UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Adaptación de *Brucella* al entorno intracelular en su hospedador: solapamiento entre mecanismos de homeostasis de metales y redes transcripcionales de virulencia

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

Lic. Gastón Ezequiel Amato

Director de Tesis: Dr. Rodrigo Sieira

Codirector de Tesis: Dra. Angeles Zorreguieta

Consejero de Estudios: Dra. Paula María Tribelli

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET

Buenos Aires, 2025

Adaptación de *Brucella* al entorno intracelular en su hospedador: solapamiento entre mecanismos de homeostasis de metales y redes transcripcionales de virulencia

En esta Tesis, combinamos enfoques *in silico* y experimentales para identificar factores de transcripción que interfieren con el regulón de VjbR, el principal regulador de virulencia de *Brucella*. Los procedimientos aquí descritos nos permitieron identificar cuatro de motivos de secuencia de ADN conservados en promotores blanco de VjbR, los cuales podrían funcionar como sitios de unión para reguladores adicionales.

El análisis de tres de estos motivos llevó a la identificación de un elemento genético altamente conservado y presente en múltiples copias en el genoma de *Brucella*, el cual podría corresponder a un elemento BIME (del inglés, *bacterial interspersed mosaic element*), con un potencial rol en la estructuración del cromosoma bacteriano. Habiendo descartado dichos motivos como sitios de unión de factores de transcripción, centramos nuestra atención en el cuarto motivo. Éste último mostró similitud con sitios de unión de factores de transcripción pertenecientes a la familia de reguladores Fur (*Ferric-uptake regulator*).

El análisis de la actividad promotora reveló una correlación entre la presencia del motivo tipo Fur identificado *in silico* y una regulación transcripcional dependiente de hierro (Fe) y manganeso (Mn) en diversos genes blanco de VjbR. Utilizando herramientas genéticas identificamos a Fur4 y Mur, dos reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia Fur, como responsables de la regulación dependiente de metales de transición observada en los promotores analizados. La determinación de los sitios de unión de estos reguladores mostró diferentes grados de superposición con el motivo tipo Fur, lo que respalda la correlación entre su presencia y la regulación transcripcional dependiente de metales. Además, ensayos de infección en macrófagos demostraron el rol de Fur4 y Mur en la regulación *in vivo* de la expresión de factores clave de virulencia, como el sistema de secreción de tipo IV codificado por el operón *virB*.

Nuestros resultados aportan evidencia de una red transcripcional en la cual la inducción de la expresión génica mediada por VjbR es contrarrestada por la actividad de factores de transcripción que responden a cambios en las concentraciones de Fe y/o Mn. Estos hallazgos tienen importantes implicancias para la comprensión de los mecanismos mediante los cuales *Brucella* percibe señales ambientales que regulan la expresión de genes de virulencia durante la adaptación al entorno intracelular.

Palabras clave: *Brucella*, redes transcripcionales, virulencia, VjbR, Fur, metalostasis

Adaptation of *Brucella* to the intracellular environment in its host: overlap between metal homeostasis mechanisms and virulence transcriptional networks

In this Thesis, we combined *in silico* and experimental approaches to identify transcription factors that interfere with the VjbR regulon, the main virulence regulator in *Brucella*. The procedures described herein allowed us to identify a set of conserved DNA sequence motifs in VjbR target promoters, which may function as binding sites for additional regulators.

The analysis of the first three motifs led to the identification of a highly conserved genetic element with multiple copies in the *Brucella* genome, which may correspond to a BIME (*bacterial interspersed mosaic element*), potentially involved in the structural organization of the bacterial chromosome. After ruling out these motifs as transcription factor binding sites, we focused our attention on the fourth motif. The latter showed similarity to binding sites of transcription factors belonging to the Fur (ferric uptake regulator) family.

Promoter activity analyses revealed a correlation between the presence of the Fur-like motif and transcriptional regulation dependent on iron (Fe) and manganese (Mn) in several VjbR target genes. Using genetic tools, we identified Fur4 and Mur, two transcriptional regulators of the Fur family, as responsible for the metal-dependent regulation observed in the analyzed promoters. Mapping of the binding sites of these regulators showed varying degrees of overlap with the Fur-like motif identified *in silico*, supporting the observed correlation between the presence of the motif and metal-dependent transcriptional regulation. Moreover, macrophage infection assays revealed the role of Fur4 and Mur in the *in vivo* regulation of key virulence factors, such as the type IV secretion system encoded by the *virB* operon.

