de propiedades similares fuertes “.” conservación entre grupos de propiedades similares débiles. El dominio efector simil-sigma N-terminal se indica en rosa, y el dominio REC C-terminal en verde.

Tabla 6. Porcentaje de identidad de secuencia, de a pares de secuencias, correspondiente a la proteína PhyR en distintos microorganismos.

	<i>B. japonicum</i>	<i>M. extorquens</i>	<i>C. crescentus</i>	<i>B. abortus</i>	<i>S. meliloti</i>
<i>B. japonicum</i>	-	67,57	51,71	53,64	52,11
<i>M. extorquens</i>	-	-	53,52	51,18	53,94
<i>C. crescentus</i>	-	-	-	54,17	54,55
<i>B. abortus</i>	-	-	-	-	75,38
<i>S. meliloti</i>	-	-	-	-	-

Se analizó la identidad de secuencia aminoacídica entre homólogos de PhyR de *B. abortus* 2308, *M. extorquens* [72], *S. meliloti* [80], *C. crescentus* [77], y *B. japonicum* [74]. Para ello se empleó el programa Clustal-Omega2 (EMBL-EBI) [131]. En la tabla se indica el porcentaje de identidad de a pares de secuencias, donde el valor se calcula teniendo en cuenta el número de residuos idénticos entre dos secuencias, dividido la longitud del alineamiento.

De aquí en adelante, el estudio se centró en el análisis de las interacciones más importantes observadas en los ensayos de doble híbrido: LOVHK con LovR y LOVHK con PhyR. En la Figura 27 se indica un esquema de la composición en dominios de los genes analizados hasta ahora.

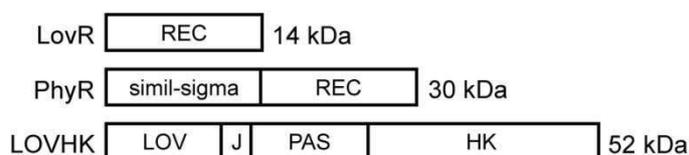
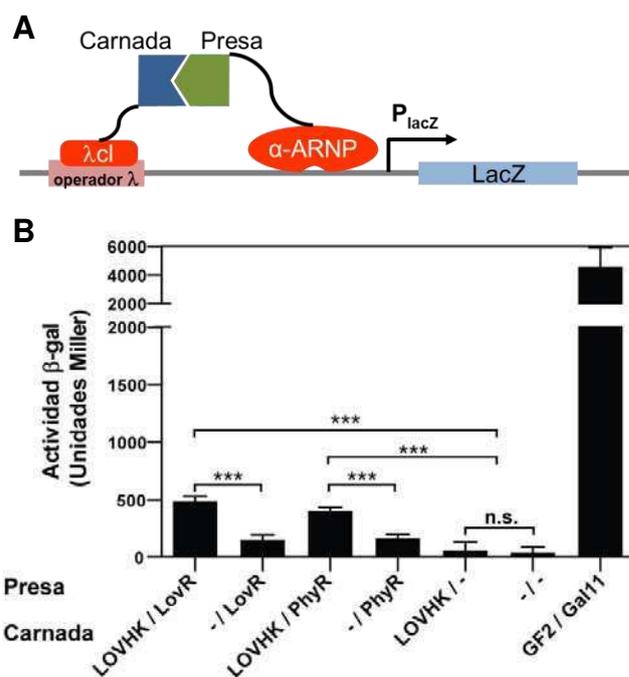


Figura 27. Esquema representativo de las proteínas involucradas en la vía de señalización de LOVHK. Se indica la distribución de dominios de cada proteína a la izquierda, y el PM de cada una de ellas a la derecha. J corresponde a la hélice alfa J presente en el extremo C-terminal de los dominios LOV [47]. Los PM teóricos de cada proteína fueron determinados con el programa on-line ExPASy-ProtParam [105].

## Cuantificación de la interacción por doble híbrido

La interacción de LOVHK con LovR, y LOVHK con PhyR se cuantificó empleando un sistema reportero basado en la determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Para ello, se emplean los mismos plásmidos que fueron utilizados en los ensayos de doble híbrido anteriores en una nueva cepa reportera: *E. coli* FW 102 O<sub>L</sub>2-62 [102]. Esta cepa posee un episoma F' con el gen reportero *lacZ* río abajo del promotor Lac, el cual posee la secuencia del operador  $\lambda$  (placOL2-62-lacZ). Al emplear los mismos plásmidos del sistema BacterioMatchII, esta cepa permite cuantificar la intensidad de la interacción proteína-proteína (cañada-presa) por medio de la activación transcripcional del gen *lacZ*, y posterior determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa (Figura 28A). Cuanto mayor sea la actividad de esta enzima, más fuerte será la interacción entre las proteínas cañada-presa que está siendo evaluada. Para cuantificar las interacciones previamente mencionadas, cantidades iguales de cada clon por separado: pTRG-LovR o pTRG-PhyR, fueron co-transformados con el plásmido conteniendo a LOVHK como cañada (pBT-LOVHK) en la cepa reportera. También se analizó la interacción con los correspondientes vectores vacíos como

control negativo y la interacción GF2-Gal11 (del sistema BacterioMatchII) como control positivo. Las interacciones LOVHK/LovR y LOVHK/PhyR mostraron una actividad  $\beta$ -galactosidasa similar y significativamente mayor que los controles negativos con los plásmidos vacíos, aunque menor que el control positivo. Estos resultados sugieren que LOVHK podría estar interactuando con dos RRs: LovR y PhyR (Figura 28B).

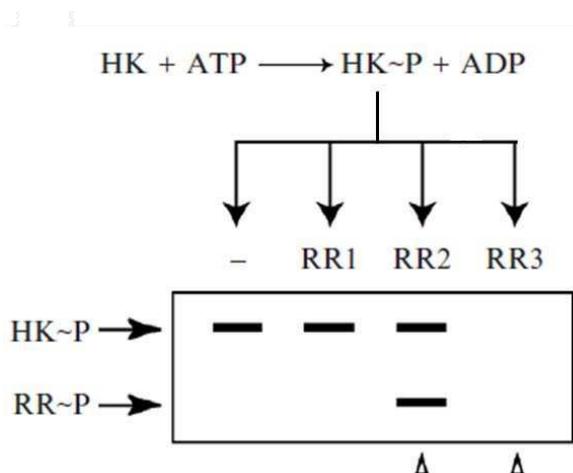


**Figura 28. Cuantificación de la interacción entre LOVHK/LovR y LOVHK/PhyR.** **A.** Representación esquemática del sistema reportero empleado en el ensayo doble híbrido. **B.** Cantidades iguales de los plásmidos pBT y pTRG conteniendo cada uno de los genes indicados, fueron co-transformados en la cepa reportera de *E. coli* FW 102 O<sub>L</sub>2-62. La interacción proteína-proteína fue cuantificada por medio de la determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Como control negativo se empleó la interacción con los correspondientes plásmidos vacíos. Como control positivo se analizó la interacción de esta cepa co-transformada con los plásmidos pBT-GF2 y pTRG-Gal11. Los datos representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de un ANOVA de un factor, seguido de comparaciones múltiples realizadas con el test de Bonferroni (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ).

### Confirmación de la interacción entre LOVHK/RRs por medio de ensayos de fosfotransferencia

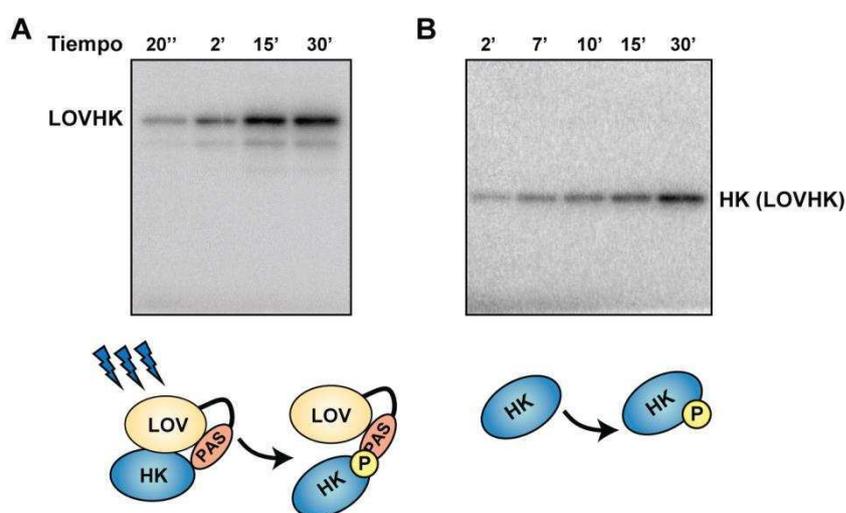
Una vez que una HK se autofosforila en un residuo histidina conservado presente en el dominio HK, esta transfiere el fosfato a un residuo aspártico conservado en el dominio REC del RR con el cual interactúa. De este modo, el RR se activa y transfiere la señal hacia otros componentes celulares [59]. Tanto LovR como PhyR poseen un aspártico conservado (Figuras 25 y 26), el cual es el sitio putativo de fosforilación. Por medio de ensayos de fosfotransferencia realizados *in vitro* con proteínas recombinantes, se puede corroborar la especificidad de la interacción HK/RR, basándose en el hecho de que una HK tiene la misma preferencia por su correspondiente RR tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos ensayos consisten en incubar a la HK en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ , obteniendo HK~P. Luego se agrega el RR a evaluar por un determinado período de tiempo, y las muestras son resueltas en un SDS-PAGE y posterior detección de la señal radiactiva. Una eficiente transferencia del fosfato marcado de la HK al RR se manifiesta de dos formas: 1) por la aparición de marca a la altura del PM del RR (RR~P) con la concomitante disminución de marca de la HK~P; 2) por la desaparición de marca de la HK y del RR debido a una alta actividad autofosfatasa intrínseca de algunos RRs, o por la presencia de actividad fosfatasa que algunas HKs presentan sobre el RR con el que interactúan (Figura 29). Se considera que la interacción es

específica si la transferencia del fosfato de la HK al RR ocurre a tiempos cortos. A su vez, se puede incubar una HK con más de un RR de forma simultánea, pudiendo determinar la preferencia de una HK por cada RR [65].



**Figura 29. Esquema de las reacciones de autofosforilación y fosfotransferencia.** HK es incubada en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ , obteniendo HK~P (autofosforilación), y luego es incubada en presencia de 3 RRs de interés. Las muestras son luego resultas en un SDS-PAGE, y detección de la señal radiactiva. La columna 1 corresponde a HK~P luego de la reacción de autofosforilación. En la columna 2 no ocurre fosfotransferencia. En las columna 3 y 4 sí hay transferencia del fosfato de la HK~P al RR, indicando que ambas interacciones son específicas. En el primer caso, al aumentar la marca del RR, disminuye la marca sobre la HK. En el segundo caso, disminuye o desaparece la marca de la HK sin la aparición de marca a la altura del RR. Lo cual puede deberse a una gran actividad de autofosfatasa del RR, o de la HK sobre el RR. Figura adaptada de Laub *et al.*, 2005 [65].

Los sistemas de doble híbrido pueden dar lugar a falsos positivos, por ello se corroboraron las interacciones observadas por medio de ensayos de fosfotransferencia. Para los siguientes ensayos se clonaron y purificaron las proteínas recombinantes LOVHK, PhyR, y LovR. Inicialmente, se realizó un ensayo de autofosforilación de LOVHK *in vitro* en función del tiempo. Luego de iluminar a LOVHK por 1 min con luz blanca, e incubarla en oscuridad en buffer de autofosforilación, se observó que LOVHK llegó a un máximo de fosforilación a los 15-30 min de incubación (Figura 30A). Posteriormente, se corroboró que el dominio HK de LOVHK también tiene la capacidad de autofosforilarse (Figura 30B).

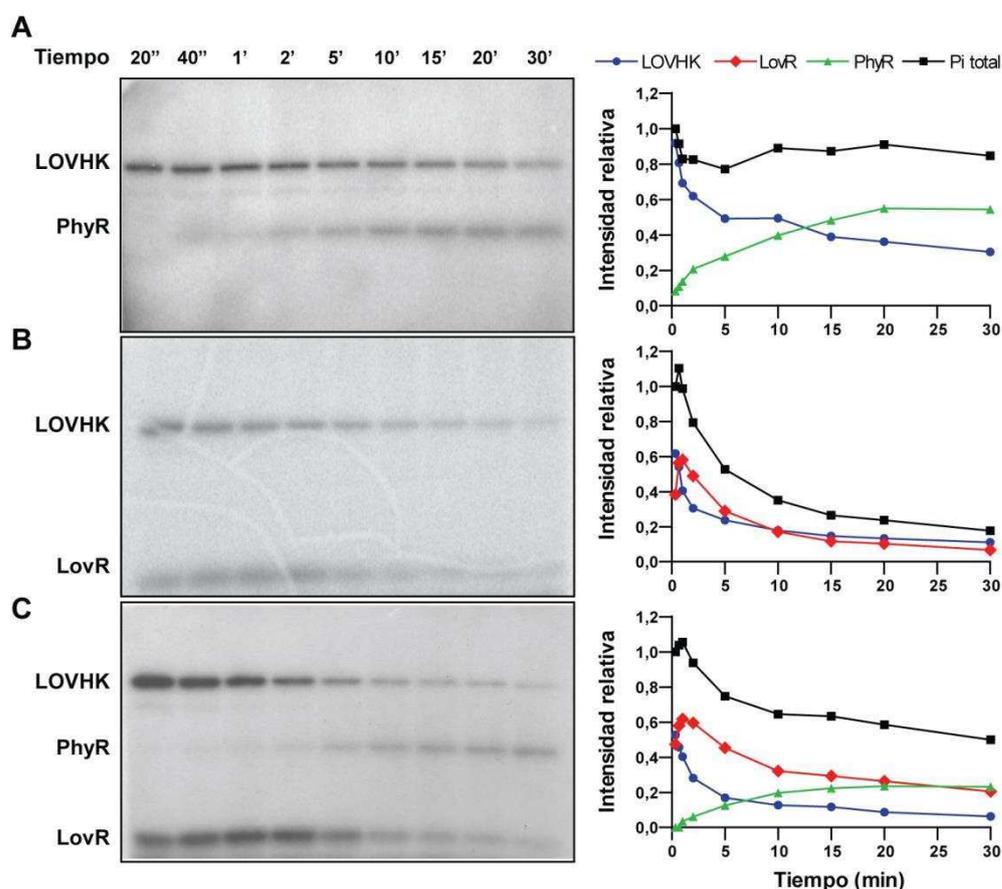


**Figura 30. Reacción de autofosforilación de LOVHK y HK en función del tiempo.** A. LOVHK (52 kDa) purificada a una concentración final 2,5  $\mu\text{M}$ , fue iluminada por 1 min con luz blanca e incubada a 37°C en buffer de autofosforilación conteniendo  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Se tomó una alícuota a cada uno de los tiempos indicados, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE 15%. Se muestra un autorradiograma representativo. Arriba del autorradiograma se indica el tiempo de incubación en

segundos (columna 1) y minutos (columnas 2-4). **B.** HK (26 kDa) purificada a una concentración final 2,5  $\mu$ M, fue incubada a 37°C en buffer de autofosforilación conteniendo  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Se tomó una alícuota a cada uno de los tiempos indicados, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE 15%. Se muestra un autorradiograma representativo. Arriba del autorradiograma se indica el tiempo de incubación en minutos.

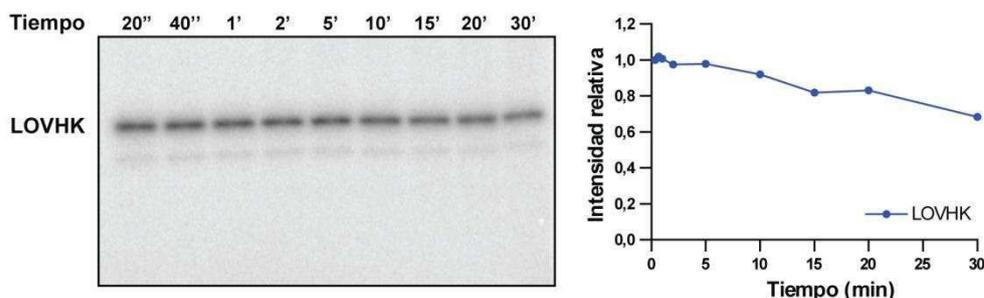
Las interacciones entre LOVHK/LovR y LOVHK/PhyR se analizaron mediante ensayos de fosfotransferencia *in vitro* empleando las proteínas recombinantes purificadas. Se iluminó a LOVHK en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  y se la incubó a 37°C durante 15 min para permitir la reacción de autofosforilación, asegurando de este modo una buena carga de fosfato en LOVHK previo a la adición de cada RR. Luego de los 15 min, se agregó PhyR o LovR por separado, o ambos RRs de forma simultánea, y se tomaron alícuotas a distintos tiempos las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE.

En estos ensayos se puede observar que LOVHK tiene la capacidad de fosfotransferir a ambos RRs, aunque la cinética de fosfotransferencia es distinta (Figuras 31A y 31B). La señal correspondiente a PhyR se hace evidente recién a los 40 seg de incubación y alcanza un plateau luego de los 20 min, manteniéndose constante a lo largo de tiempo de reacción (30 minutos). Este incremento en la marca de PhyR coincide con una disminución de la marca de LOVHK (Figura 31A). Por el contrario, LovR se fosforila rápidamente, llegando a un máximo a los 2 min, y luego se defosforila rápidamente dentro de los 10 min de incubación al mismo tiempo que la señal de LOVHK disminuye rápidamente (Figura 31B). Cuando LOVHK es incubado con PhyR, la marca total correspondiente a la suma de la señal de ambas proteínas a cada tiempo (Pi total) se mantiene constante en el tiempo sugiriendo que el nivel de fosforilación de PhyR es estable (Figura 31A). Sin embargo, la adición de LovR a LOVHK disminuye rápidamente la cantidad de fosfato presente en el sistema (Figura 31B). Este resultado sugiere que el fosfato transferido a LovR es rápidamente hidrolizado. Con el objetivo de analizar si LOVHK es capaz de fosfotransferir a un RR en presencia del otro se repitió el ensayo de fosfotransferencia agregando esta vez cantidades equimolares de ambos RRs (Figura 31C). En este caso, la cinética de fosforilación de LovR presenta un perfil similar al observado en el experimento previo en el cual LovR es incubado únicamente con LOVHK (Figura 31B). PhyR también es fosforilada aunque la cinética es un poco más lenta en comparación a cuando PhyR es incubada solo con LOVHK (Figura 31A), dando lugar a un menor grado de PhyR~P (Figura 31C). Si bien se puede observar que LOVHK aparenta tener una preferencia por LovR, la presencia de este RR no inhibe la capacidad de LOVHK de fosfotransferir a PhyR indicando que LOVHK puede interactuar con ambos RRs simultáneamente. Cuando los dos RRs están presentes, el fosfato total del sistema disminuye en el tiempo debido a la presencia de LovR pero en menor medida que cuando está LovR sola probablemente debido a que parte de la marca permanece en PhyR (Figura 31C).



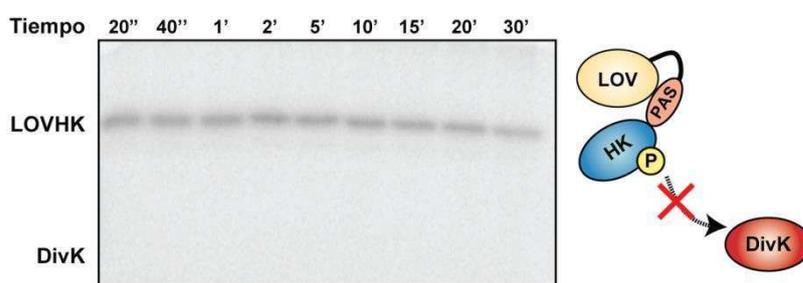
**Figura 31. Reacción de fosfotransferencia entre LOVHK y dos RRs en *Brucella*.** La proteína LOVHK purificada fue iluminada por 1 min con luz blanca en buffer de autofosforilación conteniendo  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Luego de 15 min a  $37^\circ\text{C}$ , se adicionó el RR o mezcla de RRs correspondiente, siendo la concentración final en la mezcla de reacción de  $2,5\ \mu\text{M}$  para LOVHK y cada RR. Se tomó una alícuota a cada uno de los tiempos indicados, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE 15%. A la izquierda se muestran los autorradiogramas, y la cuantificación de cada uno de ellos a la derecha. Los datos se presentan como la intensidad relativa de cada banda respecto de la marca total a los 20 segundos. El Pi total corresponde a la suma de intensidad de las bandas observadas en cada calle a cada tiempo. Arriba de los autorradiogramas se indica el tiempo de incubación en segundos (columnas 1 y 2) y minutos (columnas 3-9) luego de agregar correspondientes RRs. Fosfotransferencia entre: **A.** LOVHK y PhyR; **B.** LOVHK y LovR; **C.** LOVHK, LovR y PhyR. Referencias: LOVHK (azul; 52 kDa), PhyR (verde; 30 kDa), LovR (rojo; 14 kDa) y la Pi total (negro). El ensayo se repitió tres veces, y se muestra un experimento representativo de cada tipo de interacción.

Como control, se realizó el mismo proceso de autofosforilación de LOVHK por 15 mins y luego se agregó buffer de reacción en lugar de los RRs. Se tomaron alícuotas en función del tiempo y se cuantificó la marca correspondiente a LOVHK en función del tiempo. En la Figura 32 se puede ver que la marca de LOVHK disminuye levemente a los largo del tiempo de incubación, probablemente por hidrólisis como se ha descrito en otras HKs [65], pero esta disminución no es significativa en comparación a cuando LovR está presente en la mezcla de reacción (Figura 31B).

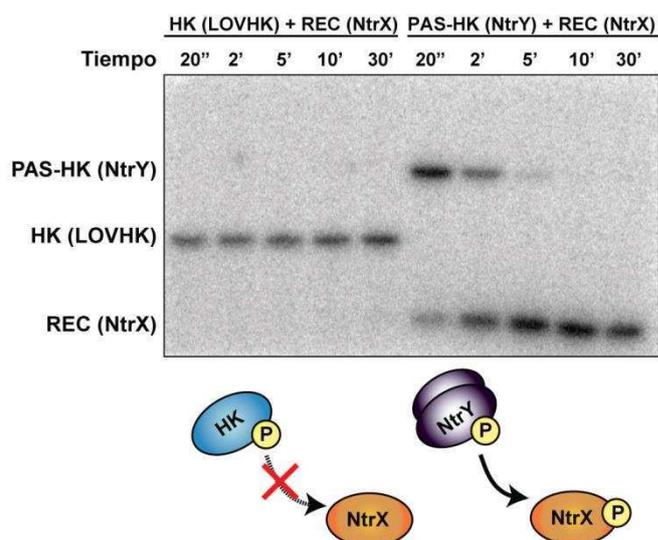


**Figura 32. La marca de LOVHK disminuye un poco con el tiempo.** La proteína LOVHK (52 kDa) purificada fue iluminada por 1 min con luz blanca en buffer de autofosforilación conteniendo  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ . Luego de 15 min a 37°C, se adicionó buffer de reacción, y se condieró este punto como tiempo inicial. La concentración final de LOVHK fue de 2,5  $\mu\text{M}$ . A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE 15%. A la izquierda se muestra el autorradiograma y a la derecha su cuantificación. Los datos se presentan como la intensidad relativa de cada banda respecto de la marca total a los 20 segundos. Arriba del autorradiograma se indica el tiempo de incubación en segundos (columnas 1 y 2) y minutos (columnas 3-9) luego de agregar el buffer de reacción.

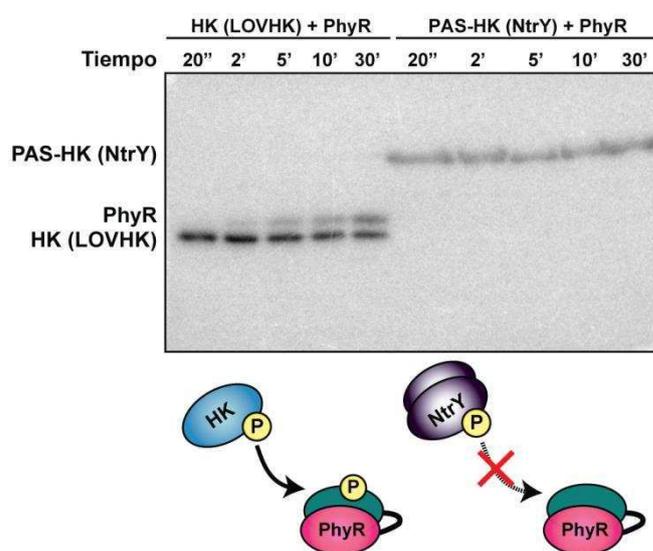
Con el objetivo de corroborar si las interacciones son específicas, se realizaron controles con proteínas HK y RR no relacionadas con el sistema LOVHK/LovR/PhyR bajo las mismas condiciones experimentales. Primero, se evaluó si LOVHK puede fosfortransferir a otros RRs de *Brucella* no relacionados con LOVHK. En la Figura 33 se observa que LOVHK no es capaz de fosfortransferir al RR de dominio único, DivK, a lo largo de los 30 min de incubación. Segundo, se observó que el dominio HK de LOVHK, el cual se autofosforila (Figura 30B) y transfiere a LovR y PhyR al igual que LOVHK entera, no es capaz de fosfortransferir al dominio REC de NtrX, pero este sí es fosforilado bajo las mismas condiciones experimentales por una proteína constituida por los dominio PAS-HK de su respectivo compañero de interacción, NtrY [104] (Figura 34). Tercero, se analizó si otra HK no relacionada puede fosforilar a PhyR y LovR. En las Figuras 35 y 36 se observa que el dominio HK de LOVHK fosfortransfiere a PhyR y LovR mientras que PAS-HK (NtrY) no es capaz de fosfortransferir a PhyR ni a LovR en el tiempo analizado.



