



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**Interacción de *Brucella* con el hospedador:  
adhesión y biogénesis de la envoltura celular**

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

**Magalí Graciela Bialer**

Director de Tesis: Dra. Angeles Zorreguieta

Consejero de estudios: Dra. M. Julia Pettinari

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET

Buenos Aires, 25 de marzo 2019

*“Lo que tú haces marca una diferencia,  
así que tienes que decidir  
qué tipo de diferencia quieres marcar en el mundo”*

*Jane Goodall*

## Agradecimientos

Quiero agradecer a todos los que fueron parte de este camino que fue el doctorado.

A la FCEyN por haberme formado en esta maravillosa disciplina. A la FIL por haber sido un lugar de crecimiento constante para mí todos estos años. Al CONICET por las becas otorgadas y la ANPCyT por los subsidios para poder trabajar.

A Angeles por brindarme la posibilidad de trabajar en su laboratorio, por confiar en mí y por enseñarme y alentarme siempre.

A los miembros de mi comité de seguimiento de tesis: Dr. Armando Parodi, Dra. Juliana Cassataro y Dra. Jimena Rinaldi, por haber acompañado este proceso durante los 5 años aportando grandes ideas y consejos.

A todos los miembros del Lab 204 (ex y presentes): Gaby, Rodri, Juli, Dani, Lila, Walter, Pato, Piku, Carol, por compartir el día a día, la buena onda, ayudarme en todo y enseñarme siempre algo nuevo. Especialmente a Piku que fue quien me enseñó a trabajar con *Brucella* y me brindó todo su conocimiento y su apoyo durante los primeros años.

Al personal de FIL: las chicas del lavadero, la gente de limpieza, mantenimiento, droguero, administración, biblioteca y soporte informático. Hacen que la labor diaria sea mucho más fácil y agradable.

A todos mis amigos de la facultad, FIL y la vida. Gracias a cada uno por estar siempre y haber sido cada uno a su modo parte de esto.

A mi familia, por su amor incondicional. A mis hermanos y los sobrinos hermosos que me han dado, por estar siempre conmigo a pesar de la distancia. A mi mamá y mi papá porque sin ellos nada de esto hubiese sido posible, siempre me apoyan en todo lo que haga y me alientan a seguir el camino que desee. Son mi ejemplo en la vida. Gracias infinitas por tanto.

Parte del trabajo presentado en esta tesis fue publicado en el siguiente trabajo:

**“MapB, the Brucella suis TamB homologue, is involved in cell envelope biogenesis, cell division and virulence”**

Autores: **Bialer MG**, Ruiz-Ranwez V, Sycz G, Estein SM, Russo DM, Altabe S, Sieira R, Zorreguieta A.

Revista: Scientific Reports

Fecha de publicación: 15 de febrero de 2019

doi: 10.1038/s41598-018-37668-3.

## Interacción de *Brucella* con el hospedador: adhesión y biogénesis de la envoltura celular

Las bacterias del género *Brucella* son organismos Gram negativos, patógenos intracelulares facultativos responsables de una zoonosis denominada Brucelosis. La envoltura de *Brucella* exhibe características únicas que hacen que estas bacterias sean patógenos furtivos y resistentes a compuestos de defensa del hospedador. *Brucella* se caracteriza por presentar tropismo a diversos tejidos y es capaz de replicar en múltiples tipos celulares. Previo a la invasión la bacteria debe ser capaz de adherirse a la célula hospedadora. Mediante estudios filogenéticos en *B. suis* 1330 se identificaron diversas proteínas que podrían cumplir una función en la adhesión al hospedador. Dentro de éstas, BmaA y BmaB pertenecen a la familia de autotransportadores (AT) monoméricos. Análisis bioinformáticos de los ortólogos de BmaA y BmaB en los genomas de numerosas cepas de *B. suis*, *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* mostraron gran variabilidad. Más aún, BmaA y BmaB serían pseudogenes en varias cepas de *B. abortus* y *B. melitensis*, indicando que estas adhesinas contribuirían a la preferencia de hospedador o al tropismo a determinados tejidos. Se demostró que BmaA y BmaB en *B. suis* son proteínas funcionales que participan en la adhesión a distintos tipos celulares y a componentes de la matriz extracelular del hospedador. Por inmunofluorescencia se observó que BmaB se localiza en el polo nuevo generado luego de la división asimétrica de *Brucella*, apoyando la hipótesis que en *Brucella* dicho polo estaría funcionalmente diferenciado para la adhesión.

Otro de los candidatos estudiados, denominado MapB, no tuvo función de adhesina, sino que cumpliría un rol crucial en la integridad de la envoltura celular. En efecto, la resistencia típica de *Brucella* tanto a la lisozima como a polimixina B se redujo marcadamente en la mutante  $\Delta mapB$ . MapB resultó ser un homólogo lejano de TamB. Esta proteína junto con TamA forman un complejo que participaría en la translocación de ATs a través de la ME. En línea con esta observación, MapB fue requerida para el ensamblaje en la ME de BmaB, ya que la mayor parte del AT se acumuló en el periplasma de  $\Delta mapB$ . La evaluación de otras proteínas de ME (OMPs) indicó que la ausencia de MapB no condujo a una alteración generalizada de OMPs, sino a una reducción en la abundancia de un subconjunto de OMPs, incluyendo miembros de la familia Omp25/31. Mediante microscopía electrónica se observó que las células  $\Delta mapB$  presentan anomalías en la morfología celular, lo que indica que la ausencia de MapB altera la división celular. Finalmente, las células  $\Delta mapB$  mostraron estar comprometidas en la invasión o supervivencia inicial en macrófagos y un fenotipo de virulencia atenuado en el modelo murino. En conjunto, nuestros resultados indican que el rol de MapB no se limita a la translocación e inserción de algunas proteínas en la ME, sino que es esencial para la estabilidad de la ME y participa en la biogénesis de la envoltura celular, un proceso que está inherentemente coordinado con la división celular.

**Palabras clave:** *Brucella* - virulencia - autotransportadores - adhesión - TAM - biogénesis de la envoltura celular - división celular

**Interaction of *Brucella* with the host: adhesion and biogenesis of the cell envelope**

Bacteria of the genus *Brucella* are gram-negative, facultative, intracellular pathogens responsible for a zoonosis called Brucellosis. *Brucella*'s cell envelope exhibits unique characteristics that make these bacteria furtive pathogens and resistant to various host defense compounds. *Brucella* is characterized by its tropism to various tissues and is capable of replicating in several cell types. Before invasion the bacterium must be able to adhere to the host cell. Through phylogenetic studies in *B. suis* 1330, several proteins that could play a role in host adhesion were identified. From these candidate proteins, BmaA and BmaB were found to belong to the family of monomeric autotransporters (AT). Bioinformatic analyzes of BmaA and BmaB orthologs in the genomes of numerous strains of *B. suis*, *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* showed great variability. Moreover, BmaA and BmaB would be pseudogenes in several strains of *B. abortus* and *B. melitensis*, indicating that these adhesins would contribute to host preference or tropism to certain tissues. It was demonstrated that BmaA and BmaB in *B. suis* are functional proteins that participate in the adhesion to different cell types and components of the host extracellular matrix. Additionally, BmaB was detected by immunofluorescence at the new pole generated after the asymmetric division of *Brucella*. This observation supports the hypothesis that in *Brucella* this pole would be functionally differentiated for adhesion.

Another of the candidates studied, called MapB, did not show adhesin function, but appeared to be crucial for cell envelope integrity. Indeed, the typical resistance of *Brucella* to both lysozyme and polymyxin B was markedly reduced in the  $\Delta mapB$  mutant. MapB turned out to represent a TamB ortholog. This last protein, together with TamA, a protein belonging to the Omp85 family, form a complex that has been proposed to participate in the translocation of AT proteins through the outer membrane (OM). Accordingly, it was observed that MapB is required for the proper assembly of BmaB in the OM, as most of the AT accumulated in the mutant cell periplasm. Both assessment of the relative amounts of other specific outer membrane proteins (OMPs) and a proteomic approach indicated that the absence of MapB did not lead to an extensive alteration in OMP abundance, but to a reduction in the relative amounts of a protein subset, including proteins from the Omp25/31 family. Electron microscopy revealed that  $\Delta mapB$  cells exhibit multiple anomalies in cell morphology, indicating that the absence of the TamB homologue in *B. suis* severely affects cell division. Finally,  $\Delta mapB$  cells were impaired in macrophage infection and showed an attenuated virulence phenotype in the mouse model. Collectively, our results indicate that the role of *B. suis* TamB homologue is not restricted to participate in the translocation of ATs across the OM but that it is essential for OM stability and protein composition and that it is involved in cell envelope biogenesis, a process that is inherently coordinated with cell division.

**Key words: *Brucella* - virulence - autotransporters - adhesion - TAM - cell envelope biogenesis - cell division**

# Índice

<b>Introducción.....</b>	<b>1-23</b>
1. Historia.....	1
2. Brucelosis en humanos y animales .....	1
Vacunación, prevención y prevalencia.....	3
3. <i>Brucella</i> spp. ....	6
4. Replicación intracelular .....	8
5. División celular asimétrica .....	9
6. Envoltura de Gram negativas y particularidades en <i>Brucella</i> .....	10
7. Biogénesis de la ME en bacterias Gram negativas: sistemas BAM y TAM .....	13
8. Adhesión al hospedador.....	16
9. Autotransportadores: sistema de secreción tipo V .....	17
10. Adhesinas y autotransportadores en <i>Brucella</i> .....	20
<b>Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>24-25</b>
<b>Resultados Capítulo I: Caracterización de los autotransportadores monoméricos BmaA y BmaB .....</b>	<b>26-44</b>
I.1. Descripción de los dominios proteicos.....	26
I.2. Funcionalidad de los ATIs en <i>Brucella</i> spp: análisis de pseudogenes <i>in silico</i> .....	28
I.3. Análisis de la expresión por RT-PCR .....	33
I.4. Generación de cepas mutantes.....	34
I.5. Funcionalidad de las adhesinas monoméricas BmaA, BmaB y BmaC.....	36
I.6. BmaA y BmaB no están involucradas en la adhesión a soportes abióticos .....	39
I.7. BmaA y BmaB están involucradas en la adhesión a la ECM .....	41
I.8. Resistencia a suero porcino .....	44
I.9. Localización subcelular .....	45
<b>Discusión - Capítulo I.....</b>	<b>48-56</b>
Pseudogenes y especiación.....	48
Funcionalidad.....	51
Resistencia a suero.....	54
Localización .....	55

<b>Resultados Capítulo II: Identificación de un sistema involucrado en la biogénesis de la envoltura celular de <i>B. suis</i></b> .....	<b>57-82</b>
II.1. Organización de dominios de BR0049* de <i>B. suis</i> .....	57
II.2. Expresión y localización subcelular .....	59
II.3. Análisis de la organización genómica .....	60
II.4. Fenotipos asociados a envoltura celular de una mutante en el gen de BR0049* .....	62
II.5. La mutante $\Delta mapB$ no es una cepa rugosa.....	66
II.6. El LPS de la mutante $\Delta mapB$ no presenta mayores alteraciones .....	67
II.7. Evaluación de la función de MapB en la translocación de proteínas de membrana ...	70
II.8. Efecto de la ausencia de MapB en la morfología celular .....	78
II.9. Análisis proteómico de las OMVs .....	80
II.10. Función de MapB: replicación intracelular en macrófagos y virulencia en ratón .....	81
<b>Discusión - Capítulo II</b> .....	<b>83-90</b>
Envoltura celular.....	83
División celular .....	87
Relaciones evolutivas.....	89
Virulencia .....	90
<b>Conclusiones finales</b> .....	<b>91</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>92-114</b>
1. Cepas bacterianas y medios .....	92
1.1. Medios de cultivo .....	92
1.2. Antibióticos.....	93
1.3. Conservación de las cepas .....	93
2. Aislamiento, purificación y manipulación del ADN .....	93
2.1. Procedimientos generales.....	93
2.2. Preparación de ADN cromosómico de <i>Brucella</i> .....	94
2.3. Preparación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	94
2.4. Secuenciación del ADN .....	95
2.5. Geles de agarosa.....	95
3. Transformación genética bacteriana.....	95
3.1. Preparación de <i>E. coli</i> competentes por shock térmico y transformación .....	95
3.2. Preparación de <i>E. coli</i> electrocompetentes y transformación.....	96
3.3. Preparación de <i>B. suis</i> electrocompetentes y transformación.....	97



3.4. Conjugación biparental en placa .....	97
4. Amplificación de secuencias mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) .	98
4.1. <i>Colony</i> -PCR.....	98
5. Construcción de cepas mutantes y complementadas .....	99
5.1. Cepas mutantes .....	99
5.2. Cepas complementadas .....	100
5.3. Etiquetado de la cepa MapB-3XFLAG .....	100
6. Aislamiento de ARN de <i>Brucella</i> , síntesis de ADNc y RT-PCR.....	101
6.1. Aislamiento de ARN de <i>Brucella</i> .....	101
6.2. Degradación de ADN genómico .....	101
6.3. Síntesis de ADNc y RT-PCR.....	102
7. Tolerancia a compuestos .....	102
8. Resistencia al complemento presente en el suero.....	103
9. Test de disociación.....	103
10. Preparación y análisis de LPS.....	103
11. Extracción de lípidos totales .....	104
12. Preparación y análisis de proteínas .....	104
12.1. Extractos de proteínas totales .....	104
12.2. Extractos de membranas totales.....	104
12.3. Fraccionamiento subcelular: protoplastos y ME+periplasma .....	105
12.4. Purificación de proteínas asociadas a OMVs .....	106
13. Electroforesis de proteínas y tinciones .....	106
14. Western blot .....	107
15. Análisis proteómico .....	108
16. Microscopía.....	109
16.1. Microscopía electrónica .....	109
16.2. Microscopía confocal .....	110
17. Ensayos de adhesión .....	110
17.1. Adhesión a superficies abióticas ( <i>biofilm</i> ).....	110
17.2. Adhesión a componentes de la matriz extracelular .....	111
17.3. Adhesión a células eucariotas en cultivo .....	111
18. Infección en ratones BALB/c .....	113
19. Análisis bioinformático.....	113
20. Análisis estadístico .....	114

<b>Anexo de Tablas</b> .....	<b>115-120</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>121-122</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>123-136</b>

## Introducción

### 1. Historia

Las bacterias del género *Brucella* fueron aisladas por primera vez en 1887 por David Bruce. En la Isla de Malta, Bruce identificó una enfermedad que causaba altas temperaturas en los enfermos, que se elevaban a 41 grados centígrados durante la noche y se estabilizaban durante el día. Este cuadro febril duraba semanas e incluso meses, y en ocasiones con desenlaces fatales. Bruce aisló un microorganismo de las muestras de bazo, hígados y riñones de los muertos al cual denominó *Micrococcus melitensis*. Para probar si efectivamente este microorganismo era el agente causal de la denominada Fiebre de Malta, infectó monos con el organismo crecido en cultivo. Siete monos fueron infectados, cuatro murieron, mientras que los tres restantes sobrevivieron pero tuvieron fiebre ondulante que imitaba a lo ocurrido en humanos. Bruce luego estudió muestras de tejido de los monos que murieron y los mismos micrococcos crecieron con éxito. El reservorio del agente causal no fue descubierto hasta 1905, cuando se lo aisló de orina y leche de cabras aparentemente sanas. Cuando se suspendió el consumo de leche cruda de cabra, la incidencia de la enfermedad descendió en forma brusca. La bacteria aislada fue luego rebautizada con el nombre de *Brucella melitensis* en honor a su descubridor. El segundo microorganismo del grupo fue aislado de ganado que padecía de aborto infeccioso por Bang en Dinamarca en 1897 (enfermedad de Bang). Este microorganismo inicialmente se denominó *Bacillus abortus*. El tercer miembro del grupo fue cultivado a partir del feto de una cerda expulsado prematuramente (*Bacillus suis*) en EE.UU. en 1914. En 1920 Evans reconoció que los tres microorganismos estaban estrechamente emparentados y los incluyó en un género aparte, denominado *Brucella*.

### 2. Brucelosis en humanos y animales

Las bacterias del género *Brucella* son cocobacilos Gram negativos, responsables de una zoonosis denominada Brucelosis, una enfermedad caracterizada por infecciones crónicas, abortos e infertilidad en animales, además de enormes pérdidas económicas a nivel productivo. En los animales, *Brucella* causa infecciones generalizadas, seguidas por una localización de la bacteria en órganos reproductivos y en el sistema retículo-endotelial. La fuente de infección la constituyen los animales infectados ya que excretan una gran

cantidad de bacterias junto con los tejidos y productos de los abortos, en la leche, y en menor medida en las secreciones genitales y orina. De este modo, los animales enfermos contaminan el ambiente diseminando al microorganismo [1]. Además de las especies de interés económico que son susceptibles a la brucelosis, también existen reservorios en animales salvajes [2]. La incidencia en este último grupo se ha ido incrementando en los últimos años [3], y su relevancia radica en que son una importante fuente de reinfección hacia el ganado [4, 5]. La amplia variedad de hospedadores para cada especie del género *Brucella*, así como la importante diversidad de especies dentro del mismo complica la erradicación de esta enfermedad.

En humanos, la infección puede deberse al consumo de alimentos contaminados y crudos (por ejemplo leche y otros derivados de lácteos, no pasteurizados), por exposición a animales infectados, muestras de los mismos (por ejemplo sangre, placenta, fetos, secreciones uterinas, orina), entre otras. Las bacterias pueden ingresar al organismo vía cortes o abrasiones, por vía oral (por ingestión de alimentos contaminados), por contaminación de las conjuntivas con aerosoles o por vía respiratoria (por ejemplo por inhalación de aerosoles) [6, 7]. La brucelosis en humanos es muy común en áreas como la costa del Mediterráneo, Medio Oriente, y Latinoamérica, donde la enfermedad es endémica. En cambio, en áreas del mundo más desarrolladas en las que las medidas de higiene y control de alimentos son más estrictos, la enfermedad se asocia con la actividad laboral, por lo que se considera una enfermedad profesional (de veterinarios, carniceros, personal de frigoríficos, laboratorios, granjeros y ganaderos) [8]. La infección lateral y congénita entre humanos es muy poco común, aunque se han reportado casos esporádicos por ejemplo por transfusión sanguínea o trasplante de médula [9-13].

La aparición de esta patología en humanos se asocia a la enfermedad del ganado. En particular, en la Argentina la brucelosis humana está muy relacionada con la infección de cabras en la zona oeste del país y con ganado bovino y porcino en el este, mientras que en centros urbanos las mayores fuentes de infección son los frigoríficos [14]. Los últimos registros de aislamientos de cepas en humanos en el país indican que en un estudio comprendido entre 1994 y 2017 la cepa de mayor prevalencia es *B. suis*, con un 48% del total de aislamientos (información cedida por la Dra. Gabriela Escobar, Centro de Referencia de Brucelosis, INEI – ANLIS Malbrán), lo cual probablemente pueda estar dado por la ausencia de control sanitario y vacunación en porcinos (ver sección 2 Introducción).

Para lograr un adecuado control de la enfermedad en el hombre es fundamental el desarrollo de programas de vacunación en el ganado. Así mismo, la vigilancia

epidemiológica en la población expuesta es fundamental, ya que un diagnóstico temprano permite una rápida mejoría, lo cual evita las complicaciones secundarias asociadas a la cronicidad de la enfermedad. Además, dado que algunos individuos con brucelosis se muestran asintomáticos, es necesario un diagnóstico preciso, especialmente en áreas endémicas [15]. Las medidas de control se basan en la prevención de los factores de riesgo. La vigilancia es entonces un elemento clave para el manejo de los programas de prevención y control [16]. Según la OMS desde mediados de la década de los 70, cada año se registran en el mundo medio millón de casos de adquisición de brucelosis en humanos. Debido a que los síntomas clínicos suelen confundirse con otras enfermedades y a que no se suelen realizar los controles de rutina adecuados para su diagnóstico, se cree que dicho número representaría solo el 4% de los casos reales [17, 18].

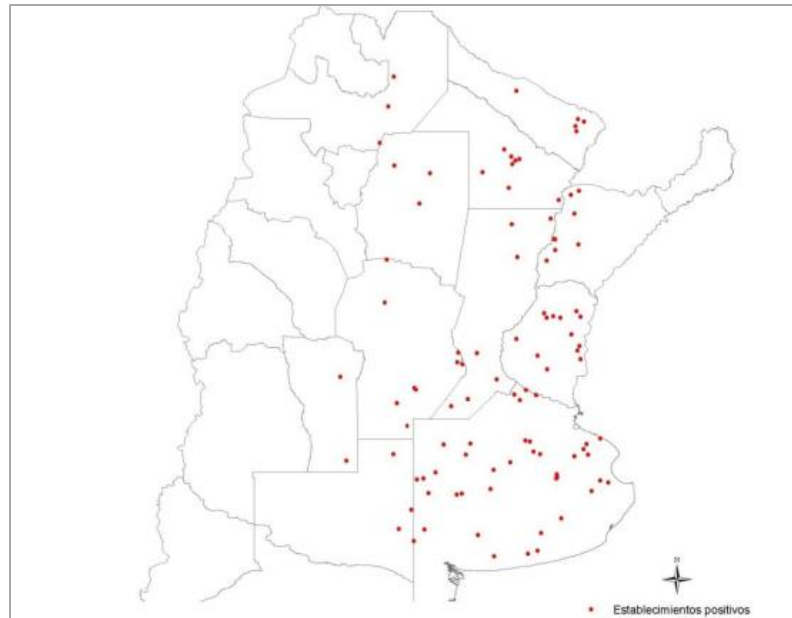
La brucelosis provoca en el mundo, incluyendo a la Argentina, pérdidas importantes en la producción pecuaria y restricciones sanitarias en el comercio interno y exportaciones, tanto en la comercialización de los animales como de sus productos derivados [19-22]. Algunos de los problemas de los animales enfermos que impactan en la economía son abortos, reducción en la fertilidad (incluso infertilidad), nacimientos de terneros débiles, pérdida de peso y merma en la producción de leche [23, 24]. En particular *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, son las especies con mayor impacto económico del grupo. Las estimaciones oficiales sobre las pérdidas anuales únicamente por brucelosis bovina en América Latina produce pérdidas millonarias, por ejemplo en Brasil alcanzan los US\$ 448 millones [21, 22, 25, 26]. Esta enfermedad junto con la tuberculosis bovina fueron las principales causas de pérdida de dinero en la ganadería del siglo XX. Es por esto que existen regulaciones internacionales que imponen restricciones en el movimiento y comercio de animales infectados con cualquiera de estas especies [27].

### **Vacunación, prevención y prevalencia**

En cuanto a la prevención, a nivel mundial, existen algunas vacunas aprobadas para uso animal. Sin embargo, cabe destacar que aún no existen vacunas para todos los hospedadores, ni para todas las especies de *Brucella*. En el caso del ganado bovino, existen dos vacunas comercializadas, pero su uso no está aprobado en todo el mundo. Ambas vacunas utilizan cepas atenuadas de *B. abortus*. Una de ellas utiliza la cepa 19 de *B. abortus* (S19), cuyo uso está aprobado solo para la vacunación de terneros de entre 3 y 9 meses, mientras que la vacuna con la cepa RB51 puede aplicarse en animales de cualquier edad. Una ventaja de la cepa RB51 es que no produce anticuerpos contra el antígeno-O

del lipopolisacárido (LPS) ya que es una mutante rugosa (deficiente en el antígeno-O del LPS, ver sección 6). Esto permite discriminar entre los animales vacunados con esta cepa, de los enfermos, ya que en animales enfermos hay un título importante de anticuerpos anti-antígeno-O. Por otra parte, un gran problema de ambas vacunas, es que estas especies son atenuadas en bovinos pero son capaces de infectar humanos.

En Argentina la vacunación del ganado bovino ha sido intensa; en el año 1982 se estableció que la vacunación de terneras de entre 3 y 8 meses con la cepa S19 de *B. abortus* fuese obligatoria en todo el territorio nacional (SENASA Resolución 73/82). A partir de 1998 se autorizó el uso de la vacuna *B. abortus* RB51 en terneros de sexo femenino de más de 10 meses y no más de tres meses de preñez y además se implementó la vacunación simultánea contra la brucelosis y la fiebre de aftosa. En ese momento la vacunación de terneras con S19 alcanzó un 95% [28]. Sin embargo, no se combatió la infección del ganado bovino por completo [29], ni la generada por otras especies de *Brucella*, así como tampoco se previno la infección de *B. abortus* a otros hospedadores [8]. En el muestreo realizado en el año 2004 por el SENASA se observaron valores de prevalencia de animales infectados del 2.15% y de predios positivos para brucelosis del 12.4 %, mientras que en el estudio del año 2014 (el último disponible) se puede observar que la prevalencia animal obtenida es de 0.81%, lo que indica una disminución en 10 años estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ); sin embargo, la prevalencia de predios se mantuvo en 12,35% con una distribución similar [30] (Figura 1). Estos valores son coincidentes con una situación epidemiológica donde la vacunación sistemática y continua de las terneras a lo largo de los años puede haber actuado como factor relacionado a la disminución de la prevalencia de la enfermedad aunque la situación está lejos de estar completamente controlada en nuestro país.



**Figura 1. Mapa que ilustra la distribución espacial de predios positivos para brucelosis bovina en Argentina. Los puntos rojos indican los establecimientos muestreados que resultaron positivos para brucelosis, con al menos un animal confirmado. Tomado del informe del muestreo para determinación de prevalencias de brucelosis bovina en la zona de mayor producción bovina en la República Argentina (SENASA, 2014)[30].**

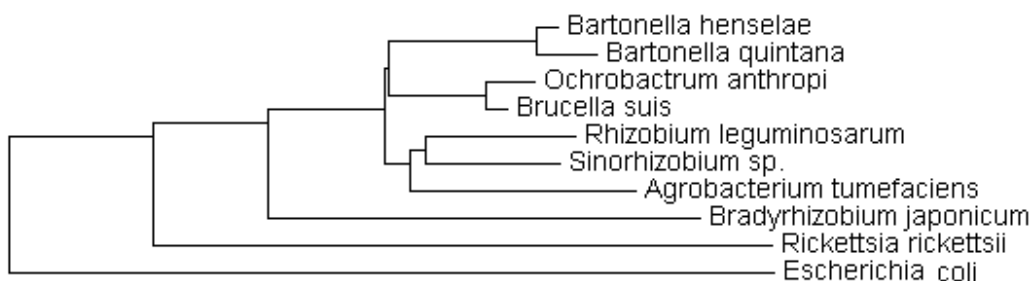
En febrero del corriente año el SENASA dispuso un nuevo Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina (resolución N°67/2019). El plan exige a los propietarios de los rodeos donde se realicen actividades de reproducción, que efectúen una Determinación Obligatoria de Estatus Sanitario (DOES) de Brucelosis por un médico veterinario acreditado. La DOES consiste en un diagnóstico serológico a la totalidad de los animales susceptibles del establecimiento. Si la totalidad de las muestras resultan negativas se considerará al establecimiento con un estatus libre de brucelosis bovina, el cual deberá ser mantenido anualmente por un muestreo parcial de animales. Se propone que esta estrategia permitirá mantener un control sanitario de la brucelosis, resguardando la salud pública y posicionando al país como uno de los mayores exportadores de carne bovina de calidad.

En cuanto al ganado caprino, existe la vacuna Rev1 que consiste en el uso de una cepa atenuada. Al igual que lo que ocurre con las cepas S19 y RB51 de *B. abortus*, ésta cepa también es virulenta para humanos. A pesar de la alta prevalencia de la brucelosis caprina en el país, el uso de esta vacuna fue autorizado en Argentina recién a fines del año 2006 (Resolución 216/2006, SENASA). La Organización Mundial de la Sanidad Animal recomienda el uso de las vacunas *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev1

para el control de ganado [31, 32]. Sin embargo, como se mencionó estas cepas son patogénicas para humanos, suponiendo un riesgo de contraer la enfermedad al momento de administrarlas [23]. Al momento no existen vacunas aprobadas para porcinos y en el país el control de sanidad de estos animales es escaso o prácticamente nulo, por lo tanto tampoco se cuenta con información estadística confiable en cuanto a la incidencia de *B. suis* en Argentina.

### 3. *Brucella* spp.

El género *Brucella* pertenece a la familia *Brucellaceae*, la cual se encuentra dentro del orden Rhizobiales de la clase  $\alpha$ -Proteobacteria [33-35]. La clase  $\alpha$ -Proteobacteria está compuesta por familias de organismos que son patógenos de animales (por ej. *Brucella* spp., *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp) o de plantas (por ej. *Agrobacterium* spp.), simbioses (por ej. *Rhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp. y *Bradyrhizobium* spp.), u organismos habitantes del suelo como por ej. *Ochrobactrum* spp., que es considerado un patógeno oportunista (Figura 2).

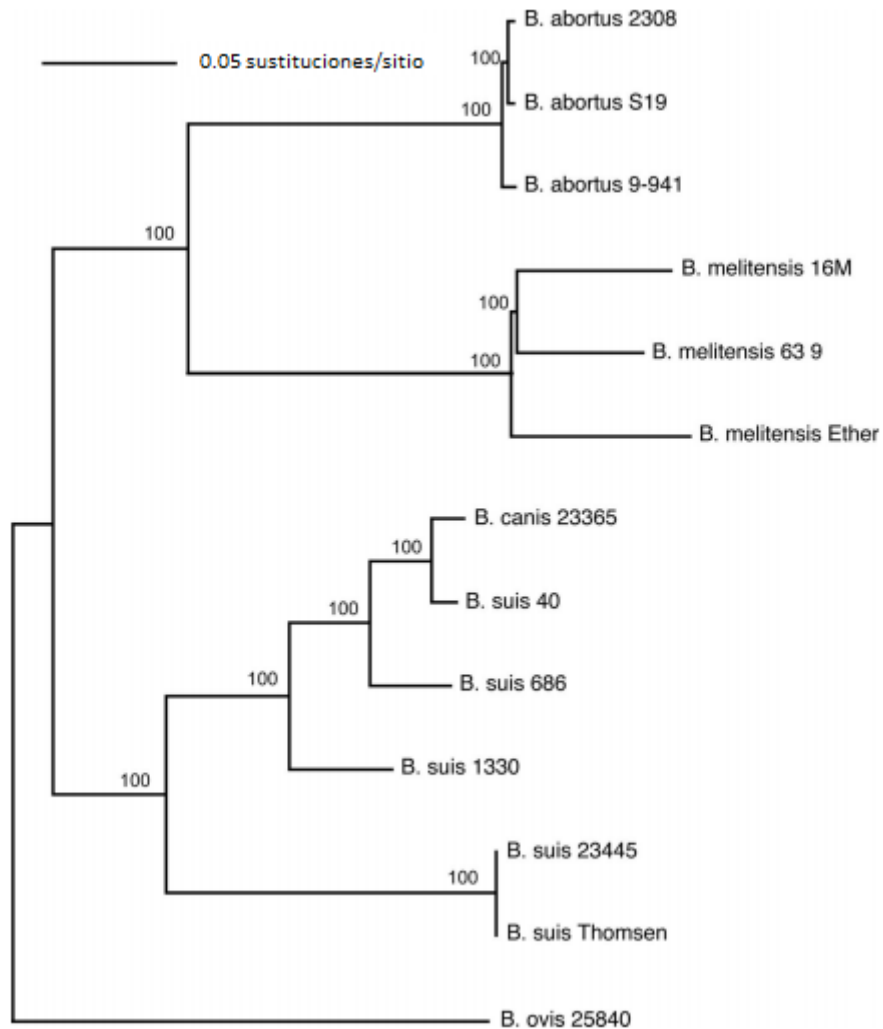


**Figura 2.** Árbol filogenético construido en base a la secuencia del ARN 16S, con algunas especies pertenecientes a las *Alphaproteobacterias* mencionadas en el texto; se incluye a modo de *outgroup* a *E. coli* (*Gammaproteobacteria*). Este árbol se construyó utilizando el RDP [36] en base al método *Neighbor Joining*. Adaptado de la tesis de V. Ruiz-Ranwez [37].

En los últimos años se ha identificado una serie de especies nuevas dentro del género *Brucella* produciéndose una expansión del mismo (Whatmore, 2009). Actualmente se reconocen 12 especies, cuyos hospedadores de preferencia se indican a continuación: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (cabras), *B. suis* (cerdos, liebres, renos), *Brucella canis* (perros), *Brucella ovis* (ovejas) y *Brucella neotomae* (roedores), *Brucella microti* (campañoles), *Brucella pinnipedialis* (pinnípedos), *Brucella ceti* (cetáceos), *Brucella papionis* (papiones), *Brucella vulpis* (zorros) y *Brucella inopinata* (aislada de un implante mamario humano). Las relaciones filogenéticas entre las



especies del género se representan en la Figura 3. Como fue mencionado en la sección anterior, de las especies descritas anteriormente *B. melitensis*, *B. abortus*, y *B. suis* son las más importantes en términos del impacto en la patogénesis de animales y humanos [38]



**Figura 3. Filogenia de las especies clásicas de *Brucella spp.* Adaptado de Foster et al 2009 [39].** El árbol fue construido usando el método de *Neighbor Joining*. En cada nodo se muestra el porcentaje de soporte basado en 1,000 repeticiones. El grupo externo *O. anthropi* se usó para enraizar este árbol, pero no se muestra debido a la larga longitud de la rama.

Las especies pertenecientes a este género poseen genomas muy similares, presentando una identidad de secuencia mayor al 94%. Poseen dos cromosomas de aproximadamente 2.1 MB y 1.2 MB con un contenido de GC de aproximadamente el 57%. Hay entre 3200 – 3400 ORFs en cada genoma. Algunos taxónomos consideran que todas las especies deberían ser consideradas biovares de una misma especie, sin embargo se

decidió continuar con esta taxonomía dada la frecuencia de aislamientos de cada una de las especies en los hospedadores.

Es interesante destacar que las diferencias encontradas en los genomas corresponden en mayor medida a proteínas de la superficie, lo cual indica que sus genes son los que sufren las principales mutaciones a lo largo de los eventos de especiación. Algunas de estas mutaciones parecen inactivar los genes, convirtiéndose éstos en pseudogenes. Es por ello que el estudio de pseudogenes resulta fundamental a la hora de comprender las diferencias existentes entre las distintas especies. En este sentido, un análisis de las categorías funcionales de los genes inactivados reveló que la mayor parte de los mismos corresponden a funciones asociadas a transporte y a la envoltura celular [40]. Este proceso refleja la adaptación a un ciclo de vida intracelular, donde el ambiente local o nicho replicativo provee un suministro constante de nutrientes. Esto sugiere que la virulencia y las diferencias en la especificidad de hospedador observadas podrían ser el resultado de la divergencia en los genomas, producida por la acumulación diferencial de pseudogenes. Se propone que la inactivación de genes, más que la delección o la transferencia horizontal, jugaría un rol más importante en la especiación y adaptación al hospedador.

#### **4. Replicación intracelular**

*Brucella* invade y replica en una variedad de células hospedadoras como macrófagos, trofoblastos, células dendríticas y epiteliales, dentro de un compartimento particular derivado del retículo endoplásmico denominado “Brucelosoma” o BCV (por *Brucella containing vacuole*) [41-43]. En la Figura 4 se esquematizan y describen los principales pasos del tráfico intracelular. Luego de la endocitosis la bacteria se adapta a condiciones intracelulares y supera las defensas del sistema inmune del hospedador [44-46]. Por lo tanto, una vez que se alcanzó la etapa crónica es difícil erradicar la bacteria ya que su estilo de vida intracelular la pone fuera del alcance de la respuesta humoral del sistema inmune, y de varios antibióticos [45, 47]. Recientemente se ha propuesto que uno de los reservorios intracelulares son los monocitos que residen dentro de la médula ósea que luego al migrar hacia otros tejidos, mediante la circulación sistémica, funcionan como “caballo de Troya” diseminando las bacterias por el resto del organismo [48]

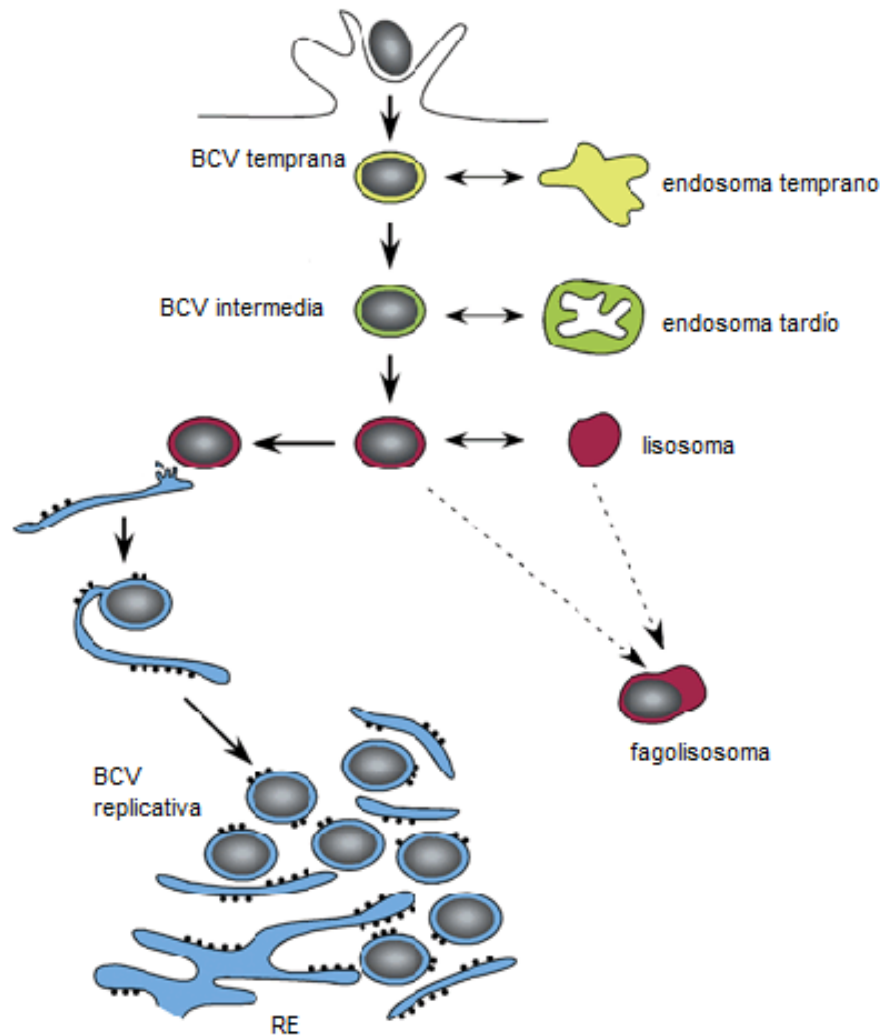


Figura 4. Tráfico intracelular de *Brucella*. Al ingresar, las BCV recién formadas transitan a lo largo de la vía endocítica, interactuando secuencialmente con los endosomas tempranos (amarillo) y los endosomas tardíos (verde) antes de fusionarse con los lisosomas (rojo). Las BCV que logran evadir la vía degradativa lisosomal, interactúan y posteriormente se fusionan con el ER (mostrado en azul) generando BCV replicativos derivados de ER. Adaptado de Starr et al, 2008 [43].

## 5. División celular asimétrica

La división celular asimétrica es un mecanismo que genera dos células hijas funcionalmente diferenciadas. En un estudio publicado en el año 2004 [49] se demostró que varias *Alphaproteobacterias* se dividen asimétricamente. En el caso de *Brucella* se generarían dos células hijas de tamaño ligeramente distinto, que presentarían funciones específicas [49]. Por otro lado, se ha propuesto que el crecimiento unipolar (implicado en la división asimétrica) sería una característica ancestral conservada dentro del orden

Rhizobiales, incluyendo a la bacteria mutualista *S. meliloti*, al patógeno de plantas *A. tumefaciens*, al patógeno de animales *Brucella*, y al patógeno oportunista *O. anthropi* [50]

En otro estudio se caracterizó a PdhS, una histidina quinasa citoplasmática esencial en la viabilidad de *B. abortus* y homóloga a las histidina quinasa PleC y DivJ de *Caulobacter crescentus* que presentan distribución asimétrica. Se determinó que PdhS se localiza específicamente en el polo viejo de la célula más larga de *Brucella* y que luego de la división y crecimiento, la célula más pequeña adquiere PdhS en su polo viejo. Por lo tanto, se propuso a PdhS como un marcador de polo viejo (identificada en rojo en la Figura 5). Con el fin de profundizar el análisis en los procesos de diferenciación de las células hijas, se han identificado otros marcadores de polo. Recientemente se determinó que la proteína AidB se localiza específicamente en el polo nuevo de *Brucella*, y en el sitio de constricción, tanto en bacterias en cultivo como en bacterias que se encuentran infectando células HeLa o macrófagos. AidB (identificada en azul en la Figura 5) es una acil-CoA-deshidrogenasa que podría estar involucrada en la destrucción de agentes alquilantes [51].

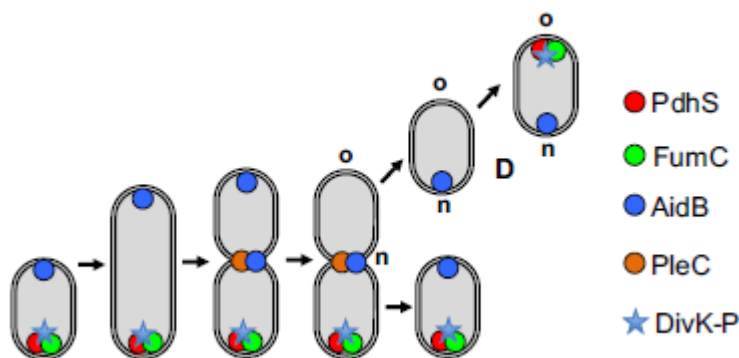


Figura 5. Esquema de la localización asimétrica de las proteínas marcadoras de polo. En rojo la histidina quinasa PdhS y en azul la acil-CoA-deshidrogenasa AidB. Adaptado de Van der Henst 2013 [52].

## 6. Envoltura de Gram negativas y particularidades en *Brucella*

La envoltura celular bacteriana es el mayor punto de interacción de los patógenos y el hospedador y por lo tanto las moléculas que forman parte de la misma tienen un rol fundamental en el éxito de la infección. En bacterias Gram negativas, la envoltura celular está compuesta por la membrana interna (MI), un espacio periplásmico (conteniendo al peptidoglicano), la membrana externa (ME) y el lipopolisacárido (LPS) como se muestra en la Figura 6.

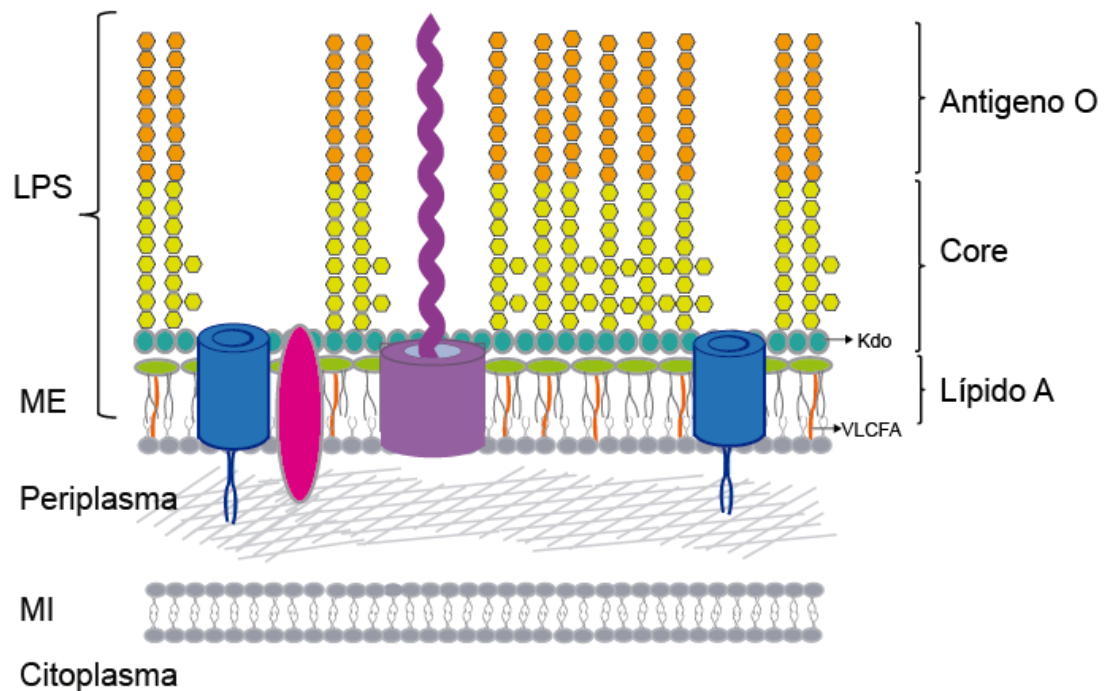


Figura 6. Esquema de la envoltura de *Brucella* spp.

La MI consiste en una bicapa de fosfolípidos, mientras que la ME es una membrana asimétrica compuesta por fosfolípidos en la cara interna y LPS en la cara externa. En cuanto al LPS de las cepas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo polisacárido (*core*) y el antígeno-O. En las formas rugosas el LPS carece del antígeno-O, o está reducido a muy pocos residuos. Particularmente, en *Brucella* el lípido A está conformado por un disacárido de diaminoglucosa, el cual se encuentra acetilado con una gran proporción de ácidos grasos de cadena muy larga (en la figura indicados como VLCFA, por sus siglas en inglés, *very long chain fatty acid*) [53, 54]. Asimismo, dos tipos de proteínas integran la ME, las lipoproteínas y las proteínas integrales de membrana. Las lipoproteínas están ancladas a la ME a través de una cola lipídica presente en el N-terminal (N-acil-diacilglicerilcisteína).

La ME posee características únicas que hacen que estos patógenos sean particularmente resistentes a compuestos bactericidas del hospedador. Además, numerosa evidencia indica que la envoltura de *Brucella* limita el reconocimiento por parte del hospedador, promueve la evasión del sistema inmune y es crucial para evitar la destrucción de la bacteria en el medio intracelular [55].