Our results provide evidence of a transcriptional network in which VjbR-mediated gene induction is counteracted by the activity of transcription factors responsive to changes in Fe and/or Mn concentrations. These findings have significant implications for our understanding of the mechanisms involved in the perception of environmental signals that govern virulence gene expression during *Brucella*'s intracellular adaptation.

Keywords: *Brucella*, transcriptional networks, virulence, VjbR, Fur, metallostasis

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, particularmente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por brindarme toda mi formación como científico.

Al Dr. Rodrigo Sieira y la Dra. Angeles Zorreguieta por darme la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Microbiología Molecular y Celular, y por la dirección y el apoyo brindados a lo largo de todo el proceso de elaboración de esta Tesis.

A mis compañeros/as del Laboratorio, que me brindaron su compañía, apoyo y ayuda constante: Magalí, Julián, Lila, Daniela, Luciana, Gabriela, Julieta y Tadeo.

A todos los grupos de investigación del Instituto Leloir que me han brindado su ayuda, en especial los grupos dirigidos por la Dra. Gamarnik, el Dr. Yanovsky y la Dra. Capdevila.

A todo el personal que conforma la Fundación Instituto Leloir, quienes, con su labor diario, permiten que sea posible llevar a cabo todas las investigaciones científicas en las mejores condiciones. Ha sido un honor para mí formar parte y hacer mi aporte a la tradición científica de excelencia de esta institución.

A los miembros de mis comités de seguimiento de Tesis, tanto del Instituto Leloir como de la Facultad: Dra. Andrea Gamarnik, Dra. Lucía Chemes, Dr. Javier Iserte, Dra. Paula Tribelli, Dra. Julia Pettinari y Dra. Karina Pasquevich.

Al CONICET por otorgarme la beca interna doctoral para poder dedicarme a la realización de esta Tesis. A la Agencia I+D+i por los subsidios otorgados para la realización de todos los procedimientos experimentales.

A mi familia y amigos por el apoyo y la contención.

Índice

Introducción……1 - 27

1. Historia……..1

2. Brucelosis……1

3. *Brucella* spp……3

4. El ciclo de vida intracelular de *Brucella*……...5

5. Sistema de secreción tipo IV VirB……..……..7

5.1 Regulación transcripcional del operón *virB*……8

6. Adaptación de *Brucella* al ambiente intracelular del hospedador……14

6.1 Homeostasis de metales y virulencia……14

7. Reguladores de la familia Fur en *Brucella*……16

7.1 Irr……...18

7.2 Mur……...19

7.3 PerR……20

7.4 Zur……21

8. Reguladores de homeostasis de metales adicionales: RirA y ZntR……22

9. Antecedentes Experimentales……23

9.1 Análisis global de la red regulatoria de VjbR……23

Hipótesis y Objetivos……28

Resultados……29 - 46

1. Análisis de los motivos A, B, y C presentes en promotores blanco de VjbR……..29

2. Análisis funcional del motivo tipo Fur en promotores blanco de VjbR……33

2.1 Mur y Fur4 están involucrados en la represión dependiente de metales de la actividad de promotores blanco de VjbR……...34