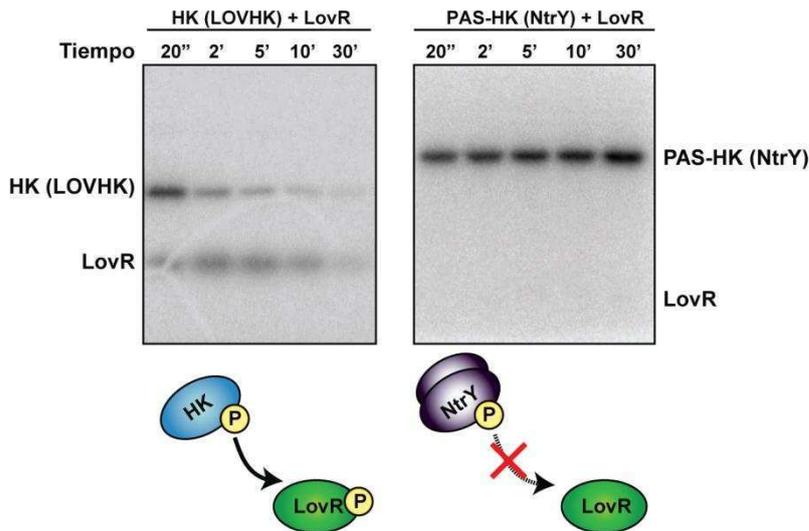
**Figura 33. LOVHK no fosfortransfiere a un RR no relacionado: DivK.** LOVHK (52 kDa) purificada fue incubada en buffer de autofosforilación conteniendo  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , e iluminada. Al cabo de 15 min a 37°C, se agregó DivK purificada (16,4 kDa), siendo la concentración final de reacción de ambas proteínas de 2,5  $\mu\text{M}$ . A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, y se analizaron por SDS-PAGE 15%. A la izquierda se muestra un autorradiograma representativo de tres repeticiones. Arriba del autorradiograma se indica el tiempo de incubación en segundos (columnas 1 y 2) y minutos (columnas 3-9) luego de agregar DivK.



**Figura 34. LOVHK no fosfortransfiere a un RR no relacionado: NtrX.** El dominio HK de LOVHK (26 kDa) o PAS-HK (NtrY) (42 kDa) a una concentración de 2,5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M respectivamente, fueron incubados por separado en buffer de autofosforilación conteniendo [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP. Al cabo de 15 min a 37°C, se agregó el dominio REC de NtrX a una relación molar final HK:NtrX de 1:3. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, y fueron analizadas por SDS-PAGE 15%. Se muestra un autorradiograma representativo de tres repeticiones. Arriba del autorradiograma se indica el tiempo de incubación en segundos (columnas 1 y 6) y minutos (columnas 2-5 y 7-10) luego de agregar el dominio REC de NtrX. Debajo se muestra una representación esquemática de la interpretación del autorradiograma.

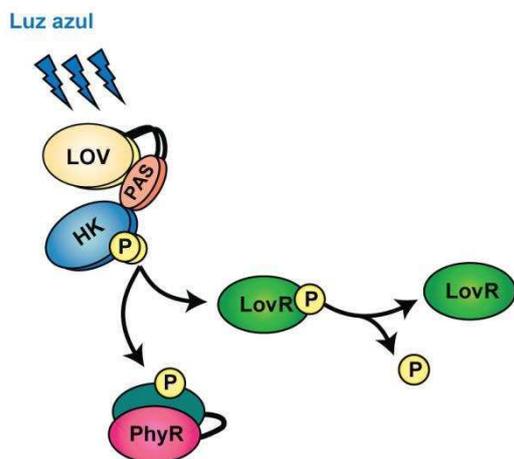


**Figura 35. PhyR no es fosforilada por una HK no relacionada: NtrY.** El dominio HK de LOVHK purificado (26 kDa) o PAS-HK (NtrY) (42 kDa) [104] fueron incubados por separado en buffer de autofosforilación conteniendo [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP. Al cabo de 15 min a 37°C, se agregó PhyR (30 kDa) purificada a cada una de las mezclas de reacción, siendo la concentración final de cada proteína 2,5  $\mu$ M. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, y fueron analizadas por SDS-PAGE 15%. Se muestra un autorradiograma representativo. Arriba del autorradiograma se indica el tiempo de incubación en segundos (columnas 1 y 6) y minutos (columnas 2-5 y 7-10) luego de agregar PhyR. Debajo se muestra una representación esquemática de la interpretación del autorradiograma.



**Figura 36. LovR no es fosforilada por una HK no relacionada: NtrY.** El dominio HK de LOVHK purificado (26 kDa) o PAS-HK (NtrY) (42 kDa) [104] fueron incubados por separado en buffer de autofosforilación conteniendo  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP. Al cabo de 15 min a 37°C, se agregó LovR (14 kDa) purificada a cada una de las mezclas de reacción, siendo la concentración final de HK y LovR de 2,5  $\mu\text{M}$ , y de PAS-HK (NtrY) 10  $\mu\text{M}$ . A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, y fueron analizadas por SDS-PAGE 15%. Se muestra un autorradiograma representativo. Arriba del autorradiograma se indica el tiempo de incubación en segundos (columnas 1 y 6) y minutos (columnas 2-5 y 7-10) luego de agregar LovR. Debajo se muestra una representación esquemática de la interpretación del autorradiograma.

Todos estos resultados indican que la interacción de LOVHK/LovR y LOVHK/PhyR es específica. LovR podría estar funcionando como un sink de fosfato, disminuyendo el grado de fosforilación de LOVHK *in vitro*, mientras que LOVHK tiene la capacidad de fosforilar al regulador central del sistema GSR en *Brucella abortus*. En el esquema de la Figura 37 se resumen los resultados obtenidos hasta el momento.



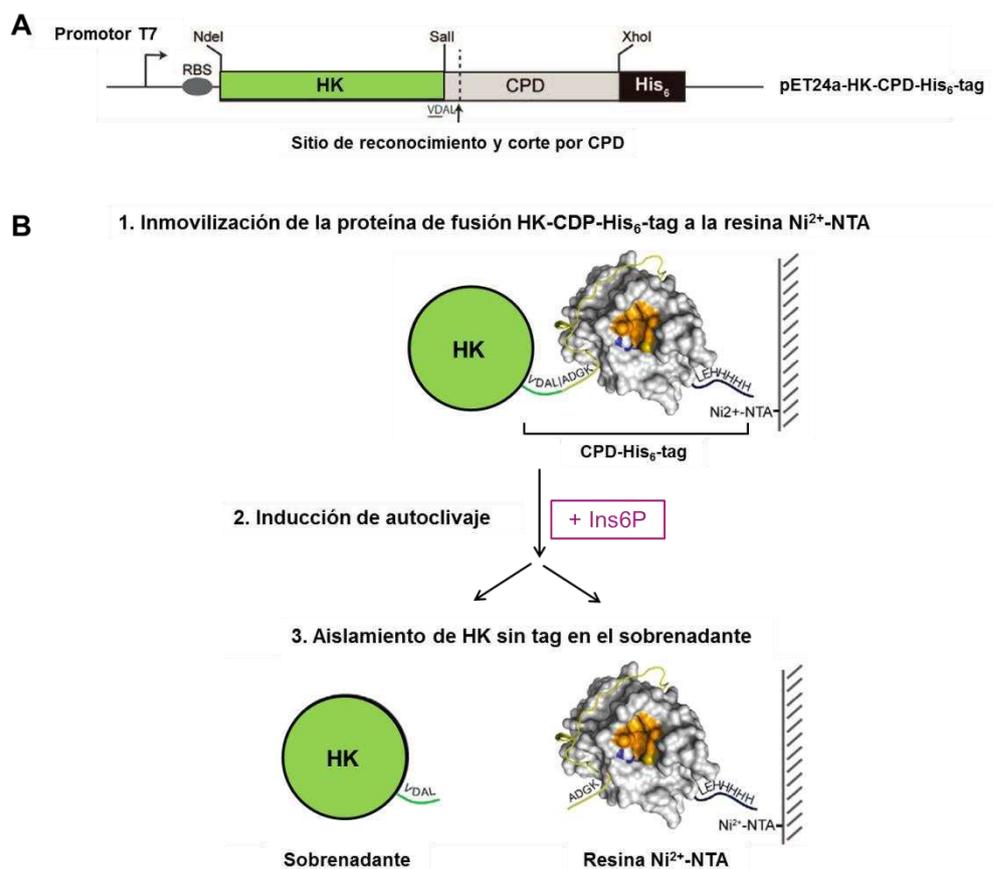
**Figura 37. Esquema representativo de la interacción entre LOVHK y sus dos RRs.** Cuando LOVHK es iluminada con luz blanca o luz azul, la misma se autofosforila en un residuo histidina conservado y luego tiene la capacidad de transferir el fosfato a dos RRs: LovR y PhyR. LovR se fosforila y defosforila rápidamente, disminuyendo el grado de fosforilación de LOVHK. Por el contrario, la marca de PhyR permanece estable en el tiempo, lo que sugiere que podría estar transfiriendo la señal hacia otros componentes celulares.

## Ensayo de determinación de actividad fosfatasa

Las HKs, además de la capacidad de autofosforilación y fosfotransferencia, pueden tener actividad fosfatasa sobre el RR al cual fosforilan [67]. Debido a que LovR se defosforila muy rápidamente, realizamos el análisis de la actividad fosfatasa sobre PhyR. Con el objetivo de determinar si LOVHK tiene actividad fosfatasa sobre PhyR es necesario disponer de PhyR~P libre de la presencia de LOVHK para que pueda ser utilizado como sustrato de la reacción fosfatasa. Para ello fue necesario diseñar un nuevo sistema de purificación del dominio HK de LOVHK.

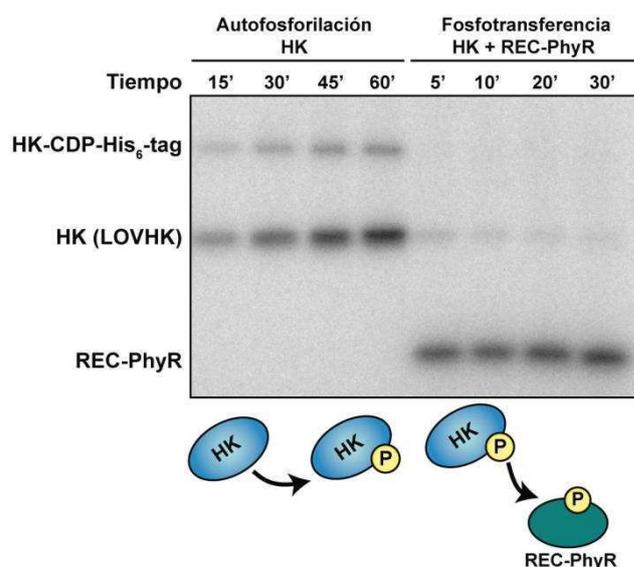
## Nuevo sistema de purificación de proteínas recombinantes libre de etiquetas

El dominio CPD (Cysteine Protease Domain) de la toxina MARTX de *Vibrio cholerae* es una proteasa con actividad autocatalítica, la cual corta exclusivamente después de un residuo leucina ubicado hacia el extremo N-terminal de la misma proteína. La actividad proteasa es inducible por el agregado de inositol-6-fosfato (Ins6P) que está presente en células eucariotas y ausente en bacterias. Esta característica ha sido empleada para diseñar un sistema de expresión y purificación de proteínas en bacterias que permite una rápida y eficiente separación de la proteína de interés de la etiqueta utilizada en la purificación de la proteína recombinante [103]. Se utilizan dos etiquetas proteicas (o tags): el dominio CPD seguido de un His<sub>6</sub>-tag. Al clonar una proteína de interés en el extremo N-terminal del CDP-His<sub>6</sub>-tag, el sitio de corte de la proteasa queda en la región entre ambas proteínas. La proteína de fusión generada es purificada del lisado bacteriano por medio de una cromatografía de afinidad por Ni<sup>2+</sup> (sin eluir), permaneciendo la proteína de fusión inmovilizada en la columna (Figura 38B). Subsecuentemente, se adiciona Ins6P, lo cual induce la actividad proteasa del dominio CPD, liberando de este modo a la proteína de interés al sobrenadante o buffer de elución [103]. En colaboración con la Dra. Jimena Rinaldi de nuestro laboratorio construimos un derivado del vector pET24a conteniendo el dominio HK-CDP-His<sub>6</sub>-tag (Figura 38).



**Figura 38. Purificación de HK a partir de HK-CPD-His<sub>6</sub>-tag.** A. Esquema de la construcción de la proteína de fusión en el plásmido pET24a-HK-CPD-His<sub>6</sub>-tag. B. Esquema de purificación empleado (adaptado de Shen *et.al*, 2009) [103].

El dominio HK de LOVHK y PhyR tienen tamaños similares: 26 kDa y 30 kDa respectivamente, por lo que resulta difícil resolverlos en un SDS-PAGE. Para poder distinguir las bandas de fosforilación con mayor facilidad, se decidió clonar, expresar y purificar el dominio REC de PhyR (REC-PhyR) en lugar de la proteína entera, siendo su PM de aproximadamente 15 kDa. Para confirmar las actividades de autofosforilación y fosfotransferencia de la nueva HK y REC-PhyR se realizó un ensayo de autofosforilación bajo las mismas condiciones que en los experimentos anteriormente descritos (Figura 39). Se puede observar que la nueva HK libre de etiquetas puede autofosforilarse y fosfotransferir al dominio REC-PhyR indicando que el sistema es funcional. En el autorradiograma se puede observar una banda superior a HK, correspondiente a una contaminación con HK-CPD-His<sub>6</sub>-tag.

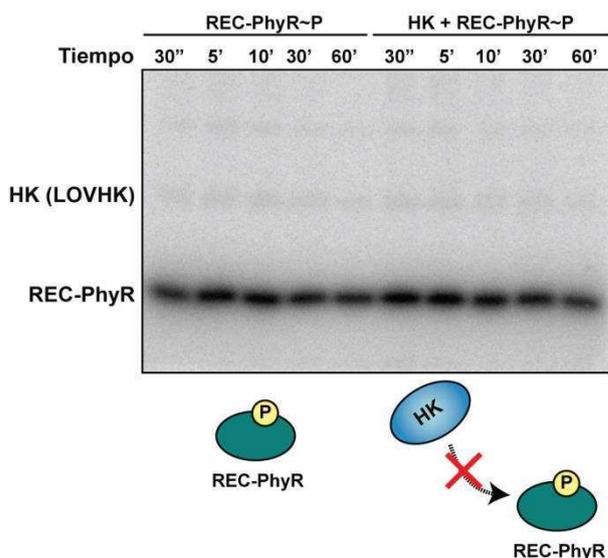


**Figura 39. Ensayo de autofosforilación y fosfotransferencia de HK recombinante libre de etiquetas.** El dominio HK de LOVHK (26 kDa) purificado a partir de la construcción HK-CPD-His<sub>6</sub>-tag (50 kDa) a una concentración 2,5  $\mu$ M fue incubado en buffer de autofosforilación conteniendo [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP a 37°C. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados, y a los 60 minutos se agregó el dominio REC-PhyR (15 kDa) a la mezcla de reacción a una concentración final de 2,5  $\mu$ M. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, y posteriormente fueron analizadas por SDS-PAGE 15%. Se muestra un autorradiograma representativo. Los números arriba del autorradiograma indican el tiempo en minutos. Debajo se muestra una representación esquemática de la interpretación del autorradiograma.

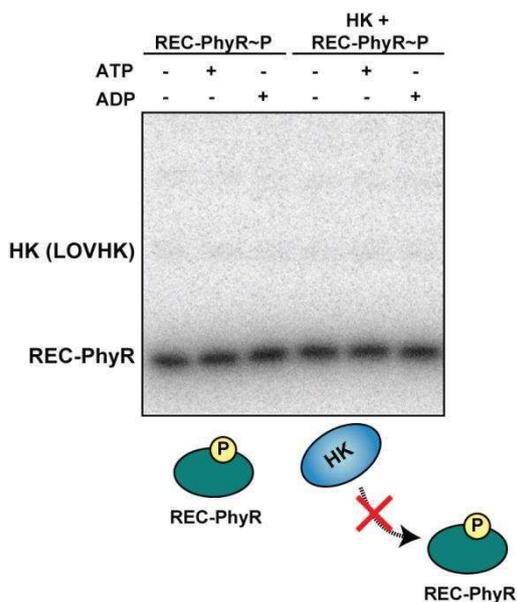
### Ensayo de actividad fosfatasa sobre PhyR

El ensayo consiste en determinar si el dominio HK de LOVHK posee actividad fosfatasa sobre PhyR, para lo cual es necesario obtener REC-PhyR~P como sustrato de la reacción. Para ello, inicialmente se autofosforiló el dominio HK libre de etiquetas por 60 min con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP y luego se agregó REC-PhyR dando lugar a la reacción de fosfotransferencia. Al cabo de 20 min se procedió a separar REC-PhyR~P respecto de HK utilizando la resina de Ni<sup>2+</sup>: REC-PhyR~P por medio del His<sub>6</sub>-tag queda retenida a la resina, mientras que HK libre de etiquetas se elimina con los lavados. Luego se eluyó REC-PhyR~P con imidazol. Esta última fracción fue utilizada como sustrato en el ensayo de actividad fosfatasa.

La actividad fosfatasa de un dominio HK *in vitro* requiere de Mg<sup>2+</sup>, y puede ser acelerada por la adición de ATP, ADP o un análogo no hidrolizable de ATP en el medio de reacción. La unión del complejo nucleótido-Mg al dominio catalítico de HK contribuye con los cambios estructurales necesarios para inducir el estado conformacional de fosfatasa que es diferente del estado con actividad quinasa [67]. En base a esto, para el ensayo de actividad fosfatasa, REC-PhyR~P fue incubada con y sin HK libre de etiquetas, en presencia de ATP no marcado. En presencia de HK la marca sobre REC-PhyR~P no se modificó de manera apreciable al cabo de 1 h de incubación y no difiere de la marca presente en REC-PhyR~P cuando es incubado solo (Figura 40). Posteriormente, se evaluó si el ADP o ATP influyen en esta reacción, sin embargo no se observó ninguna diferencia entre los distintos tratamientos, con o sin HK (Figura 41). Estos resultados sugieren que LOVHK no tiene actividad fosfatasa sobre PhyR.



**Figura 40. LOVHK no presenta actividad fosfatasa sobre PhyR.** REC-PhyR~P (15 kDa) fue incubada a 37°C en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 100 μM no marcado, en presencia y ausencia de HK libre de etiquetas (26 kDa), a una concentración final de 2,5 μM de cada proteína. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas, y fueron analizadas por SDS-PAGE 15%. Se muestra un autorradiograma representativo. Los números arriba del autorradiograma indican el tiempo en segundos (columnas 1 y 6) o en minutos (columnas 2-5 y 7-10) respectivamente. Debajo se muestra una representación esquemática de la interpretación del autorradiograma.



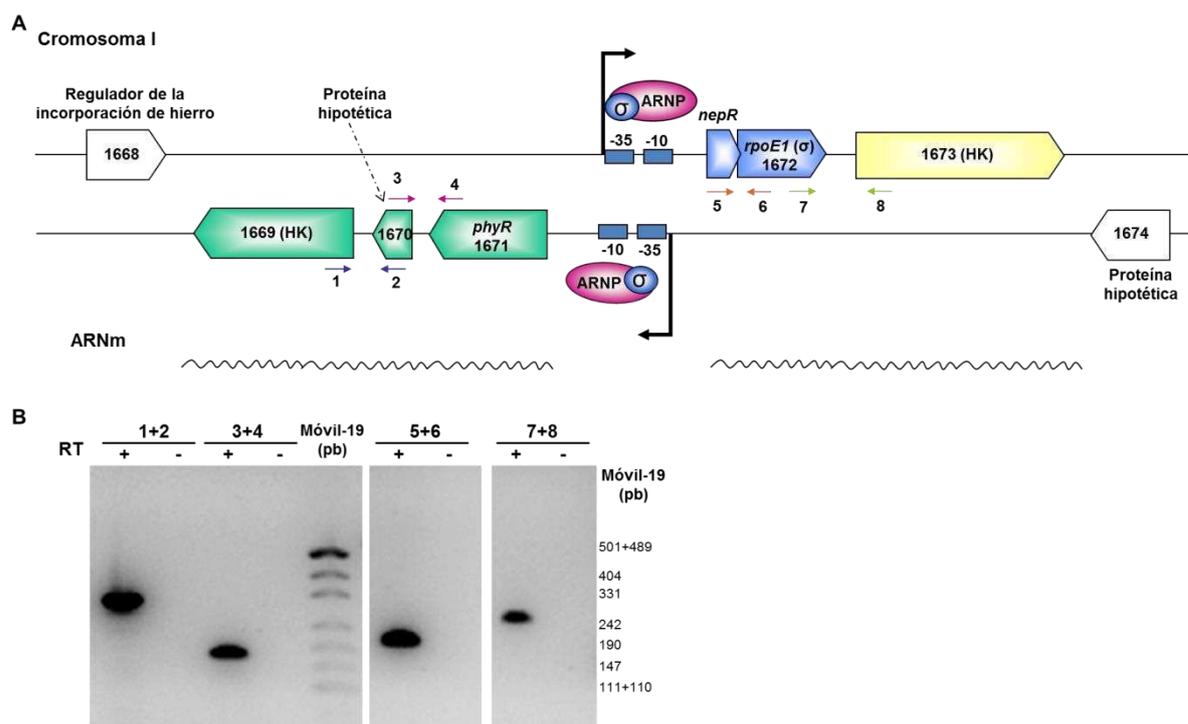
**Figura 41. LOVHK no presenta actividad fosfatasa sobre PhyR.** REC-PhyR~P (15 kDa) fue incubada a 37°C en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, en presencia y ausencia de HK libre de etiquetas (26 kDa), o agregando ADP 100 μM, o ATP 100 μM. La concentración final de cada proteína fue de 2,5 μM. A los 10 min se tomó una alícuota de cada reacción, y las mismas fueron analizadas por SDS-PAGE 15%. Se muestra un autorradiograma representativo. Debajo se muestra una representación esquemática de la interpretación del autorradiograma.

## Capítulo 2: LOVHK modula el sistema de Respuesta General a Estrés y altera la expresión del operón *virB*

### El sistema GSR es activo en *Brucella abortus* 2308

En el capítulo anterior, se demostró que LOVHK tiene la capacidad de interactuar de forma específica con el RR, PhyR. PhyR es el principal componente del sistema GSR en  $\alpha$ -proteobacterias, el cual durante los últimos 8 años ha sido descrito en varios microorganismos pertenecientes a este grupo [71-75,78,79,81-84]. Al momento de comenzar el presente trabajo de tesis, el sistema GSR aún no había sido estudiado en *Brucella*. Por ende, con el objetivo de corroborar si LOVHK podía activar al sistema GSR en *Brucella*, se decidió analizar si este sistema es activo en dicho microorganismo.

Los genes correspondientes a los componentes principales del sistema GSR presentan una organización genómica característica. En particular la organización y secuencia de los distintos genes está conservada en las diversas especies de *Brucella* (Figura 42A), los cuales se localizan en el cromosoma I. Los genes que codifican para *phyR* (BAB1\_1671) y *rpoE* (BAB1\_1672) se encuentran codificados en sentido divergente. El gen correspondiente a *nepR* no está anotado en los genomas de *Brucella*: se localiza río arriba de *rpoE1*, y la secuencia de ambos genes se superpone en 29 pb. Tanto río abajo de *phyR* como río abajo de *rpoE1* se encuentran codificados dos putativas HK pertenecientes a la familia HWE (BAB1\_1669 y BAB1\_1673 respectivamente). El gen BAB1\_1670 codifica para una proteína hipotética. Con el objetivo de verificar si dichos genes se expresan como un operón, se extrajo ARN total de un cultivo de *Brucella abortus* 2308 wt crecido en medio rico, y se preparó ADNc a partir del mismo con y sin enzima Retrotranscriptasa (RT), como se detalló en Materiales y Métodos. Utilizando este ADNc como molde se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos que hibridan en genes adyacentes y, como control negativo, se utilizó ADNc sin RT. La presencia de un producto de PCR correspondiente a una región intergénica sugiere que ambos genes se expresan juntos en un mismo ARNm. Las reacciones realizadas con ADNc sin RT se emplean como control negativo y permite corroborar si la muestra de ARN estaba contaminada con ADN genómico. En la Figura 42A se indica el sitio en el cual de hibridación de cada par de oligonucleótidos y en la Figura 42B se muestra el resultado de la RT-PCR. A partir de estos resultados se puede concluir que *phyR*, BAB1\_1670 y BAB1\_1669 se expresan como un operón, mientras que *nepR*, *rpoE1* y BAB1\_1673 se expresan como otro operón (Figura 42A).