Debido a su rol en el éxito de la infección, la envoltura celular de *Brucella* es objeto de numerosos estudios. Por ejemplo se propone que *Brucella* tiende a formar bicapas lipídicas muy estables [56, 57]. En particular, esto se debe a la presencia de varias proteínas de membrana externa (OMPs) que mantienen interacciones hidrofóbicas con otros componentes y/o contienen dominios hidrofílicos que le permite unirse al peptidoglicano. Como consecuencia, estas características contribuirían a la rigidez propia de la célula de *Brucella* en comparación con otras bacterias Gram negativas [57-59]. El LPS de *Brucella* es particularmente poco endotóxico. Por un lado, los VLCFA presentes en el lípido A no son capaces de ser reconocidos por el receptor TLR4 (receptor tipo Toll) como ocurre en otras bacterias Gram negativas [60, 61]. Una segunda característica anti-inflamatoria del LPS de *Brucella* es que genera una pobre activación del complemento [62]. Por otro lado, el LPS de *Brucella* cumple funciones particulares, interviniendo en el control del tráfico intracelular, en el control de la respuesta inmune de la célula hospedadora e inhibiendo la presentación antigénica por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II (MHCII) con la consiguiente disminución en la activación de linfocitos T [63, 64]. En particular, se ha observado que el antígeno-O del LPS inhibe la apoptosis de los macrófagos invadidos, beneficiando a la bacteria [65]. Tanto el lípido A como el core exhiben una menor proporción de cargas negativas en comparación con el LPS de otras bacterias estudiadas [42]. Todas estas características fisicoquímicas particulares resultan en una baja permeabilidad (y por lo tanto mayor resistencia) de *Brucella* a compuestos policatiónicos, como la polimixina B y la lisozima, y una mayor permeabilidad a compuestos hidrofóbicos [66-69].

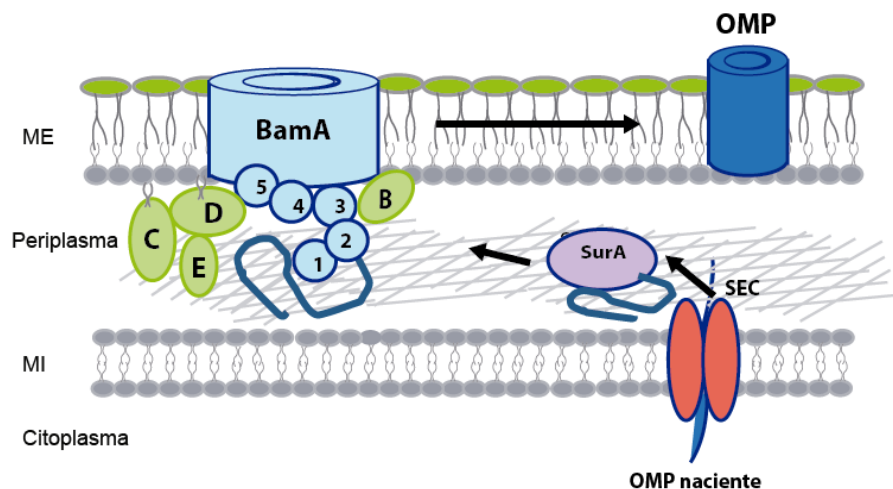
La composición lipídica de las membranas de *Brucella* spp. también posee características particulares; el fosfolípido mayoritario es la fosfatidilcolina (PC), un fosfolípido común en eucariotas pero poco frecuente en bacterias [70]. Las propiedades estructurales proporcionadas por la PC son distintas a las de la fosfatidiletanolamina (PE), fosfolípido mayoritario en muchas otras Gram negativas. En ensayos *in vitro*, la PC forma bicapas más estables [71]. Se ha demostrado que su síntesis ocurre a partir de colina suministrada por el hospedador y que su presencia es necesaria para la colonización de ratones BALB/c [72]. Las características particulares de los lípidos de membrana de *Brucella* contribuyen a que la bacteria sea considerablemente permeable a compuestos hidrofóbicos pero poco permeable a péptidos catiónicos [66, 68, 69, 73, 74]. Más aún, la baja abundancia de PE (alrededor del 25% en *B. melitensis* en comparación con otras especies como *E. coli*, donde su contenido se eleva hasta el 80%) y la presencia de la fosfolipasa BveA, que corta específicamente PE, está relacionada con la resistencia a

polimixina B y la persistencia de la virulencia en ratones [75]. Otros componentes de la ME de *Brucella* relevantes en la virulencia son las OMPs [76, 77]. Mutantes en distintas OMPs (por ejemplo Omp10 y Omp19) presentaron un fenotipo de virulencia atenuado en ratón [78].

### **7. Biogénesis de la ME en bacterias Gram negativas: sistemas BAM y TAM.**

Mientras que la estructura y función de la ME ha sido conocida por décadas, su biogénesis aún no se ha dilucidado completamente. Todos los componentes de la ME se sintetizan en el citoplasma o en la cara citoplasmática de la MI, y deben ser transportados a través de la MI y periplasma a fin de alcanzar la ME e incorporarse a ella.

Todas las proteínas destinadas a la ME se sintetizan como precursores con secuencias señal en el N-terminal, que son esenciales para la translocación a través de la MI. Se han identificado dos maquinarias de translocación: el sistema Sec, que transporta las proteínas desplegadas, y la maquinaria Tat (por sus sigla en inglés, *Twin-Arginine Translocase*), que conduce las proteínas plegadas a través de la MI. Varias chaperonas periplasmáticas han sido involucradas en el proceso de biogénesis de la ME [79]. Por ejemplo, una chaperona descrita es Skp la cual se une directamente a los polipéptidos una vez que los mismos atraviesan el canal de la maquinaria Sec. Otra de ellas es SurA involucrada exclusivamente en la unión a proteínas integrales de membrana previniendo el plegamiento prematuro o la agregación de los polipéptidos en el periplasma. La inserción de las proteínas en la ME ha sido durante mucho tiempo enigmática y se ha considerado un proceso espontáneo [80]. Sin embargo, diferentes trabajos han identificado maquinarias proteicas esenciales para este proceso. Una de ellas es la maquinaria BAM la cual asiste a la inserción de proteínas que contienen barriles  $\beta$ . El complejo BAM está compuesto por la proteína esencial BamA y proteínas accesorias. BamA pertenece a un subgrupo de la superfamilia de proteínas Omp85 que se caracteriza por poseer un dominio con estructura de barril  $\beta$  conservado en el extremo C-terminal insertado en la ME y 5 dominios periplásmicos en la región N-terminal denominados POTRA (por sus siglas en inglés, *polypeptide transport associated*), cuya función propuesta es mediar en la interacción inicial del complejo BAM con los sustratos polipeptídicos [81]. Las proteínas accesorias BamB, BamC, BamD, y BamE son lipoproteínas que están ancladas a la ME a través del extremo N-terminal. Todos los componentes son necesarios para el correcto ensamblaje y la inserción eficiente en la ME de las OMPs que contienen en su estructura un barril  $\beta$  [82-84]. En la Figura 7 se esquematizan todos los componentes de la maquinaria BAM.



**Figura 7.** Esquema de los componentes principales de la maquinaria BAM y el recorrido en la translocación de OMPs a través de la MI y su inserción en la ME. La OMP naciente se transloca desplegada por la maquinaria SEC, en el espacio periplásmico chaperonas la mantienen desplegada, luego interactúa con el complejo BAM, hasta que se inserta en la ME.

Otra familia de proteínas a las cuales BAM asiste a su inserción en la ME son los autotransportadores, cuya estructura consiste en un dominio barril  $\beta$  en el C-terminal (ver sección 9 de Introducción). Antiguamente se creía que estas proteínas contenían toda la información necesaria para su correcta translocación e inserción a la ME. Sin embargo, hoy en día varias evidencias indican que el término "auto" en realidad no contempla el mecanismo de translocación de los autotransportadores ya que se requieren otras proteínas para su correcta secreción. Se demostró que la maquinaria BAM era necesaria para la translocación de varios autotransportadores, particularmente de la inserción del dominio C-terminal en la ME [82, 85-89]. El sistema BAM junto con otros complejos asociados a la envoltura celular son cruciales en la biogénesis de la envoltura de bacterias didermas, en particular del ensamblado de la ME [87].

Más recientemente, se ha descrito un nuevo sistema llamado *Translocation and Assembly Module* (TAM) que sería necesario para la correcta translocación de autotransportadores como Ag43 y P1121 en *E. coli* y *Citrobacter rodentium*, respectivamente [90]. El sistema TAM consiste en TamA, otro miembro de la superfamilia Omp85, que posee estructura de barril  $\beta$  que se embebe en la ME y tres dominios POTRA que se orientan hacia el periplasma y a través de los cuales se propone que interactúa con TamB (Figura 8A). TamB por su parte, es una proteína de gran tamaño (136 kDa en *E. coli* K12) que se inserta en la MI mediante un péptido señal codificado en el N-terminal que es



no clivable; el resto de TamB exhibe una extensa estructura  $\beta$ -helicoidal que está inmersa en el periplasma [90, 91].

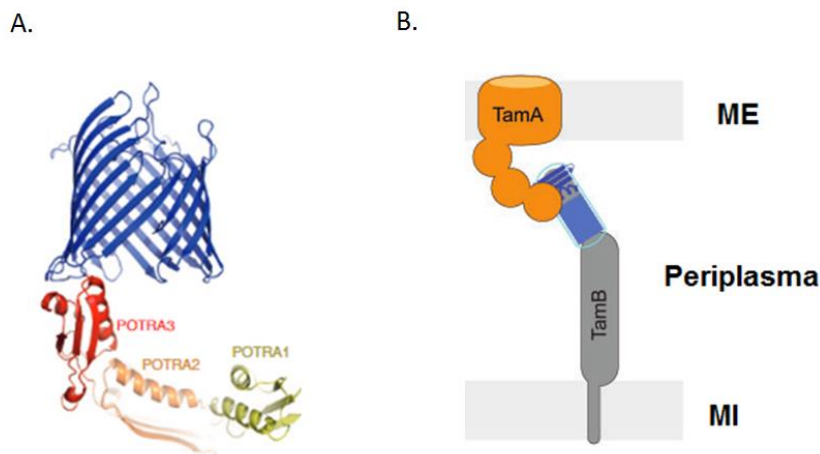


Figura 8. A. Estructura de TamA, en azul se observa el barril  $\beta$  que se inserta en la ME, hacia el periplasma protruyen los dominios POTRA. Adaptado de Gruss 2013 [92]. B. Modelo de la maquinaria TAM. En naranja el componente TamA inserto en la ME, la proteína TamB (gris) se ancla a la MI por un péptido hidrofóbico no clivable. Ambas proteínas interactúan en el periplasma a través de los dominios POTRA.

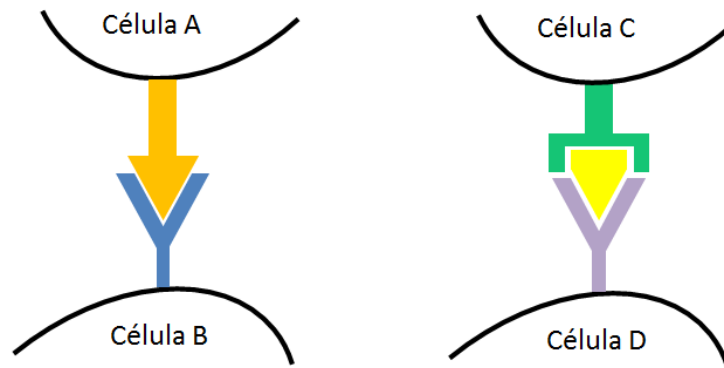
El sistema TAM resultó no ser esencial en *Gammaproteobacterias*, pero su ausencia afectó la virulencia o la colonización de *C. rodentium* y *Salmonella enterica* en modelos murinos [90]. TamB tendría un efecto regulador sobre la interacción del sistema TAM con sus sustratos [93], ya que recientemente se postuló que TamB posee una cavidad hidrofóbica denominada “taco  $\beta$ ” que podría servir como chaperona para guiar las cadenas hidrofóbicas  $\beta$  de los sustratos del sistema TAM a través del periplasma [91]. Por otro lado, las proteínas de la familia TamB se encontraron ampliamente distribuidas en la mayoría de los linajes bacterianos gramnegativos, incluso en numerosos géneros que no albergan autotransportadores [94]. Esto plantea la pregunta de cuál es el papel principal de TamB en la biogénesis de la envoltura celular bacteriana. Curiosamente, otros estudios sugieren que los miembros de la familia TamB de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Gammaproteobacteria*), *Deinococcus radiodurans* (Deinococcus-Thermus phylum) y *Borrelia burgdorferi* (espiroqueta) podrían tener un papel más general en la biogénesis de la ME [95-98].

## 8. Adhesión al hospedador

La capacidad de los microorganismos de colonizar y multiplicarse en un tejido específico del hospedador es un prerrequisito para poder establecer una enfermedad

infecciosa. La internalización a células de mamíferos es una estrategia común, utilizada por muchas bacterias patógenas que les permite colonizar al hospedador [99]. Los patógenos intracelulares deben primero adherirse a la superficie celular, y mantener esa asociación con el tejido del hospedador [100]. Esta etapa es crítica en el proceso de infección ya que evita la eliminación de la bacteria de los tejidos, sobre todo para patógenos como *Brucella* spp., y *Yersinia* spp. que primero colonizan áreas que están continuamente lavadas por fluidos, movimientos peristálticos o por acción de cilios presentes en las superficies mucosas de las vías digestiva y respiratorias. Por otro lado, el recambio de células epiteliales de estas superficies es bastante rápido; por ejemplo, la monocapa de células epiteliales intestinales se repone continuamente, renovándose aproximadamente cada 48 horas [101]. Tal es la importancia de la adhesión, que incluso se ha propuesto que la inhibición de la adhesión bacteriana a distintos componentes del hospedador tendría un potencial terapéutico [102].

Para adherirse a las células del hospedador, las bacterias patógenas expresan moléculas asociadas a la superficie llamadas adhesinas que en muchos casos reconocen directamente proteínas de la superficie celular eucariota u otros componentes de la superficie (por ejemplo carbohidratos), mediando una fuerte asociación con la célula del hospedador. En cambio, otras adhesinas se adhieren de modo indirecto a la célula hospedadora al unirse a productos de secreción de esta u otra célula, como por ejemplo proteínas de la matriz extracelular (ECM, del inglés *extracellular matrix*), que si bien están unidas a la membrana plasmática no son parte integral de la misma [103]. En la Figura 9 se pueden observar los esquemas representativos de ambos tipos de interacción: en un caso el reconocimiento de la célula A por parte de la célula B sería directo, la adhesina de la célula B reconoce directamente al receptor presente en la superficie de la célula A. En el segundo caso el reconocimiento sería indirecto: la adhesina de la célula D reconoce a la célula C vía una molécula intermediaria (en amarillo).



**Figura 9. Esquema de reconocimiento celular directo (izquierda) e indirecto (derecha).**

Dentro de las adhesinas bacterianas, las históricamente más estudiadas han sido las adhesinas multiméricas llamadas fimbriales o *pili*. Sin embargo en los últimos años se han identificado una gran cantidad de adhesinas no fimbriales unidas a la superficie, siendo algunas filamentosas [104]. Dentro de las adhesinas fimbriales presentes en bacterias existen distintos tipos de *pili* como los de tipo I (por ejemplo FimH de *E. coli* [105]) y los de tipo IV (como por ejemplo Pil de *N. gonorrhoeae* o Spa de *Clostridium perfringens*), y las llamadas *curli* las cuales no suelen tener un ligando específico (como Csg de *Salmonella enterica*) [104]. Dentro de las no fimbriales se encuentran las que pertenecen a la familia de los Autotransportadores, detallada en la siguiente sección.

## **9. Autotransportadores: sistema de secreción tipo V**

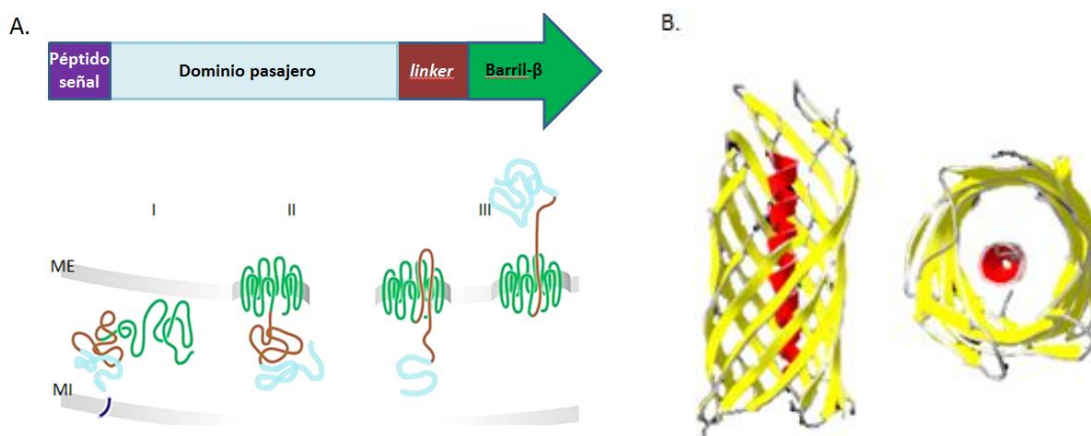
La secreción de proteínas en bacterias es esencial para una gran variedad de funciones, incluidas la interacción con el medio ambiente y el hospedador. Para aquellas proteínas cuyo destino final es la superficie bacteriana o el medio extracelular las bacterias Gram negativas pueden utilizar seis sistemas principales de secreción de proteínas, enumerados del I al VI, los cuales están muy conservados [106]. Para translocar proteínas a través de la MI, los sistemas II y V utilizan la maquinaria Sec [107, 108] o Tat [109-111], mientras que la secreción a través de los sistemas I, III, IV y VI es independiente de Sec y Tat. Los sistemas tipo I forman un complejo tripartito que se extiende desde la MI hasta la ME formando un canal por el cual el sustrato proteico es translocado al medio extracelular sin intermediarios periplasmáticos [112]. El sistema tipo II consiste en un complejo

multiproteico que atraviesa toda la envoltura, se encarga de mediar la translocación de la proteína ya ensamblada desde el periplasma al medio extracelular a través de la ME [113]. Los sistemas multiproteicos tipo III y tipo IV reconocen a sus sustratos en el citoplasma y translocan las proteínas al medio externo o incluso a células del hospedador, en muchos casos funcionando como “inyectisomas” de factores de virulencia [114, 115]. El sistema tipo VI, recientemente descrito en *Salmonella*, es una estructura que pone en contacto directo a la célula dadora y la receptora. En un comienzo se creyó que mediaba únicamente la interacción con células eucariotas, sin embargo luego se describió que también participa en la interacción entre bacterias [116, 117]

Los sistemas de secreción de tipo V corresponden a los autotransportadores (ATs) [118]. Su denominación se debe a que en un comienzo se creía que la proteína secretada albergaba en sí misma el mecanismo que media su propio transporte al medio extracelular. Sin embargo, recientemente se demostró que no es completamente autosuficiente, dado que, como se mencionó anteriormente, otros sistemas participan asistiendo a la correcta inserción y/o translocación de estas proteínas (ver sección 7 de Introducción). La secreción consta básicamente de dos pasos; las proteínas contienen un péptido señal reconocido por la maquinaria Sec, el cual les permite atravesar la MI [119]. Una vez en el periplasma, el extremo C-terminal de los autotransportadores monoméricos (ATI) forma un barril  $\beta$  de 12/14 hebras antiparalelas que se inserta en la ME y es esencial para que el dominio funcional (“pasajero”) se transloque a través de la misma [119, 120] (Figura 10A). Los autotransportadores triméricos (ATII) tienen un dominio de translocación en el extremo C-terminal más pequeño que comparte similitudes estructurales y funcionales con los monoméricos [100, 121, 122].

La translocación a través de la ME parece ser independiente de fuentes de energía, tales como adenosina trifosfato (ATP) o gradiente de iones [118]. La hipótesis más aceptada propone que la fuente de energía para la translocación a través de la ME deriva del correcto plegamiento del dominio pasajero sobre la superficie bacteriana [123], de ahí también su denominación “autotransportador”. Los ATs sólo están presentes en el reino *Bacteria* y son más prevalentes en el *phylum* Proteobacteria, incluyendo las clases  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\epsilon$ -Proteobacteria [124]. Cabe destacar que todos los ATs de bacterias patógenas caracterizados a la fecha han sido catalogados como factores de virulencia. Los ATs pueden tener una amplia variedad de funciones, incluyendo adhesión, invasión, proteólisis, citotoxicidad, resistencia al complemento, hemaglutinación, entre otras [118, 121, 125]. Incluso un único AT puede cumplir más de una función. La región más variable de los ATI

es la que corresponde al dominio pasajero, que es la que alberga la actividad biológica. En cambio, el dominio C-terminal se encuentra altamente conservado (dominio PFAM03797) y suele estar formado por aproximadamente 250-300 aminoácidos [121]. En la mayoría de los ATI, el dominio pasajero es clivado luego de ser translocado al medio extracelular, resultando una proteína o bien soluble o una proteína que queda en contacto con la superficie bacteriana mediante interacciones no covalentes con el barril  $\beta$  [118, 121]. El dominio translocador del autotransportador NalP de *Neisseria meningitidis* (PDB: 1UYO) fue cristalizado confirmando la presencia de un barril  $\beta$ , compuesto por 12 hebras  $\beta$  transmembrana y un poro central de aproximadamente 10 Å de diámetro, con un segmento  $\alpha$  hélice pasando por el poro [126]. En la Figura 10B se puede observar la estructura obtenida por cristalografía, coloreada en función de la estructura secundaria.



**Figura 10. A. Esquema de dominios característicos presentes en los ATI y modelo propuesto de translocación. (I) El péptido señal (violeta) es reconocido por la maquinaria Sec y el polipéptido se transloca al periplasma. (II) El dominio de barril  $\beta$  (verde) se inserta en la ME formando un poro a través del cual ocurre (III) la translocación del dominio pasajero (celeste) hacia el espacio extracelular. C. Estructura cristalográfica del barril  $\beta$  y *linker* de NalP de *Bordetella pertusis*. En amarillo se puede observar el barril formado por 12 hebras  $\beta$ , atravesado por un segmento  $\alpha$ -helicoidal (rojo). Adaptado de Henderson et al 2004.**

Un ejemplo que merece ser mencionado de ATs tipo I es TibA de *E. coli* enterotóxica. TibA cumple varias funciones: media la autoagregación de las bacterias, participa en la formación de *biofilm* sobre superficies abióticas, media la adhesión de la bacteria a una serie de tipos celulares humanos [127, 128] y también funciona como invasina ya que fue necesaria para una invasión eficiente a varios tipos celulares humanos [129].

Por otro lado, los ATI de una gran variedad de bacilos patogénicos, incluyendo IcsA y SepA de *Shigella flexneri*, AIDA-I de *E. coli*, NalP, y BrkA de *Bordetella pertusis*, están localizados en uno de los polos de la bacteria [119, 130]. Más aún, estos AT han mostrado una ubicación polar en el citoplasma previa su secreción [130].

#### **10. Adhesinas y autotransportadores en *Brucella*:**

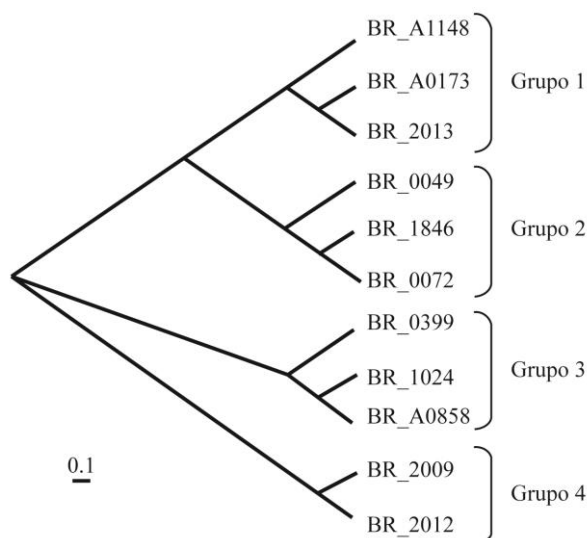
A lo largo de los años se han acumulado evidencias que sugieren que la adhesión a componentes de la ECM y/o a las células del hospedador es un paso importante en la infección de *Brucella* [131-138]. Debido al amplio espectro patogénico de *Brucella* y su capacidad de invadir distintos tipos celulares y tejidos [139], se ha sugerido que la bacteria es capaz de expresar moléculas de superficie (adhesinas) capaces de reconocer receptores generales así como también receptores específicos de determinados tejidos [131]. En el año 2004, Castañeda-Roldan y colaboradores publicaron un trabajo en el cual investigaron las propiedades de adherencia de *Brucella* spp. a células epiteliales y macrófagos. Estos autores demostraron que *B. abortus* y *B. melitensis* son capaces de unirse a estas células con una cinética característica [131]. Se propuso que la adhesión sería dependiente de receptores con residuos ricos en ácido siálico y/o residuos sulfatados, tanto en macrófagos, células epiteliales como en eritrocitos humanos [131, 140]. También se propuso que algunas proteínas de la ECM como fibronectina, colágeno y vitronectina podrían actuar como puente en las etapas de adhesión [131]. Estudios anteriores habían demostrado que *Brucella* se adhiere a ácido siálico presente en glóbulos rojos humanos y de otros animales [141].

En un trabajo posterior se identificó a SP41, una proteína con alta similitud a un transportador de glicerol-3-fosfato de tipo ABC. Dicha proteína resultó involucrada en la adhesión a células HeLa. Es interesante destacar que la capacidad de adhesión de SP41 se pierde al utilizar células HeLa previamente tratadas con neuraminidasa, lo cual sugiere que alguna molécula de la célula rica en ácido siálico estaría involucrada en la interacción [142]. Bandara y colaboradores caracterizaron una proteína de *B. suis* que pertenecería a la familia de los ATI, a la que denominaron OmaA. Dada su similitud con proteínas clasificadas como adhesinas, los autores propusieron que esta proteína podría poseer la misma función; sin embargo esta posibilidad no fue explorada. La mutante *omaA* no presentó diferencias con la cepa silvestre en la replicación intracelular en macrófagos (a 24 ni 48 horas) y tampoco en la carga en bazo de ratones una semana después de haber sido inoculados intraperitonealmente. En cambio, entre la tercer y novena semana siguiente a la

inoculación, la mutante fue eliminada más eficientemente que la cepa silvestre, indicando que OmaA sería importante en la fase crónica de la infección [143]. Este autotransportador corresponde a BmaB, objeto de estudio del presente trabajo (ver Resultados Capítulo I).

En el año 2012 Czibener y colaboradores identificaron una isla de patogenicidad en *B. abortus* que al mutarla reduce la adhesión a células epiteliales en cultivo [132]. Luego, en el año 2016, profundizaron en la caracterización de uno de los genes, denominado *bigA*, que codifica para una adhesina que alberga un dominio bacteriano “semejante a inmunoglobulina”, presente en varias adhesinas como en la Intimina de *E. coli* enterohemorrágica. Los autores demostraron que BigA participa en la adhesión a células epiteliales polarizadas Caco-2 y MDCK. Observaron que mientras que la eliminación del gen redujo significativamente la adhesión, la sobreexpresión la incrementó dramáticamente [144]. Asimismo, la proteína recombinante se localizó en mayor medida en las uniones célula-célula e indujo cambios en el citoesqueleto de la célula hospedadora, indicando que posee un receptor celular vinculado a la adhesión que desencadena una cascada de señales intracelulares.

En nuestro laboratorio, con el fin de identificar en *B. suis* otras proteínas que pudieran estar involucradas en la adhesión de la bacteria al hospedador, se realizó una búsqueda bioinformática en la secuencia publicada del genoma de *B. suis* 1330 [145]. Para ello, se realizó una búsqueda sistemática de ORFs cuyos productos pudieran contener dominios asociados con la adhesión [134], clasificados en la base de datos Pfam [146]. Como resultado de esta búsqueda se obtuvieron 11 proteínas candidatas. En la Figura 11 se puede observar un árbol filogenético con dichas proteínas, construido con el fin de inferir sus funciones y proximidad, a partir de posibles relaciones evolutivas [134]. Al analizar este árbol se pueden distinguir 4 grupos: los primeros dos agruparían miembros de la familia de los autotransportadores. En particular, el grupo 1 está constituido por proteínas pertenecientes a los ATs de tipo I, mientras que en el segundo se pueden identificar proteínas pertenecientes a los ATs tipo II. En el tercer grupo se ubican proteínas que no pertenecerían a ninguna familia en particular y todas presentarían un único dominio asociado a la adhesión (hemaglutinina, intimina o adhesina). Por último, en el cuarto grupo se encuentran dos proteínas con dominios de invasina.



**Figura 11. Árbol filogenético de posibles adhesinas codificadas en el genoma de *B. suis* 1330.** Mediante un análisis bioinformático se buscaron en el genoma de *B. suis* 1330, genes que codifiquen proteínas que presenten uno o más dominios asociados a la adhesión. De este modo se identificaron 11 genes candidatos. Las proteínas codificadas por los genes candidatos fueron agrupadas en cuatro grupos en un árbol filogenético construido utilizando el método de distancia *Neighbor Joining*. Adaptado de la tesis doctoral de D. Posadas (2010).

La proteína BRA1148, cuyo gen se encuentra localizado en el cromosoma II, fue previamente caracterizada en nuestro laboratorio [136]. Inicialmente, con el fin de identificar adhesinas de *B. suis*, se construyó una biblioteca de fagos que exponen en su cápside péptidos de *B. suis* 1330 (*phage display*). Exponiendo esta biblioteca a fibronectina inmovilizada se aislaron fagos que expresaban fragmentos de proteínas candidatas a ser adhesinas con capacidad de unión a fibronectina, uno de los componentes de la ECM del hospedador a los que *Brucella* es capaz de adherirse. Entre los fagos candidatos, se identificó uno que expresaba un péptido de este autotransportador monomérico (BR1148), al que se denominó BmaC (por *Brucella monomeric autotransporter*). El fago que expresaba el péptido de BmaC fue capaz de inhibir la adhesión de *B. suis* tanto a una monocapa de HeLa como a fibronectina inmovilizada. A su vez, la cepa de *B. suis* mutante en *bmaC* mostró una menor capacidad de adhesión a fibronectina inmovilizada y a las líneas celulares epiteliales HeLa y A549 (línea epitelial pulmonar humana). Al realizar infecciones a células HeLa co-inoculando las cepas mutante y silvestre, la mutante fue desplazada por la silvestre. Se determinó que anticuerpos anti-BmaC así como anti-fibronectina son capaces de inhibir la adhesión de *Brucella* a células HeLa. Se propuso que



BmaC mediaría la adhesión de *B. suis* a la fibronectina, tanto para adherirse a la ECM, como a fagocitos no profesionales [136].

Por otro lado, dos de las proteínas del grupo 2 (BR0072 y BR1846), denominadas BtaE y BtaF respectivamente por sus siglas en inglés (*Brucella trimeric autotransporter*), pertenecen a la familia de ATs tipo II y contribuyen a la adhesión de *B. suis* a células del hospedador y componentes de la ECM [137, 138]. El análisis de los genomas de *Brucella* spp. mostró que casi todas las cepas de las diferentes especies de *Brucella* albergan dos autotransportadores triméricos, los ortólogos de BtaE y BtaF. En general, los genes de estas proteínas en las distintas especies de *Brucella* contienen todos los dominios necesarios para su secreción y función. En los ensayos realizados en *B. suis*, BtaF resultó ser promiscua, dado que tuvo la capacidad de adherirse a múltiples compuestos y a superficies tanto bióticas como abióticas. Además fue necesaria para la adhesión en células epiteliales. Ambas proteínas fueron requeridas para una completa virulencia en ratón. Al igual que BmaC, BtaE y BtaF se expresaron en una baja proporción de bacterias, pero en todos los casos se observaron en el polo nuevo generado luego de la división celular, sugiriendo que el polo nuevo funcionaría como “polo adhesivo”. Esto es consistente con el carácter polar observado en este género bacteriano, y en algunos organismos filogenéticamente emparentados. Curiosamente, BtaF también estuvo implicada en la resistencia al complemento presente en el suero porcino. Estos resultados demuestran la importancia de los ATs en el proceso infeccioso de *Brucella* [136-138, 147].

Llamativamente, si bien BR0049 se agrupó con BR1846 y BR0072, no presentó dominios típicos de ATs tipo II (ver capítulo II de Resultados).

Como se describirá en la sección siguiente, la exploración por métodos informáticos del genoma de *B. suis* 1330 muestra que además del ATI BmaC, dicho genoma alberga otras dos proteínas de la familia ATI, denominadas BmaA (110 kDa) y BmaB (160 kDa). La presencia de motivos asociados con adhesinas que se repiten a lo largo del dominio pasajero/funcional sugiere que ambas proteínas podrían participar en la adhesión de la bacteria al hospedador. Una búsqueda de los correspondientes ortólogos en los genomas de otras especies de *Brucella* indica que éstas también albergarían los genes *bmaA* y *BmaB*; sin embargo, en muchos casos se trataría de pseudogenes (ver Resultados - sección I.3). Estas observaciones abren interesantes interrogantes en cuanto al rol de estas potenciales adhesinas en la preferencia de hospedador por *Brucella* spp.

## Hipótesis y Objetivos

La envoltura celular es el mayor punto de interacción entre *Brucella* y el hospedador, y por lo tanto, las moléculas que la conforman tienen un rol fundamental en el éxito de la infección. Justamente, la envoltura, y en particular la membrana externa de *Brucella* presentan características únicas que convierten a este patógeno en un organismo furtivo y resistente a diversos agentes nocivos del hospedador. Aunque se ha avanzado considerablemente en la comprensión de las bases genético-moleculares que le permiten a *Brucella* sortear la respuesta inmune del hospedador, evadir el camino lisosomal y crear su nicho replicativo intracelular, los mecanismos moleculares que subyacen a la interacción inicial con el hospedador, incluida la adhesión a la célula hospedadora han sido poco explorados. La hipótesis de trabajo es que *Brucella* expresa múltiples adhesinas que contribuyen a la adhesión de la bacteria a diversos tipos celulares y tejidos.

Por otro lado, la correcta inserción en la ME de factores de virulencia, incluidas proteínas con propiedades adhesivas, requiere de complejas maquinarias de biogénesis. Por las características únicas de la envoltura de *Brucella*, estas maquinarias se han adaptado a ensamblar una pared celular rígida y resistente a varios agentes tóxicos del hospedador. Si bien BR0049 resultó filogenéticamente cercana a proteínas de la familia de los AT, no pertenece a esta familia. Los fenotipos de sensibilidad asociados a la mutante [37] sugieren que BR0049 tendría un rol más general asociado a la biogénesis de la envoltura celular.

## Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la adhesión de *Brucella* al hospedador y aportar al conocimiento sobre los factores involucrados en la biogénesis de la membrana externa de *Brucella*.

## Objetivos específicos

### 1. Evaluar la funcionalidad de las adhesinas BmaA y BmaB:

- Explorar la funcionalidad de BmaA y BmaB en diferentes especies de *Brucella* a través de análisis *in silico*
- Evaluar en *B. suis* el rol de BmaA y BmaB en la adhesión a células del hospedador y otras funciones “adhesivas” a través de enfoques genéticos.
- Determinar la localización subcelular de las adhesinas

### 2. Determinar la función del locus BR0048-*mapB*:

- Realizar predicciones de dominios y funciones de BR0048-MapB y la localización subcelular de MapB
- Determinar el efecto de la delección de *mapB* en las características de los componentes de la ME de *B. suis*
- Explorar la función de MapB de *B. suis* en la inserción de OMPs en la ME: identificación de posibles sustratos
- Analizar el rol de MapB en la replicación intracelular en macrófagos
- Analizar el rol de MapB en la virulencia *in vivo* en modelo murino

## Capítulo I:

### Caracterización de los autotransportadores monoméricos BmaA y BmaB

#### I.1 Descripción de los dominios proteicos

En el marco de esta tesis se exploró la función de las proteínas del grupo 1 en la interacción de *Brucella* con el hospedador (ver sección 10 Introducción) aún no caracterizadas, BR0173 (BmaA) y BR2013 (BmaB). Los genes BR0173 y BR2013 están localizados en el cromosoma I y II, respectivamente, del genoma de *B. suis* 1330. Como ya se describió anteriormente, ambos *loci* codifican para dos proteínas de la familia de los autotransportadores de tipo I. Las proteínas de esta familia poseen en el extremo N-terminal un péptido señal que les permite ser reconocidas por la maquinaria Sec, la cual media la translocación de la proteína a través de la MI y hacia el espacio periplásmico. Una vez allí, el barril  $\beta$  codificado en el extremo C-terminal se inserta en la membrana externa formando un poro a través del cual el dominio pasajero, y funcional, se transloca al medio extracelular. Como se mencionó en la Introducción y se describirá en el Capítulo II de Resultados, se ha presentado evidencia que indica que el barril  $\beta$  C-terminal es necesario pero no suficiente para la correcta inserción de proteínas de esta familia en la ME; efectivamente, otras maquinarias asisten a la translocación de estas proteínas [90, 96] (esta Tesis).

El gen *bmaA* tal cual está anotado codifica para una proteína de 1113 aminoácidos (110 kDa) [145]. Sin embargo, la búsqueda del péptido señal mediante el programa SignalP (tanto las versiones 4.1 como 3.0) no arrojó ningún resultado positivo. Este hecho nos llevó a analizar la secuencia de ADN río arriba del codón de iniciación anotado. Este estudio nos permitió identificar un marco de lectura abierto (ORF) alternativo, cuyo codón de iniciación codificaría para una valina, 66 pb río arriba del inicio anotado que podría corresponder al inicio de la traducción. Se ha reportado que los codones GTG (Val) y TTG (Leu) son usualmente reconocidos como inicio de la traducción de genes en procariontes [148, 149]. Con el fin de corroborar dicha observación se analizó el péptido propuesto con SignalP, prediciéndose un sitio de corte con alto *score*. Esta observación sugiere que BmaA es una proteína de 1135 aminoácidos (114 kDa) en lugar de los 1113 previamente propuestos. El péptido señal constaría de 31 aminoácidos, presentando un sitio posible de corte entre los residuos 31 y 32.

La proteína predicha posee el dominio C-terminal característico de autotransportador conformado por 12 hebras  $\beta$  antiparalelas predichas (Jpred4) y en el

dominio pasajero presenta 5 repeticiones asociadas a autotransportadores (PATR) [150] y dominios clásicos relacionados a factores de virulencia como el del tipo pectina liasa (o *pectin lyase-like*) según las bases de datos Pfam, TIGR e InterProScan. Este dominio está presente en proteínas que son consideradas factores de virulencia y su rol primario está descrito en la hidrólisis de pectina, uno de los componentes de la pared celular vegetal, por lo tanto suele estar presente frecuentemente en fitopatógenos. Sin embargo, este dominio también se encuentra presente en otros factores de virulencia relacionados a células de mamíferos como la proteína *tailspike* del fago P22 de *Salmonella*, y la proteína Pertactina (P.69) de *Bordetella pertussis* [151]; además según la base de datos del NCBI aparecen dominios de la superfamilia AidA (*e-value*  $2,9 \cdot 10^{-30}$ ), dichos dominios corresponden a la adhesina AIDA-I de *E. coli* enteropatógena (O126:H27) [152].

Por su parte, BmaB está anotada como una proteína de 1593 aminoácidos y posee los dominios típicos en el N y C-terminal. Presenta un péptido señal predicho de 25 residuos (SignalP 3.0) y el dominio pasajero posee los dominios descritos para BmaA, además de un dominio identificado en Pfam como Pertactina (PF03212.14) [151]. La Pertactina es una de las principales proteínas que participa en la adhesión de *Bordetella pertussis* a las células epiteliales de la tráquea y constituye uno de los factores de virulencia característicos de dicha bacteria.

En la Figura 12 se esquematizan los dominios de las proteínas. La simple observación de la organización de dominios de BmaA y BmaB muestra que estas proteínas presentan una organización de dominios y motivos similar, y que se diferencian fundamentalmente en el número de PATRs y en la presencia del dominio Pertactina en BmaB. Más aún, el alineamiento de ambas proteínas con el programa Clustal Omega, arroja una identidad de secuencia del 41.87%. Además, ambas proteínas comparten características en común con BmaC, como ser la arquitectura de dominios característicos de autotransportadores. Realizando un alineamiento observamos que presentan una identidad entre el 28% (BmaA) y 30% (BmaB) con una porción hacia el C-terminal de BmaC.

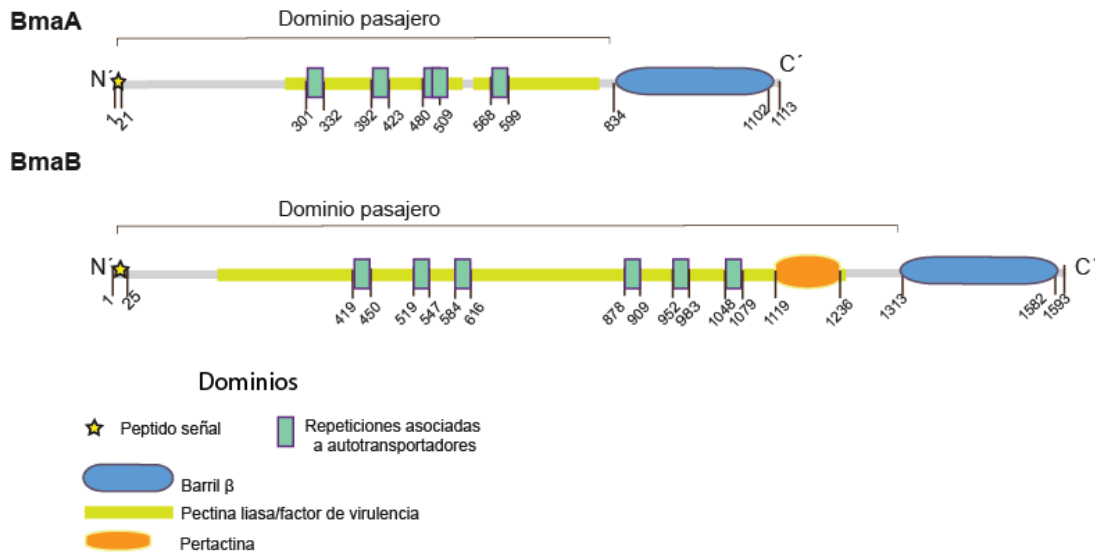


Figura 12. Esquema de los dominios predichos para las proteínas BmaA y BmaB. Se utilizó la información conjunta obtenida a partir de Pfam, InterProScan y SignalP.

## I.2 Funcionalidad de ATIs en *Brucella* spp: análisis de pseudogenes *in silico*

Como se mencionó en la Introducción (sección 3 - *Brucella* spp.) es sabido que los genomas de las distintas especies de *Brucella* son muy similares entre sí. Las diferencias encontradas corresponden, en mayor medida, a proteínas de la superficie. Dado que las mismas son las responsables de la interacción inicial con el hospedador, es de esperarse que estén sujetas a una presión selectiva mayor; podría proponerse entonces que los genes de estas proteínas sufran mutaciones a lo largo de los eventos de especiación. Algunas de estas mutaciones podrían alterar dominios, motivos o inducir cambios estructurales locales, y otras mutaciones podrían incluso inactivar el gen dando lugar a “pseudogenes”.

Como se describió en la sección anterior el análisis de dominios de BmaA y BmaB de *B. suis* indica que podrían ser funcionales. Para abordar la posibilidad que exista variabilidad entre especies de *Brucella* se realizó un análisis bioinformático de las proteínas ortólogas a BmaA y BmaB en *B. abortus* y *B. melitensis* con el objetivo de determinar si los genes de estas adhesinas están presentes y si los productos podrían ser funcionales. Para obtener resultados concluyentes en cuanto a variabilidad de secuencia o pseudogenización en función de la especie se analizaron las secuencias de los ortólogos de numerosas cepas; 10 cepas de *B. suis*, 9 de *B. abortus*, 8 de *B. melitensis*. Los resultados se plasmaron en la Tabla 1.

**Tabla 1**  
**Análisis *in silico* de secuencias de autotransportadores monoméricos, basadas en la homología con la cepa de referencia utilizada en esta tesis (*B. suis* 1330)**

Especie/cepa	BmaA					BmaB				
	PS	AT	PATR	Long	Func	PS	AT	PATR	Long	Func
<i>B. suis</i>										
bv1 1330	si	si	5	1113	✓	Si	si	6	1593	✓
bv1 VBI22	si	si	5	1113	✓	si	si	6	1593	✓
bv2Bs143CITA	si*	si	3	678	✓	si	no	5	1020	✗
bv2 PT09172	si	si	3	678	✓	si	no	5	1018	✗
bv3 str. 686	si	si	1	421	✓	si	si	3	571	✓
bv4 str. 40	si	si	5	990	✓	si	no	5	1020	✗
bv5 str. 513	si*	si	8	1066	✓	si	no	5	1018	✗
CNGB 786	si*	si	1	594	✓	no	no	6	869	✗
92/63	no	no	9	1980	✗	no	no	5	867	✗
ZW046	si	si	5	1062	✓	si*	si	1	678	✓
<i>B. abortus</i>										
2308 A	si*	no	15	2091	✗	no	si	3	478	✗
63/294	si*	si	5	1135	✓	no	no	3	743	✗
64/122	si*	si	13	2073	✓	no	si	2	671	✗
bv.9 str. C68	no	si	11	1595	✗	no	si	3	696	✗
S19	si*	no	15	2044	✗	no	no	3	743	✗
BDW	si	no	15	1741	✗	no	no	3	743	✗
3196	no	si	11	1595	✗	no	no	3	743	✗
bv.6 str. 870	no	si	9	1217	✗	no	no	3	743	✗
bv.1 9-941	si*	no	15	2096	✗	no	si	0	487	✗
<i>B. melitensis</i>										

bv. 1 str. 16M	no	si	0	487	<b>X</b>	no	si	6	1374	<b>X</b>
M28	si*	si	0	529	<b>✓</b>	no	si	1	565	<b>X</b>
bv. 2 str. 63/9	si*	si	0	529	<b>✓</b>	no	si	1	565	<b>X</b>
F8/01-155	si*	si	0	529	<b>✓</b>	no	si	1	565	<b>X</b>
UK22/06	no	no	6	405	<b>X</b>	no	si	1	565	<b>X</b>
F5/07-239A	no	no	4	354	<b>X</b>	si	si	6	1551	<b>✓</b>
bv. 3 str. Ether	no	si	0	487	<b>X</b>	si	si	6	1551	<b>✓</b>
UK31/99	no	no	4	360	<b>X</b>	si	si	6	1551	<b>✓</b>

\* Se realizó una búsqueda de 300 pb río arriba del inicio propuesto de la traducción, se tradujo la secuencia y se predijo la presencia de péptido señal buscando todas las valinas o leucinas posibles.