3. Fur4 y Mur interaccionan directamente con los promotores blanco de VjbR……36

4. Determinación de secuencias consenso de unión de Fur4 y Mur……40

5. Replicación intracelular de mutantes *mur* y *fur4*……43

6. Rol de Fur4 y Mur en la regulación de la expresión intracelular del operón *virB*…...45

Discusión……..47 - 51

Conclusiones……...52

Materiales y Métodos……53 - 62

1. Cepas bacterianas y medios de cultivo……53

1.2 Conservación de cepas bacterianas……..53

2. Aislamiento, purificación y manipulación de ADN……53

2.1 Preparación de ADN genómico de *Brucella*……..53

2.2 Preparación de ADN plasmídico de *E. coli*……54

2.3 Electroforesis de ADN……..54

2.4 Clonado de fragmentos de ADN en vectores plasmídicos……55

3. Transferencia de vectores plasmídicos a cepas bacterianas……55

3.1 Preparación de *E. coli* DH5a competentes por shock térmico y transformación……...55

3.2 Preparación de *E. coli* S17 electrocompetentes y transformación……55

3.3 Conjugación biparental en placa……56

4. Amplificación de secuencias mediante PCR……56

4.1 *Colony* PCR……56

4.2 PCR de extensión por superposición……57

5. Construcción de vectores plasmídicos……..57

6. Construcción de cepas mutantes……...58

7. Construcción de cepas con fusiones transcripcionales cromosómicas de copia única……59

8. Medición de la actividad β-galactosidasa……59

9. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y tinciones……59

10. Expresión y purificación de proteínas recombinantes……..60

11. Preparación de extractos proteicos de *Brucella*……60

12. Ensayo de protección a la ADNasa I……...61

13. Ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA)……..61

14. Ensayos de infección celular……62

14.1 Experimentos de replicación intracelular……62

14.2 Actividad intracelular del promotor *virB1*……62

15. Análisis estadístico……62

Anexo……63 - 66

Tabla Suplementaria 1. Lista de cepas empleadas……63

Tabla Suplementaria 2. Lista de plásmidos empleados……..64

Tabla suplementaria 3. Lista de oligonucleótidos empleados……..65

Listado de abreviaturas……...66

Bibliografía……67 - 82

Introducción

1. Historia

Una vez finalizada la Guerra de Crimea, el cirujano general de las fuerzas británicas, Jeffrey Allen Marston (1831-1911), fue destinado a Malta. En 1863, publicó un informe sobre una fiebre peculiar, que él mismo había padecido, y que describió como “ondulante” [1]. En 1884, el médico militar David Bruce (1855-1931), acompañado de su esposa Mary Elizabeth Bruce, una destacada microbióloga, también fue destinado a Malta. Ellos retomaron las observaciones de Marston y, al aislar un pequeño germen a partir del bazo de un paciente fallecido, publicaron sus hallazgos en 1887. En 1893, tras demostrar su papel causal mediante inoculación en monos, Bruce nombró a la bacteria *Micrococcus melitensis* [2].

Por otro lado, ya a principios del siglo XIX, en Inglaterra, algunos médicos habían observado la contagiosidad de los abortos en los rebaños. En 1895, el veterinario danés Bernhard Lauritz Frederik Bang aisló e identificó el agente causal en los productos abortivos de las vacas. Este descubrimiento consistió en un bacilo Gram-negativo, de difícil cultivo, pero que al ser inoculado en una hembra sana preñada, causaba un aborto. Esta bacteria, bautizada como *Bacillus abortus*, era la responsable de la "enfermedad de Bang" en el ganado.

En respuesta a la “fiebre mediterránea” que afectaba a las tropas británicas en Malta, la Real Sociedad de Medicina creó una comisión de investigación dirigida por David Bruce. En 1905, Temístocles Zammit (1864-1935) descubrió la presencia de *Micrococcus melitensis* en la sangre de cabras, concluyendo que la enfermedad era una zoonosis. Este hallazgo permitió confirmar que la infección en humanos se producía por la ingestión de leche cruda de cabra. Como resultado, en 1906 se prohibió el consumo de leche de cabra sin hervir para las fuerzas navales y militares de la isla. Gracias a esta medida, en menos de un año, la fiebre de Malta fue prácticamente erradicada de las tropas británicas en la isla (de 643 casos en 1905 a solo 7 casos en 1907).

La unificación de la bacteriología veterinaria y médica fue realizada por la bacterióloga estadounidense Alice Catherine Evans (1881-1975). En 1918, Evans demostró que el *Bacillus abortus* (causante de la enfermedad bovina) era similar al *Micrococcus melitensis* (responsable de la enfermedad humana y caprina). En 1920, se adoptó el término genérico *Brucella* en honor a Bruce. Las dos primeras especies descritas fueron *Brucella abortus* (más común en bovinos) y *Brucella melitensis* (más común en pequeños rumiantes). El tercer miembro del grupo, *Brucella suis*, fue cultivado en 1914 a partir de un feto de cerdo expulsado prematuramente en EE. UU. [3]

2. Brucelosis

Las bacterias del género *Brucella* son cocobacilos Gram-negativos responsables de la zoonosis conocida como brucelosis. Esta enfermedad se caracteriza por infecciones crónicas, abortos e infertilidad en animales, además de generar importantes pérdidas económicas en la producción ganadera. En los animales, *Brucella* provoca infecciones generalizadas que se localizan principalmente en los órganos reproductivos y el sistema retículo-endotelial. La principal fuente de infección es el animal infectado

que excreta grandes cantidades de bacterias a través de productos abortivos, leche, y en menor medida en secreciones genitales y orina. De este modo, los animales enfermos contribuyen a la contaminación del entorno y a la diseminación del microorganismo [4]. Además de las especies de animales de interés económico, existen reservorios en fauna silvestre, cuya incidencia ha aumentado en los últimos años. Estos reservorios representan una fuente de reinfección para el ganado [5]. La diversidad tanto de hospedadores como de especies dentro del género *Brucella* complica la erradicación de la enfermedad [6, 7].