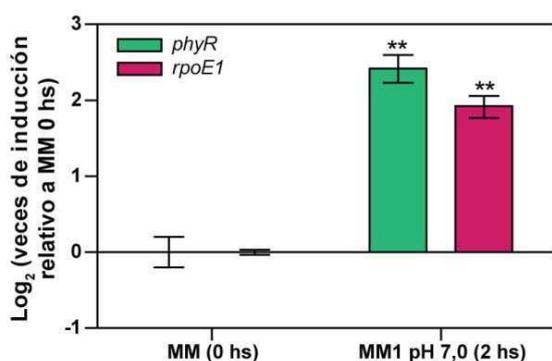
**Figura 42. Organización genómica y expresión de los genes involucrados en el sistema GSR en *Brucella* spp. A.** Esquema de la región genómica del sistema GSR en *Brucella*, ubicado en el cromosoma I. Los números corresponden a la anotación de los genes en el genoma de *B. abortus* 2308. Las flechas numeradas indican los oligonucleótidos empleados para amplificar las regiones intergénicas y debajo se indica los ARNm propuestos para la expresión de los operones. **B.** RT-PCR a partir de ADNc de *Brucella* wt preparado con RT y sin RT (control negativo). Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa 1,3%. Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones realizadas con tres muestras biológicas independientes. Los oligonucleótidos corresponden a 1) 1669\_1670\_FW; 2) 1669\_1670\_Rev; 3) 1670\_1671\_FW; 4) 1670\_1671\_Rev; 5) NepR/1672\_RT\_FW; 6) NepR/1672\_RT\_Rev; 7) 1672\_1673\_FW; 8) 1672\_1673\_Rev (Apéndice 2).

El sistema GSR posee una autorregulación positiva, es decir que cuando se enciende el sistema, además de aumentar la transcripción de genes en respuesta estrés, aumenta la transcripción de los mismos genes del sistema incluyendo *phyR*, *nepR* y *rpoE1* [74,75,80-85,94]. Esto se debe a que en la región promotora entre los genes *phyR* y *rpoE1* se encuentran dos sitios de unión para RpoE1, cada uno dirigiendo la expresión de cada operón. En *Brucella* estos dos sitios se encuentran superpuestos. En base a esto, monitoreamos la inducción o grado de activación del sistema por medio de la cuantificación de los niveles de ARN de *phyR* o *rpoE1* por qRT-PCR en tiempo real.

Como se mencionó previamente, al momento de comenzar la tesis este sistema no había sido aún descrito en *Brucella*, por lo que se decidió verificar si el sistema era activo en *Brucella* y a qué factores de estrés respondía. En varias  $\alpha$ -proteobacteria, el sistema GSR responde a diversos factores de estrés incluyendo la exposición a peróxido de hidrógeno, luz UV, alta osmolaridad, ausencia de una fuente de carbono o a la desecación [71,72,74,75,78,79,81]. En general la fase estacionaria de un cultivo bacteriano es considerada un factor de estrés debido a la falta de nutrientes, lo cual puede activar el sistema GSR en varias bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [74,79,80,132]. De este modo, las bacterias logran adaptarse más eficientemente a

otras condiciones ambientales cuando se encuentran en fase estacionaria en comparación a cuando se encuentran en fase exponencial. Como consecuencia, todos los experimentos que se describen a continuación fueron realizados con bacterias creciendo en fase exponencial para evitar una posible inducción del sistema de estrés en fase estacionaria. Por otro lado, debido a que en varios artículos se reportó que el sistema GSR respondía mejor a diversos factores de estrés cuando la bacterias eran crecidas en medio mínimo, los primeros ensayos de respuesta a estrés fueron realizados en este medio.

Durante el tráfico intracelular de *Brucella*, las bacterias están expuestas a la falta de nutrientes dentro de la BCV. La falta de una fuente de carbono ha sido documentado como un inductor del sistema GSR en diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [93,133] incluyendo a *B. japonicum* perteneciente al grupo  $\alpha$ -proteobacteria [74]. Por ende, se analizó si la falta de una fuente de carbono podría inducir el sistema GSR en *Brucella*. Para ello, se cultivaron células de *Brucella* wt en medio mínimo MM hasta fase exponencial (tiempo 0 hs) y luego se transfirieron an un medio carente de una fuente de carbono (medio mínimo MM1 pH 7,0 [109]). Al cabo de 2 hs se extrajo ARN total y se analizó la expresión de *phyR* y *rpoE1* por qRT-PCR. En la Figura 43 se puede observar que la expresión de ambos está incrementada al cabo del periodo de incubación en comparación con el tiempo 0 hs. Esto sugiere que la falta de una fuente de carbono activa al sistema GSR en *Brucella*.

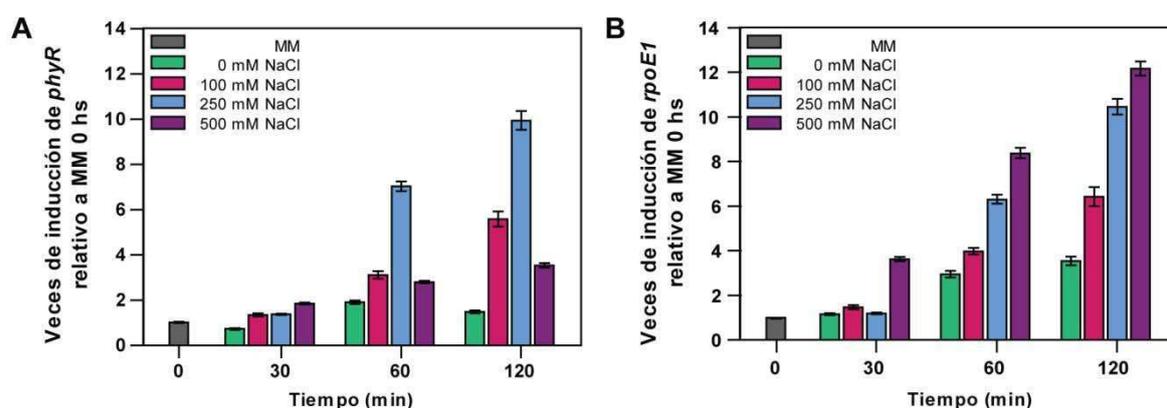


**Figura 43. El sistema GSR responde a estrés por falta de una fuente de carbono.** Se cultivó *B. abortus* 2308 wt en MM hasta fase exponencial. Se tomó una alícuota (0 hs), y se lavó y resuspendió el resto del cultivo en MM1 pH 7,0. Al cabo de 2 hs se tomó una alícuota. Se cuantificó la expresión de *phyR* (verde) y *rpoE1* (rosa) por qRT-PCR. Se empleó el gen *if-1* como referencia. Se presenta un experimento representativo de dos repeticiones. Los datos se presentan como el log<sub>2</sub> de las veces de inducción a las 2 hs respecto de las 0 hs  $\pm$  error estándar de duplicados de un mismo experimento. Para comparar el efecto del tratamiento con la condición inicial se realizó un T-test de Student a dos colas entre el tiempo 0 hs y 2 hs (\*\*= p < 0,01).

En trabajos previos se demostró que la exposición simultánea de bacterias a más de un factor de estrés potencia la inducción del sistema GSR [92]. Con el objetivo de analizar si el mismo efecto ocurre en *Brucella* se combinó la falta de una fuente de carbono con distintas concentraciones de NaCl en un experimento similar al anterior. Se cultivaron células de *Brucella abortus* wt en MM hasta fase exponencial (tiempo 0 hs) y luego se transfirieron al medio MM1 pH 7,0 adicionado con distintas concentraciones de NaCl por distintos periodos de tiempo. Se puede observar que tanto el nivel de transcripción de *phyR* como de *rpoE1* es mayor cuando *Brucella* es expuesta a dos factores de estrés de forma simultánea, respecto de uno solo. Además, los resultados obtenidos sugieren que la inducción del sistema GSR en *Brucella* es dependiente del tiempo y de la

concentración de NaCl (Figura 44). Sin embargo, al incubar con NaCl 500 mM hay una baja inducción de *phyR*, mientras que esto no ocurre con *rpoE1*.

En base a todos estos resultados se concluye que el sistema GSR es activo en *Brucella*. En los diversos ensayos de qRT-PCR realizados se observó que los niveles de *rpoE1* son mucho más bajos que los de *phyR* en comparación con el gen de referencia *if-1*: la expresión de *rpoE1* varía entre 100 y 200 veces menos que *if-1*, mientras que los niveles de expresión de *phyR* son comparables con los de *if-1*. Por ende, en los ensayos posteriores se monitoreó la inducción del sistema GSR por medio de los niveles de transcripción de *phyR*.



**Figura 44. La inducción del sistema GSR por falta de nutrientes y NaCl es dependiente del tiempo y de la concentración.** Se cultivó *B. abortus* 2308 wt en MM (gris) hasta fase exponencial. Se tomó una alícuota a tiempo 0 hs, y el resto del cultivo se lavó con MM1 pH 7,0, se dividió en 4, y luego se resuspendió en MM1 pH 7,0 con distintas concentraciones de NaCl: 0 mM (verde), 100 mM (rosa), 250 mM (celeste), 500 mM (violeta). Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, y se cuantificó por qRT-PCR la expresión de: **A.** *phyR* y **B.** *rpoE1*. El empleo el gen *if-1* como referencia. Los datos se presentan como las veces de inducción promedio de cada gen relativo a tiempo 0 hs en MM  $\pm$  error estándar de duplicados correspondientes al mismo experimento.

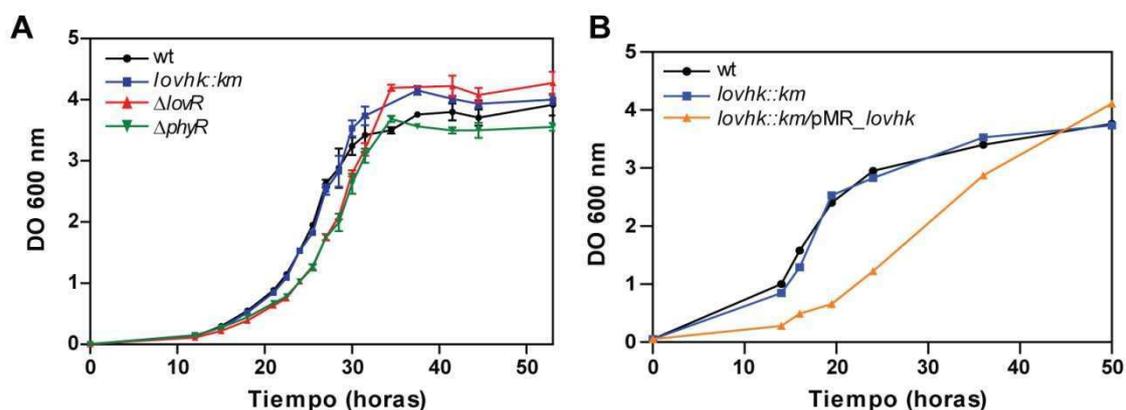
## Construcción de cepas mutantes y complementadas en *Brucella*

Con el objetivo de estudiar la conexión entre LOVHK y el sistema GSR se construyeron las cepas mutantes de  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  en *Brucella*. Para ello se delecionaron los genes BAB1\_0099 y BAB1\_1671 de *B. abortus* 2308, respectivamente. Los detalles se describen en la sección Materiales y Métodos. Posteriormente, con el objetivo de corroborar si los efectos observados se deben a la ausencia de LOVHK, se complementó la mutante *lovhk::km*. Para ello, se introdujo en esta cepa el plásmido pMR10cat\_lovhk, el cual expresa *lovhk* bajo el control de su propio promotor, generando de este modo la cepa *lovhk::km/pMR\_lovhk*. Este es un plásmido de bajo número de copias, replicativo en *Brucella*.

### Caracterización del crecimiento de las distintas cepas en medio líquido

Antes de realizar los siguientes ensayos, se decidió caracterizar el crecimiento de las cepas mutantes *lovhk::km*,  $\Delta lovR$ ,  $\Delta phyR$  y la complementada *lovhk::km/pMR\_lovhk* en comparación con la cepa wt. Para ello se realizaron curvas de crecimiento en TSB monitoreado por la DO<sub>600nm</sub>. En la Figura 45A se observa que las cepas wt, *lovhk::km*,  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  presentan una tasa de crecimiento similar. También se monitoreó el crecimiento de estas cepas en medio mínimo MM pero se observó que el crecimiento de las tres cepas mutantes es más lento que el de la cepa wt y es más variable que las curvas en TSB (datos no mostrados). Por ende, de aquí en adelante los ensayos fueron realizados con bacterias cultivadas en medio rico.

Por otro lado, la cepa complementada de LOVHK muestra un crecimiento más lento en comparación con las cepas wt y la mutante *lovhk::km* en medio líquido TSB (Figura 45B). Es probable que este efecto se deba a la expresión de *lovhk* a partir de un plásmido multicopia, lo cual puede retrasar el crecimiento bacteriano o ser tóxico, como ha sido previamente reportado para otras HKs [134].



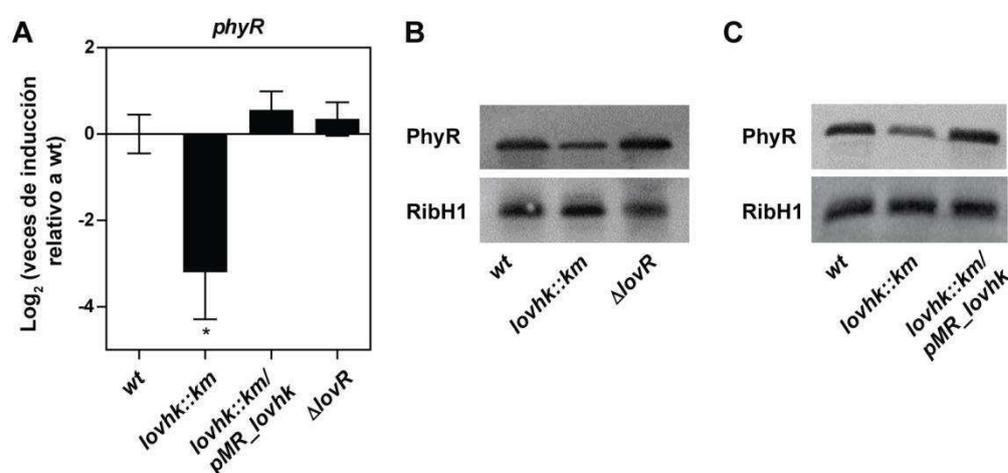
**Figura 45. Curvas de crecimiento en TSB de las distintas cepas de *Brucella*.** **A.** Se cultivó *B. abortus* wt (negro), y las mutantes *lovhk::km* (azul),  $\Delta lovR$  (rojo) y  $\Delta phyR$  (verde) en medio rico TSB con agitación a 37°C, desde una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0,005. Se determinó la DO<sub>600nm</sub> a distintos tiempos, y se graficó la DO<sub>600nm</sub> promedio  $\pm$  desvío estándar de triplicados de un mismo experimento en función del tiempo. **B.** Se cultivó *B. abortus* wt (negro), *lovhk::km* (azul) y *lovhk::km/pMR\_lovhk* (naranja) en TSB desde una DO<sub>600nm</sub> inicial de 0,05 y se determinó la DO<sub>600nm</sub> a distintos tiempos.

### LOVHK modula el sistema GSR

Con el objetivo de analizar si LOVHK puede modular al sistema GSR en ausencia de estrés se estimó el grado de activación basal de dicho sistema en las distintas cepas de *B. abortus* por medio de la determinación de los niveles de transcripción basal de *phyR*. Las cepas wt, *lovhk::km* y  $\Delta lovR$  fueron cultivadas hasta fase exponencial y se cuantificó *phyR* por qRT-PCR. Se observó que la expresión de *phyR* se encuentra significativamente disminuida en la mutante *lovhk::km* en comparación con la cepa wt, mientras que la mutante  $\Delta lovR$  no presentó diferencias (Figura 46A). Para corroborar si este efecto se debía a la ausencia de *lovhk* se cuantificó *phyR* en la cepa complementada *lovhk::km/pMR\_lovhk*. En la Figura 46A se puede observar que los niveles de *phyR*

en la cepa complementada son similares a la cepa wt y significativamente diferentes de la mutante *lovhk::km*.

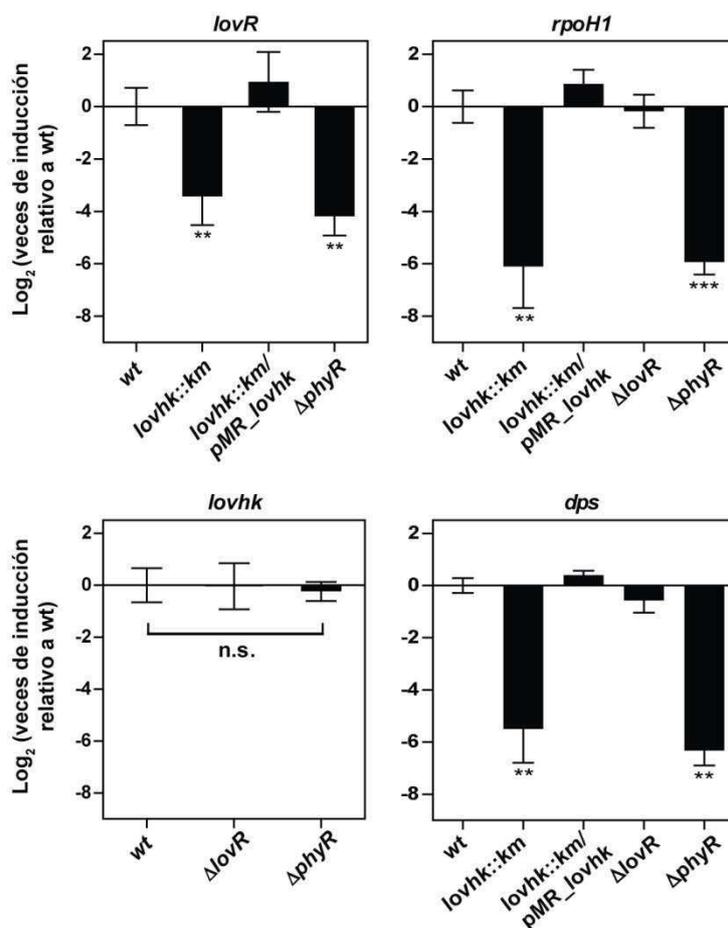
A su vez, se analizó por western blot el nivel de expresión de la proteína PhyR en las distintas cepas en las mismas condiciones que en el ensayo anterior. Como control de carga se empleó un anticuerpo policlonal contra RibH1. Se observó que el nivel PhyR se encuentra disminuido en la mutante de *lovhk::km* en comparación con la cepa wt y presenta una disminución del 40 al 60%. Por otro lado, no se observaron diferencias en la mutante  $\Delta lovR$  (Figura 46B). Al complementar la mutante de *lovhk::km* los niveles de PhyR se restauraron a los de la cepa wt (Figura 46C). En resumen, estos resultados sugieren que LOVHK es requerida para mantener los niveles de expresión basal de PhyR en medio rico.



**Figura 46. La expresión de PhyR se encuentra disminuida en la mutante de *lovhk::km*.** **A.** Se cultivó *B. abortus* 2308 wt y las mutantes isogénicas *lovhk::km*,  $\Delta lovR$  y *lovhk::km/pMR\_lovhk* en TSB hasta fase exponencial, y se cuantificó la expresión de *phyR* por qRT-PCR. Se empleó gen *if-1* referencia. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes, y son reportados como el log<sub>2</sub> de las veces de inducción promedio de *phyR* en cada cepa relativo a la cepa wt  $\pm$  error estándar. Los valores *p* entre cada cepa y la wt fueron determinados por medio de un ANOVA de un factor, seguido de un test de Tukey de comparaciones múltiples (\*= *p*<0,05). **B.** Se analizó la expresión de PhyR a nivel de proteína por western blot, en cultivos crecidos en TSB hasta fase exponencial correspondientes a *B. abortus* 2308 wt, y las mutantes *lovhk::km* y  $\Delta lovR$  empleando un anticuerpo policlonal anti-PhyR hecho en ratón. Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones. **C.** Se analizó la expresión de PhyR por western blot, en cultivos crecidos en TSB hasta fase exponencial correspondientes a *B. abortus* 2308 wt, *lovhk::km* y *lovhk::km/pMR\_lovhk*. Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones. RibH1 fue empleado como control de carga. PhyR: 30 kDa; RibH1: 16,8 kDa.

En el cuarto año del desarrollo del presente trabajo de tesis, Kim *et al.*, 2013 caracterizaron el sistema GSR en *Brucella abortus*, como ya se ha detallado en la introducción. En dicho trabajo identificaron una serie de genes que son regulados por el sistema GSR en *B. abortus* incluyendo *rpoH1* (factor sigma-32 RpoH1 de la ARN polimerasa), *dps* (DNA starvation/stationary phase protection protein Dps) y *lovR*. Por ende, se decidió investigar si la expresión de estos genes está modificada en las distintas mutantes. Para ello, se cultivaron *B. abortus* 2308 wt, *lovhk::km*,  $\Delta lovR$ ,  $\Delta phyR$  y *lovhk::km/pMR\_lovhk* en medio rico hasta fase exponencial. Se extrajo el ARN total de

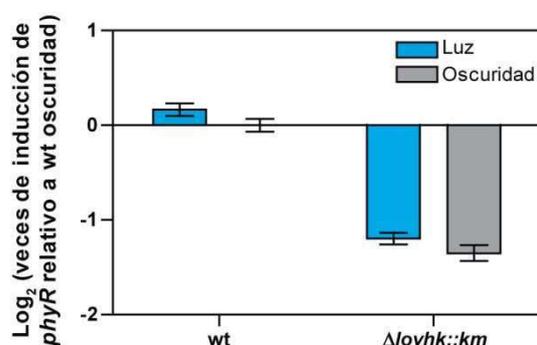
todas ellas y se analizó la expresión de *rpoH1*, *dps* y *lovR* por qRT-PCR. La expresión de los tres genes se encuentra significativamente disminuida tanto en la mutante *lovhk::km* como en la mutante  $\Delta phyR$  en comparación con la cepa wt, mientras que se dicha disminución se restaura en la cepa complementada *lovhk::km/pMR\_lovhk* (Figura 47). Por el contrario, la expresión de *lovhk*, *rpoH1* y *dps* no está modificada en la mutante  $\Delta lovR$ . De igual manera, la delección de *phyR* no altera la expresión basal de *lovhk* en comparación con la cepa wt (Figura 47). Estos resultados sugieren que LOVHK contribuye a regular la transcripción basal de genes regulados por el sistema GSR en *B. abortus in vivo*.



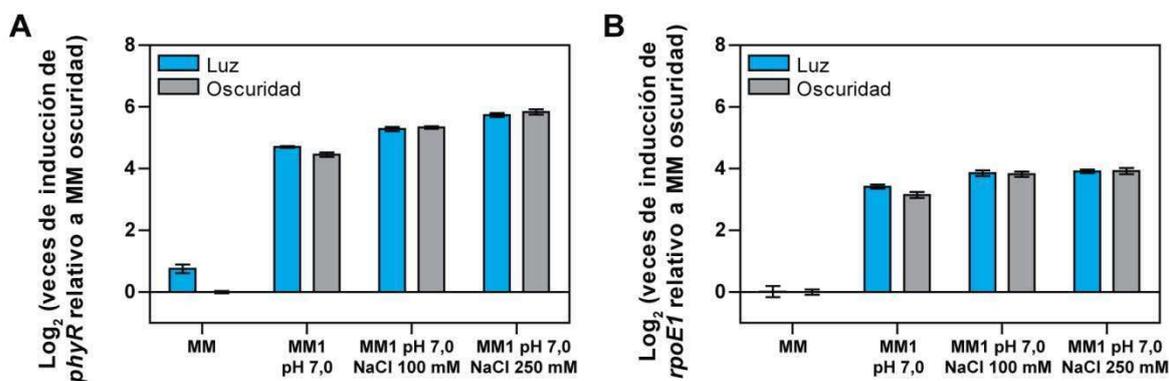
**Figura 47. LOVHK contribuye al grado de activación basal del sistema GSR.** *B. abortus* 2308 wt y las cepas isogénicas *lovhk::km*,  $\Delta lovR$ ,  $\Delta phyR$  y *lovhk::km/pMR\_lovhk* fueron cultivados en TSB hasta fase exponencial, y la expresión de los genes *lovhk*, *lovR*, *dps* y *rpoH1* fue cuantificada por qRT-PCR. El gen *if-1* fue usado como referencia. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes, y son reportados como el log<sub>2</sub> de las veces de inducción promedio de cada gen en cada cepa relativos a la cepa wt  $\pm$  error estándar. Los valores *p* entre cada cepa y la wt fueron determinados por medio de un ANOVA de un factor, seguido de un test de Tukey de comparaciones múltiples de (\*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*\*=  $p < 0,001$ ).

## El sistema GSR no se induce por luz

Debido a que LOVHK es un sensor de luz azul y a que puede fosforilar a PhyR de forma específica, se decidió analizar si la luz como factor de estrés puede inducir el sistema GSR a través de LOVHK. Para ello, se realizaron varios ensayos utilizando *Brucella* wt y/o *lovhk::km* cultivadas en medio rico TSB o medio mínimo MM, con distintos tiempos de exposición a luz blanca y/o azul y en presencia de factores de estrés como la ausencia de una fuente de carbono o la presencia de alta concentración de NaCl. En varios de estos experimentos se midió por qRT-PCR la expresión de *phyR*, *rpoE1*, *lovR*, *rpoH1* y *dps*. Sin embargo, luego de varios intentos no se observaron diferencias en los niveles de activación del sistema GSR por luz. En las Figuras 48 y 49 se muestran dos experimentos representativos.