PS: péptido señal predicho por SignalP v.3.0 y 4.1AT: dominio autotransportador, barril  $\beta$

PATR: repeticiones asociadas a autotransportadores

Long: longitud de secuencia (aminoácidos). En los casos que fue necesario se corrigió la longitud según la predicción del péptido señal.

Func: predicción de la funcionalidad según los la presencia o ausencia de los dominios antes mencionados. X: pseudogen, ✓: presenta todos los dominios funcionales.

Todos los genomas de las cepas analizadas (27 en total) mostraron albergar los *loci* de los ortólogos de los ATI BmaA y BmaB identificados en *B. suis* 1330. Sin embargo, observamos que muchos de los genes correspondientes podrían estar inactivos debido a mutaciones en la secuencia que provocan la interrupción de la traducción y la consiguiente ausencia de algún dominio esencial. Además, los autotransportadores monoméricos que potencialmente serían funcionales presentan diferencias marcadas tanto inter como intraespecíficas en relación a su tamaño, número de repeticiones y presencia o ausencia de dominios relacionados a la adhesión.

Los ortólogos de BmaA de *B. abortus* presentan gran diversidad. Por un lado se observa que las proteínas tienden a ser de mayor tamaño. Las diferencias se encuentran en el dominio pasajero de la proteína y por ende el mismo alberga mayor número de repeticiones asociadas a autotransportadores (PATR). En el análisis nos encontramos con 3 situaciones; las cepas 2308, S18 y 9-941 tienen un codón *stop* prematuro y por lo tanto no expresan el dominio C-terminal de barril  $\beta$ . Otro caso es el de las cepas 63/294 y 64/122 donde se predice funcionalidad dado que presentan todos los dominios, aunque la anotación del ORF no sería la correcta dado que la predicción del péptido señal se da aproximadamente 113 aminoácidos antes de lo predicho. Por último, las cepas C68, 870 BDW y 3196 que no codifican para un péptido señal, al mirar en la disposición del genoma



se observa que hay un codón *stop* prematuro en el N-terminal de la proteína haciendo que se divida el ORF. En el caso de BmaA de *B. melitensis* se encontró una mutación con respecto a la cepa de *B. suis* 1330 que genera una deleción de una base (Figura 13A), produciendo un corrimiento del marco de lectura y por ende generando una proteína más corta que solo alberga el dominio C-terminal característico de los autotransportadores. Curiosamente, en las cepas M28, 63/9 y F8/01-155, a pesar de predecirse ORFs más cortos, se predice un péptido señal, indicando que éste podría haber sido generado *de novo*.

Particularmente, *bmaB* en *B. abortus* sería un pseudogen en todas las cepas analizadas; la presencia de un codón *stop* prematuro genera dos péptidos truncos. Esta mutación probablemente haya ocurrido en un ancestro común dado que se encuentra conservada en las cepas analizadas dentro de la misma especie (Figura 13B). De la misma manera, en las cepas de *B. melitensis* en las que *bmaB* sería un pseudogen, ésta muestra una mutación conservada. Sin embargo, esta mutación no es la misma que la detectada en *bmaB* de *B. abortus*. Las cepas que no poseen esa mutación, son similares a *B. suis* 1330 y la predicción indica que podrían ser funcionales. El caso de la cepa 16M es particular dado que sería un pseudogen pero no presenta la misma mutación sino que el comienzo de la proteína es posterior al inicio en *B. suis* 1330 generando una proteína predicha sin péptido señal. Según la filogenia de *Brucella spp.* (ver sección 3 - Introducción), *B. abortus* y *B. melitensis* están más cercanas entre sí que con *B. suis*. Dado que, en general, las mutaciones están conservadas dentro de cada linaje pero son diferentes entre sí, se puede decir que no ocurrieron en el ancestro común que dio origen a ambas especies sino que ocurrió en paralelo en ambos linajes, resultando un ejemplo claro de evolución convergente [153].

**A.**

BRA0173  
UK22/06  
11-1823-3434  
bv.2str.63/9  
16M  
F5/07-239A

GCCAATAGCTATACGGGCGCAACGACGGTGTCTGCGGGCACGCTGACACAGGGGGCGGCA  
GCCAATAGCTATACGGGCGA-ACGACGGTGTCTGCGGGCACGCTGACACAGGGGGCGGCA  
GCCAATAGCTATACGGGCGA-ACGACGGTGTCTGCGGGCACGCTGACACAGGGGGCGGCA  
GCCAATAGCTATACGGGCGA-ACGACGGTGTCTGCGGGCACGCTGACACAGGGGGCGGCA  
GCCAATAGCTATACGGGCGA-ACGACGGTGTCTGCGGGCACGCTGACACAGGGGGCGGCA  
GCCAATAGCTATACGGGCGA-ACGACGGTGTCTGCGGGCACGCTGACACAGGGGGCGGCA  
\*\*\*\*\*

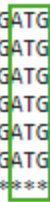


BRA0173  
UK22/06  
11-1823-3434  
bv.2str.63/9  
16M  
F5/07-239A

GGAGGCTTCAGTACGGCTTCGTGCGCTATGACGTGGATACTGACGGCACGCTTGATCTG  
GGAGGCTTCAGTACGGCTTCGTGCGCTATGACGTGGATACTGACGGCACGCTTGATCTG  
GGAGGCTTCAGTACGGCTTCGTGCGCTATGACGTGGATACTGACGGCACGCTTGATCTG  
GGAGGCTTCAGTACGGCTTCGTGCGCTATGACGTGGATACTGACGGCACGCTTGATCTG  
GGAGGCTTCAGTACGGCTTCGTGCGCTATGACGTGGATACTGACGGCACGCTTGATCTG  
GGAGGCTTCAGTACGGCTTCGTGCGCTATGACGTGGATACTGACGGCACGCTTGATCTG  
\*\*\*\*\*

BRA0173  
UK22/06  
11-1823-3434  
bv.2str.63/9  
16M  
F5/07-239A

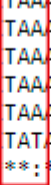
GGCGGCTTCGATACGATGCTGGCCGCGCTTTACAATGCCGGCACAATCAACATGAATGTC  
GGCGGCTTCGATACGATGCTGGCCGCGCTTTACAATGCCGGCACAATCAACATGAATGTC  
GGCGGCTTCGATACGATGCTGGCCGCGCTTTACAATGCCGGCACAATCAACATGAATGTC  
GGCGGCTTCGATACGATGCTGGCCGCGCTTTACAATGCCGGCACAATCAACATGAATGTC  
GGCGGCTTCGATACGATGCTGGCCGCGCTTTACAATGCCGGCACAATCAACATGAATGTC  
GGCGGCTTCGATACGATGCTGGCCGCGCTTTACAATGCCGGCACAATCAACATGAATGTC  
\*\*\*\*\*



**B.**

64/122  
bv.9  
63/294  
S19  
2308  
B.suis

GTTCTGACAGGAACCAACAGCTAAACTGGTACAACAACAGTAAGCGAAGGCACGCTCCAG  
GTTCTGACAGGAACCAACAGCTAAACTGGTACAACAACAGTAAGCGAAGGCACGCTCCAG  
GTTCTGACAGGAACCAACAGCTAAACTGGTACAACAACAGTAAGCGAAGGCACGCTCCAG  
GTTCTGACAGGAACCAACAGCTAAACTGGTACAACAACAGTAAGCGAAGGCACGCTCCAG  
GTTCTGACAGGAACCAACAGCTAAACTGGTACAACAACAGTAAGCGAAGGCACGCTCCAG  
GTTCTGACAGGAACCAACAGCTAAACTGGTACAACAACAGTAAGCGAAGGCACGCTCCAG  
\*\*\*\*\*



64/122  
bv.9  
63/294  
S19  
2308  
B.suis

CTTGGTAACGGTACCGGACAGGAAGCATTCTGGCGATGTGATCGTGGATCCAATTCC  
CTTGGTAACGGTACCGGACAGGAAGCATTCTGGCGATGTGATCGTGGATCCAATTCC  
CTTGGTAACGGTACCGGACAGGAAGCATTCTGGCGATGTGATCGTGGATCCAATTCC  
CTTGGTAACGGTACCGGACAGGAAGCATTCTGGCGATGTGATCGTGGATCCAATTCC  
CTTGGTAACGGTACCGGACAGGAAGCATTCTGGCGATGTGATCGTGGATCCAATTCC  
CTTGGTAACGGTACCGGACAGGAAGCATTCTGGCGATGTGATCGTGGATCCAATTCC  
\*\*\*\*\*

**C.**

```

16M          ctactttcaccggcaataatacttattcgggagggttgactgttgaacaaggtacggctg
F5/07-239A  CTACTTTCACCGGCAATAATACTTATTCTGGGAGGTTTGACTGTTGAACAAGGTACGGCTG
UK31/99      CTACTTTCACCGGCAATAATACTTATTCTGGGAGGTTTGACTGTTGAACAAGGTACGGCTG
bv.3str.Ether  CTACTTTCACCGGCAATAATACTTATTCTGGGAGGTTTGACTGTTGAACAAGGTACGGCTG
F8/01-155    CTACTTTCACCGGCAATAATACTTATTCTGGGAGGTTTGACTGTTGAACAAGGTACGGCTG
UK22/06      CTACTTTCACCGGCAATAATACTTATTCTGGGAGGTTTGACTGTTGAACAAGGTACGGCTG
bv.2str.63/9  CTACTTTCACCGGCAATAATACTTATTCTGGGAGGTTTGACTGTTGAACAAGGTACGGCTG
M28          CTACTTTCACCGGCAATAATACTTATTCTGGGAGGTTTGACTGTTGAACAAGGTACGGCTG
BR2013       ctactttcaccggcaataatacttattcgggagggttgactgttgaacaaggtacggctg
*****

16M          aagcaggtattgccgataatgctttcggttcgggcccgctaacagtaacagcgggagcta
F5/07-239A  AAGCAGGTATTGCCGATAATGCTTTCGGTTCGGGCCCGCTAACAGTACAGGCGGGAGCTA
UK31/99      AAGCAGGTATTGCCGATAATGCTTTCGGTTCGGGCCCGCTAACAGTACAGGCGGGAGCTA
bv.3str.Ether  AAGCAGGTATTGCCGATAATGCTTTCGGTTCGGGCCCGCTAACAGTACAGGCGGGAGCTA
F8/01-155    AAGCAGGTATTGCCGATAATGCTTTCGGTTCGGGCCCGCTAACAGTATAGGCGGGAGCTA
UK22/06      AAGCAGGTATTGCCGATAATGCTTTCGGTTCGGGCCCGCTAACAGTATAGGCGGGAGCTA
bv.2str.63/9  AAGCAGGTATTGCCGATAATGCTTTCGGTTCGGGCCCGCTAACAGTATAGGCGGGAGCTA
M28          AAGCAGGTATTGCCGATAATGCTTTCGGTTCGGGCCCGCTAACAGTATAGGCGGGAGCTA
BR2013       aagcaggtattgccgataatgctttcggttcgggcccgctaacagtaacagcgggagcta
*****

```

Figura 13. A. Alineamiento múltiple de las secuencias de las cepas de *B. melitensis* ortólogas a BmaA (BR0173) y BmaA de *B. suis* 1330. La flecha roja indica la posición donde se produjo una delección en *B. melitensis*. El recuadro verde indica el comienzo de la traducción (ATG) de los ORF identificados para *B. melitensis*. Se puede observar que esta mutación está conservada dentro de las cepas analizadas. B. Alineamiento múltiple de las secuencias de las cepas de *B. abortus* ortólogas a BmaB (BR2013) y BmaB de *B. suis* 1330. El recuadro rojo indica la posición donde se generó una mutación puntual (TxA) generando un codón *stop de novo* en las cepas de *B. abortus*. Se puede observar que esta mutación está conservada dentro de las cepas analizadas. C. Alineamiento múltiple de las secuencias de las cepas de *B. melitensis* ortólogas a BmaB (BR2013) y BmaB de *B. suis* 1330. La flecha roja indica la posición donde se generó una mutación puntual (CxT) generando un codón *stop de novo* en algunas cepas de *B. melitensis*.

Dados estos resultados, cabe especular que la diferencia en el número de autotransportadores funcionales en las especies analizadas, y la variabilidad existente, puede jugar un rol fundamental en la capacidad de cada especie para interactuar con la célula hospedadora y por lo tanto contribuir en la especificidad de hospedador.

### I.3 Análisis de la expresión por RT-PCR

Con el fin de evaluar si los niveles de expresión génica de los ATI daban un indicio de funcionalidad se realizaron ensayos de RT-PCR a partir de cDNA de las cepas de referencia de las especies clásicas del género (*B. suis* 1330, *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16M) obtenido de bacterias cultivadas en medio rico (TSB) en fase exponencial de crecimiento.

Por RT-PCR observamos expresión detectable de los genes de las dos adhesinas *bmaA* y *bmaB* en las tres especies de *Brucella* (Figura 14). Por lo tanto, la pseudogenización

de *bmaA* y *bmaB* de *B. melitensis* 16M y *B. abortus* 2308 no habría afectado de manera evidente su expresión.

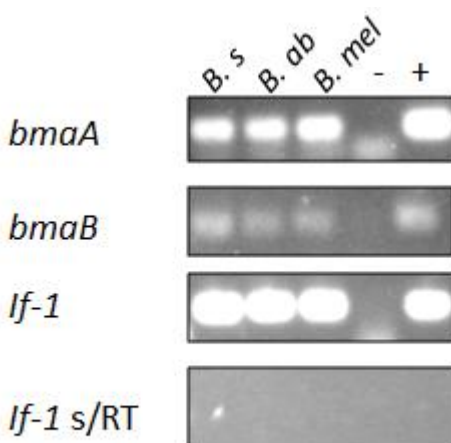


Figura 14. RT-PCR con oligonucleótidos específicos que hibridan sobre los genes *bmaA*, *bmaB*, *bmaC* e *if-1* como control. Se extrajo ARN y se sintetizó cDNAs de *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis*. El control negativo se realizó en ausencia de cDNA; como control positivo ADN genómico de *B. suis*. Como control de expresión *if-1* y como control de la transcripción se obtuvieron muestras de cDNA a las cuales no se les agregó la enzima retrotranscriptasa (*if-1* sin RT).

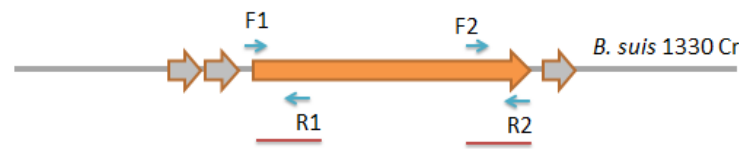
#### I.4 Generación de cepas mutantes

Como se mostró anteriormente, el análisis *in silico* realizado predijo que BmaA y BmaB no serían pseudogenes en *B. suis* 1330; y más aún, el estudio a nivel de ARNm reveló que éstos se transcriben en condiciones de cultivo *in vitro*. Este hecho planteó el objetivo de estudiar si efectivamente estas proteínas estarían involucradas en el mecanismo de adhesión. Para ello, se llevó a cabo una estrategia genética, basada en la caracterización fenotípica de mutantes. Para generar las mutantes se amplificó una región río arriba del gen de interés (utilizando los oligonucleótidos F1 y R1) y una región río abajo (utilizando los oligonucleótidos F2 y R2) (ver esquema en la Figura 15A) y éstos se ligaron utilizando un plásmido que contiene un casete de resistencia a antibiótico. En el caso de *bmaA* se utilizó una región que contiene secuencias de interrupción de la traducción y terminadores de la transcripción en tándem (*stops*) del casete Omega (StrR) [154] y en el caso de *bmaB* un casete de kanamicina [155]. Esta construcción se clonó en el plásmido pK18mobsacB [156], el cual contiene un origen de replicación funcional en *E. coli* pero no en *Brucella*. Las

mutantes se generaron por doble recombinación homóloga, luego de transferir el plásmido resultante por conjugación.

Con el fin de complementar las mutantes, los genes completos (incluidas la regiones que los flanquean) fueron clonados en el plásmido de amplio rango pBBR1MCS [157]. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos Gen\_F y Gen\_R para amplificar la región correspondiente (Figura 15B). Luego, se transformó la cepa de *Brucella* mutante con el plásmido pBBR $_{gen}$ , obteniendo la cepa complementada.

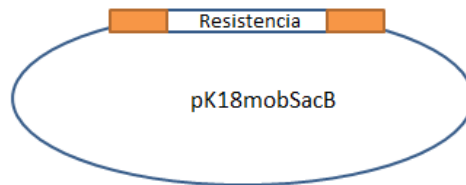
#### A. Generación de cepa mutante



#### 1. PCR



#### 2. Ligación



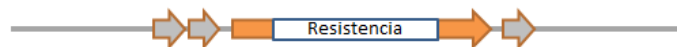
#### 3. Doble recombinación homóloga

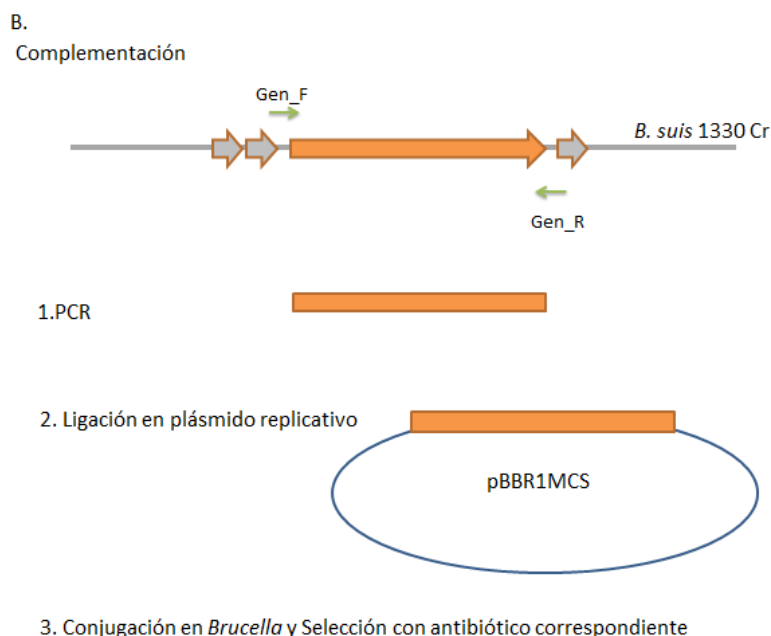


#### 4. Selección: SacR, KmS, SpecR



#### 5. Resultado





**Figura 15. A. Esquema de obtención de las mutantes. F1, R1, F2, R2 representan los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos correspondientes por PCR. B. Esquema de la obtención de la cepa complementada.**

## I.5 Funcionalidad de las adhesinas monoméricas BmaA, BmaB y BmaC

### Adhesión a células en cultivo

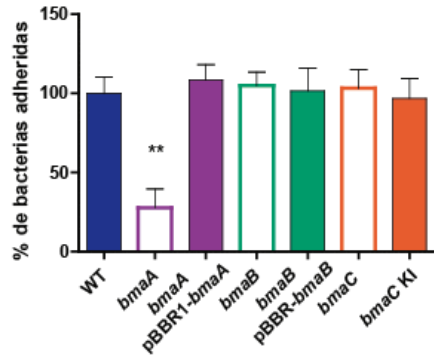
*Brucella* tiene la capacidad de infectar diversos tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, trofoblastos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales [55]. Como se mencionó anteriormente, los patógenos intracelulares deben adherirse a las células hospedadoras como paso previo a la internalización. Con el fin de caracterizar la potencial función de BmaA y BmaB de contribuir a la adhesión a células hospedadoras se decidió evaluar el efecto de la inactivación de *bmaA* o *bmaB* en la adhesión a distintos tipos celulares, en colaboración con el grupo del Dr. Pablo Baldi (Laboratorio de la respuesta inmune a la Brucelosis, IDEHU, CONICET-UBA) y la Dra. Maria Victoria Delpino (Instituto de Inmunología, Genética Y Metabolismo, INIGEM-CONICET). Resultados previos de nuestro laboratorio indicaron que BmaC presenta función de adhesión a células epiteliales en cultivo [136], como HeLa y A549. Dado que la contribución de BmaC en la interacción con otros tipos celulares no había sido estudiada se decidió ampliar el estudio e incluir a la cepa mutante  $\Delta bmaC$  y la cepa complementada *bmaC* KI (*knock in*).

En particular, se evaluó la adhesión de las mutantes a trofoblastos (Swan 71), células epiteliales de colon (HT-29 y CACO-2), sinoviocitos (SW 982 y cultivo primario) y

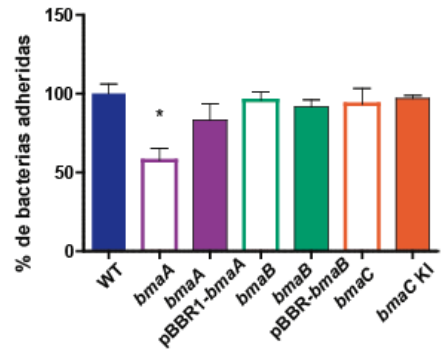
osteoblastos (hFOB y cultivos primarios a partir de calvaria de ratón) dado que se había observado previamente la capacidad de adhesión de las especies clásicas de *Brucella* a estos tipos de tejidos [158, 159]. Asimismo, es relevante evaluar el rol de las adhesinas a estos tipos celulares debido a la importancia que pueden tener en el proceso infeccioso. Dado que una de las vías principales de contagio de *Brucella* es por vía oral (por ingesta de productos lácteos no pasteurizados), se estudió el rol de las adhesinas en tipos celulares vinculados al tracto digestivo (HT-29 y CACO-2). Por otro lado, uno de los nichos de replicación y de mayor carga bacteriana es la placenta de animales infectados; es por ello que decidimos utilizar como células modelo a trofoblastos. Finalmente, una de las manifestaciones clínicas más frecuentes de la infección es la brucelosis osteoarticular, por lo tanto decidimos evaluar el rol de las proteínas Bma en sinoviocitos y osteoblastos, tanto en líneas celulares como cultivos primarios.

La mutante *bmaA* presentó una disminución en la adhesión a células epiteliales de colon en ambas líneas celulares HT-29 y Caco-2 (Figura 16A). En el caso de los trofoblastos las mutantes no presentaron diferencias con respecto a la cepa control; sin embargo, las cepas complementadas para *bmaA* y *bmaB*, construidas a partir del clonado de cada uno de los genes bajo su propio promotor en el plásmido pBBR1-MCS1 (CmR) (de mediano número de copias) mostraron un aumento significativo en la adhesión (Figura 16B). Por otro lado, las tres mutantes analizadas, *bmaA*, *bmaB* y *bmaC*, presentaron una disminución en la adhesión a sinoviocitos y osteoblastos, tanto en cultivo primario como en la línea celular (Figura 16C y D), con excepción de *bmaB* en cultivo primario de sinoviocitos. Estos resultados indican que los autotransportadores monoméricos identificados en el genoma de *B. suis* contribuyen con la adhesión inicial a distintos tipos celulares.

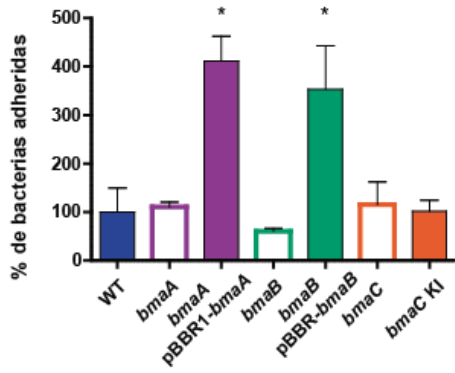
**A.** Línea celular de epitelio colorectal  
HT-29



Línea celular de epitelio colorectal  
Caco-2



**B.** Línea celular trofoblastos  
Swan 71





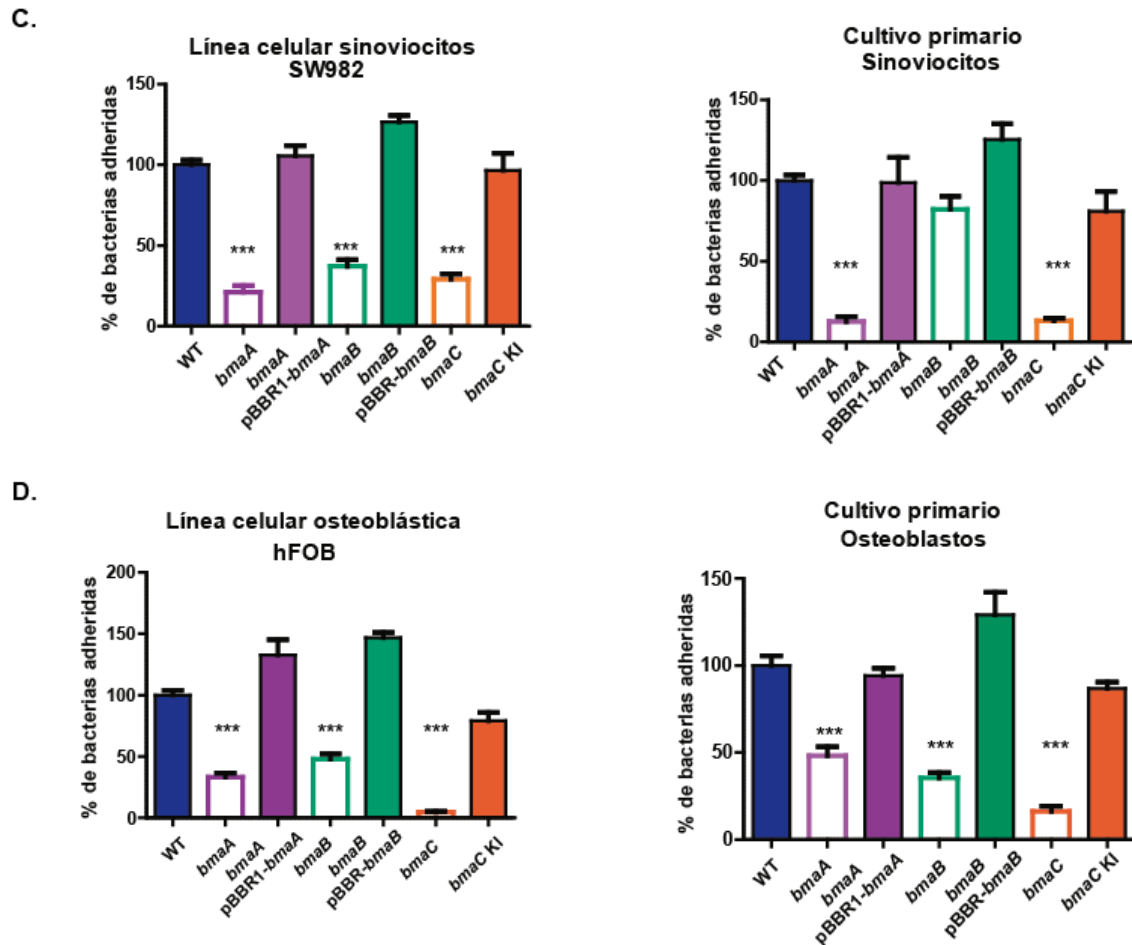


Figura 16. Adhesión a células en cultivo.

Las células se infectaron con las distintas cepas de *B. suis* (A-D), utilizando una multiplicidad de infección de 1:100. Se determinó el porcentaje de bacterias adheridas en función del total de bacterias inoculadas por pocillo. El porcentaje de bacterias adheridas se expresó relativo a la cepa control, a la cual se le asignó el valor de 100%. Los resultados que se muestran corresponden a la media  $\pm$  error estándar (SEM) del promedio de tres ensayos realizados por triplicado. Los datos fueron analizados con ANOVA seguido del test Tukey *a posteriori*. \*, Significativamente distinto del control ( $p < 0.05$ ), con un intervalo de confianza del 95%.

## I.6 BmaA y BmaB no están involucradas en la adhesión a soportes abióticos

Una manera de evaluar una posible función de las proteínas Bma en la interacción/cohesión entre bacterias, como también en la adhesión a un soporte es analizar la formación de un *biofilm* sobre un medio abiótico.

Se ha observado que las bacterias en cultivo pueden sufrir cambios en la estructura, o incluso la pérdida, del antígeno-O del LPS pasando de ser lisas a rugosas. Existen especies de *Brucella* que son naturalmente rugosas como ser *Brucella ovis* y *Brucella canis*

como se mencionó en Introducción (sección 6). Dichos cambios pueden afectar las propiedades adhesivas de las bacterias, alterando la interacción célula-célula o bien célula-soporte abiótico.

Para evaluar dicha posibilidad se realizó, a modo de control, un test de disociación como se ha descrito previamente [160]. Las cepas *B. suis bmaA::stops* y *bmaB::km* presentaron el típico comportamiento de las cepas lisas, coloreándose igual que la cepa wt, lo cual sugiere que no sufrieron un proceso de disociación. Se utilizó como control de cepa rugosa a *B. ovis* que se tiñó marcadamente de violeta oscuro.



**Figura 17. Evaluación de disociación. Tinción con Cristal violeta y oxalato de amonio de las colonias crecidas en placa en medio rico (TSA).**

Dado que BmaA y BmaB podrían tener funciones similares recientemente se generó una cepa doble mutante en los genes *bmaA* y *bmaB*. Esta mutante fue incluida, además de las simples mutantes en los ensayos que se describen a continuación. El análisis fenotípico de esta mutante permite evaluar posibles funciones redundantes, aditivas, sinérgicas o complementarias. Para obtener la doble mutante se partió de la cepa *B. suis bmaA::stops*, a la cual se le delecionó el gen *bmaB* por doble recombinación homóloga.

Se estudió la capacidad de formar una biomasa sobre placas de poliestireno de las cepas mutantes en *bmaA* y *bmaB* y de la doble mutante, y se las comparó con la capacidad de la cepa control (wt).

Se observó que las cepas no presentan diferencias significativas en cuanto a la capacidad de formación de *biofilm* sobre el sustrato abiótico hidrofóbico (poliestireno) respecto a los controles, aunque se debe aclarar que la biomasa adherida al soporte incluso en la cepa wt fue muy baja en las condiciones ensayadas.

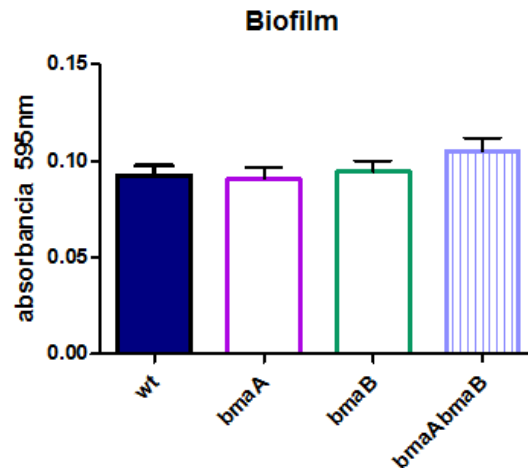


Figura 18: Formación de *biofilm* en medio rico (TSB). Se midió la capacidad formadora de *biofilm* por absorbancia (595nm) luego de tinción con cristal violeta. Los resultados que se muestran corresponden a la media  $\pm$  error estándar (SEM) del promedio de tres ensayos realizados por triplicado.

### I.7 BmaA y BmaB están involucradas en la adhesión a la ECM

Diversas evidencias sugieren que la adhesión de *Brucella* a la ECM y a células del hospedador son importantes para el proceso infeccioso [131-133, 135, 136, 138, 161]. Incluso se ha propuesto que la adhesión estaría mediada por proteínas de la superficie de la célula del hospedador ricas en residuos de ácido siálico y/o residuos sulfatados, así como también por componentes de la ECM como por ejemplo fibronectina y colágeno [131]. Se estudió entonces si BmaA y BmaB están involucradas en la adhesión a compuestos de la

ECM mediante ensayos con las cepas mutantes (Figura 19A).

A.

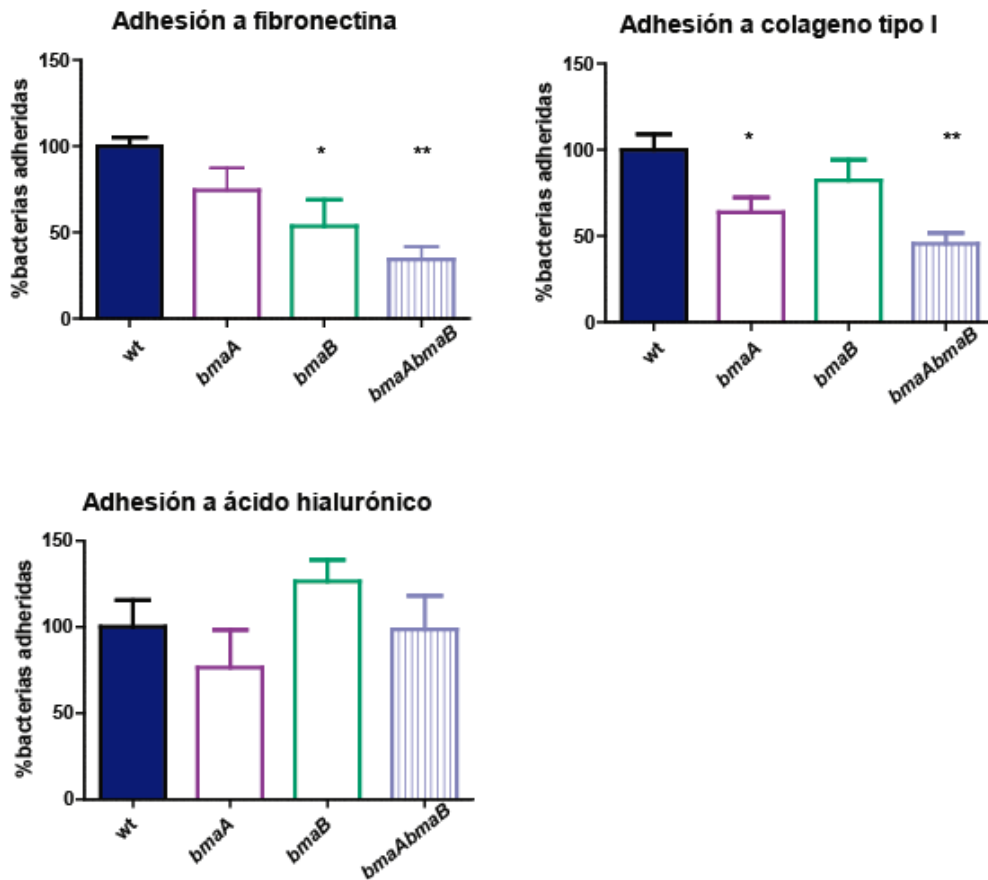


Figura 19A. Adhesión a componentes de la ECM Se analizó la adhesión de *B. suis* wt, *bmaA::stops*, *bmaB::km* y la doble mutante *bmaAbmaB* a colágeno tipo I, fibronectina y ácido hialurónico (componentes de la ECM). Los valores corresponden al porcentaje de bacterias adheridas a los pocillos luego de la incubación, referidos a la cepa control (pBBR vacío) a la cual se le asignó el valor de 100%. Los resultados que se muestran corresponden a la media  $\pm$  error estándar (SEM) del promedio de tres ensayos realizados por triplicado. Los datos fueron analizados con ANOVA seguido del test Tukey *a posteriori*. \*, Significativamente distinto del control ( $p < 0.05$ ), con un intervalo de confianza del 95%.

Por otro lado, se utilizó una estrategia que consistió en expresar en forma heteróloga en la cepa CC118 (no adherente ni invasiva) de *E. coli* (Eitel & Dersch, 2002) el gen que codifica para BmaA y BmaB en el plásmido pBBR y evaluar las propiedades adhesivas de estas cepas con respecto a la cepa control (*E. coli* CC118 con el pBBR vacío) (Figura 19B). Esta estrategia tiene la ventaja de proporcionar evidencias sobre actividad de adhesina de proteínas que puedan cumplir funciones redundantes con otras adhesinas en *Brucella* además de estudiar la capacidad de conferir dichas funciones en un contexto heterólogo.

B.

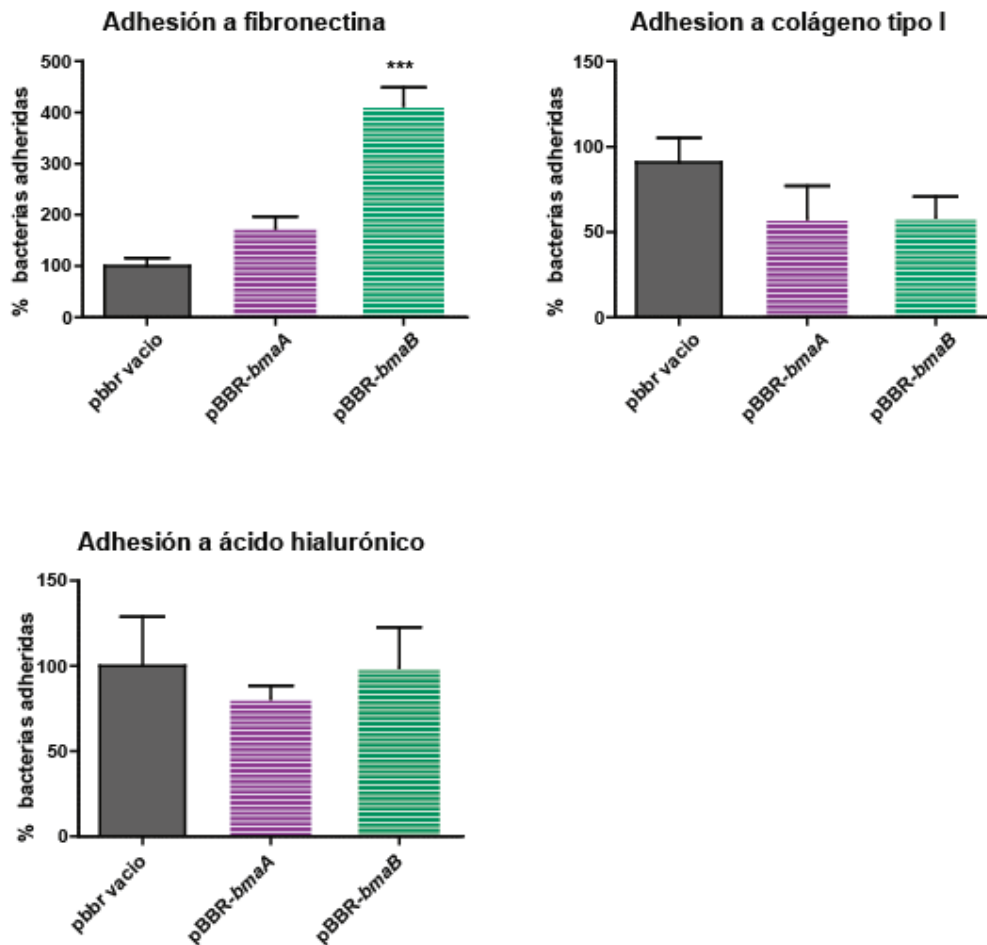


Figura 19B. Adhesión a componentes de la ECM Se analizó la adhesión *E.coli* CC118 pBBR**bmaA** y pBBR**bmaB** a colágeno tipo I, fibronectina y ácido hialurónico (componentes de la ECM). Los valores corresponden al porcentaje de bacterias adheridas a los pocillos luego de la incubación, referidos a la cepa control (pBBR vacío) a la cual se le asignó el valor de 100%. Los resultados que se muestran corresponden a la media  $\pm$  error estándar (SEM) del promedio de tres ensayos realizados por triplicado. Los datos fueron analizados con ANOVA seguido del test Tukey *a posteriori*. \*, Significativamente distinto del control ( $p < 0.05$ ), con un intervalo de confianza del 95%.

Tanto las mutantes *bmaA::stops* como la doble mutante *bmaA bmaB* presentaron una disminución en la adhesión a colágeno tipo I con respecto a la cepa control. Por otra parte, la mutante *bmaB::km* y la doble mutante *bmaA bmaB* se encontraron afectadas en la adhesión a fibronectina. En cuanto a la adhesión a ácido hialurónico ninguna de las mutantes presentó una diferencia significativa respecto a la cepa control. Los resultados

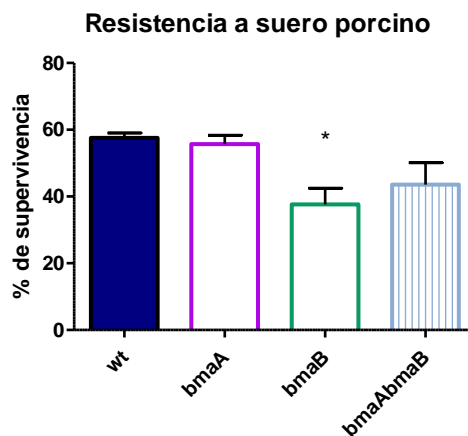
obtenidos indican que BmaA y BmaB estarían involucradas en la adhesión a componentes de la ECM como colágeno y fibronectina, no así a ácido hialurónico.

En cuanto a las cepas heterólogas, no se encontraron diferencias significativas en la adhesión a colágeno y ácido hialurónico. La cepa portadora del plásmido pBBR-*bmaB* presentó un aumento de entre 4 y 5 veces a fibronectina, confirmando la capacidad de BmaB de interactuar con dicho compuesto.

## I.8 Resistencia a suero porcino

*Brucella* es particularmente tolerante a la actividad bactericida del complemento [73, 162]. La estructura particular del LPS de bacteria es, al menos en parte, responsable de esta mayor tolerancia. Sin embargo se ha propuesto que otras moléculas además del LPS podrían contribuir con dicha resistencia [65]. Dado que algunos ATs, como por ejemplo YadA de *Y. enterocolitica* [163], UspA2 de *Moraxella catarrhalis* [164] y BtaF (una de las adhesinas de la familia de los ATII caracterizadas en nuestro laboratorio) [137] están involucrados en la tolerancia de éstas bacterias al complemento, se decidió evaluar un posible rol de BmaA y BmaB en la tolerancia a este mecanismo de defensa del hospedador. Para ello, se midió el porcentaje de supervivencia de las distintas cepas luego de ser incubadas en una dilución de suero porcino (66% de suero) con actividad de complemento y compararlas con la cepa control. Se utilizó como control la incubación de las bacterias en PBS y en suero calentado a 56 °C para inactivar la actividad del complemento.

Un 60% de las células de la cepa *B. suis* wt sobrevivió en luego de enfrentarla al suero porcino respecto al control. La mutante *bmaA* presentó un % de supervivencia similar al observado en la cepa wt. Sin embargo, la supervivencia de la cepa mutante *bmaB* fue moderadamente menor (aproximadamente 30%) respecto al de la cepa wt. La cepa doble mutante presentó una tendencia similar pero ésta no resultó estadísticamente significativa (Figura 20). Los resultados obtenidos sugieren que BmaB confiere a la bacteria que la porta, cierta tolerancia a la actividad bactericida del complemento presente en el suero.



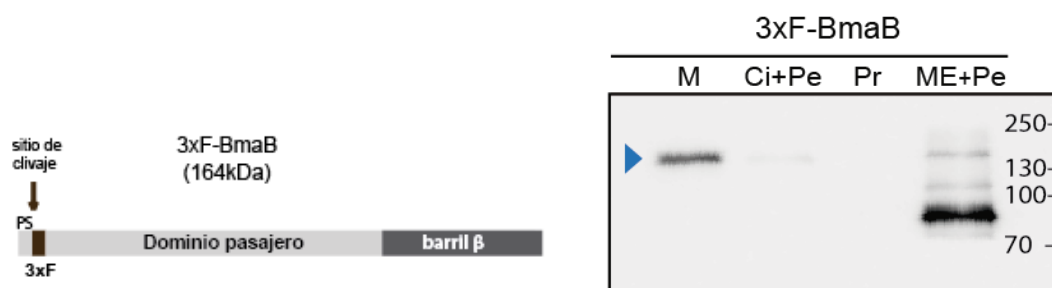
**Figura 20. Resistencia a suero porcino.** Porcentaje de supervivencia de las bacterias luego de haber sido incubadas durante 90 minutos a 37 °C con suero porcino. Los valores fueron relativizados con respecto al control en PBS. Los resultados que se muestran corresponden a la media  $\pm$  error estándar (SEM) del promedio de tres ensayos realizados por triplicado. Los datos fueron analizados con ANOVA seguido del test Tukey *a posteriori*. \*, Significativamente distinto del control ( $p < 0.05$ ), con un intervalo de confianza del 95%.

### I.9 Localización subcelular

Se propone que los autotransportadores se translocan al medio extracelular y se exponen sobre la superficie de la bacteria de modo de poder interactuar con su receptor o ligando, ya sea directamente sobre la célula hospedadora o bien con algún componente de la ECM. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que las adhesinas estudiadas hasta el momento, tanto triméricas (BtaE y BtaF) como monoméricas (BmaC), se localizan sobre la superficie de la bacteria, de manera unipolar [137, 138]. Más aún, se ha demostrado que el polo en el que se encuentran las adhesinas es el polo nuevo que se genera luego de la división celular (ver sección 5 Introducción). Se postuló que las bacterias que se producen luego de la división celular asimétrica podrían expresar las proteínas necesarias para adherirse en un polo (“n”: *new*), generando lo que denominamos un “polo adhesivo” [52].

Para evaluar si BmaA y BmaB se encuentran sobre la superficie, al igual que se demostró para BmaC, y si se localizan en una región particular de la célula, se realizaron ensayos de fraccionamiento subcelular seguidos de Western blot e inmunofluorescencia. Para ello, se generó la cepa etiquetada 3xFLAG-BmaB en la que se fusionó una etiqueta (FLAG) en el extremo N-terminal maduro de la proteína. Con el fin de aumentar la expresión del autotransportador y mejorar la capacidad de detección de la proteína dicha construcción se clonó bajo el promotor *lac* del vector replicativo pBBRMCS1 (CmR). Aunque se realizaron

varios intentos, hasta el momento no fue posible generar un plásmido que exprese la proteína 3xFLAG-BmaA. Por lo tanto los siguientes estudios se realizaron sólo con las bacterias que contienen pBBR3xFLAG**bmaB**. Dado que aún no se ha logrado una separación eficiente de MI y ME en *Brucella*, se analizó la localización subcelular mediante dos procedimientos complementarios. Primero en extractos de membranas totales (interna y externa) y en las fracciones citosólicas (es decir, citoplasma y periplasma). En segundo lugar, para discriminar entre MI y ME, se obtuvo una fracción de protoplastos (Pr) separada de una compuesta por la ME y el periplasma (ME + Pe), mediante un tratamiento con el detergente Zwittergent 3-16 seguido de centrifugación a baja velocidad (ver Materiales y Métodos). Por Western blot se pudo confirmar que la cepa de *B. suis* que contiene dicha construcción expresa la proteína etiquetada 3xFLAG-BmaB (Figura 21). Más aún, se determinó que BmaB se localiza en la fracción de membranas totales (M) y en la fracción correspondiente a ME y periplasma (ME+Pe), pudiendo concluir de esta manera que la proteína se encuentra en la ME.