En los seres humanos, la infección puede ocurrir por el consumo de alimentos contaminados y crudos, como leche y productos lácteos no pasteurizados, o por exposición directa a animales infectados y sus productos (sangre, placenta, fetos, secreciones uterinas, orina). Las bacterias pueden ingresar al organismo a través de cortes o abrasiones, por vía oral al ingerir alimentos contaminados, por contacto con aerosoles o por inhalación de los mismos [8]. La brucelosis humana es más frecuente en regiones como el Mediterráneo, el Medio Oriente y Latinoamérica, donde la enfermedad es endémica. En países más desarrollados, con medidas estrictas de higiene y control alimentario, la brucelosis está asociada a ciertas profesiones, como veterinarios, carniceros, personal de frigoríficos, laboratorios, agricultores y ganaderos [9]. Aunque las infecciones de persona a persona son muy raras, se han reportado casos aislados, como por transfusión sanguínea o trasplante de médula [10–12].

El control de la brucelosis en los seres humanos depende de la implementación de programas de vacunación en el ganado, así como de la vigilancia epidemiológica en la población expuesta. El diagnóstico temprano es esencial para evitar complicaciones secundarias asociadas a la cronicidad de la enfermedad. Además, dado que algunos individuos pueden ser asintomáticos, un diagnóstico preciso es crucial, especialmente en áreas endémicas. Las estrategias de control se basan en la prevención de los factores de riesgo, y la vigilancia juega un papel clave en la gestión de programas de prevención y control. Según la OMS, cada año se registran aproximadamente medio millón de casos de brucelosis en humanos a nivel mundial. Sin embargo, debido a que sus síntomas se pueden confundir con los de otras enfermedades y los controles diagnósticos suelen ser insuficientes, se estima que solo el 4% de los casos son diagnosticados correctamente [13, 14].

La brucelosis ocasiona importantes pérdidas en la producción ganadera en el mundo, incluida Argentina, y genera restricciones en el comercio de animales y productos derivados [15–17]. Las principales consecuencias económicas de la enfermedad son abortos, reducción de la fertilidad (incluso infertilidad), nacimientos de animales débiles, pérdida de peso y disminución de la producción de leche [18, 19]. Las especies *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* son las que tienen mayor impacto económico. En América Latina, se estima que la brucelosis bovina provoca pérdidas millonarias; por ejemplo, en Brasil las pérdidas alcanzan los US$ 448 millones [20]. Junto con la tuberculosis bovina, la brucelosis fue una de las principales causas de pérdidas en la ganadería durante el siglo XX. Por esta razón, existen regulaciones internacionales que restringen el movimiento y comercio de animales infectados por cualquiera de estas especies.

En Argentina, la brucelosis humana está especialmente vinculada con la infección en cabras en la zona oeste del país, y en ganado bovino y porcino en el este. En los centros urbanos, los frigoríficos son una de las principales fuentes de infección [21]. Un estudio realizado entre 1994 y 2017 reveló que la cepa más prevalente en

humanos es *B. suis*, con un 48% de los aislamientos (información cedida por la Dra. Gabriela Escobar*, Centro de Referencia de Brucelosis,* INEI – ANLIS Malbrán), probablemente debido a la falta de control sanitario y vacunación en porcinos. En 1982, se estableció la obligatoriedad de la vacunación de terneras de entre 3 y 8 meses con la cepa S19 de *B. abortus* en todo el territorio nacional, según la Resolución 73/82 del SENASA. A partir de 1998, se autorizó el uso de la vacuna *B. abortus* RB51 en terneros de sexo femenino mayores de 10 meses y con un máximo de tres meses de preñez. Además, en esa misma fecha se implementó la vacunación simultánea contra la brucelosis y la fiebre aftosa. En ese momento, la cobertura de vacunación de terneras con la cepa S19 alcanzó un 95% [22]. Sin embargo, la infección en el ganado bovino no fue erradicada por completo [23], ni tampoco se logró controlar la infección causada por otras especies de *Brucella*, ni prevenir la transmisión de *B. abortus* a otros hospedadores. Según un muestreo realizado en 2004 por el SENASA, la prevalencia de animales infectados fue de 2,15% y la de predios positivos para brucelosis fue del 12,4%. En el estudio de 2014 (el más reciente disponible), la prevalencia de animales infectados disminuyó al 0,81%, lo que representa una reducción estadísticamente significativa en 10 años (p-valor <0,05). Sin embargo, la prevalencia de predios positivos se mantuvo en 12,35%, con una distribución similar a la observada en 2004 [24].