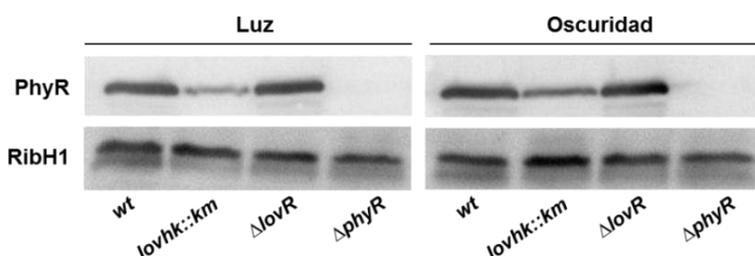


**Figura 48. El sistema GSR no se induce por luz.** Se cultivó *B. abortus* wt y *lovhk::km* en MM, en oscuridad. Cuando los cultivos alcanzaron una  $DO_{600nm} \approx 0,5-0,6$ , se dividió cada cultivo en dos muestras que fueron mantenidas en oscuridad o expuestas a la luz por 2,5 hs con agitación a 37°C. Se cuantificó la expresión de *phyR* por qRT-PCR, utilizando el gen *if-1* como referencia. Se reporta el log<sub>2</sub> de las veces de inducción promedio de *phyR* relativo a la cepa wt en oscuridad. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  error estándar de duplicados de un mismo experimento. Luz (celeste), oscuridad (gris).



**Figura 49. El sistema GSR no se induce por luz, incluso en combinación con otros factores de estrés.** Se cultivó *B. abortus* wt en MM en oscuridad. Cuando el cultivo alcanzó una  $DO_{600nm} \approx 0,6$ , se lo dividió en 4 partes y se lavó y resuspendió cada uno en: MM, MM1 pH 7,0, MM1 pH 7,0 + NaCl 100 mM, o MM1 pH 7,0 + NaCl 250 mM, manteniendo la condición de oscuridad. Luego se dividió cada cultivo en dos: uno fue mantenido en oscuridad y el otro fue expuesto a la luz, con agitación a 37°C por 1,5 hs. Se cuantificó la expresión de **A.** *phyR* y **B.** *rpoE1* por qRT-PCR, utilizando el gen *if-1* como referencia. Se reporta el log<sub>2</sub> de las veces de inducción promedio de *phyR* o *rpoE1* relativo a la cepa wt en oscuridad. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  error estándar de duplicados de un mismo experimento. Luz (celeste), oscuridad (gris).

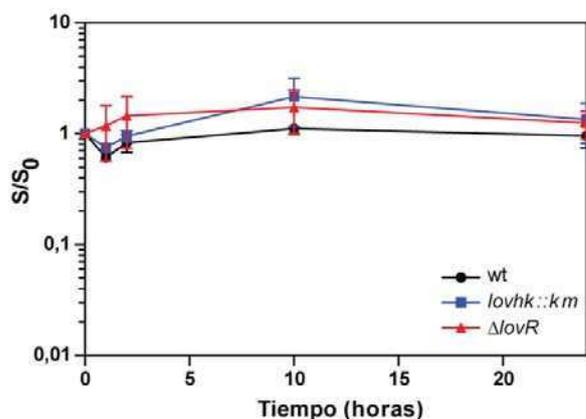
Por otro lado, se evaluó la expresión de PhyR a nivel de proteína en la cepa wt y en las mutantes de *lovhk::km* y  $\Delta lovR$ , en cultivos en medio rico incubados en condiciones de luz y oscuridad en hasta fase exponencial. En la Figura 50 se puede observar que para una misma cepa los niveles de PhyR no varían entre condiciones de luz y oscuridad. Como control, se muestra la mutante  $\Delta phyR$  que no expresa PhyR.



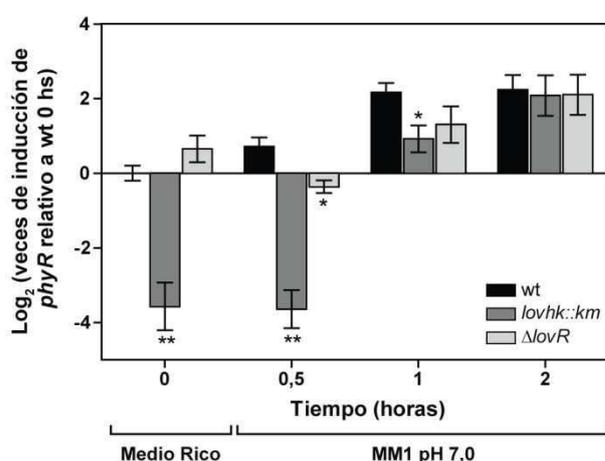
**Figura 50. La expresión de PhyR no varía entre condiciones de luz y oscuridad.** Se analizó por western blot la expresión de PhyR (30 kDa) a nivel de proteína en cultivos de *B. abortus* wt y las mutantes *lovhk::km* y  $\Delta lovR$  cultivadas en TSB, en condiciones de luz y oscuridad hasta fase exponencial. Se empleó la proteína RibH1 (16,8 kDa) como control de carga.

## LOVHK contribuye a la activación del sistema GSR

En *B. abortus* wt sistema GSR se induce cuando las bacterias son incubadas en ausencia de una fuente de carbono por 2 hs (Figura 43). A continuación, se propuso analizar si el sistema GSR también se activa en las mutantes ante el estrés de falta de una fuente de carbono. Para ello, *Brucella* wt y las mutantes *lovhk::km* y  $\Delta lovR$  fueron cultivadas en TSB hasta fase exponencial. Se tomó una alícuota (tiempo 0 h) y se transfirió los cultivos al medio MM1 pH 7,0. Se tomaron alícuotas a las 0,5 hs, 1 h y 2 hs y se determinó el nivel de expresión de *phyR*. Cada valor fue relativizado a los niveles correspondientes a la cepa wt a tiempo 0 h. La incubación en MM1 pH 7,0 no afecta la viabilidad bacteriana durante las 2 hs de duración del experimento e inclusive luego de 24 hs de incubación en dicho medio no se observaron cambios en la supervivencia de *Brucella* (Figura 51). La condición de falta de una fuente de carbono fue capaz de estimular la expresión de *phyR* en las tres cepas evaluadas y, a las 2 hs, el nivel de expresión de *phyR* fue similar en las tres cepas. En el caso de la mutante  $\Delta lovR$ , el perfil de inducción no difiere significativamente de la cepa wt excepto a las 0,5 hs en el cual se observa una leve disminución de la expresión de *phyR*. Por el contrario, el perfil de inducción en la mutante *lovhk::km* es diferente que el de la cepa wt. A tiempo 0 hs, la expresión de *phyR* es significativamente menor en la mutante *lovhk::km* respecto de la cepa wt. Al cabo de 1 h de incubación, la cepa wt alcanza un máximo de inducción, mientras que la inducción en la mutante *lovhk::km* permanece por debajo de la wt pero a las 2 hs los niveles de inducción se equiparan. (Figura 52). En conclusión, la ausencia de LOVHK no impide que el sistema GSR responda ante la falta de una fuente de carbono pero LOVHK es necesaria para llegar al máximo grado de activación en un período más corto de tiempo bajo estas condiciones de estrés.



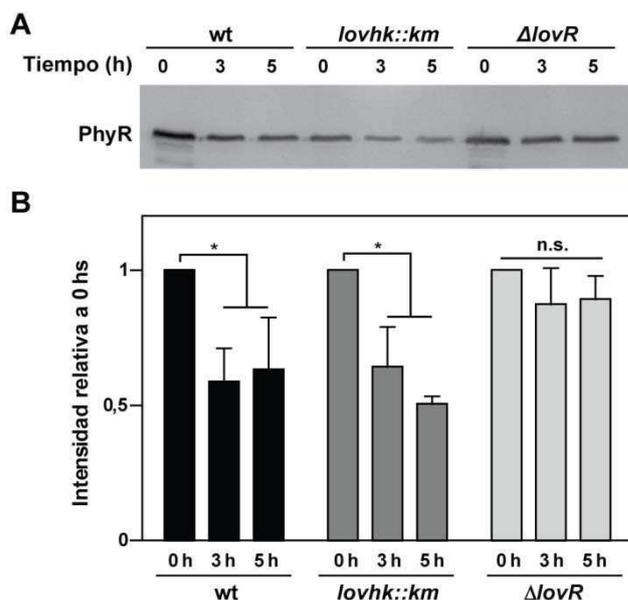
**Figura 51. Supervivencia de *Brucella* en medio mínimo MM1 pH 7,0.** Se cultivó *B. abortus* 2308 wt (negro) y las mutantes *lovhk::km* (azul) y  $\Delta lovR$  (rojo) en TSB hasta fase exponencial. Se tomó una alícuota (0 hs), y luego el resto del cultivo se lavó y resuspendió en MM1 pH 7,0, e incubó con agitación a 37°C. Se tomaron alícuotas a 1 h, 2 hs, 10 hs y 24 hs. Para determinar la viabilidad celular, se plaquearon diluciones seriadas en placas TSA agar, y luego se determinó las u.f.c. Se calculó la fracción de supervivencia ( $S/S_0$ ) para cada cepa como las u.f.c a un determinado tiempo en medio mínimo MM1 pH 7,0 respecto de las u.f.c. a las 0 hs. Los datos son presentados en escala semi-logarítmica, como la supervivencia promedio ( $S/S_0$ )  $\pm$  desviación estándar de dos muestras biológicas correspondientes a un experimento.



**Figura 52. Inducción del sistema GSR por estrés por ausencia de una fuente de carbono.** Se cultivó *B. abortus* 2308 wt (negro) y las mutantes *lovhk::km* (gris oscuro) y  $\Delta lovR$  (gris claro) en TSB hasta fase exponencial. Se tomó una alícuota (0hs), y luego el resto del cultivo se lavó y resuspendió en medio mínimo MM1 pH 7,0, y se incubó con agitación a 37°C. Se tomaron alícuotas a las 0,5 hs, 1 h y 2 hs. Se cuantificó la expresión de *phyR* por qRT-PCR, utilizando el gen *if-1* como referencia. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes, y son reportados como el log<sub>2</sub> de las veces de inducción promedio de *phyR* relativo a la cepa wt 0 hs en medio rico  $\pm$  error estándar. Los valores *p* entre cada cepa y la wt (a cada tiempo) fueron determinados por medio de un ANOVA de un factor, seguido de un test de Tukey de comparaciones múltiples (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

## Estabilidad de PhyR

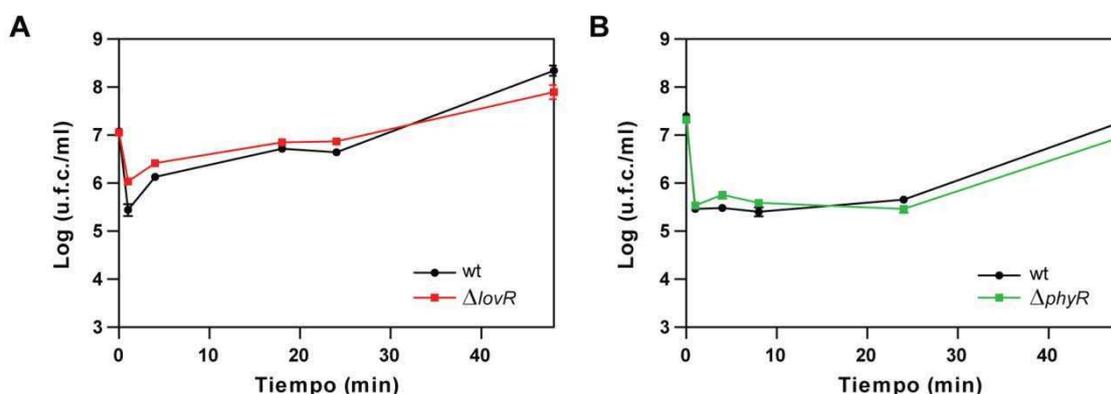
Kim *et al.*, 2013 reportaron que los niveles de la proteína PhyR *in vivo* se encuentran disminuidos en fase exponencial y ausencia de estrés, por la acción de la proteasa ClpXP. Sin embargo, en presencia de estrés por peróxido de hidrógeno los niveles de PhyR se estabilizan, posiblemente por fosforilación de PhyR y/o inactivación de ClpXP. Como consecuencia, se decidió analizar si la ausencia de LOVHK y LovR pueden alterar la estabilidad de PhyR *in vivo*. Para ello, se cultivó *B. abortus* wt y las mutantes *lovhk::km* y  $\Delta lovR$  en medio rico TSB hasta fase exponencial y se tomó una alícuota (tiempo 0 h). Luego, se agregó cloranfenicol para inhibir la síntesis proteica y se tomaron alícuotas a las 3 hs y 5 hs. Tanto en el caso de la cepa wt como la mutante *lovhk::km*, los niveles de PhyR disminuyen a lo largo del tiempo con un perfil similar. Por el contrario, en la mutante  $\Delta lovR$  los niveles de PhyR no varían significativamente a lo largo de las 5 hs de incubación con cloranfenicol (Figura 53). Si bien el efecto es modesto, este resultado sugiere que en ausencia de LovR, PhyR se encuentra más estabilizada aunque son necesarios más experimentos para confirmar la tendencia observada.



**Figura 53. Ensayo de estabilidad de PhyR.** Se cultivó *B. abortus* 2308 wt (negro) y las mutantes *lovhk::km* (gris oscuro) and  $\Delta lovR$  (gris claro) en TSB hasta fase exponencial. Se tomó una alícuota (0hs), luego se agregó cloranfenicol al resto del cultivo para inhibir la síntesis proteica, y se incubó con agitación a 37°C. Se tomaron alícuotas a las 3 hs y 5 hs. El experimento se repitió tres veces, y se determinó la cantidad PhyR por western blot. **A.** Se muestra un experimento representativo. **B.** Se cuantificó el nivel de PhyR de tres experimentos independientes. Las barras indican el promedio de la intensidad relativa a tiempo 0 hs  $\pm$  desvío estándar para cada cepa. Se realizó un análisis estadístico comparando la intensidad a un tiempo determinado con respecto al tiempo 0 hs dentro de cada cepa, por medio de un ANOVA de un factor, seguido de un T-test para muestras pareadas (\*=  $p < 0,05$ ). PhyR: 30 kDa.

### PhyR y LovR no afectan la capacidad de infección en macrófagos murinos

Con el objetivo de evaluar la capacidad de infección de las mutantes  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  se realizaron ensayos de infección en macrófagos empleando la línea celular murina J774A.1. Para ello, se infectaron monocapas de macrófagos con bacterias crecidas en medio TSB hasta fase exponencial con una multiplicidad de infección de 100:1 (bacterias:macrófagos), y se determinó la cantidad de u.f.c. a distintos tiempos post infección (p.i.). En ambos casos se observa que que la cantidad de u.f.c. intracelulares no difiere entre las cepas mutantes y la wt, disminuyendo bruscamente durante las primeras horas de la infección y luego se recuperan cuando comienza la replicación intracelular. La infectividad de las cepas  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  no difiere de la cepa wt (Figura 54).



**Figura 54. La capacidad de infección de macrófagos murinos no se ve afectada en las cepas  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  respecto de la cepa wt.** Se infectó una monocapa de  $10^5$  células de macrófagos murinos J774A.1 con  $10^7$  bacterias de las cepas wt,  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$ . Se determinó la cantidad de u.f.c./ml a distintos tiempos p.i. mediante diluciones seriadas en placas TSA agar. Los datos son reportados como el promedio del Log (u.f.c./ml)  $\pm$  desviación estándar de duplicados en función del tiempo p.i. Se muestra un experimento representativo para cada caso. **A.** Infección de las cepas  $\Delta lovR$  y wt. **B.** Infección de las cepas  $\Delta phyR$  y wt.

## La delección de *lovhk* afecta la expresión de operón *virB*

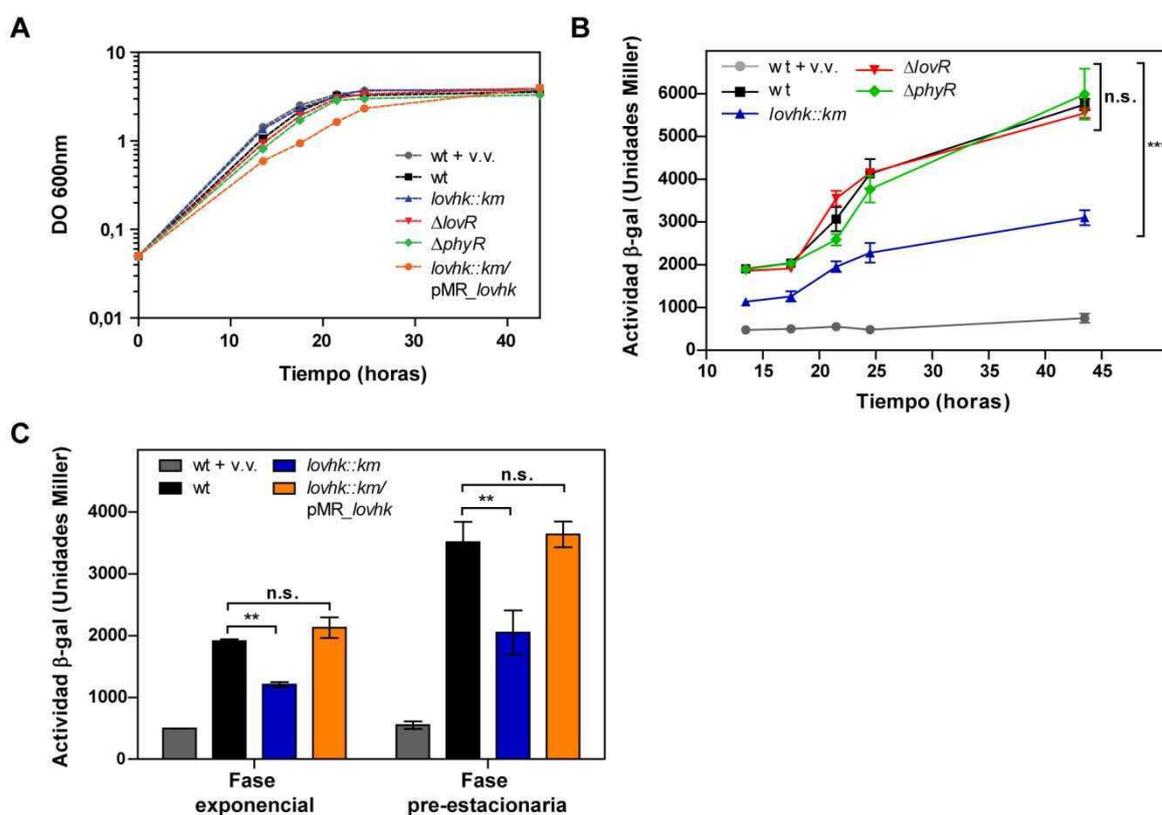
Swartz *et al.*, 2007, demostraron que la mutante *lovhk::km* es menos infectiva que la cepa wt en infecciones realizadas en la línea celular de macrófagos murinos J774A.1. Sin embargo, en *B. abortus* ninguna de las dos mutantes  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  posee diferencias de infección en comparación con la cepa wt en infecciones en macrófagos. Kim *et al.*, 2013, reportaron un resultado similar para las mutantes  $\Delta phyR$  y  $\Delta rpoE1$  en *B. abortus*, en las cuales no observaron diferencias respecto de la cepa wt en infecciones realizadas en cultivos primarios de macrófagos murinos y en la colonización inicial de bazo de ratones BALB/c. Sin embargo, demostraron que el sistema GSR es importante para el mantenimiento de una infección crónica en ratones (más de un mes p.i.). A su vez, se ha observado que la mutante  $\Delta rpoE1$  en *B. melitensis* 16M tiene un fenotipo atenuado en infecciones realizadas en ratones BALB/c a 4 semanas p.i. [135]. De este modo, el sistema GSR en *Brucella* es importante para la persistencia de la infección en ratones a tiempos largos y no a tiempos cortos p.i., mientras que LOVHK juega un rol importante en los primeros estadios de la infección. Esto sugiere que, además del sistema GSR, LOVHK podría estar señalizando hacia otros componentes celulares que justifiquen las diferencias de infección a tiempos cortos de la mutante *lovhk::km*.

El factor de virulencia más caracterizado de *Brucella* es el operón *virB* que codifica para un Sistema de Secreción de Tipo IV (SST4) [28-31]. La interrupción del operón *virB* da lugar a una completa pérdida de la capacidad de infección tanto en líneas celulares como en ratones [37]. Por tanto, la expresión del operón *virB* es crucial para la infección, la supervivencia y el establecimiento del nicho replicativo en las células que *Brucella* infecta.

El Dr. Gary A. Splitter de la Universidad de Wisconsin-Estados Unidos encontró en ensayos de microarreglos que la expresión del operón *virB* se encontraba alterada en una cepa mutante de *lovhk* en *B. melitensis* 16M (comunicación personal). Con el propósito de analizar el efecto de LOVHK en la expresión del operón *virB* en *B. abortus* se realizó una fusión transcripcional del promotor del operón *virB* al gen reportero *lacZ* en un plásmido replicativo en *Brucella*. Esta construcción fue incorporada en las cepas *B. abortus* 2308 wt y en las mutantes *lovhk::km*,  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$ . Como control, se transformó a la cepa wt con el mismo plásmido vacío, es decir, sin el promotor del operón *virB*. Debido a que en condiciones normales de crecimiento en medio rico la transcripción del operón *virB* se activa o incrementa al comienzo de la fase estacionaria [37], se cultivaron las cepas mencionadas en TSB y se tomaron muestras a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 55A) para determinar el crecimiento bacteriano y la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Con el fin de corroborar si la inducción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa es específica del promotor *virB* se utilizó la cepa wt transformada con el vector pBBR-*lacZ* vacío (wt + v.v.) como control negativo.

En la Figura 55B se puede ver que el promotor *virB* se induce en todas las cepas al entrar en fase estacionaria. Sin embargo, en la mutante *lovhk::km* se observó una disminución significativa a lo largo de toda la curva de crecimiento respecto de la cepa wt alcanzando, aproximadamente, un 50% respecto de la wt en la fase pre-estacionaria y estacionaria. Por el contrario, en las mutantes

$\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  la actividad del promotor *virB* es similar a la wt. Para comprobar si el efecto observado en la mutante *lovhk::km* es debido a la ausencia de *lovhk* se evaluó la actividad del operón *virB* en la cepa complementada *lovhk::km/pMR\_lovhk* bajo las mismas condiciones. Debido a que la cepa complementada crece más lento (Figura 55A) se evaluó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en fase exponencial ( $DO_{600nm} \approx 1,2-1,5$ ) y pre-estacionaria ( $DO_{600nm} \approx 2,8-3$ ) para cada cepa. En la Figura 55C se observa que en la cepa complementada la inducción de *virB* se restaura a los niveles de la wt. Estos resultados indican que la delección de *lovhk* disminuye la inducción del promotor del operón *virB*. De esta manera, LOVHK afecta la expresión del operón *virB* mediante un mecanismo desconocido que aparenta ser independiente del sistema GSR.



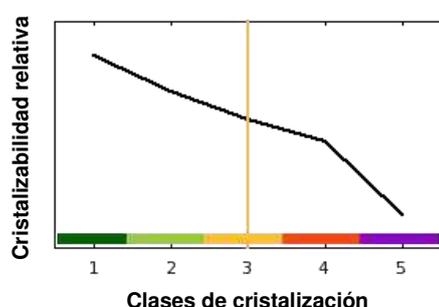
**Figura 55. La inducción del operón *virB* se encuentra disminuida en la mutante *lovhk::km*.** Se transformaron las cepas *B. abortus* 2308 wt (negro), *lovhk::km* (azul),  $\Delta lovR$  (rojo),  $\Delta phyR$  (verde) y *lovhk::km/pMR\_lovhk* (naranja) con el plásmido replicativo pBBR-prom-*virB-lacZ*. Se empleó la cepa wt transformada con el vector pBBR-*lacZ* vacío (wt + v.v.) (gris) como control negativo de inducción. Cada cepa fue cultivada en TSB desde una  $DO_{600nm}$  de 0,05 hasta fase estacionaria. **A.** Curva de crecimiento en TSB de cada una de las cepas. Se indica la  $DO_{600nm}$  en escala logarítmica en función del tiempo. **B.** Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas wt, *lovhk::km*,  $\Delta lovR$  y  $\Delta phyR$  a distintos tiempos a lo largo de la curva de crecimiento. **C.** Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas wt, *lovhk::km* y *lovhk::km/pMR\_lovhk* en fase exponencial ( $DO_{600nm} \approx 1,2-1,5$ ) y pre-estacionaria ( $DO_{600nm} \approx 2,8-3$ ). En **B** y **C** se reporta la actividad  $\beta$ -galactosidasa del promotor *virB* en Unidades Miller, como el promedio  $\pm$  desvío estándar de dos muestras biológicas correspondientes a un experimento representativo. Ambos ensayos fueron repetidos tres veces con resultados similares. Los valores *p* entre cada cepa y la wt fueron determinados por un ANOVA de un factor para cada tiempo, seguido de un test de Tukey de comparaciones múltiples (\*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*\*=  $p < 0,001$ ).