**Figura 21.** Esquema de la construcción 3xF-BmaB (PS: péptido señal, etiqueta 3xF: 3xFLAG). La flecha indica el sitio de escisión predicho. 3xFLAG-BmaB fue detectada con anticuerpos monoclonales anti-FLAG en fracciones de membranas totales (M), citoplasma más periplasma (Cy + Pe), protoplastos (Pr) y fracciones de membrana externa más periplasma (ME + Pe) en las cepas wt-3xFLAG**bmaB**. La punta de flecha azul indica el peso molecular predicho de la proteína completa con el FLAG (164 kDa).

Adicionalmente, las bacterias fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS y analizadas por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-FLAG (SIGMA) y microscopía confocal. En las condiciones del ensayo se detectó BmaB en aproximadamente un 10% de las bacterias examinadas de la cepa *B. suis* wt etiquetada. En todos los casos la señal roja correspondiente a BmaB mostró localización unipolar (Figura 22).

Por otro lado, con el objetivo de determinar la identidad del polo sobre el que se expresa la adhesina, la cepa portadora del plásmido expresa BmaB etiquetada (*B. suis*



pBBRMCS1-3XFBmaB) fue conjugado con los plásmidos replicativos de bajo número de copias pMR10 (CmR-KmR) que expresan las proteínas marcadoras de polo AidB (polo nuevo) [51] o PdhS (polo viejo) [165] fusionadas a proteínas fluorescentes (pMR10-aidB-YFP o bien pMR10-pdhS-eGFP). Cabe destacar que el plásmido pMR10 posee un origen de replicación compatible con el pBBRMCS1, pudiendo coexistir ambos en la misma célula. En la mayoría de las bacterias en las que se detectó de forma simultánea señal roja (3xFLAG-BmaB) y amarilla (AidB-YFP), ambas coincidieron en un mismo polo, indicando que la adhesina se expresa en el polo nuevo (Figura 22). Por otra parte, en los casos donde se detectó de manera simultánea marca roja (3xFLAG-BmaB) y verde (PdhS-GFP) estas se encontraron en polos opuestos (Figura 22).

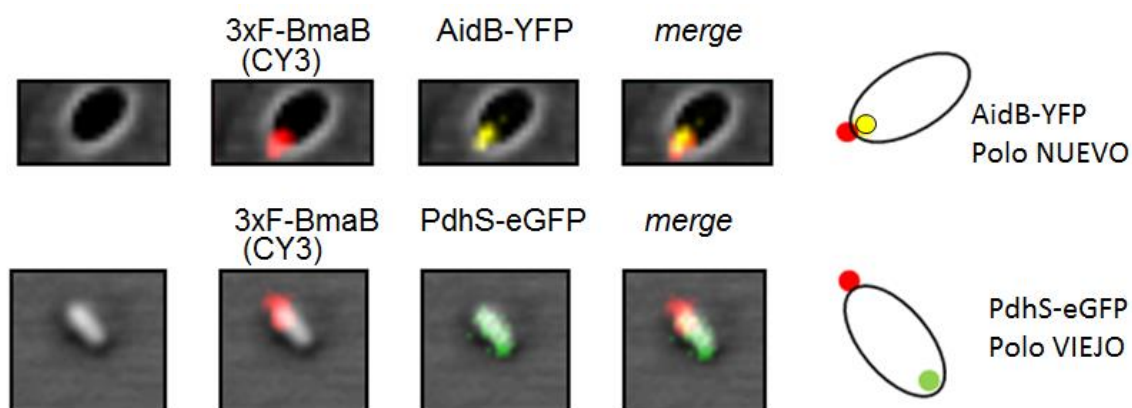


Figura 22. Localización de BmaB. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-FLAG en cultivos fijados con PFA 4% de *B. suis* wt expresando AidB-YFP (panel superior) o PdhS-eGFP (panel inferior). Se observó por contraste de fase la forma de las bacterias. Las células fueron observadas por microscopía confocal utilizando un microscopio ZEISS LSM 880 Confocal Laser Scanning Microscope. En el primer panel (de izquierda a derecha) se observa solo la luz transmitida para observar las bacterias sin marca, en el segundo panel se observa la marca correspondiente a BmaB, en el tercer panel la marca correspondiente al marcador de polo (AidB o PdhS) y en el cuarto panel la conjunción de los anteriores.

Estas observaciones indican que BmaB se localiza sobre la superficie de la bacteria que la porta y que lo hace de modo unipolar ubicándose en el polo nuevo de la bacteria generado luego de la división celular, reforzando la hipótesis de la existencia de un polo adhesivo en *Brucella* en un subtipo celular que sería el infeccioso.

## Discusión- Capítulo I

Las especies pertenecientes al género *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos capaces de infectar una gran variedad de tipos celulares [166]. Para ello, la bacteria debe ser capaz de adherirse e invadir estas células. En *Brucella* se demostró que la proteína SP41 cumple un rol en la adhesión e invasión a las células del hospedador mediante la interacción con un receptor celular que contendría residuos de ácido siálico [142]. Otras evidencias revelaron que *Brucella* sería capaz de unirse a componentes de la ECM, particularmente a fibronectina y en menor medida a colágeno y vitronectina [131]. Por otro lado, se reportó que una isla de patogenicidad que incluye cuatro genes, contribuye con la eficiencia de adhesión de *B. abortus* tanto a células HeLa como a la replicación intracelular en macrófagos J774. Se propuso que la proteína responsable estaría codificada por Bab1\_2009, y contendría un dominio de adhesión llamado *immunoglobulin-like BID\_1* [132, 144].

En base a una búsqueda bioinformática en el genoma de *B. suis* 1330 identificamos 11 proteínas que podrían cumplir un rol de adhesina. El árbol filogenético construido con estas proteínas las agrupó en 4 grupos: los grupos 1 y 2 se encontraron más cercanos entre sí que con los demás. El grupo 1 estuvo formado por los autotransportadores monoméricos (ATI) BmaA, BmaB y BmaC, mientras que el grupo 2 comprendió a los autotransportadores triméricos (ATII) BtaE, BtaF y una tercer proteína a la que hemos denominado MapB, sobre la cual se tratará el siguiente capítulo (Figura 11). Estudios previos mostraron que BtaE y BtaF contribuyen con la adhesión de la bacteria a células epiteliales y son necesarias para la virulencia completa en ratón. Asimismo, BtaE participa de la unión de la bacteria a ácido hialurónico y fibronectina. BtaF resultó más promiscua ya que parece ser capaz de unirse a distintos compuestos y soportes abióticos [137, 138]. En lo que respecta a los ATI, se mostró que BmaC media la unión de *Brucella* a células epiteliales a través de su interacción con fibronectina y que posee localización unipolar [136]. En el transcurso de esta tesis se evaluó el rol de los otros dos miembros identificados como ATI, BmaA (BRA0173) y BmaB (BR2013).

### Pseudogenes y especiación

Dentro del género *Brucella* el concepto de especie es particularmente controversial [167], principalmente por la alta conservación de los genomas [7, 168-170]. La elevada similitud entre los miembros del género ha dado lugar a que se planteara que éste sería monoespecífico y que todas las especies pertenecerían a biovariedades o cepas de la misma especie [170-172]. Esta teoría se ha desestimado principalmente porque entra en conflicto con la hipótesis de la evolución a partir del aislamiento dado por las distintas preferencias de hospedador [40, 173]. La comparación de los genomas de *B. melitensis* 16M y *B. suis* 1330 indicó que los genes más variables codifican en gran parte a proteínas hipotéticas, muchas de las cuales corresponderían a proteínas de superficie [145]. En este contexto, se evaluó la potencial funcionalidad y la diversidad en el repertorio de ATIs, es decir proteínas que posean un péptido señal en el N-terminal que les permita exportarse al espacio periplásmico y un dominio barril  $\beta$  en el extremo C-terminal a través del cual ocurre la translocación del dominio pasajero. Tal como plantearon Chain y colaboradores en su trabajo del año 2005, es particularmente relevante estudiar el rol de los pseudogenes en las distintas especies de *Brucella* y más aún, de aquellos genes que codifican para proteínas de membrana o superficie dado que éstas podrían ser las responsables de la preferencia de hospedador o tropismo a determinados tejidos [145]. Particularmente, se menciona a los autotransportadores como una de las familias de proteínas putativamente asociadas a los eventos de especiación. Asimismo, estos genes presentan una composición nucleotídica atípica, sugiriendo la transferencia lateral de genes [40, 145]. La presencia de pseudogenes (genes que codificarían para proteínas no funcionales) dentro de esta familia de proteínas en distintas especies de *Brucella* refuerza la hipótesis de que estas proteínas podrían contribuir a la especificidad de hospedador.

La comparación de los ortólogos de las adhesinas BmaA y BmaB en las distintas especies de *Brucella* muestra una considerable variabilidad. Las diferencias se observaron principalmente en el dominio pasajero, tanto a nivel secuencia, como en su longitud y en el número de PATRs. Se encontraron pseudogenes para BmaA en la mayoría de las cepas de *B. abortus* analizadas y los mismos presentaron mutaciones en diferentes sitios del gen. En general, los ORF predichos resultaron más largos que en *B. suis*. Esta situación ya ha sido observada en el caso de BtaE, donde se encontró que la proteína codificada en el genoma de *B. abortus* 2308 es más grande y posee mayor número de PATRs que la proteína de *B. suis* 1330 [147]. Contrariamente, en el análisis de los ortólogos de BmaA de *B. melitensis*, en los casos donde se identificaron pseudogenes, se localizó una mutación conservada que genera un corrimiento en el marco de lectura.

Con respecto a BmaB, tampoco se identificaron ortólogos “completos” en todas las especies clásicas de *Brucella*. En este caso, a diferencia de BmaA, se encontraron cepas de *B. suis* que no cuentan con todos los dominios proteicos necesarios para predecir que se translocan a su destino final, quedando esta predicción exclusivamente restringida a *B. suis* 1330. Realizando un análisis manual de cada una de las secuencias se encontró la presencia de mutaciones puntuales en el dominio pasajero que generan un codón *stop* prematuro, generando así una proteína trunca y por lo tanto probablemente no funcional. Dado que las mutaciones están mayormente conservadas dentro de cada especie (*B. abortus* y *B. melitensis*) pero son diferentes entre sí, se puede decir que no ocurrieron en el ancestro común que dio origen a ambas especies sino que estos eventos se desarrollaron en paralelo en ambos linajes, resultando un ejemplo claro de evolución convergente [153]. Dada la presión de selección a la que están sometidas las proteínas expuestas en la membrana, por estar en contacto permanente con el medio ambiente cambiante, es esperable que las mutaciones que se acumulan en éstas sean considerablemente mayores a las que ocurren al azar en el resto del genoma.

Cabe mencionar que la falta de predicción de un péptido señal en el producto del ORF anotado en el genoma publicado de algunas cepas no fue considerado como criterio para calificar al gen como pseudogen. Esto se debe a que en ocasiones se observó un codón de iniciación de la traducción alternativo al inicio propuesto, generalmente río arriba del ORF anotado. En estos casos, cuando analizamos las secuencias aminoacídicas traducidas a partir de una región tomada arbitrariamente río arriba del comienzo anotado de la traducción, se han identificado comienzos alternativos en los que efectivamente se predice un péptido señal con un *score* confiable. Muchas veces los nuevos codones de iniciación encontrados son distintos al comúnmente utilizado (AUG). En el caso de bacterias se ha descrito que es frecuente encontrar inicios de la traducción alternativos, siendo los aminoácidos valina y leucina muy frecuentes en el inicio de las proteínas procariontas [149, 174]. De acuerdo con esta observación, existen evidencias que indican que es más probable que las proteínas secretadas por bacterias contengan codones raros cerca del extremo 5' de sus secuencias codificantes, lo que sugiere que éstos podrían desempeñar un papel en la translocación eficiente además de mejorar el inicio de la traducción en este tipo de proteínas [175].

Es oportuno destacar que, a pesar de ser considerados pseudogenes, por RT-PCR se observó la producción (en células cultivadas en medio rico) de transcritos de los genes ortólogos de *bmaA* y *bmaB* tanto en *B. abortus* 2308 como en *B. melitensis* 16M (Figura 14)

indicando que no ha habido una selección a nivel del promotor que lleve al cese de la transcripción de dichos genes. No se puede descartar la funcionalidad de esos ARNs como reguladores de la expresión de otros genes, como ocurre en algunos casos en eucariotas [176, 177]. Asimismo, se ha demostrado en bacterias que existen mecanismos de silenciamiento de los transcritos de los pseudogenes, evitando la expresión de péptidos que generen un gasto energético para la célula [178]. Este último mecanismo tampoco podríamos descartarlo en el caso de *Brucella*.

En resumen, BmaA y BmaB presentan gran variabilidad dentro del género y por lo tanto proponemos que podrían contribuir a las diferencias en cuanto a tropismo de tejido y/o la preferencia de hospedador, sin embargo esta posibilidad debe aún ser explorada.

### **Funcionalidad**

La estudios predictivos indican que BmaA y BmaB de *B. suis* 1330 tendrían toda la información necesaria para exponerse correctamente sobre la superficie de la célula bacteriana. Para estudiar la funcionalidad de estas proteínas se analizó el efecto de la delección de los genes correspondiente sobre la adhesión a distintos tipos celulares en los cuales estas proteínas podrían resultar relevantes durante las distintas etapas del proceso infeccioso.

Una de las vías más importantes de infección de *Brucella* (principalmente de *B. melitensis*) es la ruta oral por medio de la ingesta de productos lácteos no pasteurizados. A pesar de que se considera que el tracto digestivo cumple un rol fundamental [179, 180], la cinética de infección y la respuesta inmune del hospedador no está del todo caracterizada. Se ha probado la importancia del operón *virB*, la enzima ureasa, hidrolasas de ácidos biliares y el antígeno-O del LPS en el establecimiento de la infección por dicha vía [181, 182]. Sin embargo, no hemos encontrado estudios que caractericen el contacto inicial de la bacteria con las células del tracto digestivo. Es por ello que resulta particularmente interesante evaluar el rol de las adhesinas en la interacción con el epitelio intestinal. En este sentido, ya se había demostrado que cepas lisas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* son capaces de invadir células epiteliales de colon como HT-29 y Caco-2, y replicar allí eficientemente [159, 179]. Por otra parte, múltiples evidencias demuestran que la adhesión de diversos microorganismos patógenos (*E. coli*, *Yersinia enterocolíptica*, *Helicobacter pylori*, entre otros) [183, 184] a la mucosa y epitelio intestinal ocurre a través de distintos tipos de adhesinas, tanto fimbriales como no fimbriales [185-187]. En relación a lo antes planteado, nuestros resultados indicaron que BmaA participa en la adhesión a células epiteliales

colorrectales, sugiriendo que dicha adhesina podría estar particularmente involucrada en la infección de *Brucella* por vía oral dada la capacidad de adhesión al intestino que esta adhesina le confiere a la bacteria.

Otra de las manifestaciones prevalentes de la infección por *Brucella spp.* es la brucelosis osteoarticular. La prevalencia varía entre el 27% y el 36% de los casos de brucelosis [188]. Está reportado que si bien los síntomas son variados, las formas más comunes son la sacroileitis, espondilitis y artritis periférica [189]. La artritis resulta frecuentemente poliarticular y usualmente afecta rodillas, articulación sacroilíaca, hombros y caderas, observándose en casos extremos la generación de osteopenia y daño del cartílago. La espondilitis suele desarrollar complicaciones más severas dado que a partir de su inicio en los discos intervertebrales puede posteriormente diseminarse a la vértebra y de allí a vertebras adyacentes [190]. Se ha reportado distintos patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis* que producen infecciones osteoarticulares generando daño en el tejido por mecanismos inflamatorios producidos por la entrada del patógeno [191]. En estudios previos [159] se ha demostrado que especies naturalmente lisas de *Brucella* son capaces de invadir y replicar en osteoblastos humanos. En este contexto, los resultados de los ensayos realizados en el marco de esta tesis proponen que las adhesinas BmaA, BmaB y BmaC participan específicamente en la adhesión a la línea celular osteoblástica humana (HFoB) y a cultivos primarios de osteoblastos murinos.

En animales sexualmente maduros, *Brucella* tiene un tropismo pronunciado hacia los órganos genitales generando orquitis, epididimitis e infertilidad en machos, y abortos y esterilidad en hembras [23, 24]. En humanos este tropismo hacia órganos genitales también ha sido observado, no obstante las manifestaciones clínicas son diferentes y los abortos son raros o poco frecuentes [192]. Las secreciones genitales y los productos de abortos contienen una gran carga bacteriana, y generan una importante fuente de contagio entre animales. Por lo tanto, es evidente que la localización y multiplicación en el tracto reproductivo de estos animales es crucial en la biología de *Brucella*. Se ha demostrado que *Brucella* puede invadir y replicar en trofoblastos. Es por ello que se decidió evaluar el rol de BmaA, B y C en este tipo celular. Si bien las mutantes en las adhesinas no presentaron alteración con respecto a la cepa control, las cepas complementadas que contienen los genes *bmaA* y *bmaB* en un plásmido de mediano número de copias (y que por lo tanto podrían ser consideradas sobreexpresantes), presentaron un aumento significativo en la

adhesión, sugiriendo que estas adhesinas podrían participar en la adherencia a células trofoblásticas, lo cual habilitaría la posterior invasión y replicación en las mismas. Una explicación posible con respecto a la ausencia de fenotipo en las cepas mutantes es que en las condiciones del ensayo, las adhesinas no estén cumpliendo un rol activo en la cepa wt, dada su baja expresión en el contexto de cultivo *in vitro*. En cambio, al transferir el plásmido (pBBR1-*bmaA* o pBBR1-*bmaB*) a las respectivas cepas mutantes, se produciría un aumento de la expresión de las mismas ya sea por el número de copias que posee el plásmido y/o por la estrategia de clonado utilizada, en la cual la expresión del gen podría haber quedado bajo la dirección del promotor  $P_{lac}$ . En ese contexto “sobreexpresante”, BmaA y BmaB tendrían un rol activo en la adhesión. En condiciones fisiológicas la expresión de las adhesinas podría gatillarse por múltiples factores. En este sentido, existen casos en los que se ha reportado que la replicación intracelular de *Brucella* depende de más de un factor, no resultando suficientes los estímulos generados por las células aisladas. Un ejemplo de esto se observa en la liberación de citoquinas proinflamatorias en osteoblastos infectados, la cual aumenta significativamente al agregar al cultivo medio condicionado proveniente de cultivo de macrófagos [159].

Al momento de iniciar este trabajo existían evidencias que sugerían que *Brucella* sería capaz de unirse a componentes de la matriz extracelular, en particular a fibronectina y residuos ricos en ácido siálico [131]. Por consiguiente, se evaluó la capacidad de las mutantes deficientes en las adhesinas de adherirse a distintos componentes como soportes abióticos o componentes de la ECM como fibronectina, colágeno y ácido hialurónico. En cuanto a la unión a soportes abióticos, se estudió la capacidad formadora de *biofilm* a poliestireno no encontrándose una diferencia en la unión al soporte en las mutantes con respecto al control. En este sentido cabe mencionar que la cepa wt presentó una adhesión muy baja.

En cuanto al rol de BmaA y BmaB en la unión a componentes de la ECM, se realizaron dos enfoques. Por un lado, se evaluaron las mutantes *bmaA* y *bmaB*, y por otro se llevó adelante un enfoque heterólogo que consistió en generar una cepa de *E. coli* no adherente ni invasiva (CC118) que expresa las adhesinas y evaluar la unión a los mismos compuestos. Los estudios de las mutantes indicaron que BmaA estaría involucrada en la unión a colágeno tipo I mientras BmaB podría contribuir a la unión de la bacteria a fibronectina. Estos fenotipos se repitieron en la doble mutante, mostrando un valor similar a las simples mutantes, tal como se esperaba. Con respecto al enfoque heterólogo, en el caso de BmaB se correlacionó con el fenotipo, presentándose un aumento en la adhesión

a fibronectina de la cepa portadora del plásmido que alberga al gen *bmaB*. Por el contrario, la unión a colágeno de *E. coli* que alberga el plásmido con el gen *bmaA* no fue mayor al del control con el vector vacío, indicando que en dicha bacteria BmaA no es capaz de cumplir el mismo rol o, alternativamente, a que el gen no se expresa lo suficiente en este contexto. En este sentido, por RT-PCR pudo observarse expresión de *bmaA* y *bmaB* en el contexto heterólogo de *E. coli* (datos no mostrados). Sin embargo, debe considerarse que este análisis no es una aproximación cuantitativa. Por otro lado, al no contar con anticuerpos específicos no fue posible analizar la expresión de la proteína. Por lo tanto, se podría proponer que o bien BmaA no cumple el mismo rol en un contexto heterólogo o bien que su expresión no es la adecuada en este contexto.

Es oportuno mencionar que para un análisis completo y una mayor comprensión de la funcionalidad de los ATI sería importante evaluar los factores ambientales y genéticos que regulan la expresión de los genes *bma*. Una hipótesis es que la expresión de los genes aumente en contacto con células o tejidos particulares del hospedador o mediante estímulos presentes en determinados ambientes. Serán necesarios estudios futuros para comprender si los AT (tanto monoméricos como triméricos) actúan en las mismas condiciones ambientales o, si en cambio, actúan bajo distintos estímulos, cumpliendo roles complementarios.

### **Resistencia a suero**

A partir de un complejo proceso de co-evolución, los patógenos han desarrollado estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedador. Varios de estos mecanismos están altamente conservados entre bacterias, virus y parásitos, y otros son particulares de cada especie [193]. Algunos casos descritos incluyen a la adhesina UspA2 de *M. catharralis* que está involucrada en la resistencia al complemento presente en el suero [164] y a los autotransportadores BrkA y Vag8 de *Bordetella pertusis*, [194] [195] que interactúan con componentes del complemento o reguladores del mismo, tanto de modo directo como indirecto, mediando la resistencia al complemento [195]. *Brucella*, particularmente, ha desarrollado diversos mecanismos que impiden su detección por el sistema inmune innato, entre ellos el complemento presente en el suero, permitiendo así el establecimiento de la infección crónica [67, 162, 196-198]. La estructura particular del LPS de *Brucella* es en parte responsable de la tolerancia al complemento [67, 199]. Asimismo, nuestro laboratorio mostró que la adhesina BtaF interviene en la protección de la bacteria que la porta frente a



la actividad bactericida del complemento presente en el suero [137]. En consecuencia, dada la similitud entre BmaA y BmaB con las proteínas previamente descritas en *B. pertusis*, Vag8 y BrkA, se decidió evaluar la respuesta de las mutantes *bmaA::stops* y *bmaB::km*. En el caso de BmaA no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de la cepa mutante con respecto a la cepa control, sin embargo, *bmaB* mostró un moderado aumento de la susceptibilidad al tratamiento indicando que BmaB participarían en la tolerancia de la bacteria al complemento.

### Localización

Se han descrito AT monoméricos con localización unipolar; estos incluyen, la adhesina BmaC de *B. suis* [136], la proteína que promueve polimerización de actina IcsA de *Shigella flexneri* [200] y la adhesina Aida-I de *E. coli* [130]. Es interesante destacar que algunos de los AT tipo I, incluyendo Aida-A e IcsA, son polares en el citoplasma previo a su secreción, lo cual sugiere que la misma ocurre en el polo [130, 201]. Por otro lado, se observó que el AT monomérico NalP del *N. meningitidis* contiene en sí mismo la información molecular que le permite localizarse en un polo al expresarla en *E. coli*. Tanto BtaE como BtaF mostraron tener una localización unipolar no solo en *B. suis* sino también al ser expresadas de modo heterólogo en *E. coli*, sugiriendo que el mecanismo que dirige la localización unipolar de los AT (tanto tipo I como tipo II) estaría conservado en distintas bacterias. En esta tesis fue posible generar una cepa de *B. suis* que expresa BmaB fusionada a la etiqueta 3xFLAG en el amino-terminal. Utilizando anticuerpos anti-FLAG observamos que BmaB también presenta localización polar (Figura 22). Cabe mencionar que los focos de fluorescencia correspondientes a BmaB se observaron en un bajo número de células, a pesar de que la construcción fue diseñada para que el gen *bmaB* se exprese bajo el promotor *lac* del pBBRMCS1. Una explicación posible es que existe una regulación post-transcripcional y que por consiguiente a pesar de expresar a *bmaB* bajo un promotor constitutivo, la cantidad de proteína BmaB expresada *in vitro* no sea suficiente para ser detectada en todas las células.

Otra hipótesis plausible es que las adhesinas se expresen sólo en una subpoblación de las bacterias, que dependería de la etapa del ciclo celular de *Brucella*. Esta hipótesis se basa en que, en *Brucella*, luego de una división asimétrica se generan dos tipos celulares distintos que sufren un proceso de diferenciación [49, 50, 165, 202]. Para cada una de las células hijas se puede además identificar un polo nuevo y un polo viejo [49]. Asimismo, una

baja expresión de estas adhesinas en una pequeña subpoblación bacteriana podría ser suficiente para lograr la internalización de *Brucella* y establecer así una infección limitada pero exitosa.

Para poder determinar si las adhesinas se localizan en un polo en particular, se analizó la presencia de la adhesina por inmunofluorescencia de cepas de *B. suis* que portan fusiones traduccionales de marcadores de polo viejo (PdhS) o nuevo (AidB) a proteínas fluorescentes [51, 165]. Los resultados obtenidos indican que en las condiciones estudiadas, BmaB se localiza en el polo nuevo de *B. suis*. Observaciones similares fueron descritas tanto para BmaC, como para BtaE y BtaF, sugiriendo que dicho polo estaría funcionalmente diferenciado para la adhesión [52]. Varios factores de virulencia superficiales, incluyendo estructuras adhesivas de otras *Alphaproteobacterias* cercanas a *Brucella*, han exhibido localización polar. Se ha descrito, por ejemplo, que todas las proteínas VirB de *Agrobacterium tumefaciens* tienen localización polar [203]. El microorganismo ambiental *Rhodopseudomonas palustris* y *A. tumefaciens* son capaces de adherirse a plantas y a superficies abióticas a través de uno de sus polos, en un proceso mediado por distintas estructuras, incluyendo una adhesina polisacáridica unipolar (UPP) [204, 205]. Otro ejemplo de *Alphaproteobacteria* que posee una arquitectura polar es *C. crescentus*, en cuyo polo viejo generado luego de la división celular se encuentra el polo diferenciado para la adhesión [50, 204, 206, 207]. En resumen, en *Brucella*, una hipótesis atractiva es que la adhesión inicial de la bacteria a la célula del hospedador estaría mediada por adhesinas localizadas en el polo nuevo y que esta expresión ocurre sólo en una subpoblación bacteriana infectiva.

## Capítulo II:

### Identificación de un sistema involucrado en la biogénesis de la envoltura celular de *B. suis*

Como se mencionó en la introducción la búsqueda en el genoma de *B. suis* 1330 de posibles proteínas con función de adhesina arrojó como candidata a BR0049, que se agrupó con los autotransportadores triméricos (Figura 11) [134]. Probablemente esto se debió a la abundancia de láminas  $\beta$  que se predicen a lo largo de casi toda la proteína y también a una estructura de hoja  $\beta$  encontrada en el extremo C-terminal de BR0049, justamente por sus semejanzas con la estructura del dominio pasajero y translocador de los autotransportadores. Predicciones más recientes, indican que BR0049 está filogenéticamente relacionada a TamB. Esta proteína, junto con un homólogo de TamA, conforman el sistema TAM. Como se mencionó en la sección 7 de la introducción, se ha propuesto que TAM asiste a los ATs para su correcta translocación a través de la membrana externa. Las evidencias presentadas en esta tesis muestran que el homólogo de TamB de *B. suis* (BR0049) desempeña roles que van más allá de contribuir al ensamblaje de ATs.

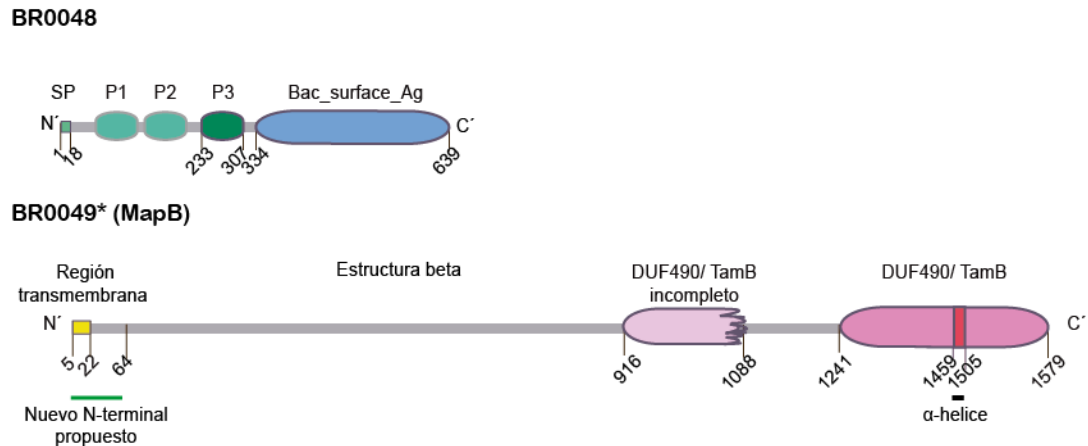
#### II.1 Organización de dominios de BR0049\* de *B. suis*

El gen anotado como BR0049 en el genoma de *B. suis* 1330 codifica para una proteína predicha de 1515 aminoácidos. Sin embargo, esta proteína no muestra una secuencia señal de exportación en el extremo N-terminal. Por otro lado, un análisis cuidadoso mediante alineamiento de la secuencia nucleotídica río arriba del codón de inicio propuesto con las secuencias de sus ortólogos de otras especies de *Brucella*, mostró que el codón de inicio del marco de lectura abierto podría ubicarse 192 pb río arriba del codón de inicio anotado. Para evitar confusiones, el ORF/proteína corregidos serán denominados BR0049\*. La proteína tendría una longitud de 1579 aminoácidos de longitud, muestra un péptido señal en el N-terminal (ver más adelante) y está altamente conservada entre las diferentes especies de *Brucella* (> 99% de identidad de secuencia de aminoácidos). Fuera de *Brucella* spp., sus homólogos más cercanos, son los ortólogos del género *Ochrobactrum* (otro miembro de la familia de las *Brucellaceae*) con una identidad de secuencia de 80-84%. En otras *Alphaproteobacterias*, como los genéricamente llamados rizobios, los homólogos comparten 30-50% de identidad de secuencia de aminoácidos. Las búsquedas en bases de datos utilizando DELTA-BLAST detectaron proteínas filogenéticamente emparentadas

en *Gammaproteobacterias* como TamB de *E. coli* y *C. rodentium* [90], que comparten 22% de identidad de secuencia con BR0049. De acuerdo con estas observaciones, proponemos que BR0049\* y sus ortólogos de otras *Alphaproteobacterias* también serían parte del sistema TAM [94].

Tal como ocurre en TamB de *Gammaproteobacterias*, las predicciones de dominios proteicos mostraron que BR0049\* contiene un dominio conservado DUF490 [90], en la región C-terminal (aminoácidos 1241-1579, E-value de  $1.86e^{-48}$ ) (Figura 21A). En cambio, el resto de BR0049\* diverge de TamB de las *Gammaproteobacterias*. BR0049\* muestra un segundo dominio incompleto DUF490 (aminoácidos 916-1088) pero menos significativo (E-value:  $8,57e^{-05}$ ) (Figura 23), que no se encuentra en TamB de *Gammaproteobacterias*. Además, utilizando el predictor de estructura secundaria JPred4, se encontró que toda la proteína está básicamente conformada por estructuras  $\beta$  con excepción de una región predicha de  $\alpha$ -hélice entre los aminoácidos 1459-1505, cuya posición relativa desde el extremo C-terminal coincide con la misma posición relativa de una región  $\alpha$ -hélice homóloga en TamB de *E. coli* [90] (Figura 23). Estas observaciones sugieren fuertemente que la proteína BR0049\* representa el ortólogo de TamB de *B. suis*, aunque una porción significativa de la región N-terminal diverge de las proteínas TamB de *Gammaproteobacterias*.

Se mostró previamente que TamB de *E. coli* y *C. rodentium* se inserta en la MI a través de una secuencia señal en el N-terminal no escindible, pero se propone que la mayor parte de la proteína está sumergida en el periplasma [90, 91, 208]. El análisis con el algoritmo SignalP-4.1 de BR0049\* predijo un péptido señal N-terminal entre las posiciones 1 y 21. Esta secuencia se superpone con una región hidrofóbica, probablemente transmembrana, entre las posiciones 5 y 22 (THTMM 2.0). Por lo tanto, de manera similar a las proteínas TamB, el extremo N-terminal de BR0049\* podría representar una secuencia señal no escindible que media la inserción de la proteína en la MI. La predicción de acuerdo al análisis con el programa Gneg-mPloc respalda la hipótesis de que BR0049\* se localiza tanto en la MI como en el periplasma.



**Figura 23. Esquema de los dominios predichos para las proteínas BR0048 y BR0049\*. Se utilizó la información conjunta obtenida a partir de Pfam, InterProScan y SignalP.**

## II.2 Expresión y localización subcelular

Para determinar la localización de BR0049\*, se generó una fusión del extremo C-terminal de la proteína con la etiqueta 3xFLAG. La presencia de la proteína BR0049\*-3xFLAG en diferentes fracciones subcelulares se analizó por Western blot utilizando anticuerpos anti-FLAG. El análisis de extractos celulares totales mostró que BR0049-3xFLAG se expresa tanto en fase exponencial como estacionaria, pero disminuye en fase estacionaria tardía (Figura 24A). Como se mencionó en el Capítulo I, aún no se ha logrado una separación eficiente de MI y ME en *Brucella*. Por lo tanto, se analizó la localización subcelular mediante dos procedimientos complementarios. Primero en extractos de membranas totales (interna y externa) y en las fracciones citosólicas (es decir, citoplasma y periplasma). El análisis mediante Western blot indicó claramente que BR0049\*-3xFLAG se localiza en la fracción de membranas totales (Figura 22B). Para discriminar entre MI y ME, se obtuvo una fracción de protoplastos (Pr) separada de una compuesta por la ME y el periplasma (ME + Pe), mediante un tratamiento con el detergente Zwitterion 3-16 seguido de centrifugación a baja velocidad (ver Materiales y Métodos) [209]. La inmunodetección con anticuerpos anti-FLAG mostró que la proteína etiquetada se localiza en la fracción de protoplastos (Figura 24B), confirmando que BR0049\* está asociada a la MI.

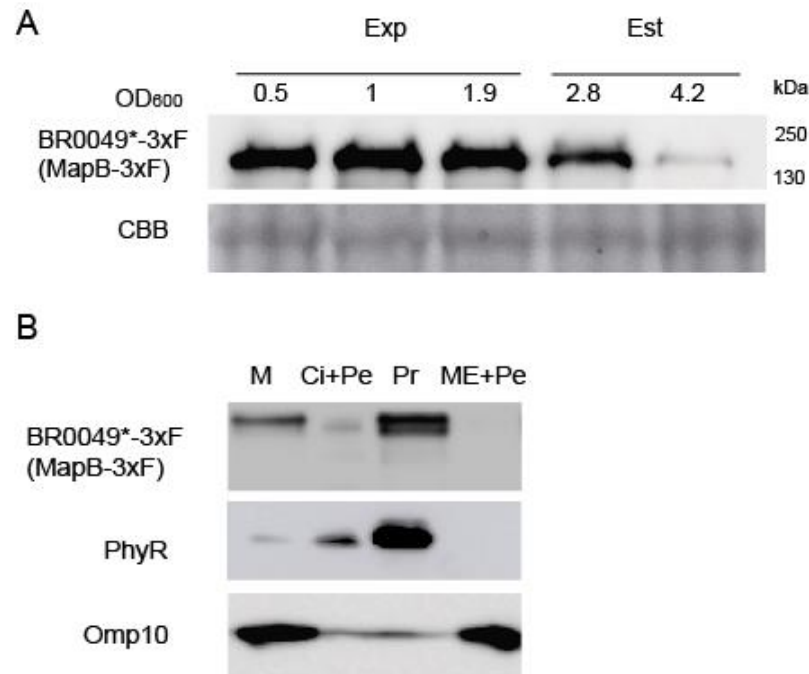


Figura 24. A. Expresión de MapB-3xFLAG (MapB-3xF) a lo largo de la curva de crecimiento. Las muestras se recolectaron a las densidades ópticas indicadas (a 600 nm) de las fases exponencial (Exp) o estacionaria (Est). Las proteínas totales equivalentes obtenidas de lisados de células totales se analizaron mediante Western blot usando el anticuerpo monoclonal anti-FLAG. B. Determinación de la localización de MapB-3xF. Se analizaron las membranas totales (M), citoplasma más periplasma (Ci + Pe), protoplastos (Pr) o membrana externa más periplasma (ME + Pe) mediante Western blot usando anticuerpos anti-FLAG (panel superior), anti-PhyR como control citoplasmático (panel central) o anti-Omp10 como control de ME (panel inferior). El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

### II.3 Análisis de la organización genómica

Río arriba del gen BR0049\* se ubica un gen que codifica para un homólogo de TamA (BR0048) (Figura 23). TamA representa el componente de ME del sistema TAM [94] que pertenece a la superfamilia Omp85/TpsB, cuyos miembros están principalmente implicados en la maquinaria de ensamblaje de proteínas en la ME con dominios de barriles  $\beta$  [81]. TamA se inserta en la ME a través de su dominio C-terminal Bac\_surface\_Ag que exhibe una estructura de barril  $\beta$ ; en el espacio periplásmico posee un dominio clásico POTRA (por *polypeptide-transport-associated*) y dos dominios POTRA divergentes [208]. En BR0049\* se identificaron tanto un dominio POTRA clásico (P3, entre los residuos 233-307) como dos dominios divergentes (P1 y P2) en región N-terminal (Figura 23).

Se propuso que los genes *tamA* y *tamB* se co-transcriben en un operón [90]. Por lo tanto, para verificar si esta organización se conserva en *B. suis*, se evaluó la expresión de

un transcripto que incluya regiones de ambos genes por RT-PCR usando ARN total de *B. suis* y oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar una región genómica que se superpone con extremo 3' de BR0048 y el extremo 5' de BR0049\*. Se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado (700 pb), indicando que los genes BR0048 y BR0049\* forman un operón (Figura 25).



**Figura 25.** Los genes BR0048 y BR0049\* forman un operón. Mediante RT-PCR se amplificó una región genómica de 700 pb (subrayada en rojo) que incluye secuencias codificantes para BR0048 y *mapB* o una región de 162 pb del gen *if-1* como control positivo. Se indican los carriles correspondientes a las reacciones realizadas con (+) o sin (-) RT.

En conclusión, la organización de dominios proteicos, la localización subcelular y el análisis transcripcional sugieren fuertemente que las proteínas BR0048 y BR0049\* conforman el sistema TAM de *Brucella* spp. (Figura 26).

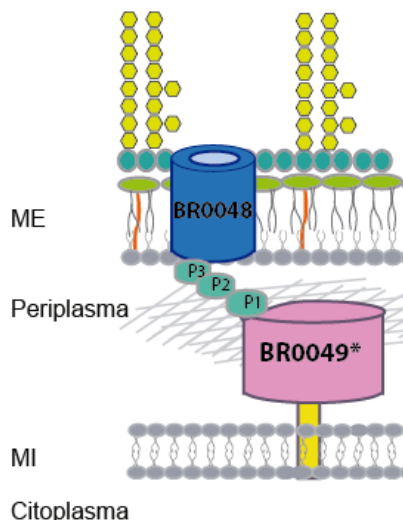


Figura 26. Esquema de la topología predicha de BR0048 y BR0049\* que abarca la envoltura de la célula bacteriana. Se indican las posiciones de la membrana externa (ME) e interna (MI).

#### II. 4 Fenotipos asociados a envoltura celular de una mutante en el gen de BR0049\*

Para explorar la función de la proteína BR0049\*, generamos un mutante por delección limpia del gen por doble recombinación homóloga. Como se describirá a continuación, dado que los fenotipos observados muestran que la superficie celular de la mutante BR0049\* se encuentra alterada, decidimos llamar a la proteína BR0049\*, MapB (por *membrane altering protein*).

Inicialmente, los primeros experimentos tuvieron como objetivo estudiar la función de MapB en la interacción inicial de *Brucella* con la célula hospedadora, utilizando modelos celulares. En estos ensayos notamos que la mutante  $\Delta mapB$  perdía marcadamente su viabilidad luego del protocolo estandarizado. Esto podía deberse al detergente que se utiliza para lisar las células (Tritón X-100). Efectivamente, observamos que luego de incubar las bacterias durante 10 minutos con Triton X-100 0.1% se reduce drásticamente la viabilidad celular de las bacterias de la cepa  $\Delta mapB$  pero no la viabilidad de las bacterias wt [37]. La complementación de la mutante con el gen *mapB* clonado en el plásmido pBBR1MCS1 ( $\Delta mapB$ -pBBR1mapB) restauró la resistencia a Tritón X-100 a niveles similares a la cepa wt (Figura 27).



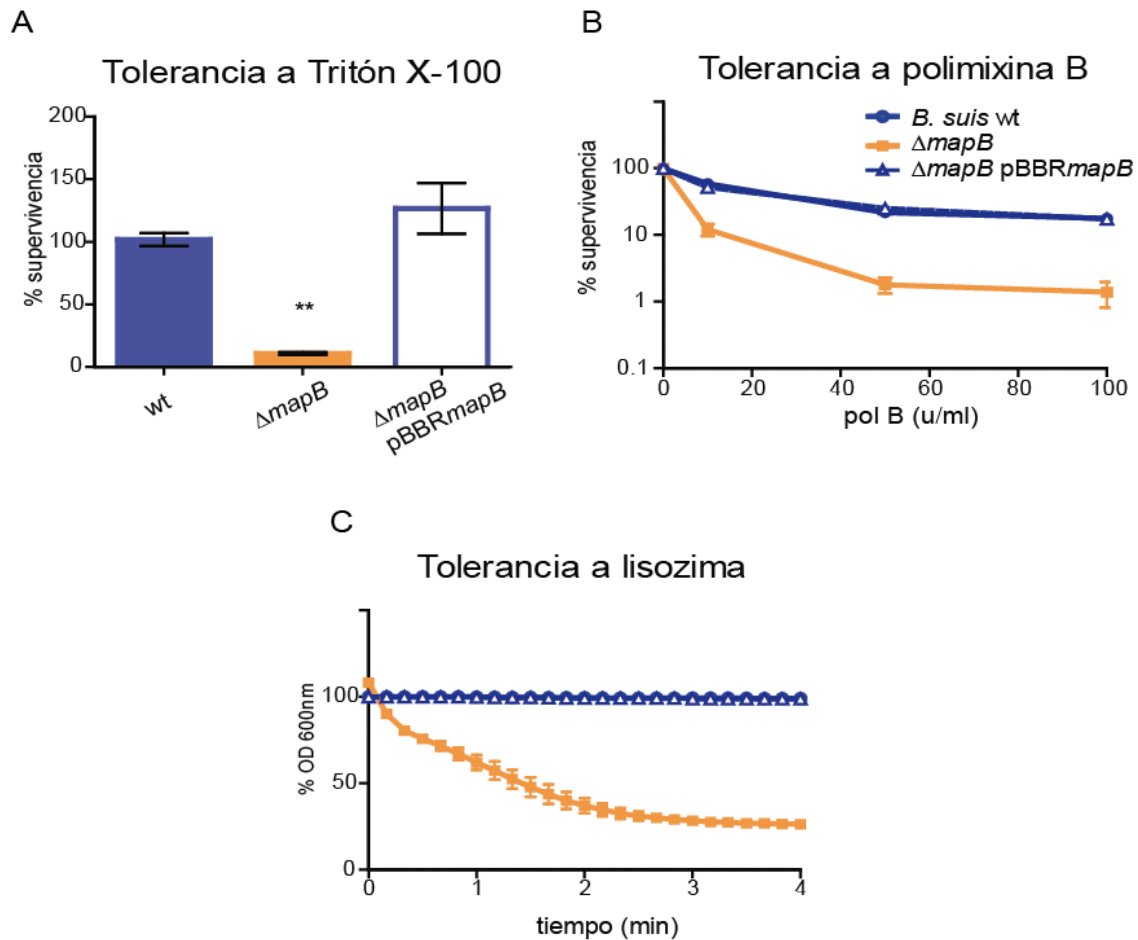


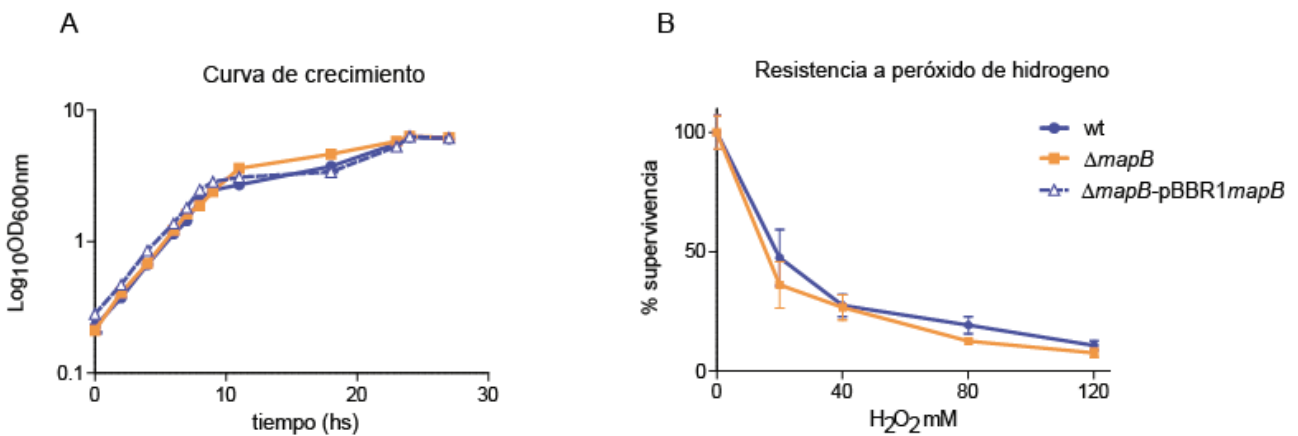
Figura 27. Se analizaron las cepas *B. suis* 1330 (wt),  $\Delta mapB$  y la cepa isogénica  $\Delta mapB$ - pBBR1mapB complementada. A. Las bacterias se incubaron con o sin Triton X-100 y se determinaron las UFC/ml. La tolerancia se expresó como el porcentaje medio de UFC en relación con las bacterias no tratadas. Se muestra el % de supervivencia de cada cepa en relación con la cepa wt. Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor seguido de una prueba de Tukey *a posteriori*. \*: significativamente diferente del control (wt), ( $p < 0.05$ ). B. Las bacterias se incubaron durante 60 min a 37 °C con 0 (control), 10, 50 o 100 unidades/ml de polimixina B y se determinaron las UFC/ml. La supervivencia se expresó como el porcentaje medio de CFU en relación con las bacterias no tratadas. C. Las bacterias se trataron con lisozima y se determinó la OD<sub>600nm</sub> de la suspensión cada 10 segundos. Los datos representan la media  $\pm$  desvío estándar (SD) de triplicados de un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Se debe aclarar que no se observaron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano en medio rico líquido entre la cepa wt, la mutante  $\Delta mapB$  y las cepas complementadas (Figura 28A). Además, la mutante  $\Delta mapB$  y la cepa wt no mostraron diferencias significativas en la sensibilidad a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura

28B) EDTA 0,67 mM, SDS al 0,1%, DOC al 0,1%, suero porcino o pH ácido (4,5) (Figura 28C).