En 2019, el SENASA estableció un nuevo Plan Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis Bovina (Resolución N° 67/2019). Este plan obliga a los propietarios de rodeos donde se realicen actividades de reproducción a realizar una Determinación Obligatoria de Estatus Sanitario (DOES) de Brucelosis, la cual consiste en un diagnóstico serológico a todos los animales susceptibles del establecimiento. Además, con la Resolución 957/2024, se incluye en el plan la posibilidad de realizar una vacunación estratégica voluntaria de hembras adultas utilizando las cepas RB51 y Delta-PGM (de fabricación nacional), para su aplicación en establecimientos con casos registrados.

En cuanto al ganado caprino, existe la vacuna Rev1, que utiliza una cepa atenuada. Al igual que las cepas S19 y RB51 de *B. abortus*, esta cepa resulta virulenta para los humanos. A pesar de la alta prevalencia de brucelosis caprina en el país, el uso de esta vacuna fue autorizado en Argentina recién a fines de 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 brucelosis en ganado [25, 26]. Sin embargo, siendo estas cepas patogénicas para los humanos, existe riesgo de contraer la enfermedad al momento de administrarlas [19]. Actualmente, no existen vacunas aprobadas para porcinos, y el control sanitario de estos animales en el país es deficiente, por lo que no se dispone de información estadística confiable sobre la incidencia de *B. suis* en Argentina.

3. *Brucella* spp

El género *Brucella* forma parte de la familia *Brucellaceae*, la cual está incluida en el orden *Rhizobiales* dentro de la clase α-Proteobacteria [27, 28]. Esta clase agrupa organismos que pueden ser patógenos de animales (como *Brucella spp.*, *Bartonella spp.*, *Rickettsia spp.*) o de plantas (por ejemplo, *Agrobacterium spp.*), así como simbiontes (como *Rhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.* y *Bradyrhizobium spp.*), además

de organismos que habitan el suelo, como es el caso de *Ochrobactrum spp.*, un patógeno oportunista.