### Capítulo 3: Resolución de la estructura tridimensional de PhyR

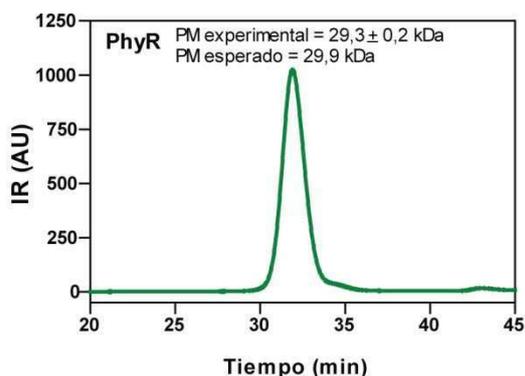
En base a los resultados obtenidos hasta el momento, continuamos con la caracterización estructural de los componentes de esta vía de señalización. La Dra. Jimena Rinaldi y el Dr. Sebastián Klinke trabajan en la caracterización estructural de los distintos dominios de LOVHK habiendo resuelto hasta el momento los dominios LOV y HK. Por otro lado, se decidió caracterizar la estructura de PhyR y LovR, tanto en estado inactivo (no fosforilado), como activo (fosforilado). En el caso de LovR, luego de varios intentos, no se logró obtener cristales. Por el contrario, sí se logró obtener cristales de PhyR en estado inactivo, por lo que se prosiguió a resolver la estructura tridimensional de la misma por cristalografía de rayos X. El siguiente análisis fue realizado con la colaboración del Dr. Sebastián Klinke y la Dra. Jimena Rinaldi.

#### Predicción bioinformática de la cristalizabilidad de PhyR

Con el objetivo de determinar la estructura tridimensional de PhyR en su estado inactivo (no fosforilado), se analizó inicialmente *in silico* la posibilidad de que esta proteína cristalice. Para ello, se empleó el servidor on-line de predicción de cristalizabilidad “XtalPred” (<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>) [136], utilizando la secuencia aminoacídica de la proteína. El estudio en cuestión arrojó como resultado una chance intermedia de cristalización “promedio” (Figura 56). Debido a este resultado promisorio se decidió seguir adelante con los intentos de cristalización de PhyR. Para ello, se purificó PhyR de *Brucella abortus* recombinante por medio de dos pasos de purificación: primero se purificó en columna de Ni<sup>2+</sup> His-Trap para separarla del lisado celular y luego en un tamiz molecular en Sephadex S-75 para separar posibles impurezas (Figuras 15 y 16). Esta construcción posee la secuencia completa de PhyR de *Brucella* (264 aa) y un His<sub>6</sub>-tag en el extremo C-terminal. Por otro lado, se determinó el tamaño y estado de oligomerización de PhyR en estado inactivo por medio de un SLS (Static Light Scattering – Dispersión Estática de Luz), observándose que se encuentra como monómero en solución, con un PM experimental promedio de 29,3 ± 0,2 kDa, el cual es similar al PM esperado de 29,9 kDa determinado por el programa ExPASy-ProtParam [105] (Figura 57).



**Figura 56. Resultado de la predicción de cristalizabilidad de PhyR por XtalPred.** De las cinco categorías posibles (1 = óptima, 2= subóptima, 3= promedio, 4= difícil, 5= muy difícil), PhyR correspondió a la categoría 3.

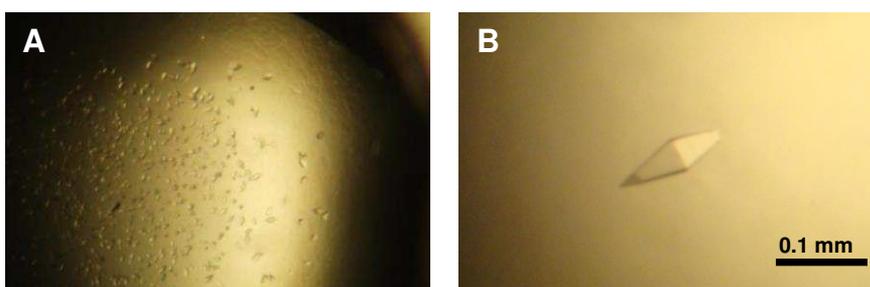


**Figura 57. Análisis por SLS de PhyR en estado inactivo.** Se analizó el tamaño y estado de oligomerización de PhyR por medio de Dispersión Estática de Luz. Para ello se realizó una cromatografía en una columna Sephadex S-75 (GE) en buffer de corrida (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 250 mM, DTT 0,5 mM). Se muestra el índice de refracción (IR) en función del tiempo, el PM esperado determinado por ExPASy-ProtParam [105], y el PM experimental calculado en función del índice de refracción.

### Obtención de cristales iniciales y optimización

En primer lugar se realizó un cribado de 240 condiciones de cristalización comerciales empleando un robot Honeybee 963 disponible en la Fundación Instituto Leloir. Este robot permite dispensar bajos volúmenes de líquido en placas de cristalización de 96 pocillos por el método de difusión de vapor en gota sentada. Aplicando este procedimiento, se obtuvo una gran cantidad de cristales pequeños con una solución compuesta por PEG 4000 25%, isopropanol 8% y acetato de sodio 0,1 M. Estos cristales tenían un tamaño menor a 10  $\mu\text{m}$ , con forma de bipirámide tetragonal, los cuales aparecieron luego de 3 días de incubación a 19°C, empleando una concentración de proteína de 28 mg/ml (Figura 58A).

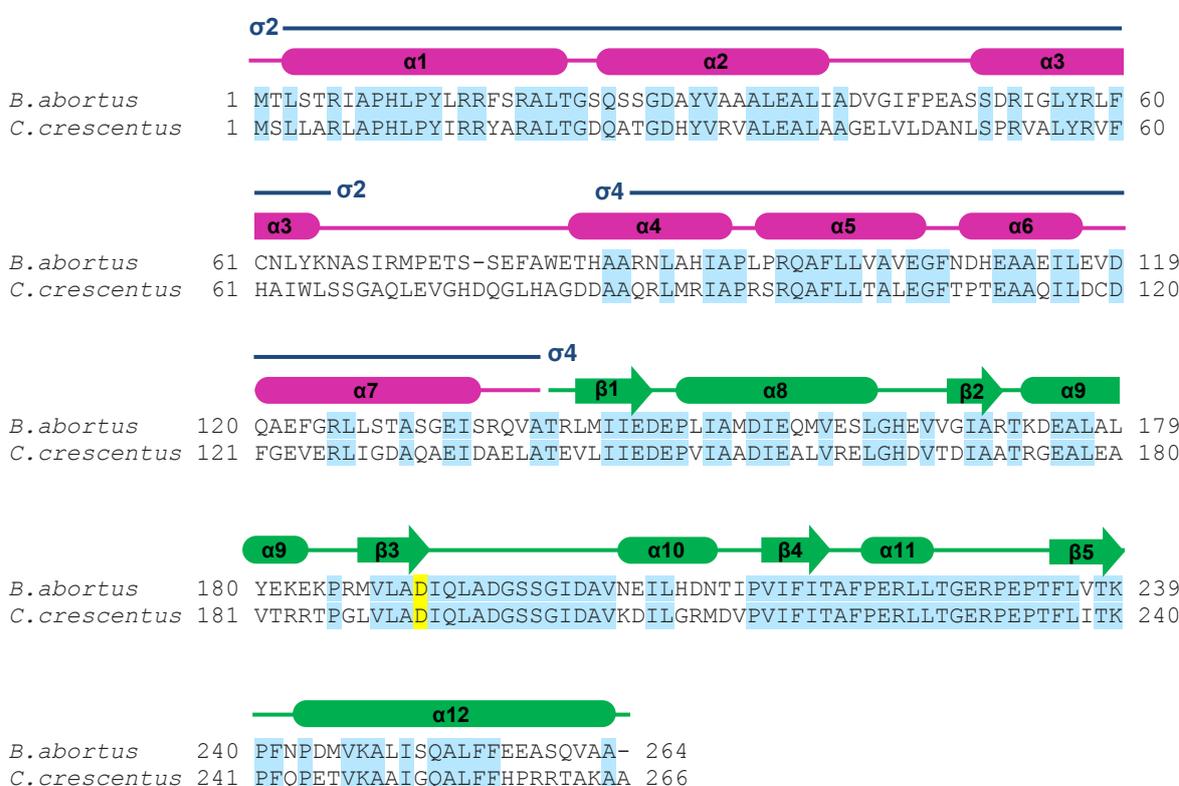
Luego, se procedió a optimizar las condiciones de cristalización con variantes de la solución anterior, utilizando el método de difusión de vapor por gota colgante en placas de 24 pocillos incubada a 19°C. Finalmente, se obtuvieron cristales en una solución final conteniendo PEG 4000 22%, isopropanol 11% y acetato de sodio 0,1 M, con un tamaño aproximado de 0,10 x 0,03 x 0,03  $\text{mm}^3$  (Figura 58B).



**Figura 58. Cristales de PhyR.** **A.** Primeros cristales de PhyR obtenidos con el robot Honeybee 963. Se obtuvo una lluvia de microcristales en una solución conteniendo PEG 4000 25%, isopropanol 8%, y acetato de sodio 0,1 M. **B.** Cristal optimizado con un tamaño aproximado de 0,10 x 0,03 x 0,03  $\text{mm}^3$ , obtenido en una solución conteniendo PEG 4000 22%, isopropanol 11% y acetato de sodio 0,1 M. Aquí se puede apreciar la geometría bipiramidal de la muestra obtenida.

## Resolución de la estructura de PhyR

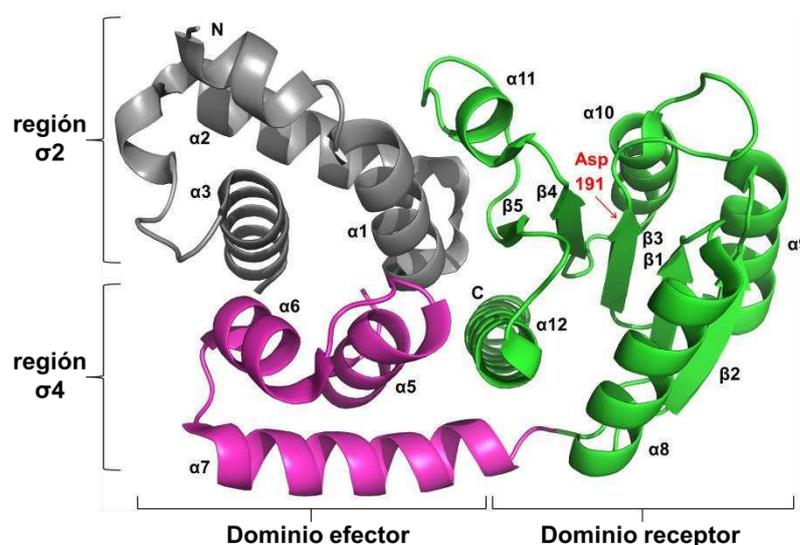
El siguiente análisis fue llevado a cabo por el Dr. Sebastián Klinke, incluyendo la colección de datos de difracción de los cristales, como la resolución de la estructura tridimensional de PhyR. Se colectaron datos de difracción de rayos X en la línea de cristalografía de macromoléculas PROXIMA-1, en la estación sincrotrón SOLEIL de Francia. La estructura fue luego resuelta utilizando datos de difracción de rayos X a 2,05 Å de resolución con los estadísticos presentados en la Tabla 2 de Materiales y Métodos. Partiendo del modelo homólogo previamente conocido de PhyR de *C. crescentus* (código PDB 3N0R, [77]) se aplicó el método de reemplazo molecular para la resolución de la estructura de PhyR de *B. abortus*. La Figura 59 muestra el alineamiento de secuencias correspondiente.



**Figura 59. Alineamiento de secuencias entre PhyR de *B. abortus* y *C. crescentus*.** El alineamiento entre ambas proteínas se realizó con el programa Clustal-Omega2 (EMBL-EBI) [131]. Ambas proteínas poseen un 54% de identidad de secuencia (143 de 264 residuos, marcados en celeste). El sitio conservado de fosforilación se indica en amarillo: Asp 191 en *Brucella* y Asp 192 en *C. crescentus*. Por arriba del alineamiento se indican los elementos de estructura secundaria para ambos dominios: en rosa los correspondientes al dominio efector simil-sigma N-terminal, y en verde los correspondientes al dominio REC. También se indican las regiones σ2 y σ4 del dominio efector (azul) [77].

Se observa una sola molécula de PhyR por celda asimétrica y presenta muy pocas interacciones con las moléculas vecinas, confirmando que la proteína cristaliza en forma de monómero. El modelo cristalográfico de PhyR de *B. abortus* está formado por 268 residuos (de un total de 270 que posee la proteína entera). Como ya se ha mencionado, PhyR posee un dominio efector simil-

sigma en el extremo N-terminal y un dominio receptor en el extremo C-terminal. El dominio N-terminal está formado por un arreglo compacto de seis hélices  $\alpha$  que puede dividirse en dos regiones:  $\sigma_2$  y  $\sigma_4$ , característicos de los factores sigma alternativos de la transcripción en bacterias. Este dominio funciona como un dominio anti-anti-sigma, al unirse a la proteína anti-sigma NepR. Por otra parte, el dominio REC C-terminal posee el plegamiento clásico del dominio REC, el cual consiste en una hoja  $\beta$  hidrofóbica central de 5 hebras rodeada por 5 hélices  $\alpha$  (Figura 60). Este dominio contiene el residuo de ácido aspártico fosfoceptor (Asp191).

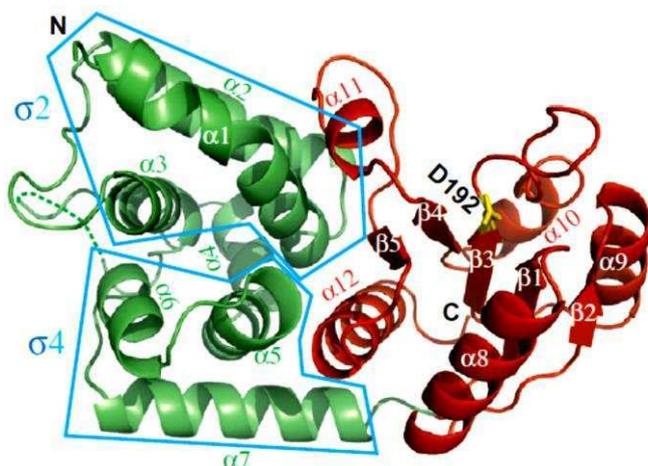


**Figura 60. Estructura cristalográfica de PhyR de *Brucella*.** El dominio efector N-terminal de PhyR está formado por un arreglo compacto de 6 hélices  $\alpha$ , y puede dividirse en dos regiones:  $\sigma_2$  (gris) y  $\sigma_4$  (rosa). El dominio REC C-terminal consiste en una hoja  $\beta$  hidrofóbica central de 5 hebras rodeada por 5 hélices  $\alpha$  (verde), y posee el residuo fosfoceptor Asp191, el cual se indica con una flecha en rojo. En la figura se indican los elementos de la estructura secundaria de cada dominio.

### Comparación con PhyR de *Caulobacter crescentus*

El dominio N-terminal de *C. crescentus* está formado por un arreglo de 7 hélices  $\alpha$  y un loop, flexible y desordenado, entre las regiones  $\sigma_2$  y  $\sigma_4$  (Figura 61). El dominio C-terminal está formado por una hoja  $\beta$  hidrofóbica central de 5 hebras rodeada por 5 hélices  $\alpha$ . La estructura de PhyR de *Brucella* se asemeja a la de PhyR de *C. crescentus*, presentando el mismo plegamiento global, con un rmsd de 1,28 Å para 223 carbonos alfa alineados. La estructura de PhyR de ambas bacterias es muy similar (Figura 62), pero existen algunas zonas con marcada divergencia (Figura 63). En *Brucella* no se logra ver el loop flexible entre las regiones  $\sigma_2$  y  $\sigma_4$  y sólo se pueden observar 6 hélices  $\alpha$ . Esta diferencia se debe a la ausencia de densidad electrónica en la hélice  $\alpha_4$  correspondiente a la región  $\sigma_4$  del dominio simil-sigma de PhyR de *Brucella* y al loop que conecta las regiones  $\sigma_2$  y  $\sigma_4$  (residuos Asn 66 a His 90) (Figuras 62B y 63C) En el caso de *C. crescentus* hay ausencia de densidad electrónica entre los residuos Gln 70 a Val 73 y hacia el final del extremo C-terminal correspondiente a los residuos Tyr 262 a Ala 266. Por otro lado, la hélice C-terminal  $\alpha_{12}$  es unos residuos más larga en *Brucella* y protruye del centro de la proteína entrando

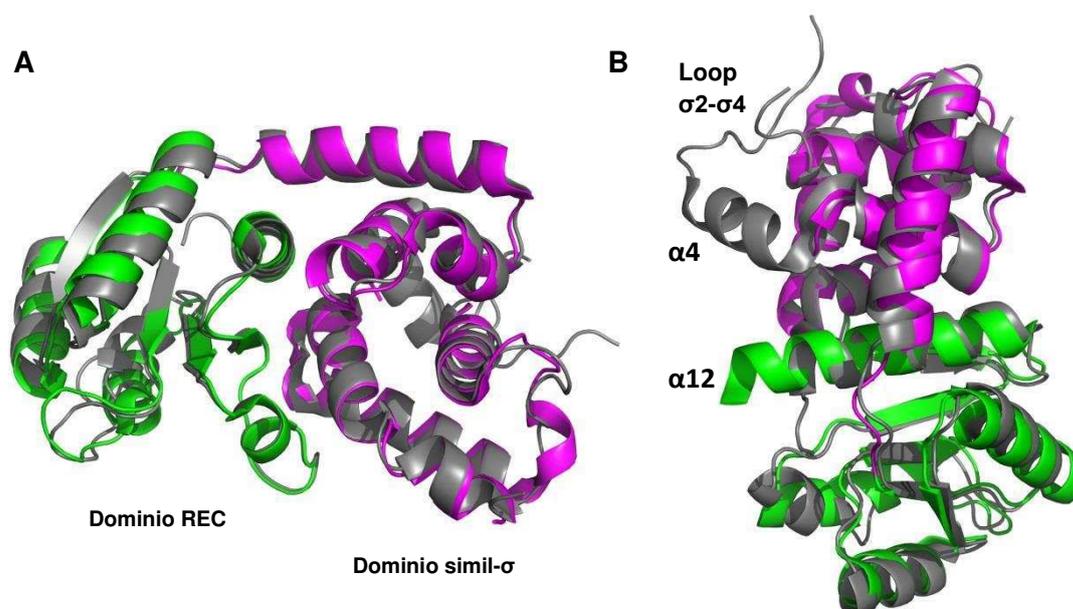
en contacto con el solvente (Figuras 62B y 63B). Esta hélice incluye los residuos de artefacto de clonado del vector y el His<sub>6</sub>-tag.



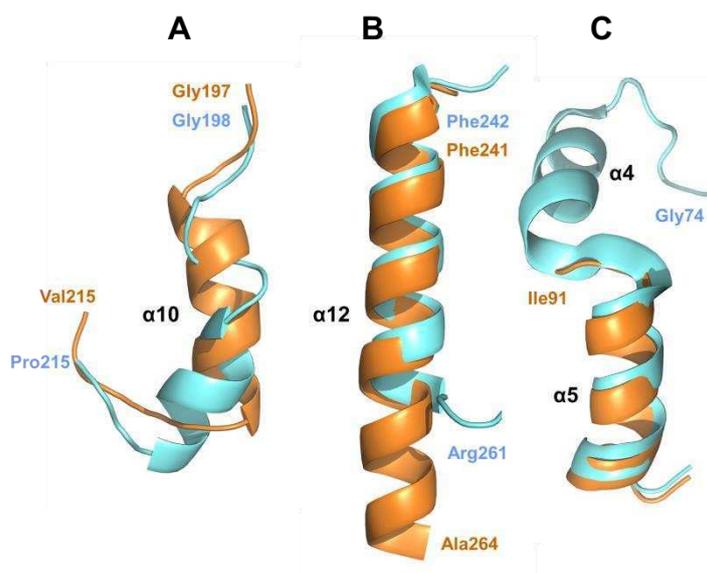
**Figura 61. Representación de la estructura tridimensional de PhyR de *C. crescentus*.** El dominio N-terminal (verde) de *C. crescentus* está formado por un arreglo 7 hélices  $\alpha$ , y un loop flexible y desordenado entre las regiones  $\sigma 2$  y  $\sigma 4$  (líneas punteadas). El dominio C-terminal (rojo) está formado por una hoja  $\beta$  hidrofóbica central de 5 hebras rodeada por 5 hélices  $\alpha$ . En amarillo se indica el residuo fosforilable del dominio REC: Asp 192. Imagen tomada de Herrou *et al.*, 2010 [77].

En la estructura de PhyR de *C. crescentus* hay contactos intramoleculares entre el dominio REC y el dominio simil- $\sigma$  que, probablemente, contribuyen a la estabilización del dominio simil- $\sigma$  en una conformación cerrada, en el estado inactivo no fosforilado. La superficie de contacto entre ambos dominios corresponde a la región formada por las estructuras secundarias  $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$  y es la zona en la cual se conoce que el dominio REC sufre cambios conformacionales luego de ser fosforilado en varias proteínas conteniendo un dominio REC. El modelo actual establece que la fosforilación del dominio REC desestabiliza la interacción entre el dominio simil- $\sigma$  y el dominio REC permitiendo que las regiones  $\sigma 2$  y  $\sigma 4$  queden expuestas al solvente y se separen por medio del loop flexible que conecta ambas regiones. De este modo, el dominio simil- $\sigma$  puede ahora unirse al factor anti- $\sigma$  NepR.

Cabe la posibilidad que alguna de las diferencias estructurales observadas entre ambas proteínas esté relacionada con el hecho de que en *C. crescentus* es necesaria la fosforilación de PhyR para que pueda interactuar con NepR, mientras que en *Brucella* NepR puede interactuar con PhyR aún cuando esta última no está fosforilada (aunque con menor afinidad que cuando está fosforilada). Una posibilidad es que el loop  $\sigma 2$ - $\sigma 4$  en PhyR de *Brucella* sea más flexible y/o que las interacciones entre ambos dominios sean más lábiles, lo cual permitiría que PhyR se encuentre en un equilibrio entre una conformación cerrada y una conformación más abierta en solución en estado inactivo no fosforilado. El hecho de que el loop  $\sigma 2$ - $\sigma 4$  sea más flexible, también podría llegar a justificar por qué no se pudo resolver esa sección de la proteína. Además, la región correspondiente a este loop es la zona en la cual se encuentra la mayor diferencia en la secuencia aminoacídica entre ambas proteínas. De todos modos, esta hipótesis no puede ser corroborada con los datos obtenidos hasta el momento.



**Figura 62. Comparación de las estructuras de PhyR de *Brucella* y de *C. crescentus*.** Representación de Superposición de la estructura de PhyR de *B. abortus* (dominio REC en verde y dominio simil sigma en rosa) y la estructura de PhyR de *C. crescentus* (gris). **A.** Se observa que ambas estructuras son muy parecidas. **B.** Se puede observar que en *Brucella* no se encuentra densidad electrónica para la hélice  $\alpha 4$  y el loop entre las regiones  $\sigma 2$  y  $\sigma 4$ . También se observa que la hélice  $\alpha 12$  es más larga en *Brucella* que en *C. crescentus*.



**Figura 63. Resumen de las tres divergencias más importantes observadas entre la PhyR de *B. abortus* (naranja) y *C. crescentus* (celeste).** **A.** Hay una clara diferencia en la orientación y localización de la hélice  $\alpha 10$  en el dominio REC. **B.** La hélice C-terminal  $\alpha 12$  es más larga en *Brucella*, y protruye del centro de la proteína entrando en contacto con el solvente. **C.** En *Brucella*, hay ausencia de densidad electrónica en la hélice  $\alpha 4$  correspondiente a la región  $\sigma 4$  del dominio simil-sigma.

# **DISCUSIÓN & CONCLUSIONES**

## **Discusión**

En el presente trabajo de tesis, se ha caracterizado la vía de señalización de LOVHK desde un punto de vista bioquímico y fisiológico. Se han identificado dos compañeros de interacción de LOVHK: LovR y PhyR. Los resultados presentados indican que LOVHK señala hacia el sistema GSR en *Brucella* actuando como un regulador positivo y, además, afecta la expresión del operón *virB* por un mecanismo aún no elucidado. Esto nos permite proponer una vía de señalización para LOVHK en *Brucella abortus* 2308.

### **Compañeros de interacción de LOVHK en distintos microorganismos**

En trabajos recientes de *C. crescentus* y *E. litoralis*, se han descrito sistemas de señalización análogos al presentado aquí para *Brucella*, los cuales están formados por una proteína HK perteneciente a la familia HWE, que posee un dominio LOV y que interactúa con dos RRs, uno de dominio único denominado LovR y el otro es PhyR. En *C. crescentus*, la relación entre LovR y ambos RRs, LovR y PhyR, ha sido demostrada por medio de un acercamiento genético [94,96], mientras que en *E. litoralis* las interacciones entre estas proteínas ha sido estudiada *in vitro*, por medio de ensayos de fosfotransferencia [95].

En esta tesis, por medio de ensayos de doble híbrido bacteriano y posteriores ensayos de fosfotransferencia (Tabla 4, Figuras 28 y 31), se identificaron dos RRs como compañeros de interacción de LOVHK en *B. abortus*. En coincidencia con nuestros resultados, Kim *et al.*, 2014 demostraron que LOVHK de *B. abortus* puede fosforilar a PhyR [57]. La activación de LOVHK conduce a un aumento en la tasa de autofosforilación y posterior fosfotransferencia a sus dos RRs. La fosfotransferencia de LOVHK a LovR presenta una cinética de transferencia del fosfato más rápida que en el caso de PhyR. Sin embargo, el grupo fosfato unido a PhyR~P es más estable en el tiempo que en el caso de LovR~P. El fosfato de este último se pierde rápidamente, conllevando a una rápida defosforilación de LOVHK. Basándose en los ensayos de fosfotransferencia realizados *in vitro*, proponemos que LovR podría estar funcionando como un sink de fosfato disminuyendo el grado de activación de LOVHK *in vitro*. La rápida tasa de defosforilación de LovR puede explicarse a la propia capacidad de auto-defosforilación o a una posible actividad fosfatasa presente en LOVHK sobre LovR [137,138]. Los resultados obtenidos hasta el momento no nos permiten distinguir entre ambos mecanismos. En los ensayos realizados, no se detectó actividad fosfatasa del dominio HK de LOVHK sobre PhyR. Debido a la inestabilidad de LovR~P no fue posible estudiar el mecanismo de defosforilación de LovR.