*Brucella* es particularmente resistente a los péptidos catiónicos [66, 210]. La cepa mutante  $\Delta mapB$  mostró una sensibilidad de 5 a 14 veces mayor al lipopéptido catiónico polimixina B, comparada con la cepa wt, mientras que en la cepa complementada se restauró el fenotipo (Figura 27).

Las especies de *Brucella* también son particularmente resistentes al efecto lítico de la lisozima [66]. Sorprendentemente, mientras que la cepa wt mostró una densidad óptica ( $OD_{600}$ ) sostenida en el tiempo en presencia de lisozima, la turbidez del cultivo  $\Delta mapB$  disminuyó hasta el 26% del valor inicial después de 4 minutos de incubación debido a la lisis celular, y en la cepa complementada se restauró el fenotipo (Figura 27).



**Figura 28. Curva de crecimiento y tolerancia a diferentes estreses. A.** *B. suis* 1330 (wt),  $\Delta mapB$  y la cepa complementada  $\Delta mapB$ -pBBR1mapB se cultivaron a 37 °C en medio rico y la  $OD_{600}$  se registró a diferentes tiempos. **B.** Las cepas se incubaron con 20, 40, 80 o 120 mM de peróxido de hidrógeno durante 1 h, y se determinaron las UFC. Para ambas cepas, las UFC en cada tratamiento se normalizaron a las UFC obtenidas con el control en PBS y se muestra el % de supervivencia.

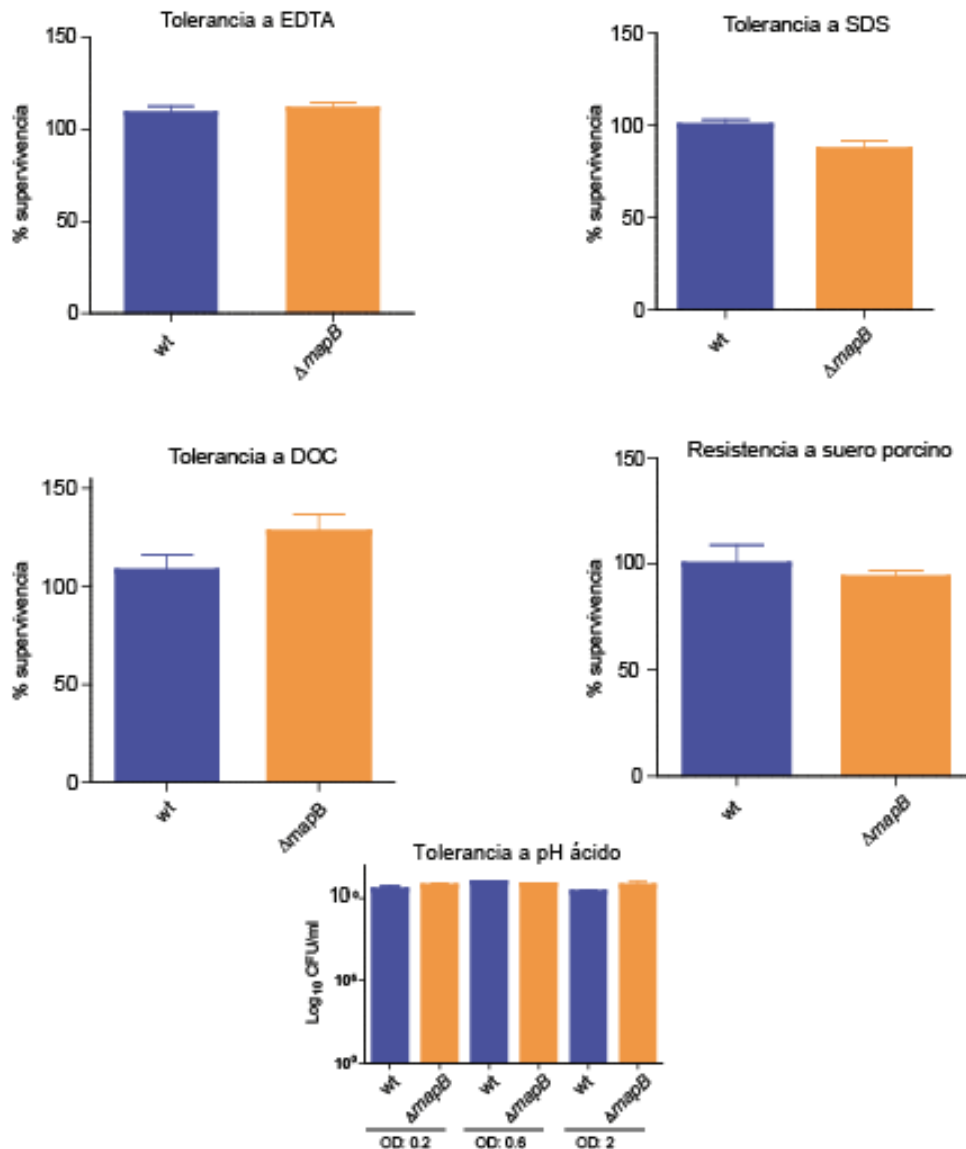


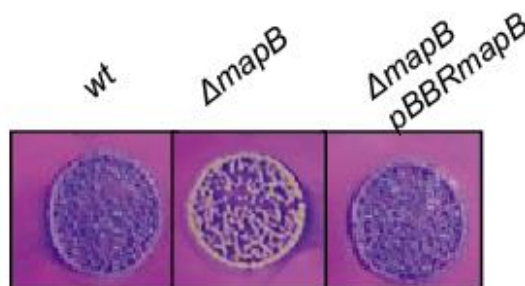
Figura 28. C. Se analizaron *B. suis* M1330 (wt) y la cepa isogénica  $\Delta mapB$ . Las bacterias se incubaron con o sin EDTA 0,67 mM, SDS 0,01% o DOC 0,1% durante 10 min a temperatura ambiente, y se determinaron las UFC. Para ambas cepas, la UFC obtenida después de la incubación con cada compuesto se normalizó para el control (UFCs obtenida sin tratamiento). Se muestra el % de supervivencia de cada cepa en relación a la cepa wt. Se realizaron tres experimentos independientes con resultados similares. Los datos se analizaron mediante la prueba T de *Student* y ANOVA de una vía sin resultados significativamente diferentes. D. Resistencia a suero porcino. Se contaron las UFC, y se calculó el porcentaje de bacterias supervivientes en relación con el control (tiempo 0) y el tratamiento (% de supervivencia). E. La tolerancia al pH ácido se llevó a cabo en distintas DO: 0,2, 0,6 y 2. Se obtuvo el número de UFC después de la incubación y se normalizaron al control (UFC obtenidas sin tratamiento). Se muestra el % de supervivencia de cada cepa en relación con la cepa wt.

Estas observaciones indican que la integridad de la envoltura celular y la resistencia típica de *Brucella* a polimixina B y lisozima depende en gran medida de MapB, sugiriendo que el sistema TAM en *B. suis* juega un rol crítico en la homeostasis de la envoltura celular.

## II.5 La mutante $\Delta mapB$ no es una cepa rugosa

En comparación con otras bacterias Gram negativas, *Brucella* es particularmente resistente a péptidos catiónicos, como la polimixina B. Esta característica se ha asociado previamente a la pérdida del antígeno-O del LPS [66, 211]. Sin embargo, este no fue el caso para la mutante  $\Delta mapB$  dado que, en primer lugar, al igual que las células wt, las células de la mutante no se aglutinaron en presencia de acriflavina al 0,1% p/v. Por el contrario, *Brucella ovis*, un control de cepa rugosa que carece del antígeno-O naturalmente, mostró aglutinación en presencia del reactivo (datos no mostrados). En segundo lugar, se observó que tanto la cepa mutante como la wt mostraron un grado de reactividad similar frente a un anticuerpo de cabra anti-*Brucella* lisa conjugado con fluoresceína (FITC) (datos no mostrados). Estas observaciones sugieren que el antígeno-O en la mutante  $\Delta mapB$  permanece asociado a la superficie celular.

Por otro lado, las células de cepas rugosas de *Brucella* desprovistas del antígeno-O retienen más cristal violeta (CV) en comparación con sus cepas parentales [160]; *B. ovis* retiene altas cantidades del colorante. Como se esperaba, no observamos un aumento de la tinción de las colonias  $\Delta mapB$  en placas en medio rico (TSA) en presencia de cristal violeta en comparación con las cepas wt y complementada. Por el contrario, mientras que las colonias de la cepa wt mostraron una coloración en presencia de CV, las colonias de la mutante apenas retuvieron el colorante. Además, en la cepa complementada con el pBBR1 $mapB$  se restauró el fenotipo (Figura 29).

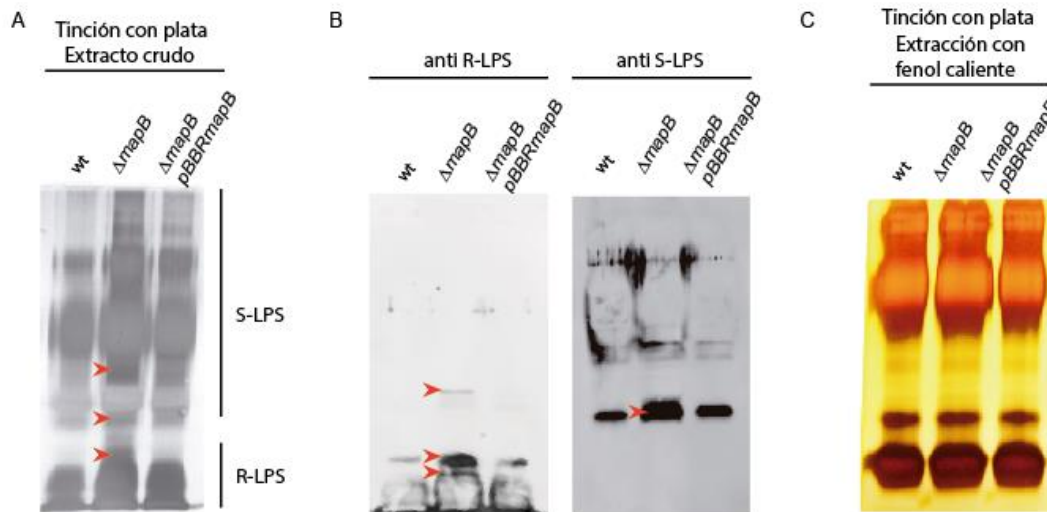


**Figura 29. Evaluación de disociación. Tinción con Cristal violeta y oxalato de amonio de colonias en placas en medio rico (TSA).**

Por lo tanto, aunque esta observación confirma que la mutante *ΔmapB* no es una cepa rugosa, el fenotipo particular de las colonias de la mutante en CV refuerza la idea que la mutante *ΔmapB* presenta la envoltura celular alterada.

## **II.6 El LPS de la mutante *ΔmapB* no presenta mayores alteraciones**

Con el fin de evaluar si los fenotipos de la mutante *ΔmapB* podrían atribuirse a diferencias estructurales del LPS, distintas a la pérdida completa de antígeno-O, los extractos de LPS obtenidos mediante tratamiento con SDS-proteinasa K se analizaron mediante tinción con plata y Western blot. Por tinción con plata se observó que, a excepción de algunas bandas adicionales u otras que presentaron una señal más fuerte en el perfil de la cepa mutante, no se observaron diferencias marcadas entre los patrones del LPS de las cepas wt, mutante y complementada (Figura 30A). El análisis por Western blot usando anticuerpos monoclonales anti-antígeno-O y anti-R (rugoso) indicó que los perfiles de S-LPS (liso) y R-LPS (rugoso) no sufrieron cambios significativos (Figura 30B). Nuevamente se observaron algunas bandas adicionales o más fuertes en el perfil de la cepa mutante (indicado con flechas).



**Figura 30. Análisis del LPS. A. SDS-PAGE y tinción con plata de extractos crudos de LPS de cada cepa. B. Análisis por Western blot utilizando anticuerpos anti-R-LPS (panel izquierdo) o anti-S-LPS (panel derecho). Las flechas rojas indican la presencia de bandas adicionales o más fuertes en el LPS de la mutante  $\Delta mapB$ . C. SDS-PAGE y tinción con plata de extractos de LPS purificados con fenol caliente.**

De manera consistente, por tinción con *Coomassie Brilliant blue* (CBB), se observó que los extractos de LPS provenientes de la mutante  $\Delta mapB$  arrastraban más proteínas que los extractos de la cepa wt (Figura 31), lo cual sugiere que la presencia de bandas extra o más abundantes observadas en el patrón de la cepa mutante podría estar relacionada con este comportamiento. Para evaluar esta hipótesis, se realizó un ensayo proteómico de la composición de las bandas diferenciales que se observaban por tinción con CBB. La asociación del LPS de la cepa mutante con diferentes proteínas no pudo explicar este efecto ya que se detectó una composición similar de proteínas en las preparaciones de las cepas wt y  $\Delta mapB$  (Tabla 2). Cabe destacar que las proteínas mayoritarias asociadas al LPS de ambas cepas correspondieron a 6 miembros del grupo Omp25/31 que, según se describió previamente, interactúan con el peptidoglicano [59, 212] y otras dos putativas OMP (BR1469 y BRA0921). Una posible explicación para estas observaciones es que la ausencia de MapB podría dar lugar a una interacción más débil de ciertas OMP con otras estructuras de la envoltura, como el peptidoglicano o, alternativamente, a una interacción más fuerte de algunas OMP con el propio LPS [213]. Por otro lado, las bandas adicionales o con señales más fuertes no se observaron en el perfil del LPS de la cepa  $\Delta mapB$  cuando se analizaron preparaciones de LPS obtenidas mediante extracción con fenol caliente (Figura

30C), apoyando la idea que las diferencias sutiles observadas en el perfil del LPS de la cepa mutante en el extracto crudo podrían deberse a una interacción diferencial de ciertas OMPs con otras estructuras de la envoltura celular.

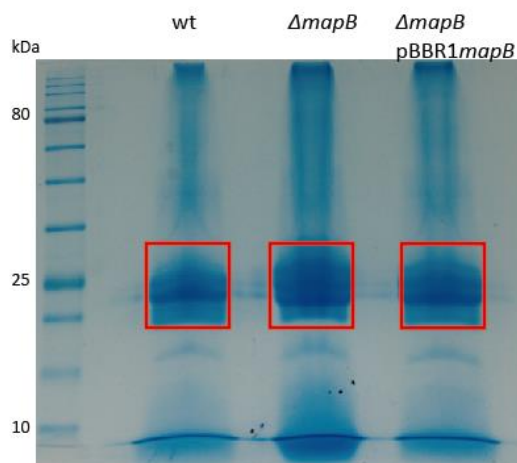


Figura 31. SDS PAGE de proteínas asociadas a las fracciones de LPS crudo.

Tabla 2: Proteínas asociadas a la fracción de LPS

ID	Código	Descripción	PSMs wt	PSMs <i>mapB</i>
P0A3U5	BRA0423	Omp31	968	1091
Q45689	BR0701	Omp25	436	562
A0A0H3G433	BR1622	Omp31b	316	320
A0A0H3G4S3	BR0119	Omp25c	170	200
A0A0H3G313	BR0971	Omp25b	38	55
A0A0H3G1F5	BR0118	Omp25d	23	28
A0A0H3G4I7	BR1469	Omp no caracterizada	9	16
Q8FVC3	BRA0921	Omp no caracterizada	3	4
A0A0H3G8I1	BRA1147	Flagelina	2	1
P64025	BR1235	Factor de elongación Tu	1	5

El LPS fue obtenido a partir de un extracto crudo. El análisis se realizó mediante nanoLC-MS/MS acoplado a QExactive Orbitrap en la cepas *B. suis* 1330 (wt),  $\Delta mapB$  y complementada. Se indican los PSMs como medida de la cantidad de péptidos obtenidos en cada cepa. Los resultados que se muestran provienen del análisis mediante digestión en gel de la zona recortada marcada en la Figura 31.

Los fenotipos asociados a la superficie celular de  $\Delta mapB$ , en particular, la mayor sensibilidad a Tritón X-100, podrían deberse a cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana. Estas modificaciones podrían hacer que la célula sea más permeable y,

por lo tanto, más susceptible a los detergentes no iónicos. Para explorar esta posibilidad, se analizó la composición de ácidos grasos de membrana a partir de lípidos totales. La Tabla 3 muestra que no hay diferencias significativas en las cantidades y la composición de ácidos grasos de las distintas cepas. Cabe mencionar que los ácidos grasos 18:1 y 19:0 cyc se deben considerar en conjunto ya que, dependiendo de la edad del cultivo, 18:1 es un precursor directo de 19:0 cyc [214]. Esta observación muestra que la mayor sensibilidad de  $\Delta mapB$  a Triton X-100, lisozima y polimixina B no se debió a cambios importantes en la composición de ácidos grasos de la membrana.

**Tabla 3: GC-MS de ácidos grasos totales**

FA	wt		$\Delta mapB$		$\Delta mapB$ pBBRmapB	
	Promedio	SD $\pm$	Promedio	SD $\pm$	Promedio	SD $\pm$
16:01	0.13	0.02	0.09	0.01	0.1	0.01
16:00	2.34	0.17	1.94	0.44	2.09	0.48
17:01	0.11	0.01	0.09	0.02	0.08	0.04
17:00	0.26	0.05	0.18	0.07	0.18	0.09
18:02	0.24	0.05	0.26	0.04	0.3	0.06
18:01	40.86	1.68	26.24	1.49	29.25	1.98
18:00	4.49	0.79	2.44	0.18	2.31	0.12
19:c	50.54	2.76	67.57	1.68	64.78	1.87
20.1	1.18	0.04	1.33	0.11	1.07	0.11
20.0	0.03	0.01	0.03	0.01	0.03	0.01

**GC-MS de ácidos grasos totales (FA) obtenidos de *B. suis* 1330 (wt),  $\Delta mapB$  y la cepa complementada. Los resultados que se indican son el promedio de tres experimentos independientes.**

## II.7 Evaluación de la función de MapB en la translocación de proteínas de membrana

Como se mencionó anteriormente, se demostró que TamB de *E. coli* y *C. rodentium* son necesarios para la translocación eficiente de los autotransportadores en la ME [90]. Para evaluar si una función similar también podría atribuirse a MapB, analizamos la presencia del ATI de *B. suis* BR2013 (BmaB) (ver Capítulo I) en extractos de células enteras y en diferentes fracciones subcelulares de las cepas wt y  $\Delta mapB$ . Como se mencionó en la sección I.9 del Capítulo I, se generó una construcción que alberga una fusión traduccional de BmaB con la etiqueta 3xFLAG en el N-terminal, inmediatamente posterior al sitio predicho de escisión del péptido señal (Figura 21-Capítulo I). Análisis por Western blot de



las proteínas de extractos de células totales de la cepa wt, usando anticuerpos anti-FLAG, mostró la presencia de una banda del peso molecular predicho (164 kDa), así como otras dos bandas de menor tamaño (Figura 32A). Curiosamente, se observaron consistentemente niveles aumentados de 3xFLAG-BmaB en extractos de células totales de la cepa  $\Delta mapB$  (Figura 32A). Para evaluar si BmaB estaba correctamente insertado en la membrana determinamos la distribución subcelular del autotransportador etiquetado en ambas cepas. Dada la dificultad de separar la ME de la MI en *Brucella*, las fracciones de las membranas totales (M) y soluble (Ci + Pe, citoplasma más periplasma) se analizaron mediante Western blot usando los anticuerpos anti-FLAG (Figura 32B). Como se esperaba, se observó principalmente una banda principal de 164 kDa en membranas totales de la cepa wt. Por el contrario, sólo se recuperó una cantidad baja de la proteína entera (164 kDa) en la fracción de membranas totales de  $\Delta mapB$ , y se observaron altos niveles de un fragmento de 85 kDa correspondiente a 3xFLAG-BmaB en la fracción soluble (Ci + Pe). Cabe mencionar que esta proteólisis no logró prevenirse mediante la adición de un cóctel inhibidor de proteasas (Roche Complete) (Figura 32B).

Otro método complementario para estudiar la localización de BmaB en ambos contextos genéticos, fue analizar la presencia de la proteína etiquetada en las fracciones enriquecidas de protoplastos (Pr) y ME-periplasma (ME + Pe) obtenidas mediante tratamiento con Zwittergent® 3-16. Como se mencionó en el Capítulo I (sección I.9), en la cepa wt la proteína 3xFLAG-BmaB se localizó en la fracción ME + Pe, aunque en este caso principalmente como un fragmento de aproximadamente 85 kDa, sugiriendo fuertemente que el AT es particularmente sensible al método de fraccionamiento. De la misma manera, en la fracción correspondiente a la cepa mutante  $\Delta mapB$  también se detectó un fragmento de la proteína del mismo peso molecular (85 kDa) en la fracción ME + Pe, aunque en cantidades mayores que en la cepa wt (Figura 32B). Por lo tanto, tomando en conjunto los perfiles de proteínas de todas las fracciones subcelulares obtenidas por ambos métodos de fraccionamiento, se puede concluir que en la cepa wt, BmaB está localizado en la ME. Por otro lado, aunque algunas moléculas de BmaB parecen alcanzar la ME en el mutante  $\Delta mapB$ , la comparación de las cantidades de proteína en las diferentes fracciones indica que BmaB se acumula mayormente en el periplasma.

**A.**

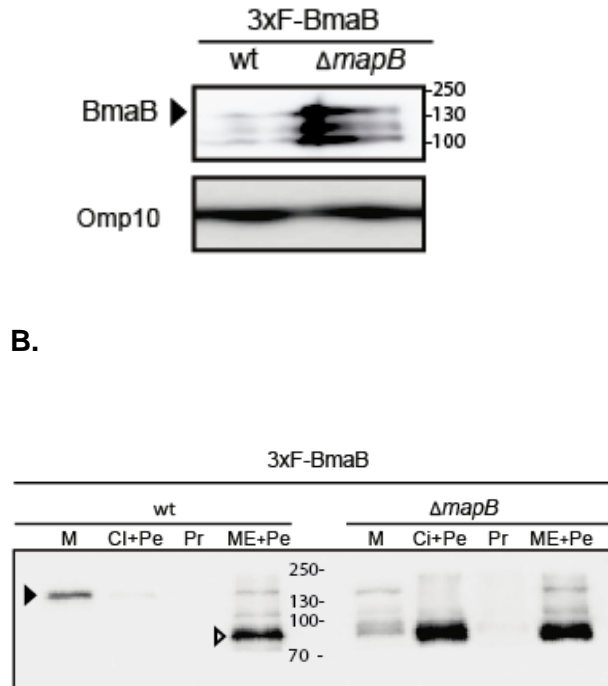
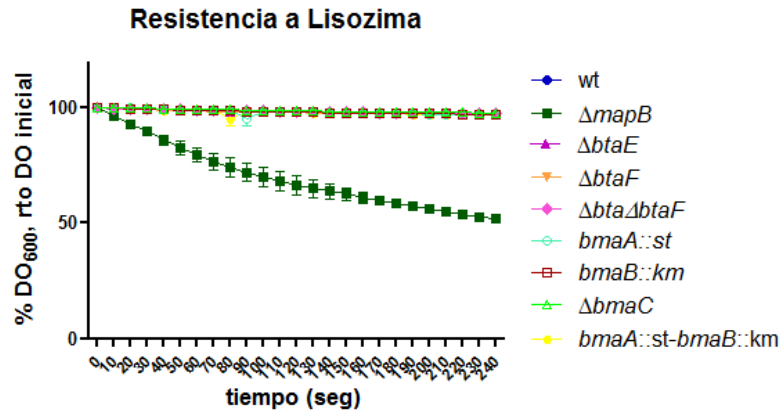


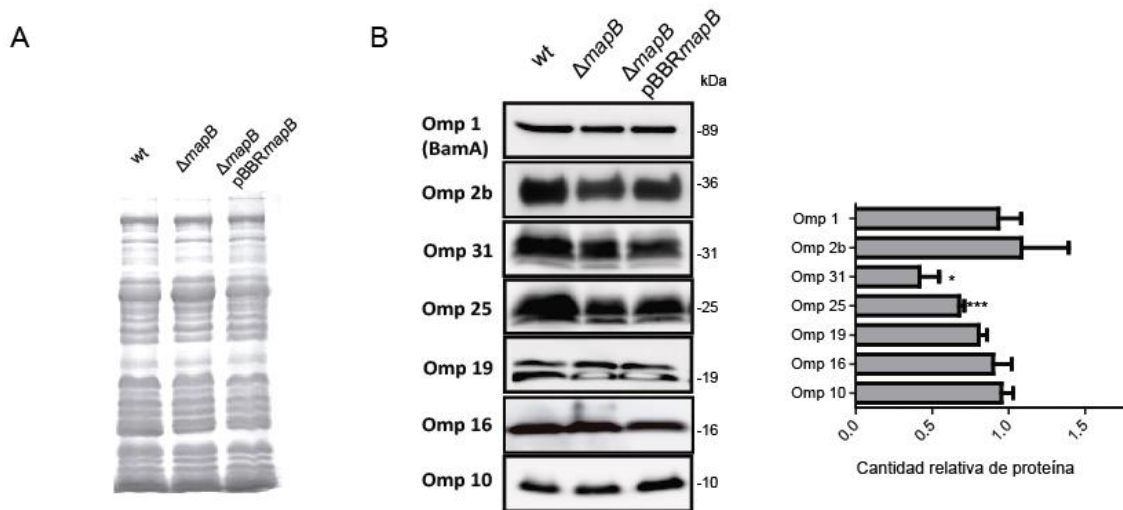
Figura 32. A. Análisis mediante Western blot de extractos de células totales de la cepa *B. suis* 1330 que contiene el plásmido pBBR3xFLAG*bmaB* (wt-3xFLAG*bmaB*), y la cepa  $\Delta mapB$  con el plásmido pBBR3xFLAG*bmaB* ( $\Delta mapB$ -3xFLAG*bmaB*) revelado con anticuerpos monoclonales anti-FLAG. La punta de flecha indica el peso molecular predicho de la proteína completa con el FLAG. Anti-Omp10 se usó como control de carga. B. Localización subcelular de BmaB. 3xFLAG-BmaB fue detectada con anticuerpos monoclonales anti-FLAG en fracciones de membranas totales (M), citoplasma más periplasma (Cy + Pe), protoplastos (Pr) y fracciones de membrana externa más periplasma (ME + Pe) en las cepas wt-3xFLAG*bmaB* (Figura 21) y  $\Delta mapB$ -3xFLAG*bmaB*. La punta de flecha negra indica el peso molecular predicho de la proteína completa con el FLAG (164 kDa); la punta de flecha blanca indica el fragmento mayoritario de 85 kDa de BmaB. Se repitió el panel correspondiente a la cepa wt de la Figura 20 (Capítulo I) a modo de comparar con la cepa  $\Delta mapB$ .

La alteración de la homeostasis de la envoltura celular que muestra la mutante  $\Delta mapB$  difícilmente podría explicarse por un defecto en la eficiencia de inserción en la ME de proteínas con actividad de adhesina. De todas maneras, para probar esta posibilidad se realizó un control de tolerancia a lisozima de todas las mutantes de los AT de *B. suis*, tanto simples como dobles, asumiendo que si el efecto en  $\Delta mapB$  se debe a la ausencia de los ATs en la membrana deberíamos observar el mismo efecto en las mutantes de los ATs. Comprobamos que ninguna de las mutantes presenta una mayor sensibilidad a la lisozima, comparada con la cepa wt, como ocurre en la mutante  $\Delta mapB$  (Figura 33).



**Figura 33.** Las bacterias se incubaron en presencia de 2  $\mu\text{g/ml}$  lisozima y se determinó la  $\text{OD}_{600}$  de la suspensión cada 10 segundos. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (SEM) de triplicados de un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Por lo tanto, una hipótesis plausible es que MapB esté involucrada en la translocación hacia la ME de un amplio rango de sustratos o, alternativamente, de un subconjunto específico de proteínas, algunas de las cuales serían importantes para el ensamblaje de la ME. Para evaluar estas alternativas, se analizó la presencia en membranas totales de una variedad de OMPs en las cepas wt,  $\Delta mapB$  y complementada mediante Western blot usando anticuerpos específicos. Asumimos que las OMPs que no son translocadas de manera eficiente a la ME de la mutante estarán sobre-representadas en las preparaciones de membranas totales. Las siguientes OMPs se eligieron para este análisis: Omp1 (BamA) [215], Omp2b (una porina oligomérica con estructura de barril  $\beta$ ) [58, 216], Omp31 y Omp25 (grupo 3 de OMP de *Brucella*, con estructura  $\beta$ , asociadas con el peptidoglicano y expuestas en la superficie) [58, 210, 217] y Omp19, Omp16 y Omp10 (lipoproteínas con un dominio hidrofílico y posible unión al peptidoglicano) [210, 218]. Los perfiles proteicos de membranas totales analizados por SDS-PAGE y tinción con CBB no mostraron diferencias significativas (Figura 34A), lo que indica que la mutante no presenta cambios generalizados en cuanto a la composición de proteínas de membrana. En cuanto a los ensayos de Western blot, utilizando anticuerpos específicos que reconocen a las diferentes OMPs, no se observaron diferencias significativas entre las cepas wt,  $\Delta mapB$  y complementada en los niveles de proteína de Omp1 (BamA), la porina Omp2b o las lipoproteínas Omp19, Omp16 y Omp10 (Figura 34B).



**Figura 34.** A. SDS-PAGE y tinción con CBB de fracciones de membranas totales. B. Western blot de fracciones de membranas totales con anticuerpos anti-Omp1, Omp2b, Omp31, Omp25, Omp19, Omp16 u Omp10. La cuantificación de la abundancia de OMPs a partir de tres experimentos independientes se determinó con relación a Omp10 como control de carga, y la abundancia relativa de OMP en  $\Delta mapB$  se expresó como la cantidad de la proteína con respecto a la cepa wt. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba posteriori de Tukey. \*: significativamente diferente del control (wt), ( $p < 0.05$ ).

El análisis del grupo 3 de OMPs usando anticuerpos anti-Omp25 o anti-Omp31 no mostró bandas discretas, sino un chorreado a lo largo de los carriles tanto en las preparaciones de la cepa wt como en las de la cepa mutante (Figura 35). El tratamiento de los extractos de membrana con 5 mg/ml de lisozima, seguido de análisis por Western blot dio como resultado la observación de bandas discretas de proteínas en ambos contextos genéticos (Figura 34B). Esto está de acuerdo con la fuerte asociación que se ha propuesto entre el peptidoglicano y este grupo de OMPs [59, 212].

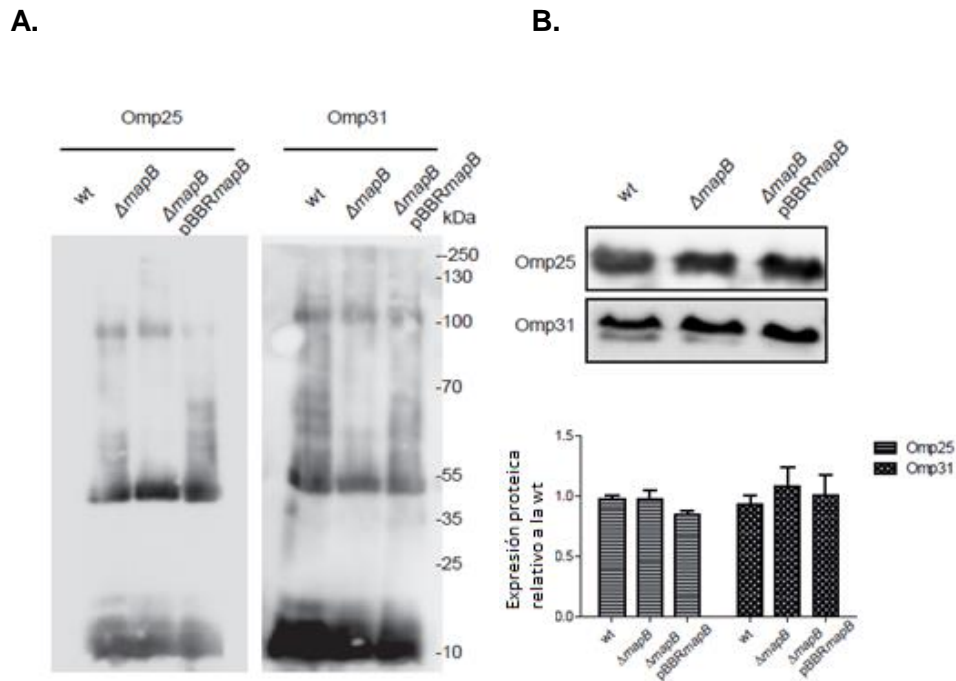


Figura 35. A. Western blot de membranas totales de *B. suis* 1330 (wt),  $\Delta mapB$  y  $\Delta mapB$ -pBBRmapB con anti-Omp25 y anti-Omp31 (inmediatamente después de la extracción). B. Western blot de extractos de células enteras con anti-Omp25 y anti-Omp31. La cuantificación de la abundancia de las bandas obtenidas de tres experimentos independientes se determinó con relación a Omp10 como control de carga, y la abundancia relativa de la OMP en  $\Delta mapB$  se expresa como cantidad de proteína con respecto a la cepa wt. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de una prueba posteriori de Tukey. \*: significativamente diferente del control (wt), ( $p < 0.05$ ).

Cabe destacar que los anticuerpos utilizados probablemente reconocen a más de un miembro de la familia de proteínas Omp25/31 [217, 219, 220]. Se observó una disminución del 50% en los niveles de las proteínas Omp25 y Omp31 asociadas a la membrana en la mutante  $\Delta mapB$  en comparación con cepa wt y la cepa complementada mostró niveles de proteína restaurados (Figura 34B). En línea con estas observaciones, se había propuesto previamente que un equilibrio estrecho en la composición de las OMPs del grupo 3 es esencial para la integridad de la ME de *Brucella* [57, 221]. Es importante aclarar que la reducción en las cantidades de Omp25 y Omp31 no se debió a una disminución en la cantidad total de dichas proteínas ya que el análisis mediante Western blot de extractos de células totales no mostró diferencias en las cantidades de estas OMPs entre la cepa wt y mutante (Figura 35).

Con el fin de realizar un análisis más global, las proteínas de membranas totales de las cepas wt,  $\Delta mapB$ , y complementada se analizaron por triplicado mediante LC-MS/MS

usando la tecnología Orbitrap (ver Materiales y Métodos) en el servicio de proteómica CEQUIBIEM (FCEyN, UBA). El análisis semi-cuantitativo a través de un análisis del tipo *label free quantification* (LFQ) mostró una abundancia similar de la mayoría de las proteínas detectadas en las tres cepas, indicando que la ausencia de MapB no provocó una disminución (o cambio) general en las cantidades relativas de proteínas de membrana. Cabe aclarar que nuestro análisis se limitó a las proteínas detectadas en las tres réplicas de ambas cepas. En línea con los ensayos de Western blot descritos en esta sección, se observó una abundancia similar de Omp1 (BamA), de la porina Omp2b y de la lipoproteína Omp16 en la cepa wt y en la mutante (Tabla 4). Además, se detectaron varias otras OMPs, incluyendo proteínas con estructura de barril  $\beta$  como BepC [222] y proteínas del grupo 3 de OMP (Omp25 y Omp25b) que mostraron abundancias similares en ambas cepas (Tabla 4).

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 34B, la abundancia de ambos miembros de Omp31 (BRA0423 y BR1622) [217, 220] disminuyó en el mutante. Además, los niveles de Omp25c (BR0119) [220] también se redujeron en comparación con la cepa wt. Esto podría explicar la disminución en la señal observada por Western blot usando anticuerpos anti-Omp25 (Figura 34B); sin embargo, no podemos descartar la contribución de Omp25d a este resultado ya que la abundancia de esta proteína estuvo bajo el límite de detección con buena confianza.

Tabla 4. OMPs detectadas por nano LC-MS/MS

ID	Gen	Nombre de la proteína/Descripción	Características estructurales	Valor-p	FC
Q45689	BR0701	Omp25	Barril- $\beta$	0.57	-
P0DI95	BR0639	Omp2b	Barril- $\beta$ , trímero, porina	0.15	-
P0A3U5	BRA0423	Omp31	Barril- $\beta$ I, trímero <sup>a</sup>	0.033	-6.4
A0A0H3G433	BR1622	Omp31b	Barril- $\beta$	0.014	-7.4
A0A0H3G4S3	BR0119	Omp25c	Barril- $\beta$	0.0034	-5.2
A0A0H3G234	BR0440	No caracterizada (MliC <sup>b</sup> )		0.7	-
A0A0H3G415	BR1154	BamA <sup>c</sup>	Barril- $\beta$ / dominio periplásmico	0.046	-
P0A3S8	BR1695	Omp16	Lipoproteína, monomérica	0.63	-
A0A0H3G313	BR0971	Omp25b	Barril- $\beta$	0.78	-
A0A0H3G2L4	BR0708	No caracterizada (DUF992 <sup>d</sup> )		0.047	-

**FC: Fold Change**

<sup>a</sup>Se sugiere estructura trimérica debido a la capacidad de formar oligómeros resistentes a SDS [56]

<sup>b</sup>MliC, Inhibidor de la lisozima tipo C, unido a la membrana

<sup>c</sup>El valor-p se encuentra al límite de la significancia. Sin embargo, mediante Western blot se demostró una abundancia similar en los contextos wt y mutante.

<sup>d</sup>DUF992, dominio conservado de función desconocida

La abundancia de cuatro proteínas con una localización subcelular predicha distinta de la ME también disminuyó en  $\Delta mapB$  en comparación con las cepas wt y complementada (Tabla 5). Los niveles de dos proteínas de la MI se redujeron en la cepa mutante: un transportador ABC relacionado con la resistencia a  $\beta$ -lactámicos (BRA0535) y una supuesta lipoproteína de anclaje L, D-transpeptidasa (BR0564) de la familia ErfK/SrfK [223]. Se propuso que el homólogo de este último en *A. tumefaciens* (Atu0845) desempeña un papel crucial en el entrecruzamiento del peptidoglicano en el polo nuevo que se produce durante el proceso de división celular [224, 225]. Además, los niveles de BR2114 también se redujeron en el mutante; esta proteína, según el servidor Gneg-mPLoc, tiene una localización periplásmica y alberga un dominio DUF2852 de función desconocida. Finalmente, la abundancia de una proteína citoplasmática de la familia DegT/DnrJ/EryC1/StrS (BR1601) se redujo en  $\Delta mapB$ . Los miembros de esta familia están implicados en la síntesis de 4-amino-6-desoxi- D-perosamina [226] (Tabla 5).

**Tabla 5: Proteínas con localización distinta de OM detectadas por proteómica (LFQ) que disminuyeron en la cepa  $\Delta mapB$** 

ID	Gen	Nombre de la proteína/Descripción	Valor-p	FC	L
A0A0H3G969	BR2114	No caracterizada (DUF 2852 DUF 702 DUF 4140)	0.027	6.5	P
A0A0H3G416	BR1601	Aminotransferasa. Pertenece a la familia DegT/DnrJ/EryC1/StrS	0.023	2.75	C
A0A0H3G2C1	BR0564	No caracterizada. Dominio catalítico L,D-transpeptidasa. Pertenece a la familia ErfK/SrfK	0.033	3.9	MI
A0A0H3G767	BRA0535	Transportador ABC, dominio permeasa	0.041	7.3	MI

Se indica la localización subcelular (L) predicha: citoplasma (C), membrana interna (MI) y periplasma (P). FC: *Fold change*

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que los fenotipos de la mutante  $\Delta mapB$  no se deben a un cambio generalizado en la abundancia de OMPs. Sin embargo, nuestras observaciones sugieren fuertemente que la proteína MapB es querida para la correcta localización y/o estabilidad en la ME de un subconjunto de OMPs, incluido el autotransportador BmaB y los miembros del grupo 3 de OMPs (familia Omp25/31). El papel de MapB en la inserción de otras OMPs en la ME no puede descartarse por completo ya que el análisis proteómico comparativo se llevó a cabo en condiciones muy estrictas.

Por otro lado, la reducción relativa de otras proteínas que, de acuerdo con sus secuencias de aminoácidos no se localizan en la ME, podría estar relacionada a efectos indirectos. Por ejemplo, la presencia de algunas de estas proteínas en sus destinos finales podría depender de su interacción con alguna OMP cuya estabilidad en la ME depende de MapB.

## II.8 Efecto de la ausencia de MapB en la morfología celular

La baja estabilidad de la envoltura de la célula  $\Delta mapB$  bajo diferentes condiciones de estrés sugiere que MapB es crucial para la homeostasis de la envoltura celular en *B. suis*. Por lo tanto, para evaluar los cambios en la superficie y la morfología celular de  $\Delta mapB$ , realizamos estudios de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de bacterias en fase estacionaria. Sorprendentemente, el análisis MEB mostró que, a diferencia de la morfología típica de pequeños cocobacilos de *Brucella*, la delección de *mapB* resultan en un aumento en el tamaño celular, la formación



de septos ectópicos, bacterias en forma de “Y” y otras morfologías celulares aberrantes (Figura 36).

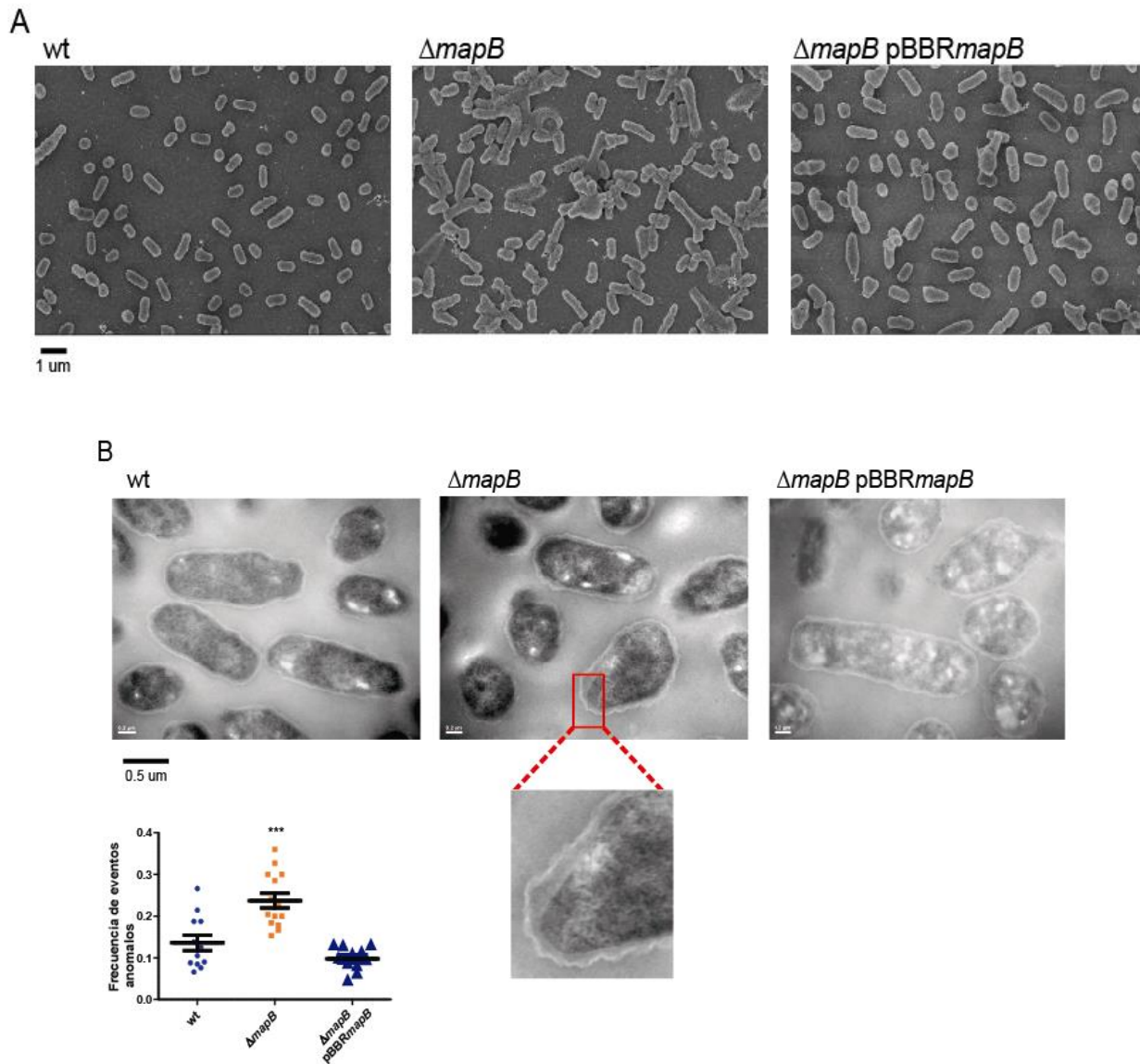


Figura 36. Las células  $\Delta mapB$  muestran una división celular aberrante. A. *B. suis* 1330 (wt),  $\Delta mapB$  y la cepa complementada  $\Delta mapB$ -pBBRmapB se cultivaron en medio rico hasta fase estacionaria temprana, se procesaron para el análisis MEB y se observaron utilizando un microscopio electrónico Carl Zeiss NTS SUPRA 40. B. Análisis mediante MET de cortes ultrafinos de *pellets* bacterianos de las cepas que se muestran en (A). El recuadro muestra una sección representativa del desprendimiento de ME observado en el mutante  $\Delta mapB$ . C. Cuantificación de células con el fenotipo de ME separada. La cantidad de eventos se registró y graficó como frecuencia de ocurrencia. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía. \*\*\*: significativamente distinto a la wt ( $p < 0.0001$ ).