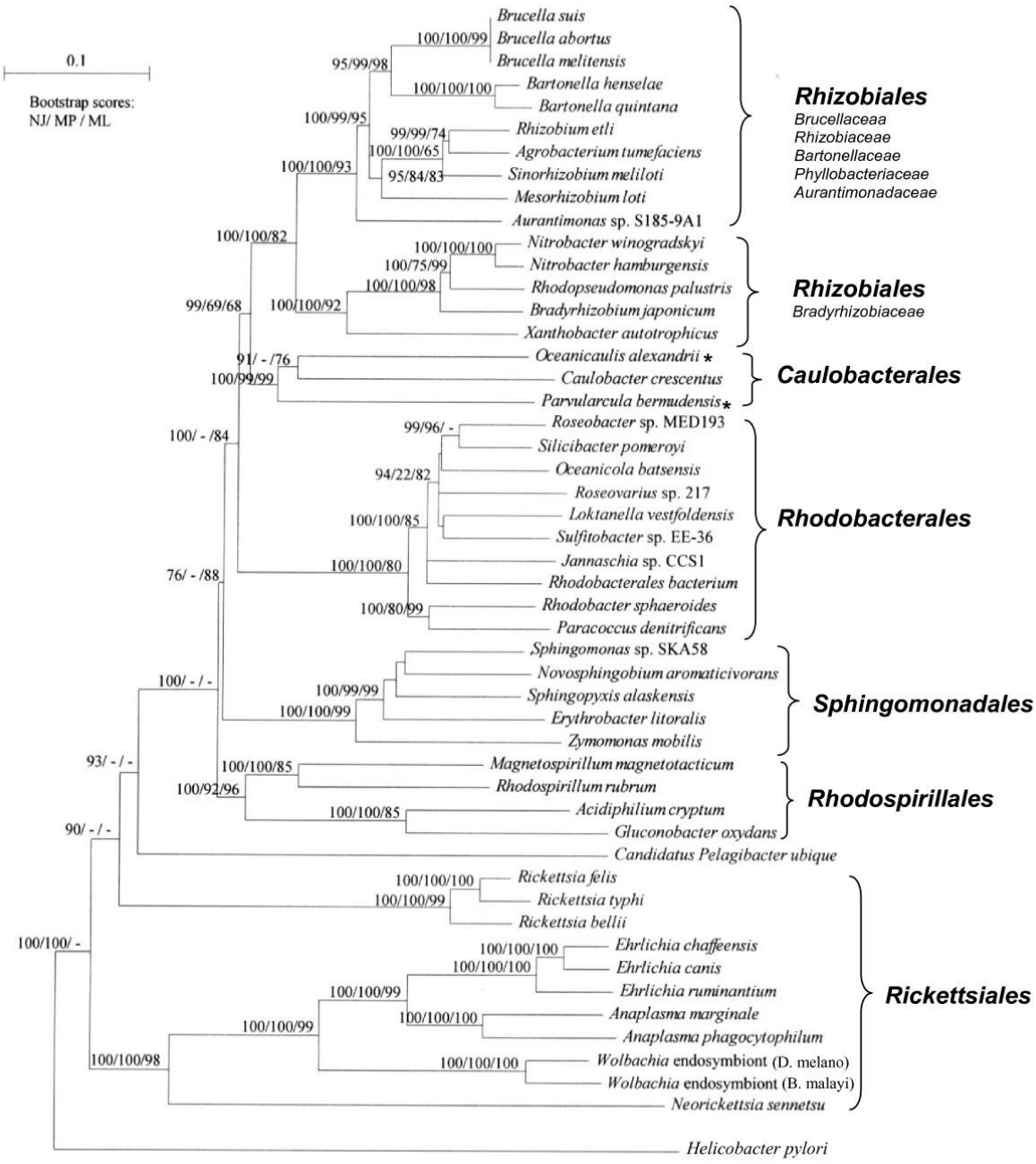


Figura 1. Árbol filogenético de la clase α-proteobacteria. Construido mediante el método Neighbor-joining a partir de la selección de 12 proteínas conservadas. Extraído de Gupta, R.S., Mok, A, 2007 [28].

En los últimos años, se han identificado varias especies nuevas dentro del género *Brucella*, lo que ha provocado una expansión de dicho género. Actualmente, se reconocen 12 especies, cuyos principales hospedadores son los siguientes: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (cabras), *B. suis* (cerdos, liebres, renos), *Brucella canis* (perros), *Brucella ovis* (ovejas), *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 especies de este género presentan genomas muy similares, con una identidad de secuencia superior al 94%. Cuentan con dos cromosomas de aproximadamente 2.1 MB y 1.2 MB, con un contenido de GC cercano al 57%. Cada genoma contiene entre 3200 y 3400 marcos de lectura abierto (ORFs, del inglés, *open reading frame*). Algunos taxónomos opinan que todas las especies deberían ser consideradas biovares de una única especie, pero se ha decidido mantener la taxonomía actual debido a la frecuencia con la que se aíslan cada una de estas especies en sus respectivos hospedadores [29].

Es relevante señalar que las diferencias observadas entre los genomas se deben principalmente a proteínas de superficie, lo que sugiere que estos genes son los que experimentan las mutaciones más significativas a lo largo de los eventos de especiación. Algunas de estas mutaciones parecen inactivar los genes, convirtiéndolos en pseudogenes. Por lo tanto, el estudio de pseudogenes es clave para comprender las diferencias entre las distintas especies. Un análisis de las categorías funcionales de los genes inactivos mostró que la mayoría de ellos están relacionados con funciones de transporte y la envoltura celular [30]. Esto sugiere que la virulencia y las diferencias en la especificidad del hospedador podrían ser consecuencia de la divergencia de los genomas, originada por la acumulación diferencial de pseudogenes. Se plantea que la inactivación de genes, más que la deleción o la transferencia horizontal, tendría un papel más importante en la especiación y adaptación al hospedador.