En *E. litoralis* las tres proteínas LOV-HK, denominadas EL368\_LOVHK, EL346\_LOVHK y EL362\_LOVHK, difieren en sus patrones de fosfotransferencia. Mientras que EL368\_LOVHK y EL346\_LOVHK pueden fosfotransferir a ambos RRs *in vitro*, EL362\_LOVHK sólo puede transferir su fosfato a EL\_LovR. La cinética de fosforilación de LOVHK y PhyR en *Brucella* es similar a la observada entre EL368\_LOVHK y PhyR en *E. litoralis*. En ambos casos, la intensidad de la señal correspondiente a PhyR~P se estabiliza luego de los 20-30 minutos de

incubación. Sin embargo, la tasa de defosforilación de LovR~P es mayor en *Brucella* que en *E. litoralis*. Por otro lado, en *E. litoralis* se ha observado la defosforilación de PhyR~P cuando se agrega LovR no fosforilado al medio de reacción en presencia de AMP-PNP (Adenosina 5'-( $\beta,\gamma$ -imido)-trifosfato) un análogo de ATP no hidrolizable que actúa como un inhibidor competitivo del ATP), mientras que en *Brucella* no se ha observado dicho efecto las bajo las condiciones experimentales empleadas (Figura 31C). Hay dos posibles escenarios que podrían explicar esta observación en *Brucella*:

- A) PhyR es defosforilada por LovR y LOVHK vuelve a re-fosforilar a PhyR (ya que sigue habiendo ATP marcado en el medio de reacción), de modo que el nivel de PhyR~P se mantiene constante;
- B) LovR actúa como un sink de fosfato sólo de LOVHK y PhyR~P es estable aún en presencia de LovR.

Los resultados presentados aquí no permiten distinguir entre ambas hipótesis, por lo que es necesario realizar otros ensayos, como evaluar si LovR favorece la defosforilación de PhyR~P cuando se agrega LovR no fosforilado a la mezcla de reacción, como se ha observado en *E. litoralis* [95].

En cuanto a la organización genómica de los genes involucrados en esta vía de señalización, ya se ha mencionado que la disposición de los genes correspondientes a sistema GSR se encuentra conservada en diversas  $\alpha$ -proteobacterias. Sin embargo, existen algunas diferencias en cuanto a la localización de *lovhk* y *lovR* (Figura 64). En *B. abortus*, *lovhk* (BAB2\_0652) y *lovR* (BAB1\_0099) se encuentran codificados en distintos cromosomas, y tanto *lovhk* como *lovR* no poseen un compañero de interacción aparente en una región cercana a cada gen. Por el contrario, en *C. crescentus*, *lovK* y *lovR* están codificados en un mismo locus [96]. En el caso de *E. litoralis*, su genoma codifica para tres genes *lovhk*. *EL362\_lovhk* y *EL\_lovR* se encuentran codificados en un operón, mientras que *EL368\_lovhk* y *EL346\_lovhk* son HKs huérfanas, sin un RR predecible en una región cercana [95]. La localización genómica de estas proteínas LOVHKs y de sus correspondientes RRs de dominio único es diferente entre las distintas especies y, además, la homología de secuencia entre los diferentes LovR es baja (Tabla 5 y Figura 25). Por tanto, no es posible predecir el RR compañero de LOVHK mediante análisis bioinformáticos y se requiere de estudios experimentales para identificar y confirmar él o los compañeros de interacción de LOVHK.

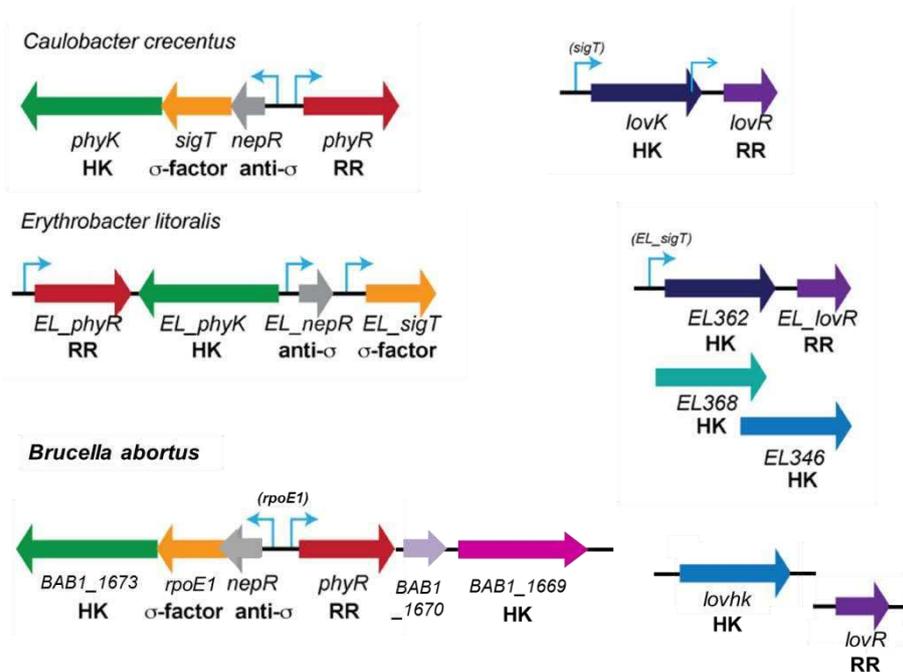


Figura 64. Comparación de la organización genómica de la vía de transducción de señales LOVHK/LovR/GSR. Representación esquemática de la organización de los genes correspondientes al sistema GSR, y los genes que codifican para *lovhk* y *lovR* en *C. crescentus*, *E. litoralis* y *B. abortus*. Figura adaptada de Correa *et al.*, 2013 [95].

### El sistema GSR es activo en *Brucella* y LOVHK contribuye a su activación

Al comenzar el presente trabajo, el sistema GSR no había sido aún descrito en *Brucella*. En esta tesis se demostró que dicho sistema es activo en *Brucella abortus*, se induce ante la falta de una fuente de carbono y el nivel de inducción aumenta al ser expuesto a dos factores de estrés de forma simultánea. Además, la inducción por falta de una fuente de carbono y NaCl es dependiente del tiempo de exposición y de la concentración de sal. Posteriormente, Kim *et al.*, 2013 demostraron por medio de ensayos de supervivencia que el sistema GSR en *B. abortus* también responde a la exposición a peróxido de hidrógeno y a la acidificación del medio de cultivo [85].

En *B. abortus*, en ausencia de estrés, LOVHK aumenta la transcripción basal de *phyR* y de otros genes regulados por el sistema GSR como *rpoH1*, *dps* y *lovR* (Figuras 46 y 47). Cuando *Brucella* es sometida a estrés por falta de una fuente de carbono, la ausencia de LOVHK no impide que el sistema GSR responda pero LOVHK es necesaria para llegar al máximo estado de activación del sistema en un período de tiempo más corto (Figura 52). Estos resultados confirman que LOVHK contribuye a la activación del sistema GSR. Sin embargo, no se han observado cambios en el nivel de proteína de PhyR bajo estrés por falta de una fuente de carbono al cabo de 2-4 hs de incubación (datos no mostrados). Un resultado similar fue observado en *B. japonicum*, en el cual no observaron una variación significativa en la cantidad de PhyR al cabo de 24 hs de incubación en un medio en ausencia de una fuente de carbono

[74]. Esto sugiere la existencia de un mecanismo de regulación post-traducciona l de PhyR que no requiere de la síntesis de proteína de novo.

Recientemente, dos grupos de investigación obtuvieron resultados que están en concordancia con los nuestros. Por medio de ensayos de microarreglos, Gourley *et al.*, 2014 demostraron que tanto los genes correspondientes al sistema GSR (*phyR*, *nepR* y *rpoE1*) y algunos de los regulados por dicho sistema (*rpoH1* y *dps*) se encuentran disminuidos en la mutante de *lovhk* en comparación con la cepa wt en *B. melitensis* 16M [56]. Por otro lado, Kim *et al.*, 2014 demostraron que LOVHK de *B. abortus* es un sensor principal del sistema GSR, el cual a través de la fosforilación de PhyR activa la expresión de genes regulados por el sistema GSR (*rpoH1*, *dps* y *ba14K*) [57].

En *B. abortus*, la expresión de *lovhk* no es regulada por el sistema GSR bajo condiciones normales de crecimiento, en ausencia de estrés. Sin embargo, la transcripción de *lovR* depende del sistema GSR (Figura 47). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kim *et al.*, 2013, quienes no observaron cambios en la expresión de *lovhk*, mediante análisis de microarreglos, al comparar una cepa mutante de *rpoE1* con la cepa wt de *B. abortus* bajo condiciones de estrés por peróxido de hidrógeno. En ese mismo ensayo se observó que la expresión de *lovR* se encontraba significativamente disminuida en la mutante de *rpoE1* [85]. A su vez, ni el promotor de *lovhk* ni el de *lovR* poseen la secuencia de reconocimiento de RpoE1 [85,139], sugiriendo que el sistema GSR regula la expresión de *lovR* de forma indirecta. Por el contrario, en *C. crescentus* el motivo de reconocimiento de  $\sigma^T$  (el ortólogo de RpoE1) se encuentra presente en el promotor de los genes *lovK* y *lovR* (Figura 64) y se ha demostrado que su transcripción es regulada por el sistema GSR, sugiriendo que en este caso la regulación de la expresión es ejercida directamente por  $\sigma^T$  [94].

### **Función de LovR *in vivo***

En base a los resultados observados *in vitro*, nuestra hipótesis de trabajo fue que LovR actúa como un regulador negativo del sistema, por lo que ante su ausencia la expresión de los genes regulados por dicho sistema debería incrementarse. Sin embargo, si bien LovR disminuye el grado de fosforilación de LOVHK *in vitro* contribuyendo a que LOVHK retorne al estado inactivo (Figura 31C), *in vivo*, la delección del gen que expresa LovR no tiene un impacto en la expresión de los genes regulados por el sistema GSR (Figuras 46 y 47). Una posibilidad es que el efecto causado por la ausencia de LovR sea compensado *in vivo* por otro mecanismo aún no caracterizado. No obstante, la ausencia de LovR tiende a aumentar la estabilidad de PhyR *in vivo* (Figura 53). Este efecto podría ser la consecuencia de un menor nivel de LOVHK~P cuando LovR está presente, condición que finalmente lleva a un menor grado de fosforilación de PhyR.

En *C. crescentus*, por medio de ensayos genéticos se ha propuesto que LovR también puede controlar junto con LovK el grado de fosforilación de PhyR. La vía de señalización de LovK/LovR actúa río arriba de PhyR y en su conjunto regulan negativamente al sistema GSR.

Sin embargo, en ausencia de LovR, LovK actúa como un regulador positivo del sistema GSR, probablemente a través de la fosforilación de PhyR. Ellos proponen que cuando LovK no está fosforilado, puede actuar como una fosfatasa sobre PhyR, y que LovK~P puede actuar como una kinasa sobre PhyR, dando lugar a PhyR~P contribuyendo a la activación del sistema GSR. Al activarse el sistema GSR, aumenta la expresión de LovK y LovR. Al incrementarse los niveles de LovR, tienden a disminuir los niveles celulares de LovK~P debido a que fosfotransfiere a LovR, dando lugar a LovK no fosforilado, el cual por un lado no fosfotransfiere a PhyR y además le quita el fosfato a PhyR~P por medio de su actividad fosfatasa, disminuyendo de este modo el grado de activación del sistema GSR. En base a esto, Foreman *et al.*, 2012 proponen que LovK/LovR actúan río arriba de PhyR regulando el nivel de PhyR~P, donde LovR modularía si LovK le agrega o saca un fosfato a PhyR [94] (Figura 65).

Por otro lado, también cabe la posibilidad que LovR de *Brucella* forme parte de otra cascada de señalización que aún no ha sido descrita. En *E. litoralis* el rol fisiológico de EL\_LovR aún no ha sido estudiado. Por el contrario, en *C. crescentus*, además de la relación con el sistema GSR, la vía de señalización LOVHK/LovR está involucrada en la adhesión célula-célula y la adhesión de la bacteria a un sustrato abiótico. La expresión de ambos genes está sincronizada y depende del ciclo celular, llegando a un pico de transcripción en la transición entre los estadios de “swarmer” a “stalked” (se desarrolla una estructura de sujeción (stalk holdfast) en un polo de la bacteria).[96].

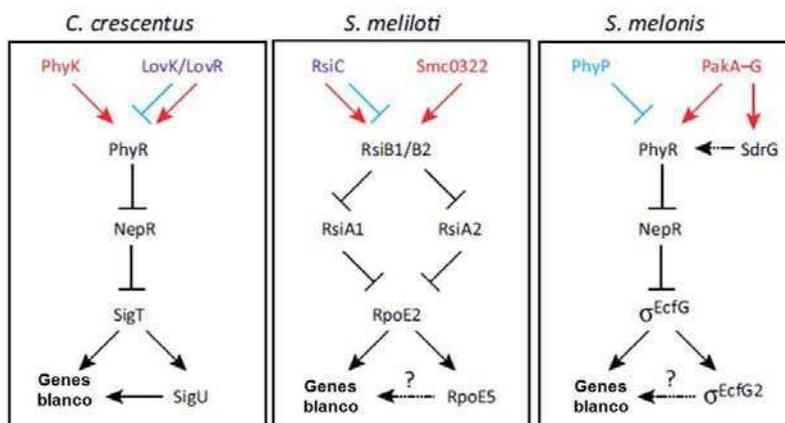
Por otro lado, también se han descrito otros RRs de dominio único asociados al sistema GSR. En *M. extorquens* PA el gen *Mext\_0407* codifica para un RR de dominio único que actúa como un regulador positivo del sistema GSR ya que, ante su ausencia, el sistema no responde a diversos tipos de estrés. Además, por medio de evidencia genética se demostró que *Mext\_0407* actúa río arriba de la cascada PhyR-NepR-RpoE [140]. Por otro lado, en *Sphingomonas meloni* Fr1 se ha identificado otro RR de dominio único denominado SdrG, el cual también actúa como regulador positivo del sistema GSR en este microorganismo, mientras que otros RRs de dominio único afectan negativamente al sistema GSR de forma dependiente de PhyR y de SdrG [141]. Todos estos ejemplos constituyen evidencia que apoyan a la idea de que diversos RRs de dominio único están involucrados en la regulación del sistema GSR, ya sea positiva o negativamente.

### Otras HKs asociadas al sistema GSR

El sistema GSR tiene la capacidad de responder ante diversos estímulos ambientales, sugiriendo que PhyR integra las señales detectadas por más de una HK sensora. El sistema GSR en  $\alpha$ -proteobacterias se caracteriza por una organización genómica conservada, lo cual incluye a los genes que codifican para el *rpoE*, *nepR* y *phyR*, y en varios también incluye una o dos HKs sensoras, las cuales pueden ser citoplasmáticas o periplasmáticas [68,71]. Hasta el momento, se han caracterizado tres de estas HK sensoras como posibles reguladores de los niveles de fosforilación de PhyR: PhyK de *C. crescentus* [75], PhyP de *Sphingomonas* sp. Fr1

[78], y RsiC de *S. meliloti* [90]. PhyK de *C. crescentus* es propuesta como una kinasa de PhyR; PhyP de *Sphingomonas* sp. Fr1 es propuesta como una fosfatasa de PhyR en ausencia de estrés, actuando de este modo como un regulador negativo del sistema GSR. RsiC de *S. meliloti* es propuesta como una kinasa/fosfatasa bifuncional, la cual fosforila a RsiB1/B2 (dos homólogos de PhyR) en presencia de estrés y defosforila ambas proteínas en ausencia de estrés. En *Brucella*, el locus del sistema GSR incluye a dos genes que codifican para posibles HKs también pertenecientes a la familia HWE: BAB1\_1669 and BAB1\_1673. Ambas HKs han sido recientemente estudiadas, y ninguna de las dos tiene la capacidad de fosforilar a PhyR. Por el contrario, BAB1\_1673 funciona como un regulador negativo del sistema GSR bajo condiciones de estrés oxidativo, análogo a PhyP de *Sphingomonas* [57]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que en *Brucella* otras HKs o vías de señalización además de LOVHK pueden estar activando a PhyR, ya que la ausencia de LOVHK no impide que el sistema GSR responda a un estrés por falta de una fuente de carbono (Figura 52). Investigaciones futuras brindarán información sobre otras HKs que puedan actuar sobre PhyR en *Brucella*.

Por otro lado, Kaczmarczyk *et al.*, 2014 identificaron siete HK, PakA y PakG, también pertenecientes a la familia HWE que regulan positivamente al sistema GSR en *Sphingomonas meloni* Fr1. Por medio de experimentos de epístasis genética y ensayos de fosfotransferencia *in vitro*, demostraron que las proteínas Paks pueden fosforilar directamente a PhyR y al RR de dominio único SdrG [141]. Además, observaron que existen diferentes grados de redundancia entre las distintas proteínas Paks, y que una misma kinasa puede sensar más de un tipo de estrés. De este modo, ellos sugieren que el sistema GSR en *Sphingomonas meloni* Fr1 podría estar sensando una determinada combinación de señales, en lugar de una señal individual. De este modo, el sistema GSR de  $\alpha$ -proteobacterias consiste en una red compleja y entrelazada de sistemas de dos componentes, en la cual varias HKs convergen en la fosforilación de PhyR, la cual también es sujeta a la regulación por RRs de dominio único [141] (Figura 65).



**Figura 65. Representación esquemática de la cascada de señalización del sistema GSR en diversas  $\alpha$ -proteobacterias.** Las flechas indican activación, mientras que las barras indican inhibición. Las flechas o barras con líneas cortadas indican un mecanismo de activación o inhibición desconocido. Las flechas entrecortadas con signo de pregunta indican que no se sabe qué genes regulan. Las HKs se muestran en rojo, las fosfatasas en azul, y las proteínas bifuncionales con actividad kinasa/fosfatasa en violeta. Figura adaptada de Francez-Charlotte *et al.*, 2015 [89].

**LOVHK y el operón *virB***

*Brucella* posee varios factores de virulencia siendo el más caracterizado hasta el momento el sistema SST4 *virB* que es esencial para la infección bacteriana [31]. La regulación del operón *virB* es compleja e incluye al menos cinco factores regulatorios [36]. En el presente trabajo, mostramos que la actividad del promotor del operón *virB* se encuentra significativamente disminuida ante la ausencia de LOVHK (Figura 55). Este resultado sugiere que, además de modular el sistema GSR, LOVHK participa de otras vías de señalización. Coincidiendo con esta hipótesis, Kim *et al.*, 2013 demostraron por medio de ensayos de microarreglos que la expresión de *virB* no modifica entre *B. abortus* wt y la mutante  $\Delta rpoE1$  bajo condiciones de estrés por peróxido de hidrógeno [85]. Además, la secuencia consenso de reconocimiento del RpoE1 no está presente en el promotor *virB*, tanto en *B. abortus* [85] como en *B. melitensis* 16M [139]. Estos resultados sugieren que el operón *virB* no es regulado directamente por el sistema GSR. Por el contrario, Delroy *et al.*, 2006 reportaron una disminución en los niveles de proteína VirB8 en una cepa mutante  $\Delta rpoE1$  en *B. melitensis*, bajo condiciones normales de crecimiento [135].

Gourley *et al.*, 2014, demostraron, por medio de ensayos de microarreglos, que la expresión de los genes del operón *virB* se encuentra aumentada en la mutante de *lovhk* en comparación con la cepa wt en *B. melitensis* [56], lo cual es el resultado inverso al que nosotros encontramos. Al presente desconocemos las razones de esta discrepancia, sin embargo, estos resultados refuerzan la hipótesis de una relación entre LOVHK y *virB* aunque el mecanismo es desconocido al presente. Nuestros resultados sumados a los resultados de otros sugieren que LOVHK podría estar controlando la expresión génica por medio de al menos dos vías de señalización: el sistema GSR y la otra se evidencia por el efecto sobre *virB*.

La menor capacidad de replicación en infecciones de macrófagos en la mutante de LOVHK en *Brucella* podría explicarse por la contribución conjunta de estas vías de transducción de señales a la regulación de diversos factores de virulencia afectando la adaptación de la bacteria a la vida intracelular. Sin embargo, se necesitan más ensayos para corroborar esta hipótesis.

**Señales detectadas por LOVHK**

Swartz *et al.*, 2007, demostraron que la proteína LOVHK de *Brucella* es un sensor de luz azul *in vitro*, y que la luz modula la virulencia de esta bacteria en infecciones realizadas en líneas celulares de macrófagos murinos. En este trabajo se demuestra que LOVHK es un regulador positivo del sistema GSR, pudiendo fosforilar al regulador central de dicho sistema. Además de otras señales, la luz también es considerada un factor de estrés. Sin embargo, no se ha podido demostrar que la luz actúe como un factor que active o module la respuesta del sistema GSR en bacterias en cultivo líquido, aunque la presencia de LOVHK sí modula la respuesta de dicho sistema. Esta evidencia sugiere que LOVHK podría estar sensando otras señales ambientales además de la luz azul. Resultados similares fueron obtenidos entre LovK y el sistema GSR en *C. crescentus*. En este último caso, los autores sugieren que LovK podría estar sensando el

potencial redox citoplasmático a través del dominio LOV, debido a que las flavoproteínas son capaces de detectar cambios en el potencial redox del entorno en el que se encuentran [94,142]. Por otro lado, estudios recientes realizados por Kim *et al.*, 2014 sugieren que LOVHK podría estar involucrada en la respuesta a estrés oxidativo a través del dominio PAS, pero no a través del dominio LOV [57].

La transmisión de *Brucella* ocurre mediante aerosoles, contacto directo con la mucosa, piel dañada o fluidos corporales de animales infectados, o por el consumo de productos lácteos contaminados. La luz detectada por bacterias presentes en la placenta de fetos abortados podría preparar a las bacterias para su próxima infección en un nuevo huésped [54]. Kim *et al.*, 2013, demostraron que PhyR~P/NepR forman un complejo muy estable y de larga vida en *B. abortus*, de esta forma la activación de PhyR por fosforilación prepara a la bacteria para responder no sólo al factor de estrés de ese momento, sino que también para responder a posibles factores de estrés futuros. Mecanismos similares han sido propuestos para el sistema GSR de *M. extorquens* [72], y *B. japonicum* [74]. En concordancia con este modelo, la luz o alguna otra señal sensada por LOVHK previo a la infección, podrían preparar a *Brucella* para enfrentar las condiciones adversas presentes dentro del nuevo huésped.

### La estructura tridimensional de PhyR

La estructura tridimensional de PhyR en estado inactivo es muy similar a la de *C. crescentus*. En ambas estructuras, se puede observar que el dominio simil- $\sigma$  N-terminal está formado por un arreglo compacto de 6-7 hélices  $\alpha$ , en el cual se pueden distinguir las dos regiones  $\sigma_2$  y  $\sigma_4$ ; mientras que el dominio REC C-terminal está formado por un hoja  $\beta$  hidrofóbica de 5 hebras rodeada por 5 hélices  $\alpha$ , siendo este el plegamiento característico de los dominio REC. En *C. crescentus* se han detectado interacciones intramoleculares entre ambos dominios que contribuyen a mantener ocultas las regiones que interactúan con NepR. Sin embargo, debido a que PhyR de *Brucella* puede interactuar con NepR aún en estado no fosforilado, es probable que las interacciones entre el dominio simil- $\sigma$  y el dominio REC de PhyR de *Brucella* sean más lábiles que en el caso de PhyR de *C. crescentus*.

Por otro lado, sería interesante determinar la estructura tridimensional de PhyR~P de *Brucella*, y poder comparar los cambios que se producen en la estructura debido a la fosforilación respecto a la proteína en estado inactivo. En *C. crescentus* la fosforilación del Asp 192 conservado genera cambios conformacionales que aumentan la afinidad del dominio efector por NepR [75]. Como antecedente, se ha determinado la estructura del dominio efector de PhyR junto con NepR por cristalografía en *C. crescentus* [87] y RMN en *Sphingomonas* sp. Fr1 [88].