Estas observaciones sugieren fuertemente que la ausencia de MapB causa defectos en la división celular. La cepa complementada mostró una alta proporción de células que se parecen a la cepa wt, aunque algunas bacterias mostraron formas atípicas, lo que indica que este último fenotipo no se restauró por completo. El análisis mediante MET mostró que la ME de  $\Delta mapB$  se encuentra ligeramente más separada de la MI con focos más “suelos” que en la cepa wt, aunque en un bajo pero significativo número de células. En la cepa complementada se restauró este último fenotipo (Figura 36).

## II.9 Análisis proteómico de las OMVs

*B. abortus* y *B. melitensis*, como otras bacterias, liberan vesículas de membrana externa (OMVs) al medio extracelular [227, 228]. En bacterias Gram-negativas, las OMVs se producen por desprendimientos de la ME cargadas de contenido soluble periplásmico. Se propuso que, mientras que las bacterias crecen y reciclan sus membranas externas, las paredes de las células tienden a liberar más OMVs principalmente en la zona de los septos durante la división celular. Además, existe evidencia que indica que mutantes en ciertas OMPs que se unen al peptidoglicano, como OmpA, Lpp, TolB y Pal en otros géneros bacterianos, aumentan el proceso de formación de vesículas. Por lo tanto, nos preguntamos si los múltiples septos ectópicos y la disminución en la abundancia de OMPs que interactúan con el peptidoglicano, observado en  $\Delta mapB$ , podrían conducir a una sobreproducción de OMVs y/o a un mayor contenido de proteínas asociadas a estas vesículas. Para probar esta hipótesis, bacterias de las cepas wt y  $\Delta mapB$  se cultivaron hasta fase exponencial y las fracciones de OMVs, obtenidas mediante ultracentrifugación de sobrenadantes libres de células, se analizaron mediante LC-MS/MS. Se detectaron muy pocas proteínas en la fracción de OMVs de la cepa wt, sugiriendo una baja producción de OMVs de *B. suis* 1330 en las condiciones de cultivo utilizadas. Sin embargo, la fracción de OMVs recuperada de la cepa  $\Delta mapB$  reveló un alto número de proteínas (alrededor de 40). Casi el 60% de las proteínas detectadas correspondieron a OMPs y proteínas periplásmicas, incluidos múltiples miembros de la familia de proteínas Omp25/Omp31, Omp2b, BamA, TolB y componentes periplásmicos de transportadores ABC (Tabla S1). Por lo tanto, la mutante *mapB* tiende a liberar cantidades más altas de proteínas asociadas a OMVs que las bacterias de la cepa wt. Aunque no se puede descartar que parte del material recuperado provenga del desprendimiento de la ME y pérdida del contenido periplásmico, el fenotipo

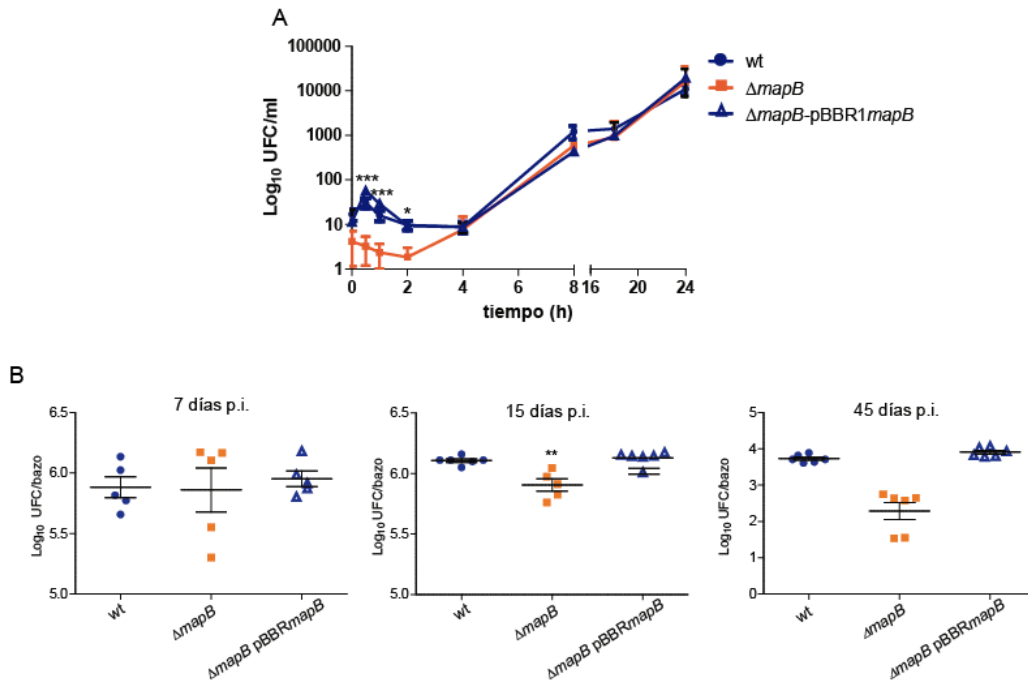
observado confirma la fragilidad de la envoltura de la célula  $\Delta mapB$  y sugiere que el proceso de formación de vesículas se altera o desregula de algún modo en la mutante.

Por lo tanto, se puede concluir que la falta de MapB conduce a defectos graves en el proceso de división celular. Además, la ausencia de MapB afectaría la asociación de ME con la pared celular, lo que conduce a niveles más altos de proteínas asociadas a OMVs.

## **II.10 Función de MapB en la replicación intracelular en macrófagos y virulencia en ratón**

Para evaluar si MapB juega un papel en el proceso de virulencia, se estudió la internalización y la replicación intracelular en macrófagos murinos J774.1. Como se muestra en la Figura 37A, la delección de *mapB* afectó significativamente la cantidad de UFC intracelulares recuperadas particularmente en etapas tempranas (30 min a 8 h después de la infección). Sin embargo, en etapas posteriores, las bacterias que lograron sobrevivir se replicaron a velocidades similares a las de la cepa wt. Estos resultados sugieren que  $\Delta mapB$  presenta un defecto en la internalización y/o supervivencia durante las primeras etapas de la infección en macrófagos, pero no en etapas posteriores.

Para examinar más profundamente el papel de MapB en el proceso de infección, realizamos estudios *in vivo* utilizando el modelo de ratón. Con este fin, se infectaron grupos de cinco ratones por cepa mediante inoculación intragástrica [181] y se evaluó la infección esplénica a los 7, 15 y 45 días p.i., que representan fases agudas y crónicas [229]. A los 7 días p.i. no hubo diferencias significativas en la infección esplénica entre las cepas wt, mutante y complementada. Sin embargo, a los 15 y 45 días p.i. la infección esplénica de la cepa  $\Delta mapB$  se redujo significativamente, en 0,4 log y 1,45 log, respectivamente, en comparación con la cepa wt (Figura 37B). En todos los casos, la cepa complementada mostró un recuento de UFC esplénico similar al de la wt. Tomados en conjunto estos resultados indican que se requiere MapB para la virulencia completa de *B. suis* en ratones infectados por vía oral.



**Figura 37. MapB contribuye a la supervivencia intracelular en macrófagos y la virulencia completa en ratones.** A. replicación intracelular bacteriana en macrófagos murinos J774A.1. A las 0 h (control), se recuperaron bacterias de 0,5 h, 1 h, 4 h, 8 h, 18 h y 24 h de los macrófagos y se plaquearon para el recuento de UFC. Los resultados se expresan como Log<sub>10</sub> de UFC/ml. Los datos representan la media ± error estándar (SEM) de triplicados. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes. B. Ratones BALB/c se inocularon por administración intragástrica con *B. suis* 1330 (wt),  $\Delta mapB$  o la cepa complementada  $\Delta mapB$ -pBBR1mapB. Se sacrificaron 5 ratones por grupo a los 7, 15 y 45 días post infección (p.i.). Las UFC recuperadas bazos homogenizados se contaron y se expresaron como Log<sub>10</sub> UFC por bazo. Los datos se normalizaron a t=0 h y se analizó mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba *a posteriori* de Tukey. El experimento fue realizado dos veces con resultados similares. \*: significativamente diferente de wt (p <0.05); \*\*\*: significativamente diferente de wt (p <0.0001).

## Discusión - Capítulo II

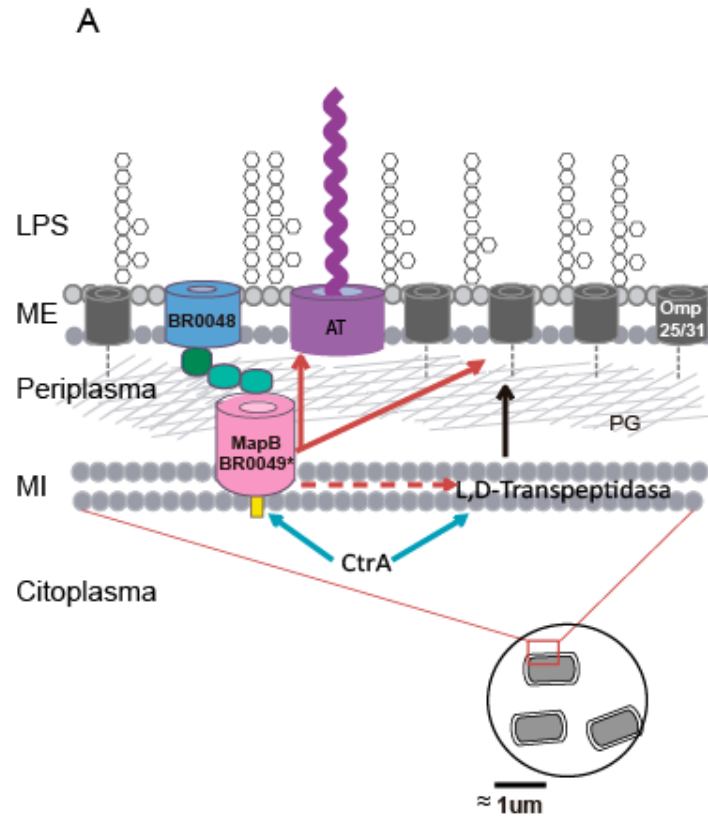
El sistema TAM ha sido descrito por primera vez en el año 2012 [90] y desde entonces las evidencias publicadas en otras especies no han aportado una comprensión cabal sobre su función en la fisiología bacteriana. En esta tesis se proporciona información sobre el papel de MapB, el homólogo de TamB en *B. suis*, en la biogénesis de la envoltura celular. El modelo que proponemos sobre el rol de TAM que surge de nuestras observaciones se representa en la Figura 38 y se analizará con más detalle a continuación. Nuestra observación inicial sobre la marcada sensibilidad a Tritón X-100 en la mutante  $\Delta mapB$  nos llevó a plantear la hipótesis que MapB (o sea TAM) podría tener un papel fundamental en la estabilidad de la envoltura celular [37].

### Envoltura celular

Para comprender mejor el impacto de la ausencia de MapB en las características de la superficie celular, la mutante  $\Delta mapB$  se expuso a diferentes condiciones de estrés. Encontramos que las bacterias que carecían de MapB perdían la resistencia típica de *Brucella* tanto a la polimixina B como a la lisozima [37, 66, 210], lo que indica que MapB es en parte responsable de mantener la estabilidad de la envoltura celular que permite a *Brucella* superar los efectos perjudiciales de esos agentes. Se demostró que los fenotipos de la mutante  $\Delta mapB$  no eran atribuibles a cambios evidentes en el LPS, que es considerada una estructura de superficie clave en la resistencia de *Brucella* a varios agentes antimicrobianos del hospedador, incluida la polimixina B [66, 230].

Por lo tanto, nos preguntamos cuál es el proceso mediado por MapB (y su *partner* putativo BR0048), cuya deficiencia produce profundas alteraciones en la estabilidad de la envoltura celular. Selkrig y colaboradores propusieron que el sistema TAM está involucrado en la translocación y ensamblaje de ciertas proteínas, específicamente proteínas de la familia de los autotransportadores [90]. En el marco de este trabajo encontramos que las células  $\Delta mapB$ , en lugar de dirigir el autotransportador BmaB a la ME tienden a acumularlo en el periplasma (Figura 32B). Sin embargo, los fenotipos observados en  $\Delta mapB$  no podrían explicarse simplemente por un defecto en la translocación de los autotransportadores ya que las funciones de esta familia de proteínas en *Brucella* están restringidas a la adhesión bacteriana a la ECM y a las células hospedadoras [136-138, 147] (ver Resultados-Capítulo I). Además, las mutantes (simples y dobles) en los genes de los autotransportadores de *B. suis* no mostraron sensibilidad a Triton X-100 (datos no mostrados) o a la lisozima (Figura

33), sugiriendo fuertemente que MapB no podría estar involucrado únicamente en la eficiencia de translocación de los autotransportadores. En este sentido, una hipótesis plausible era que TamB de *Brucella* podría estar involucrada en la translocación de un subconjunto más amplio de OMPs, algunas de las cuales serían importantes para la homeostasis de la ME. Realizando un análisis mediante Western blot usando anticuerpos específicos contra varias OMPs y un enfoque proteómico de membranas totales demostramos que no hay un defecto generalizado en la composición de proteínas de membrana; sin embargo, la abundancia relativa de OMPs de la familia Omp25/31 en la mutante deficiente en MapB estaba alterada. Curiosamente, se ha propuesto que es necesario un equilibrio estrecho de proteínas de esta familia para la estabilidad de la ME, y se ha descrito que las proteínas Omp25/31 interactúan fuertemente tanto con el LPS como con el peptidoglicano, lo que permite una mayor rigidez de la envoltura celular [210, 221]. En línea con esto, los cambios observados en la abundancia relativa de proteínas de la familia Omp25/31 podrían explicar, al menos en parte, la inestabilidad de la ME de las células deficientes en MapB (Figura 38B).



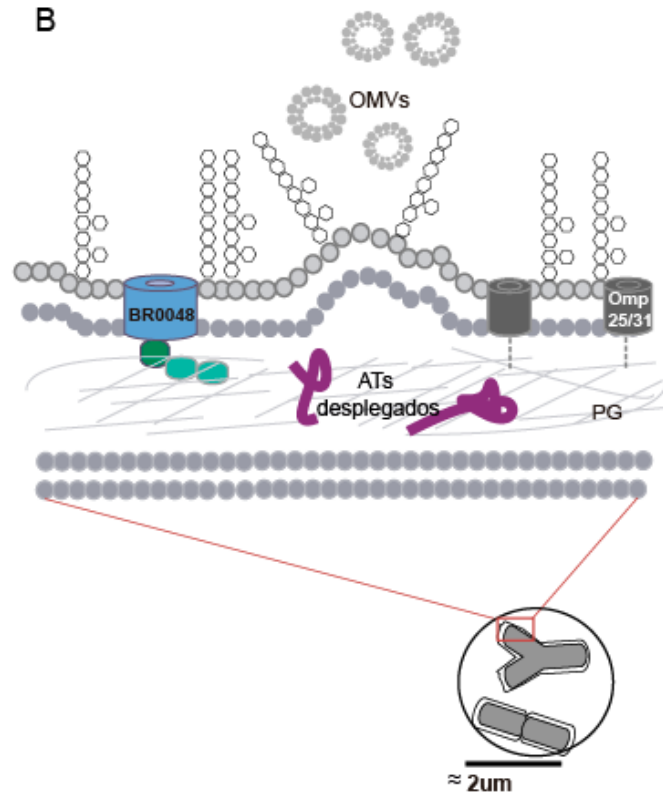


Figura 38: Modelo para el rol de TAM en *B. suis*. Los círculos inferiores contienen las bacterias de tipo wt (A) o mutante  $\Delta\text{mapB}$  (B), destacando la división celular alterada que se produce en las células  $\Delta\text{mapB}$ . Se muestran los componentes principales de la envoltura celular. A. Las proteínas Omp25/31 están representadas en negro y el autotransportador BmaB en violeta. Las flechas rojas sólidas indican que la translocación adecuada de las proteínas BmaB y Omp25/31 depende de MapB. La flecha roja punteada representa un efecto indirecto sobre la abundancia de la L, D-transpeptidasa. Las flechas azules indican una regulación directa del operón BR0048/mapB y el gen de la L, D-transpeptidasa por CtrA, el regulador principal de la división celular [231]. La flecha negra simboliza el papel propuesto para L, D-transpeptidasa en el entrecruzamiento del peptidoglicano. B. Modelo de la envoltura de  $\Delta\text{mapB}$  que representa sus alteraciones en ausencia de MapB: acumulación de BmaB desplegada en el periplasma, disminución de la abundancia de proteína Omp25/31 en la ME y un efecto negativo indirecto sobre la abundancia de una L,D-transpeptidasa que puede contribuir a la apariencia más suelta de ME, un peptidoglicano relajado y una sobreproducción de OMVs que contienen altos niveles de carga de proteína. OM: membrana externa; IM: membrana interna; PG: peptidoglicano; ATs: autotransportadores; OMV: vesículas de membrana externa.

La envoltura celular de *Brucella* es particularmente resistente a detergentes no iónicos en comparación a la envoltura de *E. coli* [69]. La mayor sensibilidad a Tritón X-100 (detergente no iónico) de la mutante  $\Delta\text{mapB}$  podría explicarse por los efectos directos o indirectos sobre la composición de ácidos grasos; sin embargo, no observamos diferencias importantes en las cantidades de ácidos grasos totales de membrana. No obstante, no



pueden descartarse modificaciones de los ácidos grasos menos abundantes, como los de cadena muy larga (VLCFA) que sustituyen el lípido A del LPS en *Brucella* [229, 230]. Se necesitarán más estudios estructurales sobre el lípido A utilizando métodos más sensibles para evaluar si la ausencia de MapB afecta a la acilación de los VLCFA del lípido A. Por otra parte, se ha demostrado que una baja proporción del contenido de fosfatidiletanolamina (PE) en la ME de *B. abortus* está relacionado con la resistencia a la polimixina B, y que al aumentar la cantidad de PE se genera un fenotipo sensible a este reactivo [75]. Por lo tanto, consideramos que sería interesante analizar si la delección de *mapB* afecta el contenido de fosfolípidos.

Se sabe que el cristal violeta se disocia en iones en solución y que el catión es responsable de la tinción bacteriana en su interacción con los componentes de la pared celular cargados negativamente, incluidos el LPS y el peptidoglicano. El fenotipo de las colonias  $\Delta mapB$  en presencia del colorante resultó sorprendente, dado que la cepa mutante es casi incapaz de retener el compuesto. La causa de dicho fenotipo es desconocida, pero claramente implica alteraciones críticas en las propiedades de la envoltura celular. La incapacidad de las células mutantes  $\Delta mapB$  para retener el colorante podría explicarse por una reducción en las cargas negativas de la pared celular o, en base a la evidencia discutida hasta ahora, un debilitamiento de las interacciones entre los diferentes componentes de la envoltura celular.

### **División celular**

La mutante  $\Delta mapB$  es viable en condiciones de cultivo normales, pero la observación de morfologías celulares aberrantes indica que la división celular, elongación celular, o incluso ambos procesos, están alterados en la mutante. Esto implica que, en *Brucella*, el proceso de biogénesis de la envoltura celular mediado por TAM debe estar coordinado con la división celular. Apoyando esta hipótesis, un análisis reciente por inmunoprecipitación de cromatina seguido de secuenciación profunda (ChIP-seq) mostró que el promotor de *B. abortus* de los ortólogos BR0048 y *mapB* es uno de los blancos de CtrA, un regulador global de la división celular [231] (Figura 38A). Curiosamente, se demostró que, además de reconocer promotores de genes implicados en la progresión del ciclo celular, CtrA se une a promotores de genes que codifican proteínas que participan en la biogénesis de la ME. Más aún, la mutante condicional en *ctrA* mostró morfologías alargadas y ramificadas. Estas mismas morfologías también fueron detectadas dentro de

células HeLa indicando que las bacterias con formas anormales fueron capaces de llegar al nicho replicativo del retículo endoplásmico en las células hospedadoras. Además, la ausencia temporal de CtrA alteró la composición de la ME, en particular afectando la localización de la proteína Omp25. Por lo tanto, algunos de los fenotipos de las células “depletadas” de CtrA se asemejan a los observados en la mutante  $\Delta mapB$ , incluida la capacidad de alcanzar el nicho de replicación, ya que aunque  $\Delta mapB$  presentó defectos en la división celular, logra replicarse satisfactoriamente en macrófagos (Figura 37). Una hipótesis atractiva es que MapB de alguna manera asiste a CtrA en la regulación del ciclo celular. Se necesitarán más estudios para confirmar la regulación del operón BR0048-*mapB* por CtrA y la interacción entre esta última proteína y MapB durante el ciclo celular.

En la cepa  $\Delta mapB$  también estuvieron disminuidas unas pocas proteínas con una localización subcelular predicha distinta a la ME. La disminución en la abundancia de estas proteínas podría deberse a efectos indirectos de la mutación *mapB* en la expresión génica o en la estabilidad de las mismas. Una de ellas, una putativa L, D-transpeptidasa (BR0564), resulta particularmente interesante ya que está relacionada con el entrecruzamiento, o *crosslinking*, del peptidoglicano. Las L, D-transpeptidasas catalizan la formación de los enlaces 3,3 entre dos residuos m-Dap, permitiendo así el enlace de éstos con la malla de peptidoglicano (Figura 38A). Se ha descrito que el ortólogo de *A. tumefaciens* (Atu0845) es crucial para el crecimiento polar durante la división celular [224, 225]. Además, el homólogo en *B. abortus* (BAB1\_0589) y otros cinco genes que codifican L, D transpeptidasas han sido descritos como blancos del regulador del ciclo celular CtrA (véase más arriba) [231]. Por lo tanto, la disminución en la abundancia de BR0564 podría contribuir a la apariencia más “suelta” de la ME (Figura 36B). En el futuro será interesante analizar el grado de entrecruzamiento de los muropéptidos en la pared celular de  $\Delta mapB$ .

Numerosos estudios han mostrado que las bacterias Gram-negativas, incluyendo *Brucella* spp., liberan OMVs de forma espontánea durante el crecimiento normal. Estas vesículas cumplen diferentes roles biológicos [227, 232, 233]. Muy pocas proteínas fueron detectadas en la fracción de OMVs recuperada del medio extracelular de la cepa wt de *B. suis* cultivada hasta la fase exponencial. Por el contrario, se detectó un número considerable de proteínas en la fracción de OMVs de  $\Delta mapB$ , y aproximadamente el 60% de ellas correspondieron a OMPs y proteínas periplásmicas. Esta observación sugiere que los defectos en la homeostasis de la envoltura celular en las células  $\Delta mapB$  favorecen la vesiculización de la ME o, alternativamente, conducen a la pérdida de proteínas periplásmicas y la liberación de fragmentos de ME debido a su fragilidad. Se ha propuesto

que las OMVs se generan por desprendimiento de la ME en áreas donde las proteínas que unen la ME al peptidoglicano están ausentes. Además, se ha sugerido que los enlaces OM-peptidoglicano tendrían un rol en la producción de vesículas [234, 235]. Por otro lado, las células en fase exponencial de crecimiento, que están bajo una alta tasa de división celular, producen OMVs principalmente en los septos [236, 237]. Asimismo, diferentes mutantes que presentan una ME comprometida mostraron un fenotipo de hipervesiculación [236, 238, 239]. En base a estos hallazgos, una hipótesis plausible es que un debilitamiento de las interacciones de la ME con el peptidoglicano (como aquellas mediadas por proteínas de la familia Omp25/31) en la mutante  $\Delta mapB$  podría resultar en la producción de un mayor número de vesículas (Figura 38B). Sin embargo, cabe mencionar que el análisis por TEM no nos permitió confirmar esta hipótesis debido a la dificultad en cuantificar OMVs. De todos modos, nuestras observaciones apoyan la idea de que la homeostasis de la ME está alterada en la mutante  $\Delta mapB$ . Otra observación interesante (aunque indirecta) es que el LPS obtenido a partir de la cepa mutante tiende a arrastrar más OMPs que el de las cepas wt y complementada. Esto podría explicarse por una interacción alterada de algunas OMPs con otros componentes de la envoltura celular, como el peptidoglicano.

Lo que se discutió hasta ahora sugiere que en *Brucella*, TAM podría ser necesario para una interacción estable de la ME con otros componentes de la envoltura celular, como el peptidoglicano. TAM podría cumplir esta función ayudando al anclaje de las OMPs al peptidoglicano y/o a través de otro mecanismo desconocido. El complejo Tol-Pal es un sistema ampliamente estudiado que conecta la MI y la ME. Se cree que la invaginación de ME que se produce luego de la formación del septo durante la división celular está mediada por el complejo Tol-Pal, anclando la ME a la MI y contribuyendo a la interacción de la ME con el peptidoglicano [240]. Las bacterias defectivas en cualquier componente del sistema Tol-Pal se vuelven susceptibles a varios compuestos tóxicos (incluyendo detergentes), exhiben una invaginación tardía de la ME y forman grandes cantidades de OMVs en sitios de constricción y polos celulares [240-242]. El sistema TAM conecta la MI con la ME a través de las interacciones TamA-TamB [90, 208], y en *B. suis* es necesario para la integridad de la envoltura celular y la división celular. Por lo tanto, proponemos que el sistema TAM en *Brucella* se comportaría como otro subcomplejo que asegura la homeostasis de la envoltura celular durante la división celular.

### **Relaciones evolutivas**

Es posible que en *Brucella* y otras bacterias estrechamente emparentadas, las proteínas TamB cumplan un rol diferente al descrito previamente para las proteínas TamB de *E. coli*, *C. rodentium* y *S. typhimurium* (todas *Gammaproteobacterias*) [90]. Por lo tanto, surge la pregunta si las proteínas TamB de diferentes clases dentro de las proteobacterias han evolucionado de acuerdo a su estilo de vida para cumplir diferentes funciones relacionadas con la biogénesis de la envoltura celular. Con respecto a esto vale la pena mencionar que, además del característico dominio C-terminal DUF490 que está presente en todas las proteínas TamB, MapB alberga un dominio DUF490 adicional (aunque incompleto) (Figura 23). Este hecho respalda la idea de posibles diferencias funcionales dentro del *phylum* Proteobacteria. Curiosamente, muchos *phyla* que albergan un homólogo TamB no codifican para autotransportadores y, por otra parte, en algunos *phyla* que no poseen un ortólogo de TamA, TamB está genéticamente asociado con BamA, sugiriendo fuertemente una divergencia funcional en la evolución de TamB y las proteínas con las que interactúa [94]. Además, las mutantes de los homólogos en *A. actinomycetemcomitans* (*Gammaproteobacteria*) y *Deinococcus radiodurans* mostraron que sus envolturas celulares estaban comprometidas [95, 98, 243]. Estas evidencias apoyan la hipótesis de una divergencia funcional entre los homólogos de TamB de diferentes *phyla*.

## Virulencia

En este trabajo demostramos que MapB es requerida para una invasión eficiente y/o la supervivencia en las etapas iniciales de la infección y también para la virulencia completa en ratones. Además, se ha propuesto que el ciclo celular y la virulencia de *B. abortus* están coordinados [244, 245]. Por lo tanto, dado el vínculo entre MapB y la división celular, no es sorprendente que las bacterias que carecen de *mapB* se vean afectadas en algunos mecanismos de virulencia.

Por otro lado, está descrito que las bacterias en la etapa del ciclo celular G1 (“*newborn*”) son más infecciosas que las bacterias que se encuentran en las fases S o G2 [245]. Consecuentemente, la reducción en UFC recuperadas de los macrófagos infectados con la cepa mutante  $\Delta mapB$  durante las primeras horas después de la infección, podría indicar una menor proporción de células infecciosas del tipo “*newborn*” al inicio de la infección en macrófagos. Los defectos en la división celular (y diferenciación) de las bacterias que carecen de MapB podrían ser responsables de una reducción en la generación del subtipo celular infectivo, lo cual podría conducir a una disminución en la eficiencia de la reinfección de células vecinas en el hospedador y como consecuencia, en

la propagación de la infección. Esta hipótesis explicaría el fenotipo atenuado de la mutante  $\Delta mapB$  en el modelo de ratón.

Por otro lado, la inestabilidad de ciertas OMPs en la ME en la cepa  $\Delta mapB$ , que representan en sí mismos factores de virulencia (como los autotransportadores) también conduciría a una adhesión y/o supervivencia alteradas en cultivos celulares y a un fenotipo atenuado en ratones. La ausencia de MapB *per se* también podría afectar la supervivencia bacteriana durante las primeras horas de la infección de células de mamíferos. En este caso, la reducción de la viabilidad bacteriana podría explicarse por defectos en la homeostasis de la envoltura celular de la mutante  $\Delta mapB$  que conduce a la pérdida de los determinantes de dicha envoltura que protegen a las células de *Brucella* del efecto tóxico de antimicrobianos del hospedador.

## Conclusiones finales

En el marco de esta tesis se demostró que para una adhesión eficiente de *B. suis* a distintos tipos celulares es necesaria la expresión de BmaA y BmaB, dos proteínas pertenecientes a la familia de los ATI, indicando una vez más que los miembros de esta familia de proteínas participan en las etapas iniciales del proceso infeccioso a las células del hospedador. Asimismo, se proporcionaron evidencias que nos permiten proponer como hipótesis que el repertorio de adhesinas de la familia de los ATI en *Brucella* podría contribuir a la preferencia de hospedador y/o al tropismo a determinados tejidos u órganos. Se determinó que BmaB presenta localización unipolar, y más precisamente en el polo nuevo generado luego de la división celular, apoyando la hipótesis de la existencia de un polo adhesivo en *Brucella*.

Por otro lado, se presentaron múltiples evidencias que indican que el homólogo de TamB en *B. suis* (MapB) resulta relevante para correcta inserción de los autotransportadores en la membrana externa, pero además demostramos que MapB posee una función más general en relación a la composición y estabilidad de la membrana externa. Proponemos que el sistema TAM en *Brucella*, y posiblemente en sus parientes cercanos del grupo *Alphaproteobacteria*, desempeña un papel determinante en el ensamblaje de envoltura celular en un mecanismo coordinado con la división celular.

## Materiales y Métodos

### 1. Cepas bacterianas y medios.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio (DH5 $\alpha$  y S17-1) se cultivaron a 37 °C en medio Luria-Bertani (LB), salvo en el caso de la preparación de electrocompetentes para lo cual se la cultivó en 2xYT. *Brucella suis* 1330 (wt) (ATCC 23444) y las cepas derivadas se cultivaron a 37 °C en medio rico *Tryptic Soy Broth* (TSB, BactoTM) o en *Tryptic Soy Agar* (TSA, BactoTM). Todas las cepas de *Brucella* utilizadas en este estudio se manipularon en un laboratorio de bioseguridad presente en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires, Fundación Instituto Leloir (FIL). Todas las cepas de *E. coli* y *B. suis* utilizadas en este estudio se enumeran en la Tabla complementaria S2 (Anexo).

#### 1.1 Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo LB y 2xYT indicada como gramos por litro de cada componente se detalla en la tabla 6.

Gr/litro de medio	LB	2xYT
Triptona	10	10
Extracto de levadura	5	10
NaCl	5	5
Agar*	17	-

Tabla 6: Composición de medios de cultivo

\*, Únicamente para medios sólidos

## 1.2 Antibióticos

En caso de ser necesario se adicionaron distintos antibióticos a los medios de cultivo. En la tabla 7 se encuentra el listado de antibióticos utilizados junto con las concentraciones empleadas para cada especie.

Antibiótico	Stock		Concentración final ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	Concentración (mg/ml)	Solvente	<i>E. coli</i>	<i>B. suis</i>
Ácido Nalidixico	20	Agua	-	10
Ampicilina	200	Agua	400	10
Cloranfenicol	25	Etanol, metanol	50	6
Kanamicina	50	Agua	50	25
Tetraciclina	5	Etanol	10	-

Tabla 7: Concentraciones de los antibióticos utilizados.

## 1.3 Conservación de las cepas

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas fue realizada por congelamiento rápido de una suspensión de bacterias cultivadas en medio sólido (bajo presión de selección con antibióticos cuando corresponda) en glicerol estéril a una concentración final de 20% (v/v) en criotubos conservados a  $-20^{\circ}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Aislamiento, purificación y manipulación de ADN

### 2.1 Procedimientos generales.

Los protocolos utilizados para las digestiones con enzimas de restricción, desfosforilaciones del ADN, rellenado de los extremos 5', electroforesis en gel de agarosa y ligaciones se realizaron según la metodologías descritas en el manual “*Molecular Cloning*” [246].

Para la recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y PCR se emplearon los sistemas *Wizard SV Gel* y *PCR Cleanup System* (Promega Inc. Cat N° #A9282). Tanto las enzimas de restricción, polimerización, lisozima, ADNasa, ARNasa y algunos de los marcadores de peso molecular fueron provistos por New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Promega Inc o Invitrogen Life Technologies (La Jolla, CA, USA). En algunos casos el marcador de peso molecular, Taq ADN polimerasa y Pfu polimerasa fueron



provistos por el servicio de Biología Molecular de la Fundación Instituto Leloir (FIL), y adicionalmente se utilizó Taq Pegasus de EmbioTec.

## 2.2 Preparación de ADN cromosómico de *Brucella*

Para purificar el ADN cromosómico de *Brucella* se cultivaron las bacterias por 48 h con los antibióticos adecuados. 25 ml de TSB se inocularon con 0.25 ml del pre-cultivo estacionario. Se cosecharon las bacterias a  $DO_{600}=0.6$  por centrifugación (8.000 rpm 5 min a 4 °C o hasta observar un *pellet* compacto). Las bacterias se lavaron 2 veces con 5ml de TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA). En cada paso de lavado las células se centrifugaron por 5 min a 8.000 rpm. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 1,5 ml TE. Se agregaron 30 µl de lisozima (50 mg/ml), 90 µl de SDS 10%, 15 µl de proteinasa K (20ml/ml) y se mezcló por inversión. Esta preparación se incubó por 1 h (a ON) a 37 °C. Luego se agregaron 300 µl de NaCl 5M y se mezcló. Se agregaron 50 µl de RNasa (10 mg/ml), se mezcló e incubó por 15 min a 37 °C. Se agregó 240 µl de CTAB 10% en 0,7 M NaCl y se incubó 10 min a 65 °C. La preparación fue sometida a una extracción con un volumen de cloroformo (aprox. 4 ml) y centrifugada a 5.000 rpm por 15 min a 4°C. La fase superior (acuosa) se transfirió a un tubo limpio. La preparación fue sometida a una extracción con un volumen de fenol:cloroformo (1:1). La extracción se realizó por 10 min a 60 °C y luego se agregó 0,6 vol de isopropanol. Se centrifugó a máxima velocidad 10 min y el *pellet* se lavó con 500 µl de etanol 70%. El etanol se descartó y se dejó secar al aire. Por último, el ADN se resuspendió en buffer TE.

## 2.3 Preparación de ADN plasmídico de *E. coli*.

Las preparaciones de ADN plasmídico a partir de *E. coli* se realizaron siguiendo las recomendaciones del libro "*Molecular Cloning*" [246]. Se cultivaron las bacterias en medio LB con los antibióticos adecuados, hasta obtener un cultivo en fase estacionaria (ON a 37 °C). Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación (5.000 rpm, 5 min) y se resuspendieron en solución P1. Luego de agregar solución P2 y RNasa, la mezcla se incubó por 15 min a la temperatura adecuada para la RNasa utilizada. Se agregó la solución P3 y luego se centrifugó (15 min a 14.000 rpm). La preparación fue sometida a una extracción de ADN con un volumen de cloroformo y centrifugada a 5.000 rpm 15 min a 4°C. La fase superior (acuosa) fue transferida a un tubo limpio. Se agregó etanol absoluto y se incubó el tubo 25 min a -20°C. Se centrifugó la muestra (30 min a 14.000 rpm), y luego de

descartar el SN se lavó el *pellet* con 500 µl de etanol 70%. Se resuspendió el ADN en 20 o en 50 µl de agua milliQ, según correspondiera a plásmidos de bajo o alto número de copias.

Soluciones empleadas:

P1: Tris-HCl 50 mM; EDTA 10 mM pH=8,0

P2: NaOH 200 mM; SDS 1%

P3: Acetato de sodio 2,55 M, pH=4,8

En los casos en que se requirió de plásmidos de alta calidad por ejemplo para secuenciación, se utilizó el kit *Wizard® SV Gel and PCR Cleanup system* (Promega, Cat #A9282).

Todos los plásmidos utilizados en este estudio se enumeran en la Tabla S3 (Anexo)

## 2.4 Secuenciación del ADN

Las muestras se secuenciaron utilizando el kit *BigDye* (Applied Biosystems) en un secuenciador ABI 377, por el servicio de secuenciación de la FIL. Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa Chromas Lite versión 2.01.

## 2.5 Geles de agarosa

La separación de plásmidos o fragmentos obtenidos por extracción de ADN plasmídico, restricción, PCR, *colony*-PCR y RT-PCR fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa, generalmente entre 0.8 y 1.2% (p/v); conteniendo 1-2 µg/ml de Bromuro de Etidio. El perfil de bandas fue fotografiado en un sistema digital de adquisición de imágenes Bio-Rad.

## 3. Transformación genética bacteriana

### 3.1 Preparación de *E. coli* competentes por *shock* térmico y transformación

Para la preparación de bacterias competentes se cultivaron las cepas correspondientes en 5 ml de LB ON con agitación, a 37°C. 50 ml de LB fueron inoculados con el pre-cultivo y cultivados con agitación a 37°C. Cuando se alcanzó una  $DO_{600}=0.5-0.6$  las bacterias fueron transvasadas a mamaderas de centrifuga (estériles). A partir de este paso fue crítico mantener las células en hielo todo el tiempo. Las células se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C en un rotor previamente enfriado. Luego de descartar el SN, se resuspendió el *pellet* en 25 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1M estéril frío, y la suspensión fue incubada 20 min en hielo. Las células fueron centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C sin freno.

Luego de descartar el SN se resuspendieron suavemente las células en 2 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.1M estéril frío. Se agregaron 2 ml de glicerol 30% estéril a las células y se alicuotaron de a 200  $\mu\text{l}$ . Las alicuotas se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

Para realizar el *shock* térmico para transformación bacteriana se añadió el ADN al tubo de las bacterias competentes y se incubó 30 min en hielo. Luego la mezcla fue incubada durante 90 seg. en baño a  $42^\circ\text{C}$ . Se agregó 1 ml de LB estéril y se agitó vigorosamente. La mezcla fue incubada 1 h a  $37^\circ\text{C}$  con agitación. Se plaqueó una alicuota (100 $\mu$ ) del cultivo tal cual. Se centrifugaron las células 2-3 min y luego se descartó la mayor parte del SN (se dejaron aproximadamente 100  $\mu\text{l}$  para resuspender el *pellet*). El *pellet* fue resuspendido en el resto del sobrenadante y luego fue plaqueado en medio selectivo.

### 3.2 Preparación de *E. coli* electrocompetentes y transformación

Para obtener células electrocompetentes, se utilizó un protocolo previamente puesto a punto con el fin de obtener electrocompetentes de alta eficiencia [247]. Para ello se inocularon 25 ml de LB con bacterias provenientes de cultivos en medios semi-sólidos y se cultivaron ON a  $37^\circ\text{C}$  con agitación. 500 ml de 2xYT se inocularon con 5 ml del cultivo ON. Cuando se alcanzó una  $\text{DO}_{600}=0.5-0.6$  se transvasó el cultivo a mamaderas de centrifuga (estériles) previamente enfriadas, y se incubaron en hielo durante 30 minutos. A partir de este paso fue crítico mantener las células todo el tiempo en hielo. Las células fueron centrifugadas a 4.000g durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$  utilizando un rotor previamente enfriado. Luego de descartar el sobrenadante, las células fueron suavemente resuspendidas en 500 ml de glicerol 10% frío e incubadas por 30 min en hielo. Se repitieron los pasos de lavado tres veces. Se estimó el volumen del *pellet* y se lo resuspendió en un volumen de glicerol 10% frío. Las células fueron inmediatamente fraccionadas de a 50  $\mu\text{l}$  en tubos previamente enfriados. Rápidamente se congelaron los tubos con nitrógeno líquido y se los conservó a  $-80^\circ\text{C}$ .

Para la electroporación se empleó para cada tubo de 50  $\mu\text{l}$  de células electrocompetentes, 1-2  $\mu\text{l}$  de ADN (entre 1 y 10  $\mu\text{g}$ , disuelto en agua milliQ) y se utilizaron cubetas de 2 mm (Bio-Rad). El electroporador utilizado fue *Gene Pulser Transfection System* (Bio Rad). Las condiciones de electroporación para *E. coli* fueron las siguientes:

Capacitancia	25 $\mu\text{F}$
Voltaje	2.5kV
Resistencia	200 $\Omega$

Luego de la electroporación, se incubaron las células por 1 hora a 37°C en medio rico con agitación y finalmente se plaquearon en medio selectivo.

### 3.3 Preparación de *B. suis* electrocompetentes y transformación

Para generar bacterias electrocompetentes de *Brucella*, éstas fueron cultivadas en medio sólido ON a 37°C. Las células fueron tomadas con un ansa y luego resuspendidas en agua milliQ estéril fría. A partir de este paso fue crítico mantener las células en frío. Se lavaron las células 5 veces con agua estéril fría. Las células fueron resuspendidas en 300 µl de H<sub>2</sub>O milliQ estéril fría. No es conveniente conservar estas competentes, ya que pierden eficiencia. Para la transformación se tomaron 150 µl de la suspensión y se mezclaron con 2-5 µl (10-50 µg) de ADN. Luego se realizó la electroporación utilizando cubetas BioRad de 2 mm de espesor y el mismo electroporador que en el caso de *E. coli*. Las condiciones de electroporación para *B. suis* fueron las siguientes:

Capacitancia	25 µF
Voltaje	2.5kV
Resistencia	400 Ω

Luego de la electroporación, se incubaron las células por 1 hora a 37°C en medio rico con agitación, y finalmente se plaquearon en medio selectivo.

### 3.4 Conjugación biparental en placa

Se utilizó la conjugación biparental para transferir plásmidos conjugables desde cepas dadoras (movilizadoras) de *E. coli* S17 a cepas receptoras (*B. suis*). Para ello las cepas dadora y receptora fueron cultivadas ON a 37°C con agitación (cada una por separado, con los antibióticos necesarios para cada cepa). Se lavaron los cultivos 3 veces (para lavar posibles restos de antibióticos) con PBS estéril. Cada *pellet* fue resuspendido en 40-80 µl de PBS estéril. Sobre una placa TSB (sin antibióticos) se sembró a modo de control una pequeña estría de cada cepa. Se mezcló el resto de las células de ambas cepas y se sembró la mezcla en forma de gota en una placa de TSB sin antibióticos. Se cultivaron las bacterias ON a 37°C. Se realizó una réplica a una placa con los antibióticos necesarios para seleccionar las bacterias transconjugantes.

## 4. Amplificación de secuencias mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Todas las amplificaciones fueron realizadas en microtubos de pared delgada de 0.2 ml. Los oligonucleótidos utilizados tanto para PCR como *colony*-PCR se encuentran detallados en la Tabla S4. Estos fueron provistos por Invitrogen Life Technologies y por Macrogen (Korea). Las reacciones se llevaron a cabo según las sugerencias del fabricante en cada caso, según la enzima utilizada. En las reacciones de PCR en las que se empleó como molde ADN genómico de *B. suis*, la composición de la mezcla de reacción, por tubo, fue la siguiente:

Buffer Taq 10X libre de Mg <sup>++</sup>	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	*
dNTPs (40mM)	1 µl
Primer Forward* (10 µM)	2,5 µl
Primer Reverse* (10 µM)	2,5 µl
Taq polimerasa	0,5 µl
ADN molde	1-5 µl
H <sub>2</sub> O (milliQ)	Cant. suf. <u>para llevar a volumen</u> 50 µl

\*Variaron de acuerdo a la reacción.

#### **Ciclado:**

94 °C x 5 min  
 94 °C x 30 seg  
 Tan\*\* x 30 seg  
 72 °C x 30 seg/kb  
 72 °C x 10 min  
 25°C ∞

\*\* La temperatura de alineamiento varió en función de la secuencia de los oligonucleótidos empleados. Para realizar un cálculo aproximado de dicha temperatura se utilizó el programa *Tm calculator* de NEB (New England Biolabs)

#### **4.1 Colony-PCR**

Tanto en el caso de *colony*-PCR a partir de ADN de *E. coli* o *Brucella*, se empleó como molde ADN total proveniente de colonias bacterianas lisadas (sin purificar). Para obtener estos lisados, se picó la colonia de interés con un escarbadietes estéril. Las bacterias de la punta del escarbadietes fueron resuspendidas en 50 µl de H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Se incubaron las bacterias durante 5 min a 100 °C y en el caso de *Brucella*, las bacterias fueron congeladas para favorecer la ruptura celular. Se centrifugaron las células a máxima velocidad 20 min. Se utilizaron 2 a 5 µl del sobrenadante como molde para reacciones de PCR realizadas con las mismas proporciones descriptas en el punto anterior.

### **5. Construcción de cepas mutantes y complementadas**

### 5.1 Cepas mutantes

Para generar la cepa *bmaA::stops* se utilizaron los oligonucleótidos MbmaA\_Fw y MbmaA\_Rev (ver Tabla S4) para amplificar una región central de aproximadamente 1 kb del gen de *bmaA*. El fragmento fue clonado en pGEMTeasy y digerido con las enzimas de restricción BamHI. Por otro lado, se digirió el plásmido pHP45-Ω con BamHI, liberándose el casete Ω y se ligaron ambos fragmentos. Luego se digirió con la enzima HindIII liberándose la resistencia antibiótica, pero dejando la región de *stops* interrumpiendo el gen. La construcción fue transferida al plásmido pKmobSacB [156] (en *E. coli* S17) y luego conjugado a *B. suis*.

Para la cepa mutante *bmaB* se utilizaron los oligonucleótidos MbmaB\_Fw y MbmaB\_Rev para amplificar una región central del gen de 1468pb, el cual fue clonado en el vector pGEMTeasy. Se utilizó la enzima SmaI para introducir un casete de kanamicina en medio del amplicón. La construcción fue transferida al plásmido pKmobSacB [156] y conjugado en *B. suis* (ver Figura 15 Capítulo I).

En ambos casos se seleccionaron los eventos de simple recombinación al cromosoma, plaqueando las bacterias en TSA kanamicina (resistencia provista por el plásmido). Luego, una colonia simple recombinante fue inoculada en medio TSB (sin antibiótico) y cultivada 16 horas a 37°C. Se seleccionaron colonias dobles recombinantes plaqueando en TSA sacarosa 10%. Se confirmó que los clones resistentes a sacarosa fuesen sensibles a kanamicina. Los clones dobles recombinantes se confirmaron por *colony*-PCR, obteniéndose las cepas *bmaA::stops* y *bmaB::Km* respectivamente.

En el caso de la cepa  $\Delta mapB$ , los oligonucleótidos que contienen sitios de reconocimiento de enzimas de restricción fueron diseñados para amplificar las regiones flanqueantes de *mapB* (BR0049\*). Los oligonucleótidos  $\Delta mapB\_F1$  y  $\Delta mapB\_R1$  amplifican una región de 306 pb en el extremo 5', y los oligonucleótidos  $\Delta mapB\_F2$  y  $\Delta mapB\_R2$  en una región de 391 pb en el extremo 3'. Los fragmentos de PCR generados se purificaron, se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes, se ligaron y se clonaron en el vector suicida movilizable pK18mobsacB (KmR) [156] obteniendo el plásmido pKmobsacB $\Delta mapB$ . Este plásmido se transformó en *E. coli* S17-1 y luego se conjugó con la cepa de tipo salvaje (wt) de *B. suis* (NalR). Se seleccionaron clones recombinantes dobles (NalR, KmS, sacarosaR). La deleción limpia de todo el ORF se confirmó mediante PCR.

### 5.2 Cepas complementadas

Se utilizaron los oligonucleótidos E bmaA Fw y Rev (Tabla S4) para amplificar 3519pb correspondiente a todo el gen de bmaA y los oligonucleótidos EbmaB\_FW y EbmaB\_Rev para amplificar el gen completo de bmaB, incluidas las regiones promotoras. Cada uno de estos fragmentos se clonó en el plásmido pBBR1 [248] obteniéndose los plásmidos pBBRbmaA y pBBRbmaB respectivamente. Se conjugó en *B. suis* bmaA::stops o bmaB::Km, obteniéndose la cepa complementada.

Los mismos plásmidos se utilizaron para introducirlo en la cepa de *E. coli* CC118 para los ensayos heterólogos.

El gen *mapB* se clonó en un vector de amplio rango de hospedadores, pBBR1MCS-1. Se amplificó una región de 5.284 pb (que contiene 706 pb río arriba del codón de inicio de *mapB*, el ORF de *mapB* y 30 pb río abajo del codón stop) utilizando los oligonucleótidos BR0049FComp y BR0049RComp (ver Tabla S4). El producto amplificado se clonó en el plásmido pBBR1MCS-1 [248] obteniendo el vector pBBR*mapB*, que se conjugó en la cepa  $\Delta$ *mapB* de *B. suis*. Los clones complementados ( $\Delta$ *mapB* pBBR*mapB*) se seleccionaron (CmR) y se confirmaron mediante PCR.

### 5.3 Etiquetado de la cepa MapB-3xFLAG

Se amplificó una región de 719 pb correspondiente a la región 3'de *mapB* utilizando los oligonucleótidos MapB\_fw\_FLAG y MapB\_rev\_FLAG, y luego se subclonó en el plásmido pQE1-3xFLAG usando el sitio de la enzima de restricción EcoRI, obteniendo el vector pQE1-3'*mapB*3xFLAG. Luego, el fragmento *mapB* 3' y la secuencia 3xFLAG se clonaron en el plásmido pK18mobSacB. El plásmido pK18mobSacB3'*mapB*3xFLAG resultante se transformó en *E. coli* S17 y luego se conjugó con la cepa de *B. suis* wt. Se realizó la selección de dobles recombinantes (NaIR, KmS, sacarosaR).

## 6. Aislamiento de ARN de *Brucella*, síntesis de ADNc y RT-PCR

### 6.1 Aislamiento de ARN de *Brucella*

Para el aislamiento de ARN de *Brucella* se utilizó el kit de Illustra RNAspin mini (GE, Cat.N 25-0050-70). Sin embargo, no se siguió el protocolo exacto del kit, sino que se realizaron algunas modificaciones que mejoran la extracción en este género bacteriano que se detallan a continuación:

- Homogenización de la muestra y lisis celular:

Se tomó 1 ml del cultivo de bacterias fue centrifugado a 5.000 rpm durante 5 min. El *pellet* fue resuspendido en una solución compuesta por 85 µl de buffer TE, 15 µl de SDS10% y 1 µl de proteinasa K (10 µg/ml) e incubado por 1 h a 37°C. Se agregaron 250 µl de buffer RA1 (provisto en el kit) y 3.5 µl de β-mercaptoetanol. La mezcla fue luego agitada vigorosamente.

- Limpieza del lisado y retención en columna:  
El lisado fue transvasado a un tubo *RNAspin* mini *filter* y centrifugado a 11.000 x g, 1 min. Luego de descartar el filtro se transfirió el filtrado a un tubo nuevo al cual se le adicionaron 350 µl de etanol 70%. Se dispuso el lisado en una *RNAspin* mini *column* y se lo centrifugó a 8.000 x g, por 30 seg. Luego se descartó el eluído.
- Lavados:  
Se agregaron a la columna 350 µl de MDB y se la centrifugó a 11.000 x g durante 1 min. Luego se descartó el eluído.
- Elución:  
Se agregaron 40 µl de agua DEPC y se centrifugó la columna a 11.000 x g 1 min. El eluído contuvo el ARN.

Luego, se corrió una alícuota en gel 0.8% agarosa para visualizar la muestra (previamente calentada a 60°C durante 5 minutos).

## 6.2 Degradación de ADN genómico

Para la degradación de ADN genómico se utilizó el kit RQ1 RNase-Free DNase de Promega. A 1 µg de RNA se le agregaron 1 µl de ADNasa (libre de ARNasas), 1 µl de *Buffer* de reacción provisto (10X), 0.5 µl de inhibidor de ARNasa y agua DEPC hasta llegar a 10 µl finales. Se incubó la mezcla durante 3 h a 37°C. Luego se agregó 1 µl de RQ1 ADNase *stop solution* y se incubó la mezcla a 65°C durante 10 min para terminar de inactivar la ADNasa.

## 6.3 Síntesis de ADNc y RT-PCR

Para la síntesis de ADNc a partir del ARN previamente obtenido, se utilizó la retrotranscriptasa viral Superscript III de Invitrogen. Para ello 1 µg de ARN fue tratado con ADNasa. Se agregaron 0.5 µg de *random hexamers* (*random primers*). Se incubó a 70°C durante 5 min y luego se llevó inmediatamente a hielo. Se agregaron 5 µl de *buffer* 5x, 10



mM dNTPs, 25 unidades de RNaseOUT, 200 unidades de Superscript III y se agregó agua libre de ARNasas hasta 25 µl finales. La mezcla se incubó a 42°C durante 1h.

Controles: 1) se agregaron todos los reactivos menos RT; 2) se agregaron todos los reactivos pero sin ARN como molde, en su lugar se agregó agua.

Para la RT-PCR se utilizó 0.5-1 µl de ADNc como molde y se siguió un protocolo de PCR (detallado en el punto 4) utilizando los oligonucleótidos correspondientes (RT) detallados en la Tabla S4. Se utilizaron oligonucleótidos de control correspondientes al factor de iniciación de la traducción *if-1* (BR0249): IF-1\_Fw e IF-1\_Rv [249].

## 7. Tolerancia a compuestos

Se evaluó la supervivencia de *Brucella* al incubarla con distintos compuestos. Las bacterias crecidas ON se llevaron a una concentración de  $4 \times 10^5$  UFC/ml en buffer fosfato. Se incubaron con el compuesto de interés (100 µl de suspensión bacteriana y 100 µl del compuesto o *buffer* control): buffer MM pH 4.5 [250], Tritón X-100 0.1%, SDS 0.1%, EDTA 0,67mM, DOC 0.1% y polimixina B. En el caso de la polimixina B se utilizaron distintas concentraciones de modo de poder construir una curva; estas concentraciones fueron: 0, 10, 50, 100 y 500 unidades/ml. La incubación se realizó durante 20 min a 37 °C. Se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril y un recuento en placa de la cantidad de bacterias viables. Cada cepa se evaluó con cada compuesto por duplicado o triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de UFC sobrevivientes. Para evaluar la tolerancia a lisozima se cultivaron las bacterias hasta llegar a la OD deseada. Se tomaron 700 µl - 1 ml de cultivo, y se cosecharon las células por centrifugación (5 min a 5.000 rpm). Las células fueron resuspendidas en una solución de lisozima 2 µg/ml en 0.05M de Tris-HCl (pH 8.0 a 22 °C). Rápidamente se dispuso la suspensión en una cubeta y se midió la absorbancia cada 5 ó 10 segundos.

## 8. Resistencia al complemento presente en el suero

Se realizó una prueba de resistencia al complemento presente en el suero porcino como se describió [251]. Las bacterias se cultivaron en medio rico (TSB) a 37 °C hasta la fase exponencial temprana (OD<sub>600</sub> entre 0.3-0.5). Luego se lavaron con PBS-MgCl<sub>2</sub> 5 mM y se resuspendieron en el mismo *buffer*. Se realizó una dilución para obtener una suspensión de OD<sub>600</sub> de 0.01 (equivalente a  $5 \times 10^7$  UFC/ml para *Brucella*). Las células se incubaron a 37 ° C en suero porcino al 50% en placa de 96 pocillos. Después de 90 minutos, se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril y se plaqueó. Se contaron las UFC y se calculó

el porcentaje de bacterias supervivientes en relación con el control (tiempo 0). Los resultados se expresaron relativizados a la cepa control, a la cual se le asignó el 100%. Como control, se inactivó el complemento de suero incubando el suero a 56 °C durante 30 min. El experimento se repitió por triplicado tres veces con resultados similares.

### **9. Test de disociación: de cepas lisas a cepas rugosas.**

Para evaluar si las cepas de *Brucella* utilizadas eran lisas o rugosas se realizó un test en placa de tinción con Cristal Violeta (CV) como se describió anteriormente [160]. Para ello se crecieron las colonias en placa en medio TSA. Luego, se inundó la placa con una solución de cristal violeta y oxalato de amonio (dilución 1:40 en agua miliQ de la solución madre\*). Las colonias de cepas rugosas se tiñen más oscuras que las cepas lisas. Se utilizaron a modo de control de cepa lisas *B. suis* 1330 y *B. ovis* como control rugoso.

\*solución madre: 2gr de cristal violeta disueltos en 20 ml de etanol absoluto. Luego se agregó la mezcla de 0,8 gr de oxalato de amonio disuelto en 80 ml de agua miliQ.

### **10. Preparación y análisis de LPS.**

Se realizó la purificación del LPS mediante dos métodos: precipitación con isopropanol [252] y extracción con fenol caliente [253]. En ambos casos, después de mezclar con *buffer* Laemmli [254], la suspensión de LPS se analizó mediante SDS-PAGE (15%) y se reveló por oxidación de los hidratos de carbono con periodato seguido de tinción con plata (ver sección 13 Materiales y Métodos). Además se realizó un análisis por inmunoblot. Para ello luego del SDS-PAGE se realizó una transferencia ON a 8V a membranas de nitrocelulosa. Las mismas se bloquearon con TBS al 5% con leche en polvo (p/v) durante 2 horas a 4 °C con agitación suave, se incubaron con anticuerpo monoclonal M84 anti-S-LPS [255] o anticuerpo anti-R-LPS [256] (1: 1,000 y 1: 3,000 respectivamente), y luego incubado con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP de cabra (1: 30,000 Santa Cruz). Finalmente, las membranas se revelaron utilizando ECL Prime (GE Healthcare) e ImageQuant LAS4000 Imager (GE Healthcare Life Sciences).

### **11. Extracción de lípidos totales.**

Se cultivaron las bacterias en medio Plommet [257] hasta llegar a una OD<sub>600</sub> de 0.6 y los lípidos totales se extrajeron y se purificaron mediante el método de Bligh y Dyer [258]. Las bacterias fueron resuspendidas en *buffer* fosfato (en tubo de vidrio) y se adicionó 2

volumenes de metanol:cloroformo 2:1. Se mezcló durante 20 min en agitación (vortex). Se agregó 1 volumen de cloroformo y se centrifugó para separar las dos fases. Se descartó la fase acuosa (superior) y la fase orgánica se pasó a un tubo limpio. La fracción se secó por burbujeo de nitrógeno. Los lípidos totales se analizaron por GC/MS y TLC.

## 12. Preparación y análisis de proteínas.

### 12.1 Extractos de proteínas totales.

Los extractos de proteínas totales de las diferentes cepas de *Brucella* se obtuvieron resuspendiendo los *pellets* bacterianos en *buffer* Laemmli [254], en los casos donde fue necesario se utilizó un Laemmli modificado con adición de urea 6M. Se calculó sembrar  $1 \times 10^8$  UFC/pocillo.

### 12.2 Extractos de membranas totales

Las membranas totales de *B. suis* se prepararon de manera similar a como se describió anteriormente [259]. Se cosecharon 100 ml de cultivo en TSB a una  $OD_{600} \approx 1$  centrifugando 10 minutos a  $5.000 \times g$  y se resuspendieron las bacterias en *Protoplasting buffer* (Tris-HCl 15 mM, sacarosa 0,45 M, EDTA 8 mM pH 8,0, PMSF 1 mM y lisozima 2 mg/ml para la cepa wt y 1 mg/ml para la mutante  $\Delta mapB$ ) y se incubaron durante 20 min en hielo. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a  $4.200 \times g$  y luego se resuspendieron en *buffer* de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.6,  $MgCl_2$  5 mM, PMSF 1 mM, DNasaI 10  $\mu g/ml$ , ARNasa 2  $\mu g/ml$ ) y bolitas de vidrio (Sigma, 400 $\mu m$ ). Se rompieron las células utilizando Precellys24 (Bertin): 7 ciclos de 3 x 30 segundos a 6.500 rpm, incubando en hielo entre cada ciclo. El homogeneizado se centrifugó durante 2 minutos a  $5.000 \times g$  a 4 °C para eliminar las células intactas y las bolitas de vidrio, y el sobrenadante se centrifugó luego a  $5.000 \times g$  durante 30 minutos dos veces, para eliminar todas las células enteras remanentes. El sobrenadante se ultracentrifugó a  $100.000 \times g$  durante 90 minutos a 4 °C. El *pellet* se lavó con Tris HCl 50 mM pH 8,0 y se volvió a centrifugar. Las muestras se resuspendieron en *buffer* Laemmli con urea 8 M o Tris-HCl 20 mM y se congelaron a -80 °C hasta su uso. Cuando fue necesario, las fracciones de membranas totales se trataron con 5 mg/ml de lisozima durante 30 minutos a 37 °C para digerir el peptidoglicano que permanece unido.

### 12.3 Fraccionamiento subcelular: protoplastos y ME+periplasma.

Las bacterias fueron cultivadas en medio rico (TSB), se cosecharon  $2,5 \times 10^{10}$  UFC totales crecidas hasta la fase de crecimiento exponencial ( $OD_{600} \approx 1$ ) por centrifugación (10 min a  $3.500 \times g$ ). Los *pellets* se lavaron con solución fisiológica (NaCl 0,9%) y se resuspendieron en 1 ml de Tris-HCl 0,2 M pH 7,6. Posteriormente, se añadió 1 ml de Tris-HCl 0,2 M, pH 7,6, sacarosa 1 M y una solución de Zwitterion 3–16 al 0,25% a la suspensión y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (este paso debe realizarse con suavidad para evitar la lisis). Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a  $8.000 \times g$ , los *pellets* se separaron de los sobrenadantes y se almacenaron a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso.

En cada experimento de fraccionamiento, los controles del procedimiento de purificación se llevaron a cabo mediante Western blot usando anticuerpos anti-PhyR [249] y anti-Omp10 [219] como controles citoplásmicos y de proteína de membrana y respectivamente. Todas las muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante tinción con CBB o plata. Los análisis se realizaron utilizando hibridomas anti-OMPs monoclonales: anti-Omp1, Omp2b, Omp10, Omp16, Omp19, Omp25 (A68 / 04B10 / F05) y Omp31 (A59 / 10F09 / G10) [219, 260] o anti-FLAG M2 (Sigma), según corresponda. La incubación del anticuerpo primario se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario de cabra, anti-ratón conjugado con HRP (1: 30,000 Santa Cruz). La cuantificación de la bandas de gel se realizó con el programa ImageJ por triplicado.

#### **12.4 Purificación de proteínas asociadas a OMVs**

Los cultivos de las diferentes cepas crecieron hasta la fase exponencial. A continuación, las células se sedimentaron a  $5.000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ . Para eliminar las células residuales, el sobrenadante se filtró utilizando una membrana SFCA de  $0,22 \mu\text{m}$  (Minisart®; Sartorius). Para cosechar las OMV, el filtrado se sometió a ultracentrifugación a  $100.000 \times g$  durante 6 horas a  $4^\circ\text{C}$  (Beckman Coulter). El sobrenadante se desechó, el sedimento que contenía los OMV se lavó con PBS estéril y se repitió la etapa de ultracentrifugación. El sedimento final se suspendió en PBS.

#### **13. Electroforesis de proteínas y tinciones**

Las muestras fueron resuspendidas en *buffer* de siembra [254] y calentadas a  $100^\circ\text{C}$  por 5 min. Luego fueron sometidas a electroforesis en gel discontinuo [254] de

poliacrilamida (12% o 15% según el tamaño de proteínas a separar), cuya composición se describe en la Tabla 8. La electroforesis se realizó a 100 V constantes.

Solución Stock	Gel corrida 12%	Stacking gel
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1.65 ml	0.78 ml
Tris HCl 1.5M pH 8.8	1.25 ml	-
Tris HCl 0.25M pH 6.8	-	1.25 ml
Acrilamida:bisacrilamida*	2 ml	0.425 ml
SDS 20%	25 µl	12,5 µl
TEMED	3.5 µl	3 µl
APS 10%	50 µl	30 µl
Volumen final	5 ml	2,5 ml

**Tabla 8. Composición de geles discontinuos desnaturizantes de poliacrilamida.\* Acrilamida:bisacrilamida 30 % (p/v) (29.2:0.8)**

Los geles fueron teñidos con CBB o plata, según la necesidad.

Tinción con CBB: Los geles fueron enjuagados con agua miliQ, teñidos con solución de tinción durante 30 min a temperatura ambiente con agitación, y luego desteñidos con solución decolorante ON en agitación.

Tinción con plata: Los geles fueron enjuagados con agua miliQ con agitación a temperatura ambiente (5 cambios) durante 30 min. Fueron fijados en solución fijadora en agitación (al menos 1h y hasta ON a 4 °C). Luego, fueron lavados con agua miliQ en agitación durante 40 min (4 cambios). Para el caso de LPS, se procedió a la oxidación de carbohidratos con periodato de sodio 0.7% [261] en agitación por 10 a 15 minutos y se enjuagó con agua miliQ agitando durante 2 h (8 cambios). Para teñir con plata se agregó la solución tinción con plata amoniacal, agitando durante 15 min. Se lavó con agua miliQ durante 25 min (3 cambios). Se reveló con agregado de solución reveladora, agitando manualmente mientras se agregó gota a gota, observándose la aparición de bandas. Se detuvo la reacción con Solución *stop* por 2 minutos con agitación y se enjuagó con agua miliQ durante 1 min.

Buffer de corrida 10X:(1litro) Tris base 0.25 M, Glicina 1.92 M. Se utiliza 1X para la corrida electroforética, al diluirlo se agrega SDS 0.1 % (final)

Buffer de siembra (6X) - Laemmli: 7 ml de 4X Tris-HCl pH 6.8, 3 ml de glicerol, 1 g SDS, 1.2 mg Azul de bromofenol y 0.93 g DTT. Llevar a 10 ml con H<sub>2</sub>O miliQ. Conservar a -70 °C alicuotado. Dilución de uso 1X.

Solución de tinción: *Coomassie Brilliant Blue* R250 0.25 g. ácido acético glacial 10 ml. Metanol: H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) 90 ml. Solución decolorante: ácido acético glacial 10 ml. Metanol: H<sub>2</sub>O (1: 1 v/v) 90 ml

Solución fijadora EtOH 40% y 5% acético (para 1 litro): 400 ml etanol absoluto (Merck) + 50 ml ácido acético glacial + llevar a 1000 ml con agua miliQ. Conservar a 4° C

Periodato de sodio 0.7% en agua miliQ (0,7 g metaperiodato de sodio en 100 ml de agua miliQ. Preparar en el momento.

Solución de tinción con plata amoniacal: Mezclar 3.5 ml hidróxido de amonio concentrado 28-30% + 44.8 ml de hidróxido de sodio 0.36%. Agitar y llevar a 210 ml con agua miliQ. Luego agregar lentamente 8.4 ml nitrato de plata 19.8% quedando final a 0.75% p/v.

Solución Stop (5% acético) (para 1 litro): 50 ml ácido acético glacial + 950 ml agua miliQ

Solución reveladora: Se mezclan 0.5 ml de formaldehído 37% (v/v) con 30 g de carbonato de sodio (3% w/v) llevar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O miliQ. Preparar en el momento.

#### **14. Western blot**

Se transfirieron las proteínas previamente separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida a una membrana PDVF (*Hydrophobic polyvinylidene difluoride*, GE Healthcare). Se bloqueó la membrana incubándola en TBS 5% leche descremada (p/v), ON a 4°C con agitación.

Se incubó la membrana con el anticuerpo primario (dilución adecuada, en TBS-leche 5%) durante 2 h, a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana fue lavada 3 veces con TBS 0.05% Tween (cada lavado tuvo una duración de 5-10 min). La membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rabanita (1:30.000 en TBS- leche 5%; de Santa Cruz) durante 1 h, a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana fue lavada 2 veces con TBS 0.05% Tween (cada lavado tuvo una duración de 5-10 min). La membrana fue lavada una vez con TBS (el lavado tuvo una duración de 5-10 min). Luego se reveló con ECL Prime (GE Healthcare) e ImageQuant LAS4000 Imager (GE Healthcare Life Sciences).

Buffer de transferencia 1X: 3,75 g de Tris, 18 g de glicina. Agregar 200 ml de metanol. Llevar a 1 litro con agua miliQ.

## 15. Análisis proteómico

El análisis de espectrometría de masas se realizó en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM), en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA) de la siguiente manera: las proteínas de membrana se digirieron ON a 37 °C con 100 ng de tripsina (Promega V5111) en 25 mM de bicarbonato de amonio pH 8.0. Los péptidos se desalaron utilizando *zip tips* C18 (Merck Millipore) y se eluyeron en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O: ACN: FA 40: 60: 0,1%. Las digestiones se analizaron mediante nanoLC-MS/MS en un nanoHPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap QExactive. Se utilizó un gradiente de 120 min de H<sub>2</sub>O: ACN a un flujo de 33 nl/min con una columna de *Easy Spray* C18 de 2 mm x 150 mm. El método MS2 se utilizó para fragmentar los 12 picos más abundantes en cada ciclo. Los datos crudos se procesaron utilizando el software Proteome Discoverer - versión 2.1.1.21 - (Thermo Scientific) con el algoritmo de búsqueda SEQUEST. La búsqueda se realizó contra la base de datos de *B. suis* 1330. La tolerancia del precursor se ajustó a 10 ppm y la tolerancia de iones del producto a 0,05 Da. Las modificaciones estáticas se ajustaron a la carbamidometilación de cisteínas, y las modificaciones dinámicas se ajustaron a la oxidación de metioninas y la acetilación N-terminal. Los *hits* de proteínas se filtraron para obtener únicamente los de alta confianza. Para realizar el experimento de *Label free quantification* (LFQ), las muestras se analizaron por triplicado. Los datos obtenidos para el área de cada proteína se procesaron con el programa Perseus (*Max Planck Institute of Biochemistry*, versión 1.5.5.3, disponible de forma gratuita) que permite un análisis estadístico más profundo. Para cada par de muestras, trazamos  $-\log$  valor-p ( $-\log$  Student T-test p-value A\_B) en el eje “y” en función de Student T-test de la diferencia entre A y B en el eje “x”. Luego se analizaron las proteínas mediante *Volcano plot* con un *fold change* mayor a 2 (menor que -1 o mayor que 1 en el eje “x” del gráfico) y un valor-p inferior a 0.05 (por encima de 1.3 en el eje “y” del gráfico). Esas proteínas fueron consideradas para el análisis como expresadas diferencialmente.

## 16. Microscopía

### 16. 1 Microscopía electrónica

Para el análisis de Microscopía electrónica de transmisión (MET), se cosecharon cultivos bacterianos en medio TSB a una OD<sub>600</sub>  $\approx$  0.6 y 2.5 (fase exponencial y estacionaria

de crecimiento), se lavaron los *pellets* dos veces con *buffer* fosfato 0,2 M y se fijaron en glutaraldehído al 2% v/v (SIGMA Gradel 25%) en *buffer* fosfato pH 7.2-7.4 durante 2 h a 4 °C. La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1% durante 1 h a 4 °C y luego las muestras se deshidrataron aumentando las concentraciones de etanol y se incluyeron en una resina epoxi. Se realizaron cortes ultrafinos en ultramicrotomo (90 nm) y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras fueron examinadas en el microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL) en el Servicio Central de Microscopía Electrónica en la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Para el análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB), se cosecharon cultivos bacterianos en medio TSB a una  $OD_{600} \approx 0.6$  y 2.5 (fase exponencial y estacionaria de crecimiento), se lavaron los *pellets* dos veces con *buffer* fosfato 0,2 M y se fijaron en glutaraldehído al 2% v/v (SIGMA Gradel 25%) en *buffer* fosfato pH 7.2-7.4 durante 2 h a 4 °C. Luego, 10  $\mu$ l de las suspensiones bacterianas se montaron en cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina. Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (de 20 a 100%, 3 veces cada concentración, durante 5 minutos cada vez). Después del secado por punto crítico (MACN) y metalización, las muestras se montaron en tacos con cinta de carbono y se observaron en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA-FCEyN UBA) utilizando un Carl Zeiss NTS SUPRA 40.

## 16.2 Microscopía confocal

### Localización de las adhesinas sobre la superficie bacteriana

Para detectar la presencia de las adhesinas sobre la superficie bacteriana mediante inmunofluorescencia se cultivaron las cepas de *Brucella* que poseen la construcción pBBR1-3xFLAG*bmaB* y marcadores de polo (pMR10-*aidB*-YFP [51] o pMR10-*pdhS*-GFP [165] en TSB y antibióticos correspondientes, hasta alcanzar la DO deseada (en este caso fue 0.6). Luego, las células se cosecharon por centrifugación (5 min a 5.000 rpm) y fueron lavadas con PBS.

Las células se fijaron con paraformaldehído 3.7%, durante 15 minutos a 37°C en agitación suave y se lavaron 2 veces con PBS, y una vez con PBS-1% seroalbúmina bovina (BSA). Las bacterias fueron resuspendidas en 40  $\mu$ l del anticuerpo primario (anti FLAG, SIGMA) diluido 1:50 en PBS-BSA 0.5% e incubadas durante 40 min a temperatura ambiente, con agitación suave. Se lavaron las bacterias 3 veces con PBS-BSA 1% y luego fueron resuspendidas en 40  $\mu$ l de anticuerpo anti-ratón conjugado a Cy3 (IgG-Cy3-*conjugated donkey anti-mouse antibody*, Jackson Immuno Research) diluido 1:250 en PBS-



BSA 0.5%, y se las incubó durante 40 min, a temperatura ambiente. Las bacterias fueron lavadas 2 veces con PBS-BSA 1% y una vez con PBS. Se resuspendieron en un volumen de PBS. Se montó una alícuota de la suspensión sobre un *pad* de agarosa 1%. Se cubrieron las muestras con un cubreobjetos y se las observó con un microscopio confocal (Carl Zeiss LSM 5 Pascal *laser scanning microscope*) utilizando un objetivo adecuado (Plan Achromat 100x/1.4 *Oil differential interference contrast objective (DIC)*) o alternativamente en el microscopio confocal Zeiss LSM 880 con *Airyscan*. Las imágenes fueron analizadas con el software ZEN 2.3.

En todos los casos se realizaron los controles de viabilidad correspondientes, en medio líquido y sólido, posterior a la fijación.

## 17. Ensayos de adhesión

### 17.1 Adhesión a superficies abióticas (*biofilm*)

La adhesión bacteriana a distintas superficies abióticas (placas de poliestireno como modelo de soporte hidrofóbico) se midió por el método de Cristal violeta. Para ello se cultivaron las bacterias ON a 37°C, con agitación. Se realizó una dilución 1:1000 del cultivo, de la cual se dispusieron 150 µl en cada pocillo de una placa de poliestireno *multiwell* de 96 pocillos (Cellstar, Greiner Bio One). Se selló la placa por fuera con *parafilm* de modo de desfavorecer la evaporación del medio de cultivo y se cultivaron las bacterias a 37°C ON, con agitación. Los pocillos fueron lavados 3 veces cuidadosamente, con NaCl 0.9%. En cada pocillo se agregaron 150 µl de una solución acuosa de Cristal violeta 0.1% y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Los pocillos fueron lavados 3 veces con NaCl 0.9%. Se agregaron 150 µl de etanol absoluto por pocillo. El líquido de cada pocillo fue mezclado con una micropipeta, y se lo transvasó a uno de una placa nueva. Se midió la absorbancia a  $\lambda = 595$  o 570 nm. Para ello se utilizó un lector de microplaca DTX 880 *multimode* detector, Beckman Coulter. Para cada cepa el ensayo se realizó por octuplicado.

### 17.2 Adhesión a componentes de la matriz extracelular

Se evaluó la adhesión bacteriana a componentes de la matriz extracelular en base al protocolo descrito previamente [262] que fue adaptado a las necesidades de este trabajo. Los componentes evaluados fueron: colágeno tipo I, fibronectina y ácido hialurónico. Para ello se realizaron diluciones de los distintos compuestos (0.1 mg/ml) en PBS estéril. Se dispusieron 50 µl por pocillo de cada sustrato (por triplicado) en una placa

de 96 pocillos (Cellstar, Greiner Bio One) , y se la incubó ON a 4°C sin agitación. Las bacterias previamente cultivadas ON fueron lavadas con PBS estéril y se resuspendieron en PBS estéril de modo de obtener  $1 \times 10^9$  UFC/ml ( $DO_{600}=0.2$  en el caso de *Brucella*). Los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS estéril para retirar el remanente de compuesto no adherido. Se agregaron 50  $\mu$ l de la suspensión bacteriana, por pocillo y la placa fue incubada 3 h a 37°C, sin agitación. Se lavaron 3 veces los pocillos con PBS estéril. Para despegar las bacterias adheridas se agregaron 50  $\mu$ l de Tripsina-EDTA (Tripsina 0.05%(Gibco), EDTA 0.5%) por pocillo, y se incubó la placa 10 min a 37°C. Se plaquearon diluciones en medio sólido (TSA) con los antibióticos adecuados de modo de determinar el número de UFC recuperadas. Los datos se expresaron como el porcentaje de bacterias incubadas que permanecieron adheridas a cada compuesto, referidos a la cepa control.

### 17.3 Adhesión a células eucariotas en cultivo

Para los ensayos de adhesión se utilizaron las líneas celulares Caco-2 (ATCC® HTB-37™), HT-29 (ATCC® HTB-38™), SW 982 (ATCC® HTB-93), hFOB (ATCC® CRL-11372), Swan 71 y la línea derivada de macrófagos murinos J774.A1 (ATCC® tib-67). Todas las células (menos los macrófagos) se cultivaron en medio DMEM (Gibco Invitrogen Cell Culture) suplementado con 2 mM glutamina (Sigma-Aldrich), 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor Argentina) en presencia de 100 unidades/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin . Los macrófagos J774 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Cell Culture) suplementado con 2mM glutamina, 10% de SFB, en presencia de la misma combinación de antibióticos y antimicóticos que en el caso anterior. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub>. Para el mantenimiento las células se utilizaron botellas de 25 o 75 cm<sup>2</sup> (Cellstar® greiner bio-one). Todos los ensayos de infección con las diferentes cepas de *B. suis* se realizaron con células entre el pasaje 4 y 12, contados a partir del descongelado de un *stock* mantenido en nitrógeno líquido en placas p24 (Cellstar® Greiner Bio-One).

En estos ensayos se utilizó una multiplicidad de infección (MOI, por *multiplicity of infection*) de 100:1. Se sembraron en placas de 24 *wells* (Cellstar® Greiner Bio-one)  $5 \times 10^4$  células por pocillo (en 1 ml de medio). Se las incubaron ON a 37°C en atmosfera con 5% CO<sub>2</sub> en el medio adecuado. Las células fueron lavadas 2 veces con 1 ml de PBS estéril. Por otro lado, el volumen necesario de un cultivo ON de bacterias, se diluyó en el medio adecuado (RPMI o DMEM) sin antibióticos de modo de obtener una suspensión de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Se reemplazó el PBS del lavado de las células por 0.5 ml de la suspensión

bacteriana. Las placas fueron centrifugadas (1.000 rpm 10 min) y luego fueron incubadas a 37°C 5% CO<sub>2</sub> durante 1h. Para el recuento de bacterias totales asociadas se lavaron 3 veces los pocillos con 500 µl de PBS estéril y a cada pocillo se le agregaron 100 µl de Tritón X-100 0.1% (menos en el caso de la mutante  $\Delta mapB$ , que se le agregó DOC 0,1%). La placa se incubó 10 min a 37°C y se realizaron diluciones seriadas del contenido de cada pocillo. Se plaquearon las diluciones en placas con el antibiótico adecuado y se realizó el recuento en placa (5 gotas de 10 µl para cada dilución de cada pocillo).

Para los ensayos en macrófagos J774:

Luego de 45 min de incubación con la suspensión bacteriana se cambió el medio de cultivo de las células por medio fresco suplementado con gentamicina (20 µg/ml), de modo de matar las bacterias que no ingresaron. La placa se incubó 1 h a 37°C 5%CO<sub>2</sub>. Los pocillos se lavaron 3 veces con 500 µl de PBS estéril y luego a cada pocillo se le agregaron 100 µl de Tritón X-100 0.1% o DOC 0,1%, según corresponda. Se incubó la placa 10 min a 37°C y se realizaron diluciones seriadas del contenido de cada pocillo. Se plaquearon las diluciones en placas con el antibiótico adecuado, y se realizó el recuento en placa (5 gotas de 10 µl para cada dilución de cada pocillo).

## **18. Infección en ratones BALB/c**

Los procedimientos y protocolos de manejo de animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Bienestar Animal (Comité de Bienestar Animal), número de protocolo 225/2015) de acuerdo con la Política de Bienestar Animal (Ley 087/02) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Centro de Investigación Veterinaria (CIVETAN). Todos los protocolos experimentales se realizaron con la premisa de minimizar el sufrimiento al que están expuestos los animales y utilizar el número mínimo de animales experimentales para garantizar resultados estadísticamente significativos. Estos experimentos fueron llevados a cabo por la Dra. Silvia Estein.

Se compraron ratones BALB/c de seis a ocho semanas de edad en las instalaciones para animales la FIL. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en grupos experimentales al menos 1 semana antes de ser inoculados y se mantuvieron en compartimentos ventilados (con filtros), con suministro de comida y agua a voluntad. El protocolo utilizado fue similar a otros previamente descritos por distintos autores [181]. Brevemente, ratones hembras BALB/c fueron inoculados intragástricamente con una suspensión de aproximadamente  $1.3 \times 10^8$  UFC en bicarbonato de sodio 10% mediante una

cánula plástica introducida por la boca. Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados a los 7, 15 y 45 días post-infección (p.i.); a los cuales se les extirpó el bazo. Se plaquearon en TSA (por duplicado) diluciones del homogenato de bazo, y se incubaron las placas durante 4 días a 37°C. Luego se contaron las UFC y estos datos se normalizaron mediante transformación log, lo cual permitió la evaluación mediante ANOVA, seguido por un *test a posteriori* de Tukey (Prism 5.0; GraphPad Software, Inc.). Los experimentos se realizaron dos veces, con resultados similares.

## 19. Análisis bioinformático

Para la búsqueda de pseudogenes, primero se realizó la búsqueda de genes ortólogos se utilizaron dos estrategias, por un lado se utilizó la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) que provee una herramienta de localización de ortólogos. Se verificó la existencia de secuencias ortólogas en KEGG para esto se utilizó el método bioinformático *Bidirectional Best Hits* (BBH) [263]. Este consiste en realizar una búsqueda con una secuencia proteica de un genoma de partida (en este caso *B. suis* 1330) sobre un genoma en el cual se quiere determinar la existencia de ortólogos. Si existen secuencias similares se procede a seleccionar aquella correspondiente al mejor *hit*. Con estas secuencias seleccionadas se realiza una nueva búsqueda, pero esta vez contra el genoma de partida. Si la secuencia correspondiente al mejor *hit* de esta segunda búsqueda, resulta ser la de partida, se considera que los genes pueden ser ortólogos. En nuestra búsqueda solo fueron seleccionadas aquellas secuencias que dieron hits con *E-value* menor o igual a  $10^{-4}$ . Y por otro lado se realizó una búsqueda por similitud de secuencia mediante Blastp buscando los ORF que conserven la misma posición en el genoma (sintenia).

La búsqueda de dominios se realizó utilizando Pfam [264, 265]. La secuencia del péptido señal y la localización subcelular se predijeron utilizando SignalP Server [266] y Gneg-mPloc [267]. Los alineamientos se realizaron con ClustalOmega (EMBL-EBI) o Muscle [268]. Los segmentos transmembrana se predijeron con TMpred [269], y el peso molecular se predijo usando ExPASy [270]. La predicción de operones se llevó a cabo utilizando *MicrobesOnline Operon* [271]. La estructura secundaria fue predicha por Phyre [272] y Jpred4 [273].

## 20. Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc). Al comparar 2 grupos, la diferencia estadística se determinó con el *test* de Student (T test); mientras que al comprar 3 o más grupos el *test* utilizado fue ANOVA de una vía, seguido del *test* de Tukey o el de Dunnett. El criterio adoptado para determinar que una diferencia fuera estadísticamente significativa fue que  $p < 0.05$ .

## Anexo

Tabla S1: Proteínas asociadas a OMVS

ID	Gen	Nombre de la proteína/Descripción	Localización
<i>Wt</i>			
P0A343	BRA0196	10 kDa chaperonina groS	C
Q8FYR5	BR1251	ATP sintasa subunidad beta, atpD	C
Q8FX87	BRA0195	60 kDa chaperonina groL	C
A0A0H3G431	BR1182	Proteína no caracterizada	MI
A0A0H3G988	BR2149	Proteína de unión al ADN, inducible por inanición	C
A0A0H3G433	BR1622	Omp31b	ME
A0A0H3G313	BR0971	Omp25b	ME
<i>ΔmapB</i>			
A0A0H3GC63	BR1284	Omp22	ME
Q45689	BR0701	Omp25	ME
A0A0H3G4S3	BR119	Omp25c	ME
P0A3U5	BRA0423	Omp31	ME
Q8FX87	BRA0195	60 kDa chaperonina, groL	C
A0A0H3G313	BR0971	Omp25b	ME
A0A0H3G433	BR1622	Omp31b	ME
Q8FXX2	BR2125	Chaperona DnaK	C
P0DI95	BR0639	Omp2b	ME
A0A0H3GA04	BRA0265	Transportador ABC, proteína de unión a azúcares	P
Q8FYR5	BR1799	ATP sintasa subunidad beta, atpD	MI
A0A0H3GAL2	BRA0538	Transportador ABC, proteína de unión a oligopéptidos	P
P64025	BR1251	Factor de elongación Tu, tufA	C
A0A0H3G7C2	BR1205	Putativa lipoproteína	MI/ extracel
A0A0H3G9H5	BR0093	Aconitato hidratasa acnA	MI
A0A0H3G7V2	BRA0858	Transportador ABC, proteína de unión a D-ribosa, rbsB-2	P
Q8FWU0	BRA0355	Catalasa, katA	P
A0A0H3GFM9	BRA0756	Transportador ABC, proteína de unión a hierro	P
Q8FYR3	BR1801	ATP sintasa, subunidad alfa, atpA	MI
A0A0H3GAT8	BRA0633	Proteína no caracterizada	C
A0A0H3G3E6	BR1204	OmpA/MotB	ME
A0A0H3G3Y9	BR1562	Proteína no caracterizada	ME
A0A0H3G4E4	BR1378	Aminotransferasa, clase I	C

A0A0H3G415	BR1154	BamA	ME
A0A0H3G6H2	BRA0537	Transportador ABC, proteína de unión a oligopéptidos	P
Q8FYT2	BR1778	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintasa (flavodoxina)	MI/C
Q8FZ07	BR1697	Sistema Tol-Pal, proteína TolB	P
Q8G075	BR1236	Factor de elongación, fusA	C
Q8FUM7	BRA1193	Proteína de unión a Leu/Ile/Val	P
Q8G069	BR1243	DNA-directed RNA polimerasa subunidad beta rpoB	MI/C
A0A0H3G6N4	BRA0632	Transportador ABC, proteína de unión a aminoácidos	P
A0A0H3G7W5	BR1199	Isocitrato deshidrogenasa	C
A0A0H3G8F4	BR1728	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	C
Q7CEG6	BR1864	Chaperona, ClpB	C
Q8FW10	BRA0655	sn-glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein UgpB	P
A0A0H3G7R0	BRA0804	Transportador ABC, proteína de unión a Níquel	P
Q8G094	BR1209	RNA polimerasa subunidad alfa rpoA	MI
Q8FW84	BRA0576	Transportador ABC, proteína de unión a péptidos	P

Las proteínas asociadas a OMVs fueron detectadas por nanoLC-MS/MS acoplado a un espectrómetro de masas QExactive. Se indica la localización subcelular predicha: citoplasma (C), membrana interna (MI), membrana externa (ME) y periplasma (P).

Tabla S2. Lista de cepas utilizados en esta tesis.

Cepa	Descripción	Referencia
<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	Mobilization host: cells enable mobilization of pBBR plasmids from <i>E. coli</i> S17-1 to <i>Brucella</i> strains. <i>recA, thi, pro, hsdR</i> $\Delta$ RP4 : 2-Tc:Mu: Km Tn7 $\lambda$ pir.	<i>E. coli</i> (ATCC <sup>®</sup> 47055 <sup>™</sup> )
<b><i>B. suis</i></b>		
wt M1330	Wild-type, smooth, virulent, NaI <sup>R</sup>	Stock de laboratorio
$\Delta$ <i>mapB</i>	Cepa mutante en BR0049 por delección limpia	Tesis V. Ruiz
$\Delta$ <i>mapB</i> pBBR <i>mapB</i>	Cepa $\Delta$ <i>mapB</i> complementada con pBBR1MCS-1- <i>mapB</i>	Tesis V. Ruiz
<i>mapB3xflag</i>	<i>mapB</i> (BR0049) se etiquetó en el extremo 3' con la secuencia 3xFLAG	Esta tesis
WtpBBR3xflag <i>bmaB</i>	Cepa wt con el plásmido pBBR3xflag <i>bmaB</i> que expresa <i>bmaB</i> bajo el control del promotor <i>lacZ</i> etiquetada con la secuencia 3xFLAG en el extremo 5'	Esta tesis
$\Delta$ <i>mapB</i> pBBR3xflag <i>bmaB</i>	$\Delta$ <i>mapB</i> con el plásmido pBBR3xflag <i>bmaB</i> que expresa <i>bmaB</i> bajo el control del promotor <i>lacZ</i> etiquetada con la secuencia 3xFLAG en el extremo 5'	Esta tesis
<i>bmaA::stops</i>	Cepa mutante para <i>bmaA</i> (BRA0173) por inserción de <i>stops</i> en tándem.	Esta tesis
<i>bmaB::Km</i>	Cepa mutante para <i>bmaB</i> por inserción de casete de Kanamicina	Esta tesis
<i>bmaAbmaB</i>	Doble mutante <i>bmaAbmaB</i>	Esta tesis
<i>bmaA::stops</i> _pBBR <i>bmaA</i>	Cepa <i>bmaA::stops</i> complementada con pBBR1MCS-1- <i>bmaA</i>	Esta tesis
<i>bmaB::Km</i> _pBBR <i>bmaB</i>	Cepa <i>bmaB::Km</i> complementada con pBBR1MCS-1- <i>bmaB</i>	Esta tesis



Tabla S3. Lista de plásmidos utilizados en esta tesis.