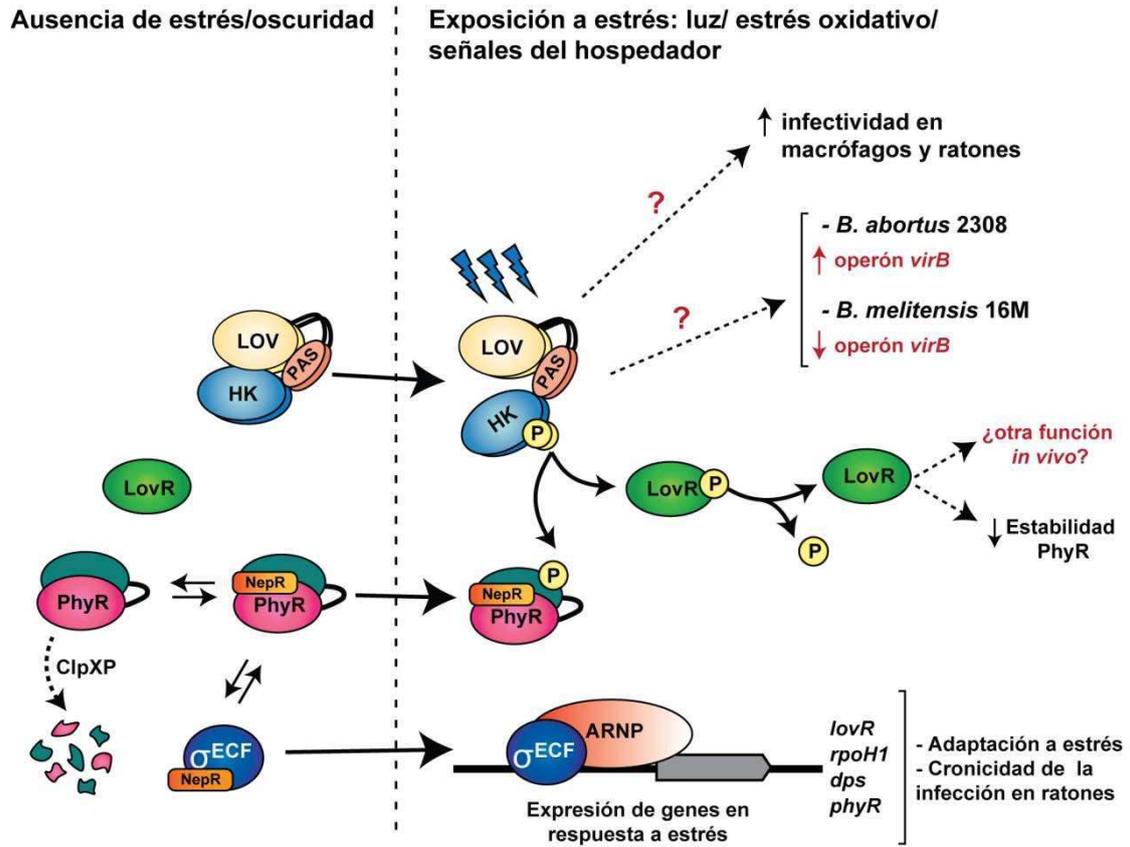
Por otro lado, también resulta interesante determinar la estructura de LovR tanto en estado activo como en estado inactivo (fosforilado). Con este objetivo, inicialmente se analizó la posibilidad de obtener cristales de LovR en estado inactivo. Sin embargo, luego de varios

intentos no se logró obtener cristales. Otra posibilidad consiste en tratar de resolver la estructura por medio de RMN.

### **Modelo propuesto para la vía de señalización de LOVHK**

El trabajo presentado en esta tesis provee importantes aportes a la caracterización de la vía de señalización de LOVHK. En la Figura 66 se indica un modelo propuesto para la vía de señalización intracelular de LOVHK, que resume los resultados obtenidos en el presente trabajo, en concordancia con la descripción del sistema GSR en *B. abortus* y otros trabajos recientes en *B. abortus*, *B. melitensis* y *E. litoralis* [56,57,85,95].

En ausencia de estrés o en condiciones de oscuridad, LOVHK se encuentra en estado inactivo y NepR (factor anti-sigma) puede interactuar tanto con PhyR (factor anti-anti-sigma) no fosforilada como con RpoE1 ( $\sigma^{\text{RpoE}}$ ). Sin embargo, los niveles de PhyR son controlados por la acción de la proteasa ClpXP, asegurando que NepR se mantenga unido al RpoE1, evitando de este modo que RpoE1 se asocie con la ARNpol (ARN polimerasa). Tras la exposición a la luz, estrés oxidativo, señales de la célula hospedadora, o por medio de alguna otra señal de estrés aún no descrita, LOVHK se activa, se autofosforila y subsecuentemente transfiere el fosfato a LovR y PhyR. A su vez, se ha demostrado que en presencia de estrés oxidativo, ClpXP se inactiva aumentando los niveles de proteína de PhyR. La fosforilación de PhyR estabiliza el complejo PhyR~P/NepR, liberando de este modo al RpoE1, el cual ahora puede asociarse a la ARNpol. El complejo ARNpol/RpoE1 regula de forma directa o indirecta la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés, a saber: *rpoH1*, *dps*, *phyR* y *lovR*. Por otro lado, LOVHK altera la expresión del operón *virB* por medio de un mecanismo aún no dilucidado. En *B. abortus* la expresión del operón *virB* aumenta en presencia de LOVHK por un mecanismo que parecería ser independiente del sistema GSR, mientras que en *B. melitensis* disminuye. Finalmente, la evidencia de ensayos realizados *in vitro* sugiere que LovR contribuye a disminuir el grado de fosforilación de LOVHK, y contribuye a disminuir la estabilidad de PhyR *in vivo*. Sin embargo aún no se ha podido determinar si LovR cumple algún otro rol *in vivo*. En síntesis, LOVHK contribuye a la activación del sistema GSR y afecta la expresión del operón *virB* en *Brucella* por un mecanismo aún desconocido. La inducción del sistema GSR conlleva a una adaptación a las nuevas condiciones ambientales, y al mantenimiento de la cronicidad de la infección en ratones, pero no afecta la capacidad de infección a tiempos cortos. Por otro lado, LOVHK contribuye a la infección del hospedador a tiempos cortos de infección, ya sea en líneas celulares de macrófagos murinos o en ratones, y a tiempos largos en ratones por un mecanismo aún no determinado.



**Figura 66. Modelo propuesto para la vía de señalización de LOVHK.** Representación esquemática de los resultados obtenidos en esta tesis, en concordancia con resultados obtenidos por trabajos previos [56,57,85,95]. Las flechas continuas sugieren una interacción directa proteína-proteína, mientras que las líneas punteadas y los signos de interrogación indican un mecanismo aún no elucidado. Ver el texto para más detalles.

## **Conclusiones**

El trabajo presentado en esta tesis provee importantes aportes a la caracterización de la vía de señalización de LOVHK en *Brucella*. En el marco de esta tesis, por medio de un trabajo integrado entre bioquímica y genética, se describe un nuevo sistema de dos componentes en *Brucella*, formado por LOVHK, LovR y PhyR. LOVHK, a través de la interacción con PhyR, constituye un regulador positivo del sistema GSR, mientras que LovR es propuesto como un sink de fosfato de LOVHK *in vitro*, aunque aún no se conoce su rol *in vivo*. Por otro lado, se ha establecido una relación entre LOVHK y el operón *virB*, pero aún no se conoce el mecanismo por el cual la expresión de *virB* se encuentra alterada en ausencia de LOVHK. Los resultados aquí presentados complementan otros trabajos recientes basados en la caracterización de la vía de señalización de LOVHK en *B. abortus* y *B. melitensis*. Por otro lado, LOVHK constituye la primer HK que puede fosforilar a PhyR en *Brucella*, siendo el primer patógeno de mamíferos en el cual se describe un rol fisiológico e interacciones bioquímicas para una proteína que contiene un dominio LOV. Estos resultados contribuyen a la comprensión de esta vía de señalización en la regulación de la virulencia de *Brucella*.

Actualmente se está continuando con algunos estudios con el objetivo de caracterizar con mayor detalle las interacciones aquí demostradas. Los hallazgos de este trabajo de tesis doctoral pueden dar lugar a estudios más profundos y específicos que lleven a dilucidar los mecanismos moleculares por el cual una misma HK puede interactuar con dos RRs de forma simultánea, así como llevar a cabo otros estudios que permitan determinar el/los mecanismos por los cuales LOVHK contribuye a la patogenicidad de *Brucella*.

## **Firmas**

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Microbiología Molecular, en la Fundación Instituto Leloir, bajo la dirección del Dr. Gastón Paris.

La misma fue finalizada en marzo de 2015.

---

**Gabriela Sycz**  
**Becaria**

---

**Dr. Gastón Paris**  
**Director**

## Apéndice 1: Lista de cepas y plásmidos empleados en esta tesis

Tabla 7. Lista de cepas y plásmidos empleados en esta tesis.

Cepa/plásmido	Descripción y/o fenotipo relevante	Referencias
<b>Cepas</b>		
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	<i>LacZ</i> $\Delta$ M15 <i>recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA relA1</i>	Invitrogen
S17-1	Cepa que permite la movilización de los plásmidos pBBR y pK18mobsaB de <i>E. coli</i> S17-1 a las cepas de <i>Brucella</i> . <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdRM</i> RP4 : 2-Tc:Mu: Km Tn7 $\lambda$ pir.	<i>Escherichia coli</i> (ATCC® 47055™)
BL21(DE3)pLysS	Cepa que permite la sobre-expresión de proteínas heterólogas en <i>E. coli</i>	Stratagene
DH5 $\alpha$ F'IQ Km <sup>R</sup>	Cepa empleada para la amplificación de los plásmidos pBT, pTRG, y sus derivados. Para la construcción de bibliotecas.	Life Technologies
BacterioMatchII Two-Hybrid System Reporter Cells	F' <i>lacIq HIS3 aadA</i> Km <sup>R</sup> . Esta cepa posee el cassette reportero <i>HIS3-aadA</i> . La detección de las interacciones proteína-proteína se basan en la activación transcripcional del gen reportero <i>HIS3</i> , el cual permite el crecimiento en presencia de 3-amino-1,2,4- triazole (3-AT), un inhibidor competitivo de la enzima His3. Las interacciones positivas son verificadas con el segundo gen reportero <i>aadA</i> , el cual confiere resistencia a estreptomycin.	Stratagene
FW 102 O <sub>L</sub> 2-62	Cepa FW102 con un F' Km <sup>R</sup> conteniendo la fusión placOL2-62-lacZ, donde el operador $\lambda$ está centrado en la posición -62 río arriba de promotor Lac. La detección de las interacciones proteína-proteína se basan en la activación transcripcional del <i>lacZ</i> , y se cuantifica por la determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa.	[101,102]
<b><i>Brucella abortus</i></b>		
wt 2308	Wild-type, lisa, virulenta, NaI <sup>R</sup>	Stock del laboratorio
<i>lovhk::km</i>	2308, Km <sup>R</sup> , inserción de un cassette de km en el gen <i>lovhk</i> (BAB2_0652)	[54]
<i>lovhk::km</i> /pMR_ <i>lovhk</i>	Mutante <i>lovhk::km</i> complementada con el plásmido pMR10 <i>cat_lovhk</i> , el cual expresa <i>lovhk</i> bajo el control de su propio promotor.	Esta tesis
$\Delta$ <i>lovR</i>	2308, delección de <i>lovR</i> (BAB1_0099)	Esta tesis
$\Delta$ <i>phyR</i>	2308, delección de <i>phyR</i> (BAB1_1671)	Esta tesis
<b>Plasmids</b>		
<b>Expresión de proteínas recombinantes</b>		
pET24a	Km <sup>R</sup> . Plásmido para la sobre-expresión de proteínas con un His <sub>6</sub> -tag en <i>E. coli</i>	Novagen
pET24a-LOVHK	Km <sup>R</sup> . Plásmido para la sobre-expresión de LOVHK (completa) con un His <sub>6</sub> -tag	Esta tesis
pET24a-HK	Km <sup>R</sup> . Plásmido para la sobre-expresión del dominio HK de LOVHK con un His <sub>6</sub> -tag	Esta tesis
pTrcHisB	Amp <sup>R</sup> . Plásmido para la sobre-expresión de proteínas con un His <sub>6</sub> -tag en <i>E. coli</i>	Invitrogen

pTrcHisB-LovR	Amp <sup>R</sup> . Plásmido para la sobre-expresión de LovR con un His <sub>6</sub> -tag	Esta tesis
pGEM-T Easy	Amp <sup>R</sup> . Plásmido para clonar	Promega
pGEM-PhyR	Amp <sup>R</sup> . Plásmido derivado de pGEM-T Easy con la secuencia de PhyR con un His <sub>6</sub> -tag	Esta tesis
pET24a-PhyR	Km <sup>R</sup> . Plásmido para la sobre-expresión de PhyR con un His <sub>6</sub> -tag	Esta tesis
pGEM-REC-PhyR	Amp <sup>R</sup> . Plásmido derivado de pGEM-T Easy con la secuencia del dominio REC de PhyR con un His <sub>6</sub> -tag	Esta tesis
pET24a-REC-PhyR	Km <sup>R</sup> . Plásmido para la sobre-expresión del dominio REC de PhyR (REC-PhyR) con un His <sub>6</sub> -tag	Esta tesis
PGEM-DivK	Amp <sup>R</sup> . Plásmido derivado de pGEM-T Easy con la secuencia de DivK	Esta tesis
pET24a-DivK	Km <sup>R</sup> . Plásmido para la sobre-expresión de DivK con un His <sub>6</sub> -tag	Esta tesis
pET22b-CPD <sub>Sall</sub>	Amp <sup>R</sup> . Plásmido de expresión con la secuencia de la proteasa CPD	[103]
pET24a-CPD-His <sub>6</sub> -tag	Km <sup>R</sup> . Plásmido de expresión conteniendo la secuencia de la proteasa CPD (Cysteine Protease Domain, de la toxina MARTX de <i>Vibrio cholerae</i> ) y un His <sub>6</sub> -tag	Esta tesis
pET24a-HK-CPD-His <sub>6</sub> -tag	Km <sup>R</sup> . Plásmido para la sobre-expresión de HK-CPD-His <sub>6</sub> -tag	Esta tesis
<b>Ensayo de doble híbrido</b>		
pBT	Cn <sup>R</sup> . 52 bp <i>MCS</i> , tamaño: 3,2 kb, posee el gen <i>lacIq</i> , origen de replicación <i>p15A</i> , <i>lac-UV5</i> , ORF del $\lambda$ cl. 5-10 copias por célula	Stratagene
pTRG	Tet <sup>R</sup> . 60 bp <i>MCS</i> , tamaño: 4,4 kb, posee el gen <i>lacIq</i> , promotor <i>lac-UV5</i> , origen de replicación <i>ColE1</i> , ORF del dominio $\alpha$ de la ARNP ( $\alpha$ -ARNP), 20-30 copias por célula	Stratagene
pBT-LGF2	Plásmido para control de interacción, con la secuencia codificante para el dominio de dimerización del activador transcripcional Gal4 fusionada con $\lambda$ cl	Stratagene
pTRG-Gal11	Plásmido para control de interacción, con la secuencia codificante de un dominio de una mutante de Gal11 fusionada a $\alpha$ -ARNP	Stratagene
pBT-LOVHK	Plásmido derivado de pBT, en el cual la secuencia completa de LOVHK fue clonada en marco con $\lambda$ cl	Esta tesis
pBT-PdhS	Plásmido derivado de pBT, en el cual la secuencia de PdhS fue clonada en marco con $\lambda$ cl	Esta tesis
pTRG-DivK	Plásmido derivado de pTRG en el cual DivK fue clonada en marco con $\alpha$ -ARNP	Esta tesis
pTRG-LovR	Plásmido derivado de pTRG en el cual LovR fue clonada en marco con $\alpha$ -ARNP	Esta tesis
pTRG-MdrR	Plásmido derivado de pTRG en el cual MdrR fue clonada en marco con $\alpha$ -ARNP	Esta tesis
pTRG-OtpR	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de OtpR fue clonado en marco con $\alpha$ -ARNP	Esta tesis
pTRG-PhoB	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de PhoB fue clonado en marco con $\alpha$ -ARNP	Esta tesis
pTRG-FeuP	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de FeuP fue clonado en marco con $\alpha$ -ARNP	Esta tesis

pTRG-CtrA	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de CtrA fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-TccR	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de TccR fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-BvrR	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de BvrR fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-TcbR	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de TcbR fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-TcfR	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de TcfR fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-TceR	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de TceR fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-FtcR	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de FtcR fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-PrIR	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de PrIR fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-TcdR	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de TcdR fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-NodW	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de NodW fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-NtrX	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de NtrX fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	[104]
pTRG-NtrC	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de NtrC fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
<hr/>		
pTRG-StcA	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de StcA fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-PrrA	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de PrrA fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	[128]
pTRG-PleD	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de PleD fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-PhyR	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de PhyR fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
pTRG-BAB1_0806	Plásmido derivado de pTRG en el cual el dominio REC de BAB1_0806 fue clonado en marco con $\alpha$ -ARN	Esta tesis
<hr/>		
<b>Construcción de cepas mutantes y complementada de <i>lovhk::hk</i></b>		
pk18mobsacB	Km <sup>R</sup> . Vector movilizable y suicida en <i>Brucella</i> , conteniendo el marcador de contra-selección sacB	[106]
pk18mobsacB_ΔlovR	Plásmido derivado de pk18mobsacB conteniendo las regiones flanqueantes a <i>lovR</i> para la construcción de la mutante Δ <i>lovR</i>	Esta tesis
pk18mobsacB_ΔphyR	Plásmido derivado de pk18mobsacB conteniendo las regiones flanqueantes de <i>phyR</i> para la construcción de la mutante Δ <i>phyR</i>	Esta tesis
pMR10cat	Cn <sup>R</sup> y Km <sup>R</sup> . Vector de clonado de amplio rango de huésped, con origen de replicación RK2 <i>oriV</i> , de bajo número de copias, derivado del plásmido pMR10, replicativo en <i>Brucella</i>	Cedido por Dr. Xavier De Bolle (C. D. Mohr and R. C. Roberts: datos no publicados)

pMR10 <i>cat_lovhk</i>	Plásmido derivado de pMR10 <i>cat</i> conteniendo al gen <i>lovhk</i> y un fragmento de 581 pb río arriba de <i>lovhk</i> , que permite la expresión de <i>lovhk</i> bajo la regulación de su propio promotor	Esta tesis
<b>Expresión de <i>virB</i></b>		
pBBR1MSC-4	Amp <sup>R</sup> . Vector de clonado de amplio rango de huésped, de número medio de copias, replicativo en <i>Brucella</i>	[143]
pBBR- <i>lacZ</i>	pBBR1MCS-4 con un fragment de 3,5 kb conteniendo el cassette <i>lacZ</i>	Laboratorio
pBBR-prom- <i>virB-lacZ</i>	pBBR- <i>lacZ</i> con un fragment de 456 pb río arriba del operón <i>virB</i> de <i>B. abortus</i>	Esta tesis

## Apéndice 2: Lista de oligonucleótidos empleados en esta tesis

Tabla 8. Lista de oligonucleótidos empleados en esta tesis.

Nombre del oligonucleótidos	Secuencia 5' to 3'	Sitio de Restricción
<b>Clonado de los genes LOVHK y PdhS en pBT para el ensayo de doble híbrido</b>		
Full_LOV_forward	AGAGCGGCCGCAATGGCAATAGATTTAAGGCCATTG	NotI
Full_LOV_reverse	AGACTCGAGTCACGCGATGCGCTGTTCCG	XhoI
PdhS_c-ter_forward	AGAGCGGCCGCGAGGAAAAGCAGGCGCTCG	NotI
PdhS_c-ter_reverse	AGACTCGAGTCAGTCAGCCAGAACGCGG	XhoI
<b>Clonado de los dominios REC de los RRs en pTRG para el ensayo de doble híbrido</b>		
BAB1_0099_forward	AGAGCGGCCGATTGATGAACGATCTGAAACATAGG	NotI
BAB1_0099_reverse	AGACTCGAGTCAGGCGACGCTGGATGAAAA	XhoI
BAB1_0136_forward	AGAGCGGCCGCAATGGAAGACTTGAAGCAGGAAGA	NotI
BAB1_0136_reverse	AGACTCGAGCGCTTGCGGAGGATGCGTTG	XhoI
BAB1_0345_forward	AGAGCGGCCGCAATGCATTTTATTATCGCTGATGA	NotI
BAB1_0345_reverse	AGACTCGAGTCAAACGCCGAGAACGTCGC	XhoI
BAB1_0370_forward	AGAGCGGCCGCAATGACGAATGAATGCAAGATTCCG	NotI
BAB1_0370_reverse	AGACTCGAGCTAAAGTGAAGACAGGCACAGCC	XhoI
BAB1_0628_forward	AGAGCGGCCGATTGCGTATCCTGATTGTTGAAG	NotI
BAB1_0628_reverse	AGACTCGAGTCAGCTGCCGCTCCCTTTTGC	XhoI
BAB1_0636_forward	AGAGCGGCCGCAATGAAAATTCTCGTTATCGAAGATGA	NotI
BAB1_0636_reverse	AGACTCGAGTCATTCCGCCCTTGCGGCAG	XhoI
BAB1_1138_forward	AGAGCGGCCGCAATGGCGGCCGATATTCTTGTT	NotI
BAB1_1138_reverse	AGACTCGAGTTATACGCCGAGAGACTTCAGC	XhoI
BAB1_1140_forward	AGAGCGGCCGCAATGATTGCAGGGCGTCCGAC	NotI
BAB1_1140_reverse	AGACTCGAGCTAACCGCCGGTCTTTGCGC	XhoI
BAB1_1538_forward	AGAGCGGCCGCAATGGGATCGAAAGACGCCAT	NotI
BAB1_1538_reverse	AGACTCGAGCTATTTCGATGCTGAGTTTGTAGCC	XhoI
BAB1_1614_forward	AGAGCGGCCGCAATGCGCGTCCTTTTGATTG	NotI
BAB1_1614_reverse	AGACTCGAGTCAGGCGCTTTTCGCGCATCT	XhoI
BAB1_1671_forward	AGAGCGGCCGCAATGACGTTATCGACGCGTATAGC	NotI
BAB1_1671_reverse	AGACTCGAGTCAGGCAGCAACTTGCGATG	XhoI
BAB1_2006_forward	AGAGCGGCCGCAATGACAGGCCGTAATTCTGATT	NotI
BAB1_2006_reverse	AGACTCGAGTTATGGGACAAGCTTATATCCCC	XhoI

BAB1_2092_forward	AGAGCGGCCGCAATGAAGGAAGCTTCGGCAA	NotI
BAB1_2092_reverse	AGACTCGAGTTACGCTTCCCGAAACGAT	XhoI
BAB1_2146_forward	AGAGCGGCCGCAATGTCCCAAGTACCCCGAA	NotI
BAB1_2146_reverse	AGACTCGAGTCAGCCGAACGAATATCCC	XhoI
BAB2_0041_forward	AGAGCGGCCGCAATGAACTGCGCATATGAACGC	NotI
BAB2_0041_reverse	AGACTCGAGTCAAAGCTCTTTGACCGGTTG	XhoI
BAB2_0042_forward	AGAGCGGCCGCAATGAAGAGAATCCTTCTAGCTGAAGA	NotI
BAB2_0042_reverse	AGACTCGAGTCAGGCGGCGATCAGCATTITTTTC	XhoI
BAB2_0081_forward	AGAGCGGCCGCAATGGCAACGCGCATTCTCAT	NotI
BAB2_0081_reverse	AGACTCGAGCTATATGGCCGCGCGGCCCA	XhoI
BAB2_0222_forward	AGAGCGGCCGCAATGAGAATTATCCTCATCGAAGACG	NotI
BAB2_0222_reverse	AGACTCGAGTCATCGTGCTGCTTTGATTG	XhoI
BAB2_0628_forward	AGAGCGGCCGCAATGACGAAAAGCGTAATGATCG	NotI
BAB2_0628_reverse	AGACTCGAGCTAGGCATCGCCAGATAGG	XhoI
BAB2_0630_forward	AGAGGATTCATGACAGCAAGGATTCTCGTCG	EcoRI
BAB2_0630_reverse	AGACTCGAGTCAGGCCGCGGATAAAACAAT	XhoI
BAB2_0762_forward	AGAGCGGCCGCAATGAAAGAAGACGCCACA	NotI
BAB2_0762_reverse	AGACTCGAGTCATGCTATTTCCACTTCATGC	XhoI
BAB2_0806_forward	AGAGCGGCCGCAATGAATATTTCTCCACAGTTCAAAGATG	NotI
BAB2_0806_reverse	AGACTCGAGCTATTGCAGGTCGGAAAACG	XhoI
BAB2_1099_forward	AGAGCGGCCGCAATGATTGTTGTCGTTGACGACA	NotI
BAB2_1099_reverse	AGACTCGAGTCACTCGATATTGATGCAGTAGCC	XhoI
<b>Verificación del inserto en plásmidos pTRG</b>		
pTRG_forward	TGGCTGAACAACCTGGAAGCT	----
pTRG_reverse	ATTCGTGCCCCGCCATAA	----
<b>Clonado de genes de Brucella abortus para la expresión de proteínas recombinantes</b>		
LOVHK_Full_NheI_Fw	GCGATGGCTAGCGAATTCACGCTTATGCCATG	NheI
LOVHK_Full_XhoI_Rev	GCGCTCGAGACTACCGCTGGCACCAGAGCCGCGATGCGCT GTTCCGGCAC	XhoI
BaLOV_5Dhpt_NheI	TTAGGATCCGCTAGCGTGCAGGATGTAACCGAG	NheI
BaLOV_3CAL_Sall	TTAGGATCCGTCGACCGTGATTGGGGCCAGAACGT	Sall
LovR_FWD_NheI	CGCGCTAGCTTGATGAACGATCTCGAACATAGG	NheI
LovR_REV_XhoI	AGACTCGAGTCAGGCGACGCTGGATGAAAA	XhoI
1671_NdeI_FWD	ATACATATGACGTTATCGACGCGTATA	NdeI
1671_His_Stop_REV	TTAGGATCCTCAATGATGATGATGATGATGGGCAGCAACTTG	----

	CGATG	
PhyR_REC_NdeI_FW	ATACATATGCACCACCACCACCACCAGGTGGCAACACG	NdeI
PhyR_REC_XhoI_REV	TAGCTCGAGTCATGCTTCCTCAAAGAAAAG	XhoI
DivK_F_Myc_NheI	ATGGCTAGCGAACAAAACCTTATTTCTGAAGAAGATCTGACGA AAAGCGTAATG	NheI
DivK_Rev_XhoI	AGACTCGAGGGCATCGCCCAGATAGGACT	XhoI
<b>Construcción de cepas mutantes y complementadas de <i>Brucella abortus</i> 2308</b>		
5LovR_FWD-BamHI	CGCGGATCCACTGGCGCTTTGTCGTGAA	BamHI
5LovR_REV	GGATGAAGATCGTTCATCAATTTTTTCTGCT	----
3LovR_FWD	GAACGATCTTCATCCAGCGTCGCCTGATG	----
3LovR_REV-SalI	CGCGTCGACGTTGCGACCGCGCCCGAT	SalI
ΔBAB1_1671(1)_EcoRI_Fw	TTAGAATTCCTCCTGTTTCGGCTTGGTCGAG	EcoRI
ΔBAB1_1671(2)_BamHI_Rev	GAACGAGGATCCTCCCGATAACGTCATGATTC	BamHI
ΔBAB1_1671(3)_BamHI_Fw	GGAGGATCCTCGTTCGTTGCTGCCTGACG	BamHI
ΔBAB1_1671(4)_PstI_Fw	TATCTGCAGGTGCCCGCTTGTCCCTGACTG	PstI
pMR10_pLOVHK_F	GCCAAGCTTCCATGGGATATCGAGAACCGCACTAACTATTTG TTTTGTC	----
pMR10_pLOVHK_R	CGTAACTTAAGTGCGGCCCCCTCGAGATAGCCATGGCGGTAA TAACGAT	----
<b>Organización de los genes del Sistema GSR</b>		
1669_1670_FW	GTAGAGCACGCAGACATTGC	----
1669_1670_Rev	GGCAATCCGAAAAGCTTGA	----
1670_1671_FW	AGGGATAACGCTGGTAGCAA	----
1670_1671_Rev	TCAGCCAGGCACTTTTCTTT	----
NepR/1672_RT_FW	CGCCTCTATACAGGACGAGACG	----
NepR/1672_RT_Rev	GTCATGCTGACCGATCAGCG	----
1672_1673_FW	CCTCAGAAGCTTCGCCTGA	----
1672_1673_Rev	CGGACAGATGATTTTCAGCAC	----
<b>Ensayos de qRT-PCR</b>		
qPCR_0282_IF1_Fw (2)	TGTTACGGAACTGCTGCCCAAT	----
qPCR_0282_IF1_Rev (2)	CGGCCCTTGGTCAGGTCATAA	----
LOV_bmf_RT_F	CGACGTGACATTGGAGCTTA	----
LOV_bmf_RT_R	AATCAAGCTGGTCCTTGCTG	----
LOVHK_RT_2_F	ACGAGGCTGACGAGGTTATG	----
LOVHK_RT_2_R	GAAATATGCAGGCGGTTCC	----
LovR_bmf_RT_F	GCCGAAATATCTTCGTGGTC	----

LovR_bmf_RT_R	GTATCGGCTTCTGGAAAACC	----
qPCR_1671_Fw (2)	CAGGTGGCAACACGTCTGATGAT	----
qPCR_1671_Rev (2)	GCTGGATATCGGCGAGAACCAT	----
qPCR_1672_Fw (2)	CGACCAGCGTGAGGCAATCAT	----
qPCR_1672_Rev (2)	GCCTCGCCTTCGATCTGGAGAA	----
rpoH1_RT_FW [85]	AGTTCAAGCTGCCGATGAGT	----
rpoH1_RT_REV [85]	CCAGGATGCATAGGTCGAAA	----
dps_RT_FW [85]	ATCTTGCCCTCATCACCAAG	----
dps_RT_REV [85]	CACATGGTCGTCGAGTTCTG	----
<b>Construcción del vector pBBR_prom_LacZ</b>		
pvirbup [111]	GCGGATCCATGACAGGCATATTTCAAC	BamHI
pvirbdown [111]	ATGAATTCGATCGTCTCTTCTCAGA	EcoRI

## Referencias

1. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV (2006) The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 6: 91-99.
2. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL (2007) Human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 7: 775-786.
3. von Barga K, Gorvel JP, Salcedo SP (2012) Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev* 36: 533-562.
4. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E (2005) Brucellosis. *N Engl J Med* 352: 2325-2336.
5. Pappas G (2010) The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int J Antimicrob Agents* 36 Suppl 1: S8-11.
6. Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA, Splitter GA (2004) Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J Bacteriol* 186: 5040-5051.
7. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, et al. (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* 187: 2715-2726.
8. Viadas C, Rodriguez MC, Garcia-Lobo JM, Sangari FJ, Lopez-Goni I (2009) Construction and evaluation of an ORFeome-based *Brucella* whole-genome DNA microarray. *Microb Pathog* 47: 189-195.
9. Wattam AR, Williams KP, Snyder EE, Almeida NF, Jr., Shukla M, et al. (2009) Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J Bacteriol* 191: 3569-3579.
10. Boschioli ML, Foulongne V, O'Callaghan D (2001) Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 4: 58-64.
11. Samartino LE (2002) Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* 90: 71-80.
12. Porte F, Liautard JP, Kohler S (1999) Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 67: 4041-4047.
13. Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, et al. (2003) *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 198: 545-556.
14. Atluri VL, Xavier MN, de Jong MF, den Hartigh AB, Tsolis RM (2011) Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu Rev Microbiol* 65: 523-541.
15. Barbier T, Nicolas C, Letesson JJ (2011) *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS Lett* 585: 2929-2934.
16. Rajashekara G, Glover DA, Krepps M, Splitter GA (2005) Temporal analysis of pathogenic events in virulent and avirulent *Brucella melitensis* infections. *Cell Microbiol* 7: 1459-1473.
17. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J (2008) *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* 9: 678-694.
18. Roop RM, 2nd, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW (2009) Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* 198: 221-238.
19. Moreno E, Moriyon I (2002) *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1-3.
20. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, et al. (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* 6: 618-625.

21. Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckert A, et al. (2002) The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 12375-12380.
22. Lopez-Goni I, Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Moriyon I, et al. (2002) Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. Vet Microbiol 90: 329-339.
23. Martinez-Nunez C, Altamirano-Silva P, Alvarado-Guillen F, Moreno E, Guzman-Verri C, et al. (2010) The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. J Bacteriol 192: 5603-5608.
24. Gee JM, Valderas MW, Kovach ME, Grippe VK, Robertson GT, et al. (2005) The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. Infect Immun 73: 2873-2880.
25. Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig G, Misra H (1991) Superoxide dismutases of virulent and avirulent strains of *Brucella abortus*. Vet Microbiol 26: 359-366.
26. Loisel-Meyer S, Jimenez de Bagues MP, Basseres E, Dornand J, Kohler S, et al. (2006) Requirement of norD for *Brucella suis* virulence in a murine model of in vitro and in vivo infection. Infect Immun 74: 1973-1976.
27. Fretin D, Fauconnier A, Kohler S, Halling S, Leonard S, et al. (2005) The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. Cell Microbiol 7: 687-698.
28. Delrue RM, Lestrade P, Tibor A, Letesson JJ, De Bolle X (2004) *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. FEMS Microbiol Lett 231: 1-12.
29. Rambow-Larsen AA, Petersen EM, Gourley CR, Splitter GA (2009) *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. Trends Microbiol 17: 371-377.
30. de Jong MF, Tsolis RM (2012) Brucellosis and type IV secretion. Future Microbiol 7: 47-58.
31. Lacerda TL, Salcedo SP, Gorvel JP (2013) *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. Curr Opin Microbiol 16: 45-51.
32. Dohmer PH, Valguarnera E, Czibener C, Ugalde JE (2014) Identification of a type IV secretion substrate of *Brucella abortus* that participates in the early stages of intracellular survival. Cell Microbiol 16: 396-410.
33. de Barsy M, Jamet A, Filopon D, Nicolas C, Laloux G, et al. (2011) Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. Cell Microbiol 13: 1044-1058.
34. de Jong MF, Sun YH, den Hartigh AB, van Dijl JM, Tsolis RM (2008) Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. Mol Microbiol 70: 1378-1396.
35. Marchesini MI, Herrmann CK, Salcedo SP, Gorvel JP, Comerci DJ (2011) In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. Cell Microbiol 13: 1261-1274.
36. Sieira R (2013) Regulation of virulence in *Brucella*: an eclectic repertoire of transcription factors defines the complex architecture of the virB promoter. Future Microbiol 8: 1193-1208.
37. Sieira R, Comerci DJ, Sanchez DO, Ugalde RA (2000) A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. J Bacteriol 182: 4849-4855.
38. Taylor BL, Zhulin IB (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. Microbiol Mol Biol Rev 63: 479-506.
39. Henry JT, Crosson S (2011) Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. Annu Rev Microbiol 65: 261-286.

40. Moglich A, Ayers RA, Moffat K (2009) Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* 17: 1282-1294.
41. Krauss U, Minh BQ, Losi A, Gartner W, Eggert T, et al. (2009) Distribution and phylogeny of light-oxygen-voltage-blue-light-signaling proteins in the three kingdoms of life. *J Bacteriol* 191: 7234-7242.
42. Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U, Briggs WR (2000) Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* 39: 9401-9410.
43. Crosson S, Moffat K (2001) Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2995-3000.
44. Crosson S, Rajagopal S, Moffat K (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42: 2-10.
45. Briggs WR (2007) The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors. *J Biomed Sci* 14: 499-504.
46. Christie JM (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* 58: 21-45.
47. Harper SM, Neil LC, Gardner KH (2003) Structural basis of a phototropin light switch. *Science* 301: 1541-1544.
48. Herrou J, Crosson S (2011) Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nat Rev Microbiol* 9: 713-723.
49. Gomelsky M, Hoff WD (2011) Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends Microbiol* 19: 441-448.
50. Purcell EB, Crosson S (2008) Photoregulation in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 11: 168-178.
51. van der Horst MA, Key J, Hellingwerf KJ (2007) Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too. *Trends Microbiol* 15: 554-562.
52. Elias-Arnanz M, Padmanabhan S, Murillo FJ (2011) Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 14: 128-135.
53. Karniol B, Vierstra RD (2004) The HWE histidine kinases, a new family of bacterial two-component sensor kinases with potentially diverse roles in environmental signaling. *J Bacteriol* 186: 445-453.
54. Swartz TE, Tseng TS, Frederickson MA, Paris G, Comerchi DJ, et al. (2007) Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* 317: 1090-1093.
55. Rinaldi J, Gallo M, Klinke S, Paris G, Bonomi HR, et al. (2012) The beta-scaffold of the LOV domain of the *Brucella* light-activated histidine kinase is a key element for signal transduction. *J Mol Biol* 420: 112-127.
56. Gourley CR, Petersen E, Harms J, Splitter G (2014) Decreased in vivo virulence and altered gene expression by a *Brucella melitensis* light-sensing histidine kinase mutant. *Pathog Dis*.
57. Kim HS, Willett JW, Jain-Gupta N, Fiebig A, Crosson S (2014) The *Brucella abortus* virulence regulator, LovhK, is a sensor kinase in the general stress response signalling pathway. *Mol Microbiol* 94: 913-925.
58. Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* 13: 52-56.
59. Gao R, Stock AM (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* 63: 133-154.
60. Casino P, Rubio V, Marina A (2010) The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr Opin Struct Biol* 20: 763-771.
61. Galperin MY (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* 188: 4169-4182.
62. Galperin MY (2010) Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* 13: 150-159.

63. Jenal U, Galperin MY (2009) Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamics. *Curr Opin Microbiol* 12: 152-160.
64. Laub MT, Goulian M (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* 41: 121-145.
65. Laub MT, Biondi EG, Skerker JM (2007) Phosphotransfer profiling: systematic mapping of two-component signal transduction pathways and phosphorelays. *Methods Enzymol* 423: 531-548.
66. Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jimenez H, Guazzaroni ME, et al. (2010) Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* 64: 539-559.
67. Huynh TN, Stewart V (2011) Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity. *Mol Microbiol* 82: 275-286.
68. Staron A, Sofia HJ, Dietrich S, Ulrich LE, Liesegang H, et al. (2009) The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol Microbiol* 74: 557-581.
69. Helmann JD (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* 46: 47-110.
70. Paget MS, Leibovitz E, Buttner MJ (1999) A putative two-component signal transduction system regulates sigmaE, a sigma factor required for normal cell wall integrity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 33: 97-107.
71. Staron A, Mascher T (2010) General stress response in alpha-proteobacteria: PhyR and beyond. *Mol Microbiol* 78: 271-277.
72. Gourion B, Francez-Charlot A, Vorholt JA (2008) PhyR is involved in the general stress response of *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol* 190: 1027-1035.
73. Francez-Charlot A, Frunzke J, Reichen C, Ebnetter JZ, Gourion B, et al. (2009) Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3467-3472.
74. Gourion B, Sulser S, Frunzke J, Francez-Charlot A, Stiefel P, et al. (2009) The PhyR-sigma(EcfG) signalling cascade is involved in stress response and symbiotic efficiency in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Microbiol* 73: 291-305.
75. Lourenco RF, Kohler C, Gomes SL (2011) A two-component system, an anti-sigma factor and two paralogous ECF sigma factors are involved in the control of general stress response in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 80: 1598-1612.
76. Alvarez-Martinez CE, Lourenco RF, Baldini RL, Laub MT, Gomes SL (2007) The ECF sigma factor sigma(T) is involved in osmotic and oxidative stress responses in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 66: 1240-1255.
77. Herrou J, Foreman R, Fiebig A, Crosson S (2010) A structural model of anti-anti-sigma inhibition by a two-component receiver domain: the PhyR stress response regulator. *Mol Microbiol* 78: 290-304.
78. Kaczmarczyk A, Campagne S, Danza F, Metzger LC, Vorholt JA, et al. (2011) Role of *Sphingomonas* sp. strain Fr1 PhyR-NepR-sigmaEcfG cascade in general stress response and identification of a negative regulator of PhyR. *J Bacteriol* 193: 6629-6638.
79. Bastiat B, Sauviac L, Bruand C (2010) Dual control of *Sinorhizobium meliloti* RpoE2 sigma factor activity by two PhyR-type two-component response regulators. *J Bacteriol* 192: 2255-2265.
80. Sauviac L, Philippe H, Phok K, Bruand C (2007) An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 189: 4204-4216.
81. Abromaitis S, Koehler JE (2013) The *Bartonella quintana* extracytoplasmic function sigma factor RpoE has a role in bacterial adaptation to the arthropod vector environment. *J Bacteriol* 195: 2662-2674.

82. Iguchi H, Sato I, Yurimoto H, Sakai Y (2013) Stress resistance and C1 metabolism involved in plant colonization of a methanotroph *Methylosinus* sp. B4S. Arch Microbiol 195: 717-726.
83. Jans A, Vercruyse M, Gao S, Engelen K, Lambrichts I, et al. (2013) Canonical and non-canonical EcfG sigma factors control the general stress response in *Rhizobium etli*. Microbiologyopen 2: 976-987.
84. Kulkarni G, Wu CH, Newman DK (2013) The general stress response factor EcfG regulates expression of the C-2 hopanoid methylase HpnP in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. J Bacteriol 195: 2490-2498.
85. Kim HS, Caswell CC, Foreman R, Roop RM, 2nd, Crosson S (2013) The *Brucella abortus* general stress response system regulates chronic mammalian infection and is controlled by phosphorylation and proteolysis. J Biol Chem 288: 13906-13916.
86. Gourion B, Rossignol M, Vorholt JA (2006) A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 13186-13191.
87. Herrou J, Rotskoff G, Luo Y, Roux B, Crosson S (2012) Structural basis of a protein partner switch that regulates the general stress response of alpha-proteobacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 109: E1415-1423.
88. Campagne S, Damberger FF, Kaczmarczyk A, Francez-Charlot A, Allain FH, et al. (2012) Structural basis for sigma factor mimicry in the general stress response of Alphaproteobacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 109: E1405-1414.
89. Francez-Charlot A, Kaczmarczyk A, Fischer HM, Vorholt JA (2015) The general stress response in Alphaproteobacteria. Trends Microbiol 23: 164-171.
90. Sauviac L, Bruand C (2014) A putative bifunctional histidine kinase/phosphatase of the HWE family exerts positive and negative control on the *Sinorhizobium meliloti* general stress response. J Bacteriol.
91. Avila-Perez M, Hellingwerf KJ, Kort R (2006) Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA. J Bacteriol 188: 6411-6414.
92. Ondrusch N, Kreft J (2011) Blue and red light modulates SigB-dependent gene transcription, swimming motility and invasiveness in *Listeria monocytogenes*. PLoS One 6: e16151.
93. Hecker M, Pane-Farre J, Volker U (2007) SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. Annu Rev Microbiol 61: 215-236.
94. Foreman R, Fiebig A, Crosson S (2012) The LovK-LovR two-component system is a regulator of the general stress pathway in *Caulobacter crescentus*. J Bacteriol 194: 3038-3049.
95. Correa F, Ko WH, Ocasio V, Bogomolni RA, Gardner KH (2013) Blue light regulated two-component systems: enzymatic and functional analyses of light-oxygen-voltage (LOV)-histidine kinases and downstream response regulators. Biochemistry 52: 4656-4666.
96. Purcell EB, Siegal-Gaskins D, Rawling DC, Fiebig A, Crosson S (2007) A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 18241-18246.
97. Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif 41: 207-234.
98. Chain PS, Comerci DJ, Tolmasky ME, Larimer FW, Malfatti SA, et al. (2005) Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae. Infect Immun 73: 8353-8361.
99. Rouot B, Alvarez-Martinez MT, Marius C, Menanteau P, Guilloteau L, et al. (2003) Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. Infect Immun 71: 1075-1082.
100. Hallez R, Mignolet J, Van Mullem V, Wery M, Vandenhoute J, et al. (2007) The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in *Brucella abortus*. EMBO J 26: 1444-1455.

101. Dove SL, Joung JK, Hochschild A (1997) Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* 386: 627-630.
102. Deighan P, Diez CM, Leibman M, Hochschild A, Nickels BE (2008) The bacteriophage lambda Q antiterminator protein contacts the beta-flap domain of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15305-15310.
103. Shen A, Lupardus PJ, Morell M, Ponder EL, Sadaghiani AM, et al. (2009) Simplified, enhanced protein purification using an inducible, autoprocessing enzyme tag. *PLoS One* 4: e8119.
104. Carrica Mdel C, Fernandez I, Marti MA, Paris G, Goldbaum FA (2012) The NtrY/X two-component system of *Brucella* spp. acts as a redox sensor and regulates the expression of nitrogen respiration enzymes. *Mol Microbiol* 85: 39-50.
105. Gasteiger E. HC, Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. In: Walker JM, editor: Humana Press. pp. 571-607.
106. Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, et al. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145: 69-73.
107. Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, Peleg Y (2010) Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J Struct Biol* 172: 34-44.
108. Eskra L, Canavessi A, Carey M, Splitter G (2001) *Brucella abortus* genes identified following constitutive growth and macrophage infection. *Infect Immun* 69: 7736-7742.
109. Arocena GM, Zorreguieta A, Sieira R (2012) Expression of VjbR under nutrient limitation conditions is regulated at the post-transcriptional level by specific acidic pH values and urocanic acid. *PLoS One* 7: e35394.
110. Bonomi HR, Marchesini MI, Klinke S, Ugalde JE, Zylberman V, et al. (2010) An atypical riboflavin pathway is essential for *Brucella abortus* virulence. *PLoS One* 5: e9435.
111. Sieira R, Comerchi DJ, Pietrasanta LI, Ugalde RA (2004) Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus* virB operon. *Mol Microbiol* 54: 808-822.
112. Kabsch W (2010) Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 125-132.
113. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, et al. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67: 235-242.
114. Navaza J (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 1367-1372.
115. Bricogne G. BE, Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P, Sharff A., Smart O.S., Vonrhein C., Womack T.O. (2011) BUSTER version X.Y.Z.: Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.
116. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 486-501.
117. Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, et al. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 12-21.
118. Cao Z, Buttani V, Losi A, Gartner W (2008) A blue light inducible two-component signal transduction system in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Biophys J* 94: 897-905.
119. Liu W, Dong H, Gao X, Zhang C, Wu Q (2012) OtpR regulated the growth, cell morphology of *B. melitensis* and tolerance to beta-lactam agents. *Vet Microbiol* 159: 90-98.
120. Zhang X, Ren J, Li N, Liu W, Wu Q (2009) Disruption of the BMEI0066 gene attenuates the virulence of *Brucella melitensis* and decreases its stress tolerance. *Int J Biol Sci* 5: 570-577.

121. Dorrell N, Spencer S, Foulonge V, Guigue-Talet P, O'Callaghan D, et al. (1998) Identification, cloning and initial characterisation of FeuPQ in *Brucella suis*: a new sub-family of two-component regulatory systems. FEMS Microbiol Lett 162: 143-150.
122. Bellefontaine AF, Pierreux CE, Mertens P, Vandenhaute J, Letesson JJ, et al. (2002) Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. Mol Microbiol 43: 945-960.
123. Sola-Landa A, Pizarro-Cerda J, Grillo MJ, Moreno E, Moriyon I, et al. (1998) A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. Mol Microbiol 29: 125-138.
124. Li Z, Fu Q, Wang Z, Li T, Zhang H, et al. (2015) TceSR two-component regulatory system of *Brucella melitensis* 16M is involved in invasion, intracellular survival and regulated cytotoxicity for macrophages. Lett Appl Microbiol.
125. Leonard S, Ferooz J, Haine V, Danese I, Fretin D, et al. (2007) FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in Rhizobiaceae. J Bacteriol 189: 131-141.
126. Mirabella A, Yanez Villanueva RM, Delrue RM, Uzureau S, Zygmunt MS, et al. (2012) The two-component system PrLS/PrLR of *Brucella melitensis* is required for persistence in mice and appears to respond to ionic strength. Microbiology 158: 2642-2651.
127. Dorrell N, Guigue-Talet P, Spencer S, Foulonge V, O'Callaghan D, et al. (1999) Investigation into the role of the response regulator NtrC in the metabolism and virulence of *Brucella suis*. Microb Pathog 27: 1-11.
128. Carrica Mdel C, Fernandez I, Sieira R, Paris G, Goldbaum FA (2013) The two-component systems PrrBA and NtrYX co-ordinately regulate the adaptation of *Brucella abortus* to an oxygen-limited environment. Mol Microbiol 88: 222-233.
129. Abdou E, Deredjian A, Jimenez de Bagues MP, Kohler S, Jubier-Maurin V (2013) RegA, the regulator of the two-component system RegB/RegA of *Brucella suis*, is a controller of both oxidative respiration and denitrification required for chronic infection in mice. Infect Immun 81: 2053-2061.
130. Correa F, Ko WH, Ocasio V, Bogomolni RA, Gardner KH (2013) Blue Light Regulated Two-Component Systems: Enzymatic and Functional Analyses of Light-Oxygen-Voltage (LOV)-Histidine Kinases and Downstream Response Regulators. Biochemistry.
131. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, et al. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol 7: 539.
132. Price CW (2011) General stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria. In: Storz G, Hengge R, editors. Bacterial Stress Response, 2nd Ed. Second ed. Washington D.C.: ASM Press. pp. 301-318.
133. Peterson CN, Mandel MJ, Silhavy TJ (2005) Escherichia coli starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly. J Bacteriol 187: 7549-7553.
134. Van der Henst C, Beaufay F, Mignolet J, Didembourg C, Colinet J, et al. (2012) The histidine kinase PdhS controls cell cycle progression of the pathogenic alphaproteobacterium *Brucella abortus*. J Bacteriol 194: 5305-5314.
135. Delory M, Hallez R, Letesson JJ, De Bolle X (2006) An RpoH-like heat shock sigma factor is involved in stress response and virulence in *Brucella melitensis* 16M. J Bacteriol 188: 7707-7710.
136. Slabinski L, Jaroszewski L, Rychlewski L, Wilson IA, Lesley SA, et al. (2007) XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. Bioinformatics 23: 3403-3405.
137. Thomas SA, Brewster JA, Bourret RB (2008) Two variable active site residues modulate response regulator phosphoryl group stability. Mol Microbiol 69: 453-465.

138. Pazy Y, Wollish AC, Thomas SA, Miller PJ, Collins EJ, et al. (2009) Matching biochemical reaction kinetics to the timescales of life: structural determinants that influence the autodephosphorylation rate of response regulator proteins. *J Mol Biol* 392: 1205-1220.
139. Ferooz J, Lemaire J, Delory M, De Bolle X, Letesson JJ (2011) RpoE1, an extracytoplasmic function sigma factor, is a repressor of the flagellar system in *Brucella melitensis*. *Microbiology* 157: 1263-1268.
140. Metzger LC, Francez-Charlot A, Vorholt JA (2013) Single-domain response regulator involved in the general stress response of *Methylobacterium extorquens*. *Microbiology* 159: 1067-1076.
141. Kaczmarczyk A, Hochstrasser R, Vorholt JA, Francez-Charlot A (2014) Complex two-component signaling regulates the general stress response in Alphaproteobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E5196-5204.
142. Purcell EB, McDonald CA, Palfey BA, Crosson S (2010) An analysis of the solution structure and signaling mechanism of LovK, a sensor histidine kinase integrating light and redox signals. *Biochemistry* 49: 6761-6770.
143. Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, 2nd, Peterson KM (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16: 800-802.