Plásmido	Descripción	Referencia
pk18mobsacB	Km <sup>R</sup> . Vector suicida y movilizable en <i>Brucella</i> , contiene contraselección <i>sacB</i>	[156]
pk18mobsacB_Δ <i>mapB</i>	Km <sup>R</sup> . Derivative of pk18mobsacB containing the flanking regions of <i>mapB</i> for Δ <i>mapB</i> mutant strain construction	Esta tesis
pQE1-3 <i>xflag</i>	Amp <sup>R</sup> . derivado de of pQE1 conteniendo la secuencia 3xFLAG (5'GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAAG 3').	Juan Manuel Spera, UNSAM.
pQE1-3' <i>mapB</i> 3 <i>xflag</i>	Amp <sup>R</sup> . Derivada de pQE1-3 <i>xflag</i> . El vector contiene el 3 <i>xflag</i> luego del extremo 3' de <i>mapB</i>	Esta tesis
pk18mobsacB_3' <i>mapB</i> 3 <i>xflag</i>	Km <sup>R</sup> . Derivado de pk18mobsacB conteniendo la etiqueta 3xFLAG en el extremo 3' de <i>mapB</i> , para construir la cepa etiquetada	Esta tesis
pBBR1MCS-1	Cm <sup>R</sup> . pBBR1MCS-1 plásmido de mediano número de copias, replicativo.	[157]
pBBR <i>mapB</i>	Cm <sup>R</sup> . pBBR1MCS-1- <i>mapB</i>	Tesis V. Ruiz
pBBR3 <i>xflagbmaB</i>	Cm <sup>R</sup> . pBBR1MCS-1-3 <i>xflagbmaB</i> vector, que expresa 3 <i>xflagbmaB</i> bajo el promotor <i>lacZ</i> , <i>bmaB</i> está etiquetada con el 3 <i>xflag</i> en el extremo 5'	Esta tesis
pHP45Ω	SpecR, contiene el casete Ω de 2 kb.	[154]
pJQ175	Contiene casete de kanamicina de 1kb	[155]
pGEMTeasy_ <i>bmaA</i> ::stops	AmpR. Fragmento de 1000pb del gen <i>bmaA</i> interrumpido por las secuencias stop del casete Ω para realizar la mutante por inserción en dicho gen.	Esta tesis
pGEMTeasy_ <i>bmaB</i> ::Km	AmpR, KmR. Fragmento de 1500pb del gen <i>bmaB</i> interrumpido por un casete de kanamicina (1kb) para realizar la mutante por inserción en dicho gen.	Esta tesis
pBBRMCS1_ <i>bmaA</i>	Fragmento que contiene el gen completo de <i>bmaA</i> utilizado para complementar la mutante	Tesis D.Posadas
pBBRMCS1_ <i>bmaB</i>	Fragmento que contiene el gen completo de <i>bmaB</i> utilizado para complementar la mutante	Esta tesis

Tabla S4. Lista de oligonucleótidos utilizados en esta tesis

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Sitio de restricción	Referencia
ΔmapB_F1	<u>GAATTCTCTCCGAGCAGATGCGCGT</u> CG	EcoRI	Tesis V. Ruiz
ΔmapB_R1	<u>GGATCCGCCTGCGGCTGGTCATCAGC</u>	BamHI	Tesis V. Ruiz
ΔmapB_F2	<u>GGATCCTATGAGCGGCCATTACGGC</u>	BamHI	Tesis V. Ruiz
ΔmapB_R2	<u>TCTAGATGATCCTTCAGGCTGACGACA</u>	XbaI	Tesis V. Ruiz
FComp	<u>CTCGAGGCAATATCCAGCCCTTCTATGAAT</u>	XhoI	Tesis V. Ruiz
RComp	<u>ACTAGTAATTAAGGAATCGGGCCAAAGCAGGC</u>	SpeI	Tesis V. Ruiz
FRTmapB	ATGAAGGGCGATGAAATCAC	----	Tesis V. Ruiz
RRTmapB	GGCTTGAACGTATTGGCAAG	----	Tesis V. Ruiz
FRT48	GGCTTCGGCGCTGAATATTC	----	Esta tesis
RRT48	TATCCTGCGAGCCGCCAATG	----	Esta tesis
FRT50	GAACCATTGTCGTCAGCCTG	----	Esta tesis
RRT50	TATTCCACATTGGCGCGGCC	----	Esta tesis
RtOpF	GCTCCGGCGATCCGAACTAT	----	Esta tesis
RtOpR	TGGAGATACGGCGGTTGGGT	----	Esta tesis
IF_Fw	TGTTACGGAAGCTGCTGCCCAAT	----	Sycz, 2015
IF_Rv	CGGCCCTTGGTCAGGTCATAA	----	Sycz, 2015
MapBFLAGFw	<u>GAATTC</u> ACTGTTCCGCGTCTTGATG	EcoRI	Esta tesis
MapBFLAGR	<u>GAATTC</u> CATAGTCCTTTTCATAGAAGATG	EcoRI	Esta tesis
MbmaA_Fw	AATTGATGGAGGGCAGTCTGA	----	D.Posadas
MbmaA_Rev	CGCCGCCCGGTATTGTCA	----	D.Posadas
MbmaB_Fw	CACGGCACCTGGAGTG	----	D.Posadas
MbmaB_Rev	GCCAGGAATGCTTCCTGT	----	D.Posadas
EbmaA_Fw	<u>AGCTCGAGGTT</u> CGCGAGCTGCGGCGTCTGGTT	XhoI	D.Posadas
EbmaA_Rev	CTGGTTCCTTCTATCAGCCTGATTAGCAGTAAGG	----	D.Posadas
EbmaB_Fw1	CT <u>ATCGATT</u> GAGTGGCGCTTGTGTTTCGCACAT	Clal	Esta tesis
EbmaB_Rev	CT <u>GAGCTCT</u> CTTGAAGCAAGTGCAGTCCGGTTA	Sall	Esta tesis
RT bmaAFwd	TGACGGTACCATCGTCTTCA	----	Esta tesis
RT bmaA Rev	GATTCACCACCTGCACATTG	----	Esta tesis

RT bmaB Fwd	AGTCGATTCGGTACGTTGG	----	Esta tesis
RT bmaB Rev	GGTACCGTTACCAAGCTGGA	----	Esta tesis
RT bmaC Fwd	AACTTGCGCACAATAACC	----	Esta tesis
RT bmaC rev	ATAGGTGCTGTCGGAATTGG	----	Esta tesis

---

## Listado de Abreviaturas

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico copia
ANLIS	Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
ARN	Ácido Ribonucleico
AT	Autotransportador
AT I	Autotransportador de tipo I o monomérico
AT II	Autotransportador de tipo II o trimérico
ATP	Adenosina Trifosfato
ATs	Autotransportadores
BAM	Maquinaria de ensamblaje de barriles-β ( <i>β-barrel Assembly Machinery</i> )
BCV	Vacuola contenedora de <i>Brucella</i>
BSA	Seroalbúmina bovina
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica determinada a 600 nanómetros
DOC	Deoxicolato de Sodio
ECM	Matriz Extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FIL	Fundación Instituto Leloir
GFP	Proteína verde fluorescente
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
kb	Kilo bases

kDa	Kilo Dalton
LB	Medio Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
Mb	Megabases
ME	Membrana Externa
MI	Membrana interna
OMP	Proteínas de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto ( <i>Open Reading frame</i> )
pb	Pares de bases
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PFA	Paraformaldehído
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Y Calidad Agroalimentaria
TAM	Módulo de translocación y ensamblaje ( <i>Translocation and Assembly Module</i> )
VLCFA	Ácidos grasos de cadena muy larga ( <i>Very long chain fatty acids</i> )

## Bibliografía

1. Castro H.A., G.S.R., Prat M.I., *Brucellosis: una revisión práctica* Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 2005. **39**(2): p. 203-16.
2. Thorne, E.T., *Brucellosis.*, in *Infectious Diseases of Wild Mammals*, E.S. Williams, Barker, I.K, Editor. 2001, Manson Publishing. p. 372–395.
3. Forbes, L.B. and S.V. Tessaro, *Evaluation of cattle for experimental infection with and transmission of Brucella suis biovar 4*. J Am Vet Med Assoc, 2003. **222**(9): p. 1252-6.
4. Cook, W.E., et al., *Brucella abortus strain RB51 vaccination in elk. I. Efficacy of reduced dosage*. J Wildl Dis, 2002. **38**(1): p. 18-26.
5. Elzer, P.H., et al., *Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 425-31.
6. Young, E.J. Principles and Practice of Infectious Diseases, ed. J.E.B. Gerald L. Mandell, Raphael Dolin. 2005, Philadelphia: Elsevier.
7. Rajashekara, G., et al., *Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in Brucella species*. J Bacteriol, 2004. **186**(15): p. 5040-51.
8. Georgios Pappas, M.D., Nikolaos Akritidis, M.D., Mile Bosilkovski, M.D., and Epameinondas Tsianos, M.D., *Brucellosis*. New England Journal of Medicine, 2005. **Volume 352:2325-2336**.
9. Acha, B.S.P., *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2nd. ed. 1986, Washington: Organización Panamericana de la Salud.
10. Mandell, G., *Infectología*. 4th. ed. 1995, Madrid: Editorial Medica Panamericana.
11. Giannacopoulos, I., et al., *Transplacentally transmitted congenital brucellosis due to Brucella abortus*. J Infect, 2002. **45**(3): p. 209-10.
12. Mesner, O., et al., *The many faces of human-to-human transmission of brucellosis: congenital infection and outbreak of nosocomial disease related to an unrecognized clinical case*. Clin Infect Dis, 2007. **45**(12): p. e135-40.
13. Ruben, B., et al., *Person-to-person transmission of Brucella melitensis*. Lancet, 1991. **337**(8732): p. 14-5.
14. Carrillo, C.G., *Animal and human brucellosis in the Americas*. 1990, Office International des Epizooties: Paris. p. pp. 4-40, 296.
15. Young, E.J., *An overview of human brucellosis*. Clin Infect Dis, 1995. **21**(2): p. 283-9; quiz 290.
16. OMS *Definiciones de caso: Brucellosis, Carbunco (Ántrax) y Rabia*. Boletín Epidemiológico, 2000. **21**.
17. Franco, M.P., et al., *Human brucellosis*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(12): p. 775-86.
18. Lucero, N.E., et al., *Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006*. Epidemiol Infect, 2008. **136**(4): p. 496-503.
19. Sreevatsan, S., et al., *A multiplex approach to molecular detection of Brucella abortus and/or Mycobacterium bovis infection in cattle*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(7): p. 2602-10.
20. Zambrano Aguayo, M.D., Pérez Ruano Miguel, *Seroprevalencia de brucellosis en ganado bovino y en humanos vinculados a la ganadería bovina en las zonas norte y centro de la provincia Manabí, Ecuador*. Rev. Salud Animal, 2015: p. 164-172.
21. N. E. Arenas, V.M., *ESTUDIO ECONÓMICO DE LA INFECCIÓN POR Brucella abortus EN GANADO BOVINO DE LA REGIÓN DEL SUMAPAZ, COLOMBIA*. Rev. Med. Vet. Zoot., 2016. **63**(3).

22. Alejandro Córdova Izquierdo, A.E.I., Román Espinosa Cervantes, Juan Eulogio Guerra Liera, Jorge Fabio Inzunza Castro, Edmundo Abel Villa Mancera, Maximino Méndez Mendoza, Rubén Huerta Crispín, Ma. de Lourdes J. Mosqueda, Armando Gómez Vázquez, Gerardo Cancino Arroyo, William Méndez Hernández, Jaime Olivares Pérez, Valente Velázquez, Pedro Sánchez, *IMPORTANCIA DE LA BRUCELOSIS BOVINA Y CONSECUENCIAS ECONÓMICAS PARA EL GANADERO* Engormix, 2017.
23. Godfroid, J., et al., *From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis*. Vet Res, 2005. **36**(3): p. 313-26.
24. Pappas, G., et al., *The new global map of human brucellosis*. Lancet Infect Dis, 2006. **6**(2): p. 91-9.
25. Szyfres, P.N.A.B., *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales* Tercera edición ed. Vol. I. Bacteriosis y Micosis. 2001: Organización Panamericana de la Salud; OMS.
26. Cardenas, L., et al., *Characterization and evolution of countries affected by bovine brucellosis (1996 - 2014)*. Transbound Emerg Dis, 2019.
27. Anon, *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 12th ed. 2003, Paris: Office International des Epizooties.
28. Samartino, L.E., *Brucellosis in Argentina*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 71-80.
29. Aznar, M.N.L., Facundo José; Cosentino, Bernardo; Sago, Andrés Miguel; la Sala, Luciano Francisco; León, Emilio; Duffy, Sergio; Pérez, Andrés, *Prevalencia y distribución espacial de brucellosis bovina en las provincias de San Luis y La Pampa*. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de la República Argentina, 2013.
30. SENASA, *Informe del muestreo para determinación de prevalencias de brucellosis bovina en la zona de mayor producción bovina en la Republica Argentina*. 2014.
31. Garin-Bastuji, B., Blasco, J.M., *Caprine and ovine brucellosis (excluding Brucella ovis)*, in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2008: Paris. p. 974–982.
32. Nielsen, K.E., D.R., *Bovine Brucellosis*, in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2008: Paris. p. 624–660.
33. Bergey, D.H., JG, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. 1994, Baltimore: Williams & Wilkins.
34. Gupta, R.S., *Protein signatures distinctive of alpha proteobacteria and its subgroups and a model for alpha-proteobacterial evolution*. Crit Rev Microbiol, 2005. **31**(2): p. 101-35.
35. Williams, K.P., B.W. Sobral, and A.W. Dickerman, *A robust species tree for the alphaproteobacteria*. J Bacteriol, 2007. **189**(13): p. 4578-86.
36. Cole, J.R., et al., *The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D141-5.
37. Ruiz-Ranwez, V., *Factores involucrados en la interacción inicial de Brucella suis con el hospedador: rol de los autotransportadores triméricos.*, in *Química Biológica, FCEyN*. 2013, Universidad de Buenos Aires Buenos Aires
38. Marzetti, S., et al., *Recent trends in human Brucella canis infection*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2013. **36**(1): p. 55-61.
39. Foster, J.T., et al., *Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus Brucella*. J Bacteriol, 2009. **191**(8): p. 2864-70.
40. Chain, P.S., et al., *Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8353-61.

41. Celli, J. and J.-P. Gorvel, *Organelle robbery: Brucella interactions with the endoplasmic reticulum*. *Curr Opin Microbiol*, 2004. **7**(1): p. 93-7.
42. von Bargen, K., J.P. Gorvel, and S.P. Salcedo, *Internal affairs: investigating the Brucella intracellular lifestyle*. *FEMS Microbiol Rev*, 2012. **36**(3): p. 533-62.
43. Starr, T., et al., *Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment*. *Traffic*, 2008. **9**(5): p. 678-94.
44. Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., Liautard, J.P., *The analysis of the intramacrophagic virulome of Brucella suis deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell*. 2002: Proc. Natl. Acad. Sci.
45. Kohler, S., et al., *What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named Brucella?* *Trends Microbiol*, 2003. **11**(5): p. 215-9.
46. Baldwin, C.L. and R. Goenka, *Host immune responses to the intracellular bacteria Brucella: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection?* *Crit Rev Immunol*, 2006. **26**(5): p. 407-42.
47. Roop, R.M., 2nd, et al., *Adaptation of the Brucellae to their intracellular niche*. *Mol Microbiol*, 2004. **52**(3): p. 621-30.
48. Gutierrez-Jimenez, C., et al., *Persistence of Brucella abortus in the Bone Marrow of Infected Mice*. *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 5370414.
49. Hallez, R., et al., *Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria*. *Trends Microbiol*, 2004. **12**(8): p. 361-5.
50. Brown, P.J., et al., *Polar growth in the Alphaproteobacterial order Rhizobiales*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(5): p. 1697-701.
51. Dotreppe, D., et al., *The alkylation response protein AidB is localized at the new poles and constriction sites in Brucella abortus*. *BMC Microbiol*, 2011. **11**: p. 257.
52. Van der Henst, C., et al., *The Brucella pathogens are polarized bacteria*. *Microbes Infect*, 2013. **15**(14-15): p. 998-1004.
53. Moreno, E., et al., *Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria*. *J Bacteriol*, 1990. **172**(7): p. 3569-76.
54. Casabuono, A.C., et al., *New Features in the Lipid A Structure of Brucella suis and Brucella abortus Lipopolysaccharide*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017. **28**(12): p. 2716-2723.
55. Martirosyan, A., E. Moreno, and J.P. Gorvel, *An evolutionary strategy for a stealthy intracellular Brucella pathogen*. *Immunol Rev*, 2011. **240**(1): p. 211-34.
56. Vizcaino, N., et al., *Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Brucella melitensis omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein*. *Infect Immun*, 1996. **64**(9): p. 3744-51.
57. Moriyon, I. and I. Lopez-Goni, *Structure and properties of the outer membranes of Brucella abortus and Brucella melitensis*. *Int Microbiol*, 1998. **1**(1): p. 19-26.
58. Cloeckert, A., et al., *Major outer membrane proteins of Brucella spp.: past, present and future*. *Vet Microbiol*, 2002. **90**(1-4): p. 229-47.
59. Cloeckert, A., et al., *Demonstration of peptidoglycan-associated Brucella outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies*. *J Gen Microbiol*, 1992. **138**(7): p. 1543-50.
60. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(10): p. 987-95.



61. Lapaque, N., et al., *Differential inductions of TNF-alpha and IIGP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides*. Cell Microbiol, 2006. **8**(3): p. 401-13.
62. Moreno, E., D.T. Berman, and L.A. Boettcher, *Biological activities of Brucella abortus lipopolysaccharides*. Infect Immun, 1981. **31**(1): p. 362-70.
63. Lapaque, N., et al., *Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(1): p. 60-6.
64. Cardoso, P.G., et al., *Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system*. Microb Cell Fact, 2006. **5**: p. 13.
65. Fernandez-Prada, C.M., et al., *Interactions between Brucella melitensis and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 2110-9.
66. Martínez de Tejada, G., et al., *The outer membranes of Brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides*. Infect Immun, 1995. **63**(8): p. 3054-61.
67. Barquero-Calvo, E., et al., *Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection*. PLoS One, 2007. **2**(7): p. e631.
68. Velasco, J., et al., *Brucella abortus and its closest phylogenetic relative, Ochrobactrum spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance*. Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3210-8.
69. Moriyon, I. and D.T. Berman, *Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the Brucella cell envelope*. J Bacteriol, 1982. **152**(2): p. 822-8.
70. Martinez-Morales, F., et al., *Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 12): p. 3461-71.
71. Seelke, R., *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Choice: Current Reviews for Academic Libraries, 2007. **45**(1): p. 68-68.
72. Comerci, D.J., et al., *Brucella abortus synthesizes phosphatidylcholine from choline provided by the host*. J Bacteriol, 2006. **188**(5): p. 1929-34.
73. Freer, E., et al., *Brucella-Salmonella lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native Brucella sp. counterparts*. J Bacteriol, 1996. **178**(20): p. 5867-76.
74. Martinez de Tejada, G. and I. Moriyon, *The outer membranes of Brucella spp. are not barriers to hydrophobic permeants*. J Bacteriol, 1993. **175**(16): p. 5273-5.
75. Kerrinnes, T., et al., *Phospholipase A1 modulates the cell envelope phospholipid content of Brucella melitensis, contributing to polymyxin resistance and pathogenicity*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(11): p. 6717-24.
76. Tibor, A., et al., *Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of Brucella abortus with similarity to pal lipoproteins*. Infect Immun, 1994. **62**(9): p. 3633-9.
77. Tibor, A., et al., *Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of Brucella abortus*. Infect Immun, 1996. **64**(1): p. 100-7.
78. Tibor, A., et al., *Effect of omp10 or omp19 deletion on Brucella abortus outer membrane properties and virulence in mice*. Infect Immun, 2002. **70**(10): p. 5540-6.
79. Sklar, J.G., et al., *Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in Escherichia coli*. Genes Dev, 2007. **21**(19): p. 2473-84.
80. Tamm, L.K., A. Arora, and J.H. Kleinschmidt, *Structure and assembly of beta-barrel membrane proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 32399-402.

81. Heinz, E. and T. Lithgow, *A comprehensive analysis of the Omp85/TpsB protein superfamily structural diversity, taxonomic occurrence, and evolution*. *Front Microbiol*, 2014. **5**: p. 370.
82. Roman-Hernandez, G., J.H. Peterson, and H.D. Bernstein, *Reconstitution of bacterial autotransporter assembly using purified components*. *Elife*, 2014. **3**: p. e04234.
83. Hagan, C.L., S. Kim, and D. Kahne, *Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components*. *Science*, 2010. **328**(5980): p. 890-2.
84. Malinverni, J.C., et al., *YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2006. **61**(1): p. 151-64.
85. Voulhoux, R., et al., *Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly*. *Science*, 2003. **299**(5604): p. 262-5.
86. Jain, S. and M.B. Goldberg, *Requirement for YaeT in the outer membrane assembly of autotransporter proteins*. *J Bacteriol*, 2007. **189**(14): p. 5393-8.
87. Ieva, R. and H.D. Bernstein, *Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(45): p. 19120-5.
88. Leyton, D.L., A.E. Rossiter, and I.R. Henderson, *From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(3): p. 213-25.
89. Sauri, A., et al., *The Bam (Omp85) complex is involved in secretion of the autotransporter haemoglobin protease*. *Microbiology*, 2009. **155**(Pt 12): p. 3982-91.
90. Selkig, J., et al., *Discovery of an archetypal protein transport system in bacterial outer membranes*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(5): p. 506-10, S1.
91. Josts, I., et al., *The Structure of a Conserved Domain of TamB Reveals a Hydrophobic beta Taco Fold*. *Structure*, 2017. **25**(12): p. 1898-1906 e5.
92. Gruss, F., et al., *The structural basis of autotransporter translocation by TamA*. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. **20**(11): p. 1318-20.
93. Shen, H.H., et al., *Reconstitution of a nanomachine driving the assembly of proteins into bacterial outer membranes*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5078.
94. Heinz, E., et al., *Evolution of the Translocation and Assembly Module (TAM)*. *Genome Biol Evol*, 2015. **7**(6): p. 1628-43.
95. Azari, F., et al., *Ultrastructural analysis of the rugose cell envelope of a member of the Pasteurellaceae family*. *J Bacteriol*, 2013. **195**(8): p. 1680-8.
96. Smith, K.P., et al., *Alteration in abundance of specific membrane proteins of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is attributed to deletion of the inner membrane protein MorC*. *Proteomics*, 2015. **15**(11): p. 1859-67.
97. Iqbal, H., et al., *The TamB ortholog of *Borrelia burgdorferi* interacts with the beta-barrel assembly machine (BAM) complex protein BamA*. *Mol Microbiol*, 2016. **102**(5): p. 757-774.
98. Yu, J., et al., *A tamB homolog is involved in maintenance of cell envelope integrity and stress resistance of *Deinococcus radiodurans**. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 45929.
99. Finlay, B.B. and P. Cossart, *Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens*. *Science*, 1997. **276**(5313): p. 718-25.
100. Lyskowski, A., J.C. Leo, and A. Goldman, *Structure and biology of trimeric autotransporter adhesins*. *Adv Exp Med Biol*, 2011. **715**: p. 143-58.
101. Peterson, J.W., in *Medical Microbiology, 4th edition*, S. Baron, Editor. 1996: Texas.
102. Klemm, P., R.M. Vejborg, and V. Hancock, *Prevention of bacterial adhesion*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010. **88**(2): p. 451-9.

103. Dersch, P., *Host Response Mechanisms in Infectious Diseases*, ed. H. H. Vol. 10. 2003. 183-209.
104. Kline, K.A., et al., *Bacterial adhesins in host-microbe interactions*. *Cell Host Microbe*, 2009. **5**(6): p. 580-92.
105. Schilling, J.D., M.A. Mulvey, and S.J. Hultgren, *Structure and function of Escherichia coli type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections*. *J Infect Dis*, 2001. **183 Suppl 1**: p. S36-40.
106. Costa, T.R., et al., *Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights*. *Nat Rev Microbiol*, 2015. **13**(6): p. 343-59.
107. Economou, A., *Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway*. *Trends Microbiol*, 1999. **7**(8): p. 315-20.
108. Mori, H. and K. Ito, *The Sec protein-translocation pathway*. *Trends Microbiol*, 2001. **9**(10): p. 494-500.
109. Herskovits, A.A., E.S. Bochkareva, and E. Bibi, *New prospects in studying the bacterial signal recognition particle pathway*. *Mol Microbiol*, 2000. **38**(5): p. 927-39.
110. Robinson, C. and A. Bolhuis, *Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(5): p. 350-6.
111. Berks, B.C., F. Sargent, and T. Palmer, *The Tat protein export pathway*. *Mol Microbiol*, 2000. **35**(2): p. 260-74.
112. Binet, R., et al., *Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review*. *Gene*, 1997. **192**(1): p. 7-11.
113. Korotkov, K.V., M. Sandkvist, and W.G. Hol, *The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(5): p. 336-51.
114. Collazo, C.M. and J.E. Galan, *The invasion-associated type-III protein secretion system in Salmonella--a review*. *Gene*, 1997. **192**(1): p. 51-9.
115. Christie, P.J. and J.P. Vogel, *Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells*. *Trends Microbiol*, 2000. **8**(8): p. 354-60.
116. Russell, A.B., S.B. Peterson, and J.D. Mougous, *Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose*. *Nat Rev Microbiol*, 2014. **12**(2): p. 137-48.
117. Schwarz, S., R.D. Hood, and J.D. Mougous, *What is type VI secretion doing in all those bugs?* *Trends Microbiol*, 2010. **18**(12): p. 531-7.
118. Henderson, I.R., et al., *Type V protein secretion pathway: the autotransporter story*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. **68**(4): p. 692-744.
119. Dautin, N. and H.D. Bernstein, *Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway*. *Annu Rev Microbiol*, 2007. **61**: p. 89-112.
120. Benz, I. and M.A. Schmidt, *Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens*. *Int J Med Microbiol*, 2011. **301**(6): p. 461-8.
121. Cotter, S.E., N.K. Surana, and J.W. St Geme, 3rd, *Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins*. *Trends Microbiol*, 2005. **13**(5): p. 199-205.
122. Bassler, J., et al., *A domain dictionary of trimeric autotransporter adhesins*. *Int J Med Microbiol*, 2015. **305**(2): p. 265-75.
123. Klauser, T., J. Pohlner, and T.F. Meyer, *Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: dissection of Neisseria Iga beta-mediated outer membrane transport*. *Embo J*, 1992. **11**(6): p. 2327-35.
124. Yen, M.R., et al., *Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1562**(1-2): p. 6-31.

125. Henderson, I.R. and J.P. Nataro, *Virulence functions of autotransporter proteins*. Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1231-43.
126. Oomen, C.J., et al., *Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter*. Embo J, 2004. **23**(6): p. 1257-66.
127. Sherlock, O., R.M. Vejborg, and P. Klemm, *The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic Escherichia coli is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 1954-63.
128. Lindenthal, C. and E.A. Elsinghorst, *Enterotoxigenic Escherichia coli TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells*. Infect Immun, 2001. **69**(1): p. 52-7.
129. Elsinghorst, E.A. and J.A. Weitz, *Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic Escherichia coli tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein*. Infect Immun, 1994. **62**(8): p. 3463-71.
130. Jain, S., et al., *Polar localization of the autotransporter family of large bacterial virulence proteins*. J Bacteriol, 2006. **188**(13): p. 4841-50.
131. Castaneda-Roldan, E.I., et al., *Adherence of Brucella to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues*. Cell Microbiol, 2004. **6**(5): p. 435-45.
132. Czibener, C. and J.E. Ugalde, *Identification of a unique gene cluster of Brucella spp. that mediates adhesion to host cells*. Microbes Infect, 2012. **14**(1): p. 79-85.
133. Hernandez-Castro, R., et al., *The BMEI0216 gene of Brucella melitensis is required for internalization in HeLa cells*. Microb Pathog, 2008. **44**(1): p. 28-33.
134. Posadas, D.M., *Transporte y adhesión en B. suis: rol de una proteína de la familia TolC en el eflujo de compuestos tóxicos y de tres posibles adhesinas en la colonización del hospedador*, in Departamento de Química Biológica. 2010, Universidad de Buenos Aires: C.A.B.A.
135. Godefroid, M., et al., *Brucella melitensis 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **59**(3): p. 364-77.
136. Posadas, D.M., et al., *BmaC, a novel autotransporter of Brucella suis, is involved in bacterial adhesion to host cells*. Cell Microbiol, 2012. **14**(6): p. 965-82.
137. Ruiz-Ranwez, V., et al., *The BtaF trimeric autotransporter of Brucella suis is involved in attachment to various surfaces, resistance to serum and virulence*. PLoS ONE, 2013. **8**(11): p. e79770.
138. Ruiz-Ranwez, V., et al., *BtaE, an adhesin that belongs to the trimeric autotransporter family, is required for full virulence and defines a specific adhesive pole of Brucella suis*. Infect Immun, 2013. **81**(3): p. 996-1007.
139. Enright, F.M., *The pathogenesis and pathobiology of Brucella infection in domestic animals*, in Animal brucellosis. 1990, CRC Press, Inc.: Boca Raton, Fla. p. 301-320.
140. Rocha-Gracia R. del, C., et al., *Brucella sp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **213**(2): p. 219-24.
141. Rocha-Gracia R., C., et al., *Brucella sp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **213**(2): p. 219-24.
142. Castaneda-Roldan, E.I., et al., *Characterization of SP41, a surface protein of Brucella associated with adherence and invasion of host epithelial cells*. Cell Microbiol, 2006. **8**(12): p. 1877-87.
143. Bandara, A.B., et al., *Putative outer membrane autotransporter protein influences survival of Brucella suis in BALB/c mice*. Vet Microbiol, 2005. **109**(1-2): p. 95-104.

144. Czibener, C., et al., *BigA is a novel adhesin of Brucella that mediates adhesion to epithelial cells*. Cell Microbiol, 2016. **18**(4): p. 500-13.
145. Paulsen, I.T., et al., *The Brucella suis genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13148-53.
146. Punta, M., et al., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D290-301.
147. Sieira, R., et al., *Combinatorial control of adhesion of Brucella abortus 2308 to host cells by transcriptional rewiring of the trimeric autotransporter btaE gene*. Mol Microbiol, 2017. **103**(3): p. 553-565.
148. B. Bachvarov, K.K.I.I., *Codon Usage in Prokaryotes*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2008. **22**(2): p. 669-682.
149. Higgs, P.G. and W. Ran, *Coevolution of codon usage and tRNA genes leads to alternative stable states of biased codon usage*. Mol Biol Evol, 2008. **25**(11): p. 2279-91.
150. Doyle, M.T., E.N. Tran, and R. Morona, *The passenger-associated transport repeat promotes virulence factor secretion efficiency and delineates a distinct autotransporter subtype*. Mol Microbiol, 2015. **97**(2): p. 315-29.
151. Emsley, P., et al., *Structure of Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin*. Nature, 1996. **381**(6577): p. 90-2.
152. Benz, I. and M.A. Schmidt, *AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic Escherichia coli strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule*. Mol Microbiol, 1992. **6**(11): p. 1539-46.
153. Merhej, V., et al., *Massive comparative genomic analysis reveals convergent evolution of specialized bacteria*. Biol Direct, 2009. **4**: p. 13.
154. Prentki, P. and H.M. Krisch, *In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment*. Gene, 1984. **29**(3): p. 303-13.
155. Quandt, J. and M.F. Hynes, *Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria*. Gene, 1993. **127**(1): p. 15-21.
156. Schafer, A., et al., *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, 1994. **145**(1): p. 69-73.
157. Kovach, M.E., et al., *pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector*. Biotechniques, 1994. **16**(5): p. 800-2.
158. Salcedo, S.P., et al., *Pathogenic brucellae replicate in human trophoblasts*. J Infect Dis, 2013. **207**(7): p. 1075-83.
159. Delpino, M.V., C.A. Fossati, and P.C. Baldi, *Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with Brucella spp.* Infect Immun, 2009. **77**(3): p. 984-95.
160. White, P.G. and J.B. Wilson, *Differentiation of smooth and nonsmooth colonies of Brucellae*. J Bacteriol, 1951. **61**(2): p. 239-40.
161. de Figueiredo, P., et al., *Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions*. Am J Pathol, 2015. **185**(6): p. 1505-17.
162. Moreno, E., et al., *Immunochemical characterization of Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides*. Infect Immun, 1981. **31**(1): p. 214-22.
163. Biedzka-Sarek, M., R. Venho, and M. Skurnik, *Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of Yersinia enterocolitica Serotype O:3*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 2232-44.

164. Attia, A.S., et al., *The UspA2 protein of Moraxella catarrhalis is directly involved in the expression of serum resistance*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 2400-10.
165. Hallez, R., et al., *The asymmetric distribution of the essential histidine kinase PdhS indicates a differentiation event in Brucella abortus*. EMBO J, 2007. **26**(5): p. 1444-55.
166. Liautard, J.P., et al., *Interactions between professional phagocytes and Brucella spp*. Microbiologia, 1996. **12**(2): p. 197-206.
167. Moreno, E., A. Cloeckert, and I. Moriyon, *Brucella evolution and taxonomy*. Vet Microbiol, 2002. **90**(1-4): p. 209-27.
168. Hoyer, B.H. and N.B. McCullough, *Polynucleotide homologies of Brucella deoxyribonucleic acids*. J Bacteriol, 1968. **95**(2): p. 444-8.
169. Hoyer, B.H. and N.B. McCullough, *Homologies of deoxyribonucleic acids from Brucella ovis, canine abortion organisms, and other Brucella species*. J Bacteriol, 1968. **96**(5): p. 1783-90.
170. Verger, J.M.M.G., *Brucella, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization*. Int. J. Syst. Bacteriology, 1985. **35**: p. 292-295.
171. Gandara, B., et al., *Limited genetic diversity of Brucella spp*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(1): p. 235-40.
172. Gill, M.J.C.K.P.W., *Methods for the identification of Brucella*. 1983.
173. Moreno, E.M.I., *The prokaryotes: an evolving microbiological resource for the microbiological community*, ed. M. Dworkin. 2001, New York: Springer.
174. McCarthy, J.E. and R. Brimacombe, *Prokaryotic translation: the interactive pathway leading to initiation*. Trends Genet, 1994. **10**(11): p. 402-7.
175. Chaney, J.L. and P.L. Clark, *Roles for Synonymous Codon Usage in Protein Biogenesis*. Annu Rev Biophys, 2015. **44**: p. 143-66.
176. Johnsson, P., et al., *A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(4): p. 440-6.
177. Zheng, D., et al., *Pseudogenes in the ENCODE regions: consensus annotation, analysis of transcription, and evolution*. Genome Res, 2007. **17**(6): p. 839-51.
178. Williams, D.L., et al., *Implications of high level pseudogene transcription in Mycobacterium leprae*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 397.
179. Ferrero, M.C., et al., *Brucella invasion of human intestinal epithelial cells elicits a weak proinflammatory response but a significant CCL20 secretion*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012. **66**(1): p. 45-57.
180. Tsois, R.M., et al., *From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(12): p. 883-92.
181. Delpino, M.V., et al., *A bile salt hydrolase of Brucella abortus contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice*. Infect Immun, 2007. **75**(1): p. 299-305.
182. Paixao, T.A., et al., *Establishment of systemic Brucella melitensis infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen*. Infect Immun, 2009. **77**(10): p. 4197-208.
183. Ilver, D., et al., *Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging*. Science, 1998. **279**(5349): p. 373-7.
184. Mahdavi, J., et al., *Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation*. Science, 2002. **297**(5581): p. 573-8.
185. Metcalfe, J.W., et al., *Characterization and identification of a porcine small intestine mucus receptor for the K88ab fimbrial adhesin*. Infect Immun, 1991. **59**(1): p. 91-6.

186. Gerlach, R.G. and M. Hensel, *Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens*. Int J Med Microbiol, 2007. **297**(6): p. 401-15.
187. Juge, N., *Microbial adhesins to gastrointestinal mucus*. Trends Microbiol, 2012. **20**(1): p. 30-9.
188. Adetunji, S.A., et al., *A systematic review and meta-analysis of the prevalence of osteoarticular brucellosis*. PLoS Negl Trop Dis, 2019. **13**(1): p. e0007112.
189. Turan, H., et al., *Osteoarticular involvement among 202 brucellosis cases identified in Central Anatolia region of Turkey*. Intern Med, 2011. **50**(5): p. 421-8.
190. Wong, T.M., et al., *Septic arthritis caused by Brucella melitensis in urban Shenzhen, China: a case report*. J Med Case Rep, 2014. **8**: p. 367.
191. Gotuzzo, E., et al., *Articular involvement in human brucellosis: a retrospective analysis of 304 cases*. Semin Arthritis Rheum, 1982. **12**(2): p. 245-55.
192. Yurdakul, T., et al., *Epididymo-orchitis as a complication of brucellosis*. Urol Int, 1995. **55**(3): p. 141-2.
193. Lambris, J.D., D. Ricklin, and B.V. Geisbrecht, *Complement evasion by human pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(2): p. 132-42.
194. Fernandez, R.C. and A.A. Weiss, *Cloning and sequencing of a Bordetella pertussis serum resistance locus*. Infect Immun, 1994. **62**(11): p. 4727-38.
195. Marr, N., et al., *Bordetella pertussis autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20585.
196. de Jong, M.F., H.G. Rolan, and R.M. Tsolis, *Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: Brucella*. Cell Microbiol, 2010. **12**(9): p. 1195-202.
197. Martirosyan, A. and J.P. Gorvel, *Brucella evasion of adaptive immunity*. Future Microbiol, 2013. **8**(2): p. 147-54.
198. Rautemaa, R. and S. Meri, *Complement-resistance mechanisms of bacteria*. Microbes Infect, 1999. **1**(10): p. 785-94.
199. Hoffmann, E.M. and J.J. Houle, *Failure of Brucella abortus lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement*. Vet Immunol Immunopathol, 1983. **5**(1): p. 65-76.
200. Goldberg, M.B., et al., *Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a Shigella flexneri protein involved in intracellular movement*. J Bacteriol, 1993. **175**(8): p. 2189-96.
201. Steinhauer, J., et al., *The unipolar Shigella surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface*. Mol Microbiol, 1999. **32**(2): p. 367-77.
202. Van der Henst, C., et al., *The histidine kinase PdhS controls cell cycle progression of the pathogenic alphaproteobacterium Brucella abortus*. J Bacteriol, 2012. **194**(19): p. 5305-14.
203. Judd, P.K., R.B. Kumar, and A. Das, *The type IV secretion apparatus protein VirB6 of Agrobacterium tumefaciens localizes to a cell pole*. Mol Microbiol, 2005. **55**(1): p. 115-24.
204. Tomlinson, A.D. and C. Fuqua, *Mechanisms and regulation of polar surface attachment in Agrobacterium tumefaciens*. Curr Opin Microbiol, 2009. **12**(6): p. 708-14.
205. Fritts, R.K., et al., *A Rhizobiales-Specific Unipolar Polysaccharide Adhesin Contributes to Rhodospseudomonas palustris Biofilm Formation across Diverse Photoheterotrophic Conditions*. Appl Environ Microbiol, 2017. **83**(4).
206. Skerker, J.M. and M.T. Laub, *Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in Caulobacter crescentus*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(4): p. 325-37.
207. Kirkpatrick, C.L. and P.H. Viollier, *Reflections on a sticky situation: how surface contact pulls the trigger for bacterial adhesion*. Mol Microbiol, 2012. **83**(1): p. 7-9.

208. Selkrig, J., et al., *Conserved features in TamA enable interaction with TamB to drive the activity of the translocation and assembly module*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12905.
209. Dohmer, P.H., et al., *Identification of a type IV secretion substrate of Brucella abortus that participates in the early stages of intracellular survival*. Cell Microbiol, 2014. **16**(3): p. 396-410.
210. Moriyón, I. and I. López-Goñi, *Structure and properties of the outer membranes of Brucella abortus and Brucella melitensis*. Int Microbiol, 1998. **1**(1): p. 19-26.
211. Freer, E., et al., *The outer membrane of Brucella ovis shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough Brucella abortus strains*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 6181-6.
212. Vassen, V., et al., *Localized incorporation of outer membrane components in the pathogen Brucella abortus*. EMBO J, 2019.
213. Gamazo, C., et al., *Brucella group 3 outer membrane proteins contain a heat-modifiable protein*. FEMS Microbiol Lett, 1993. **112**(2): p. 141-6.
214. Chang, Y.Y. and J.E. Cronan, Jr., *Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1999. **33**(2): p. 249-59.
215. Gatsos, X., et al., *Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(6): p. 995-1009.
216. Mobasheri, H., et al., *Brucella Omp2a and Omp2b porins: single channel measurements and topology prediction*. FEMS Microbiol Lett, 1997. **155**(1): p. 23-30.
217. Salhi, I., et al., *Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of Brucella spp*. Infect Immun, 2003. **71**(8): p. 4326-32.
218. Tibor, A., B. Decelle, and J.J. Letesson, *Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of Brucella spp. are lipoproteins*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4960-2.
219. Cloeckaert, A., et al., *Identification of seven surface-exposed Brucella outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay*. Infect Immun, 1990. **58**(12): p. 3980-7.
220. Martin-Martin, A.I., et al., *Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical Brucella species*. Vet Microbiol, 2009. **137**(1-2): p. 74-82.
221. Caro-Hernandez, P., et al., *Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of Brucella ovis*. Infect Immun, 2007. **75**(8): p. 4050-61.
222. Posadas, D.M., et al., *The TolC homologue of Brucella suis is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence*. Infect Immun, 2007. **75**(1): p. 379-89.
223. Magnet, S., et al., *Identification of the L,D-transpeptidases for peptidoglycan cross-linking in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2008. **190**(13): p. 4782-5.
224. Grangeon, R., et al., *PopZ identifies the new pole, and PodJ identifies the old pole during polar growth in Agrobacterium tumefaciens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(37): p. 11666-71.
225. Cameron, T.A., et al., *Peptidoglycan synthesis machinery in Agrobacterium tumefaciens during unipolar growth and cell division*. MBio, 2014. **5**(3): p. e01219-14.
226. Cook, P.D. and H.M. Holden, *GDP-perosamine synthase: structural analysis and production of a novel trideoxysugar*. Biochemistry, 2008. **47**(9): p. 2833-40.
227. Gamazo, C. and I. Moriyón, *Release of outer membrane fragments by exponentially growing Brucella melitensis cells*. Infect Immun, 1987. **55**(3): p. 609-15.



228. Lamontagne, J., et al., *Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in Brucella abortus*. J Proteome Res, 2007. **6**(4): p. 1519-29.
229. Conde-Alvarez, R., et al., *The lipopolysaccharide core of Brucella abortus acts as a shield against innate immunity recognition*. PLoS Pathog, 2012. **8**(5): p. e1002675.
230. Manterola, L., et al., *The lipopolysaccharide of Brucella abortus BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides*. J Bacteriol, 2005. **187**(16): p. 5631-9.
231. Francis, N., et al., *CtrA controls cell division and outer membrane composition of the pathogen Brucella abortus*. Mol Microbiol, 2017. **103**(5): p. 780-797.
232. Kulp, A. and M.J. Kuehn, *Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles*. Annu Rev Microbiol, 2010. **64**: p. 163-84.
233. Boigegrain, R.A., et al., *Release of periplasmic proteins of Brucella suis upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5693-703.
234. Deatherage, B.L., et al., *Biogenesis of bacterial membrane vesicles*. Mol Microbiol, 2009. **72**(6): p. 1395-407.
235. Sonntag, I., et al., *Cell envelope and shape of Escherichia coli: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins*. J Bacteriol, 1978. **136**(1): p. 280-5.
236. Katsui, N., et al., *Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1982. **151**(3): p. 1523-31.
237. Mug-Opstelten, D. and B. Witholt, *Preferential release of new outer membrane fragments by exponentially growing Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 1978. **508**(2): p. 287-95.
238. Kesty, N.C. and M.J. Kuehn, *Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into Escherichia coli outer membrane vesicles*. J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 2069-76.
239. Haurat, M.F., W. Elhenawy, and M.F. Feldman, *Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles*. Biol Chem, 2015. **396**(2): p. 95-109.
240. Gerding, M.A., et al., *The trans-envelope Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in E. coli*. Mol Microbiol, 2007. **63**(4): p. 1008-25.
241. Bernadac, A., et al., *Escherichia coli tol-pal mutants form outer membrane vesicles*. J Bacteriol, 1998. **180**(18): p. 4872-8.
242. Webster, R.E., *The tol gene products and the import of macromolecules into Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1991. **5**(5): p. 1005-11.
243. Gallant, C.V., et al., *Membrane morphology and leukotoxin secretion are associated with a novel membrane protein of Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J Bacteriol, 2008. **190**(17): p. 5972-80.
244. De Bolle, X., et al., *Brucella abortus Cell Cycle and Infection Are Coordinated*. Trends Microbiol, 2015. **23**(12): p. 812-21.
245. Degtelt, M., et al., *G1-arrested newborn cells are the predominant infectious form of the pathogen Brucella abortus*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4366.
246. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
247. Jacobsson, K., et al., *Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins*. Biol Proced Online, 2003. **5**: p. 123-135.
248. Kovach, M.E., et al., *Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes*. Gene, 1995. **166**(1): p. 175-6.

249. Sycz, G., et al., *LOV Histidine Kinase Modulates the General Stress Response System and Affects the virB Operon Expression in Brucella abortus*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0124058.
250. Rouot, B., et al., *Production of the type IV secretion system differs among Brucella species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera*. Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1075-82.
251. Heesemann, J., et al., *Plasmids of human strains of Yersinia enterocolitica: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis*. J Infect Dis, 1983. **147**(1): p. 107-15.
252. Garin-Bastuji, B., et al., *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among Brucella biovars related to A and M specificities*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(10): p. 2169-74.
253. Moreno, E., et al., *Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from Brucella abortus*. J Bacteriol, 1979. **138**(2): p. 361-9.
254. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
255. Nielsen, K.H., et al., *Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis*. Vet Immunol Immunopathol, 1995. **46**(3-4): p. 285-91.
256. Cloeckaert, A., et al., *Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough Brucella melitensis strain B115*. J Gen Microbiol, 1993. **139**(7): p. 1551-6.
257. Plommet, M., *Minimal requirements for growth of Brucella suis and other Brucella species*. Zentralbl Bakteriologie, 1991. **275**(4): p. 436-50.
258. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
259. Klingman, K.L. and T.F. Murphy, *Purification and characterization of a high-molecular-weight outer membrane protein of Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. Infect Immun, 1994. **62**(4): p. 1150-5.
260. Cloeckaert, A., et al., *Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of Brucella*. J Med Microbiol, 1991. **34**(3): p. 175-80.
261. Tsai, C.M. and C.E. Frasch, *A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels*. Anal Biochem, 1982. **119**(1): p. 115-9.
262. Serruto, D., et al., *HadA is an atypical new multifunctional trimeric coiled-coil adhesin of Haemophilus influenzae biogroup aegyptius, which promotes entry into host cells*. Cell Microbiol, 2009. **11**(7): p. 1044-63.
263. Wolf, Y.I. and E.V. Koonin, *A tight link between orthologs and bidirectional best hits in bacterial and archaeal genomes*. Genome Biol Evol, 2012. **4**(12): p. 1286-94.
264. Finn, R.D., et al., *Pfam: the protein families database*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D222-30.
265. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
266. Bendtsen, J.D., et al., *Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0*. J Mol Biol, 2004. **340**(4): p. 783-95.
267. Shen, H.B. and K.C. Chou, *Gneg-mPLoc: a top-down strategy to enhance the quality of predicting subcellular localization of Gram-negative bacterial proteins*. J Theor Biol, 2010. **264**(2): p. 326-33.
268. Edgar, R.C., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(5): p. 1792-7.

269. Hofmann, K. and W. Stoffel, *TMbase - A database of membrane spanning proteins segments*, in *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 1993.
270. Wilkins, M.R., et al., *Protein identification and analysis tools in the ExPASy server*. *Methods Mol Biol*, 1999. **112**: p. 531-52.
271. Price, M.N., et al., *A novel method for accurate operon predictions in all sequenced prokaryotes*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(3): p. 880-92.
272. Kelley, L.A., et al., *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis*. *Nat Protoc*, 2015. **10**(6): p. 845-58.
273. Drozdetskiy, A., et al., *JPred4: a protein secondary structure prediction server*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(W1): p. W389-94.