4. El ciclo de vida intracelular de *Brucella*

Brucella es capaz de llevar a cabo su ciclo de vida intracelular tanto en fagocitos profesionales como no profesionales del hospedador (Figura 2). Producto de su internalización en la célula hospedadora, las bacterias son contenidas dentro de un fagosoma que comienza un proceso de tráfico intracelular por la vía endocítica, adquiriendo tanto marcadores endosomales tempranos (como Rab5 y EEA-1) como tardíos (LAMP1, LAMP2, CD63, Rab7) [31, 32]. Dada la maduración inicial por esta vía, se denominó eBCV (por sus siglas en inglés, *endosomal Brucella-containing vacuole*) al compartimento que contiene a las bacterias en estos primeros estadios. A continuación, se produce una fusión parcial con los lisosomas del hospedador, activamente controlada por *Brucella*. Si bien se estima que hasta el 90% de las bacterias fagocitadas por macrófagos pueden ser eliminadas en esta etapa inicial, la acidificación del eBCV (hasta un pH alrededor de 4,5) [33] constituye una señal ambiental crucial para la expresión de factores de virulencia esenciales, como el operón *virB*, que codifica un sistema de secreción de tipo IV [34, 35]. Una vez transcurridas estas primeras etapas de la infección (hasta aproximadamente 8 horas post-infección (p.i.), las eBCV comienzan a interaccionar con membranas derivadas del retículo endoplasmático, lo que da inicio a la generación de una vacuola replicativa denominada rBCV (del inglés, *replicative Brucella-containing vacuole*). Durante este proceso, *Brucella* induce un aumento en la producción de vesículas por parte de los sitios ERES (*endoplasmic reticulum exit sites*) y, como resultado de la fusión de estas membranas con la eBCV, la vacuola reemplaza progresivamente los marcadores endosomales por marcadores de retículo endoplasmático, como calnexina, calreticulina y Sec61β [31, 36]. Como su nombre lo

indica, las rBCVs poseen las condiciones apropiadas para la replicación celular, que tiene lugar entre las 12 y 48 h p.i. De esta manera, *Brucella* reorganiza la vía secretora del hospedador para establecer su nicho replicativo, generando una red de rBCVs intrínsecamente conectadas con el retículo endoplásmico, que además interactúan con el tráfico vesicular entre el retículo y el aparato de Golgi [37].

Luego de una prolongada replicación intracelular (aproximadamente 48 h p.i.) el nicho replicativo de *Brucella* pasa de consistir en una red de vacuolas con membranas derivadas del retículo, a una serie de vacuolas de mayor volumen, con múltiples membranas y ciertos marcadores específicos de la vía autofágica como beclin1, ULK1, y Atg14L [38]. Dadas las características de autofagosoma de esta última etapa, se denominó a estas vacuolas como aBCV (*autophagic Brucella-containing vacuole*). La formación de las aBCVs constituye un paso importante para el egreso de *Brucella* de la célula hospedadora a través de un proceso no lítico, el cual permite la diseminación y posterior infección de células vecinas [38, 39].

Recientemente, se reportó que *Brucella* aprovecha la vía de biogénesis de los cuerpos multivesiculares (MVB, *multivesicular bodies*) para el egreso de las células infectadas [40]. Transcurridas las 72 h p.i., las BCVs adquieren marcadores específicos de MVB, como CD63 y LBPA. En resumen, se propone que luego de la replicación intracelular las BCV adquieren características autofágicas (aBCV), se fusionan con la vía de los MVB para formar anfisomas y, finalmente, se fusionan con la membrana plasmática de la célula hospedadora para lograr el egreso de esta [40].

La interacción de *Brucella* con organelas del hospedador no se limita al retículo endoplásmico, aparato de Golgi y/o lisosomas, sino que también se describió su interacción con mitocondrias. Verbeke et al., 2023 [41] han descripto un nuevo tipo de BCV, denominado BCV mitocondrial (mBCV), caracterizado por la presencia de *B. abortus* en mitocondrias agrandadas y alteradas morfológicamente durante las etapas finales de la infección. En este trabajo se demostró que *Brucella* induce el proceso de mitofagia en la célula hospedadora mediante la activación de la vía HIF-1α/BNIP3L a través de una respuesta a la privación de hierro. La fragmentación de la red mitocondrial (producida entre las 30 y las las 72 h p.i. aproximadamente) favorece el egreso de *Brucella* de la célula hospedadora, lo que resalta la importancia de la interacción *B. abortus* – mitocondria en las etapas finales del ciclo infeccioso [41].

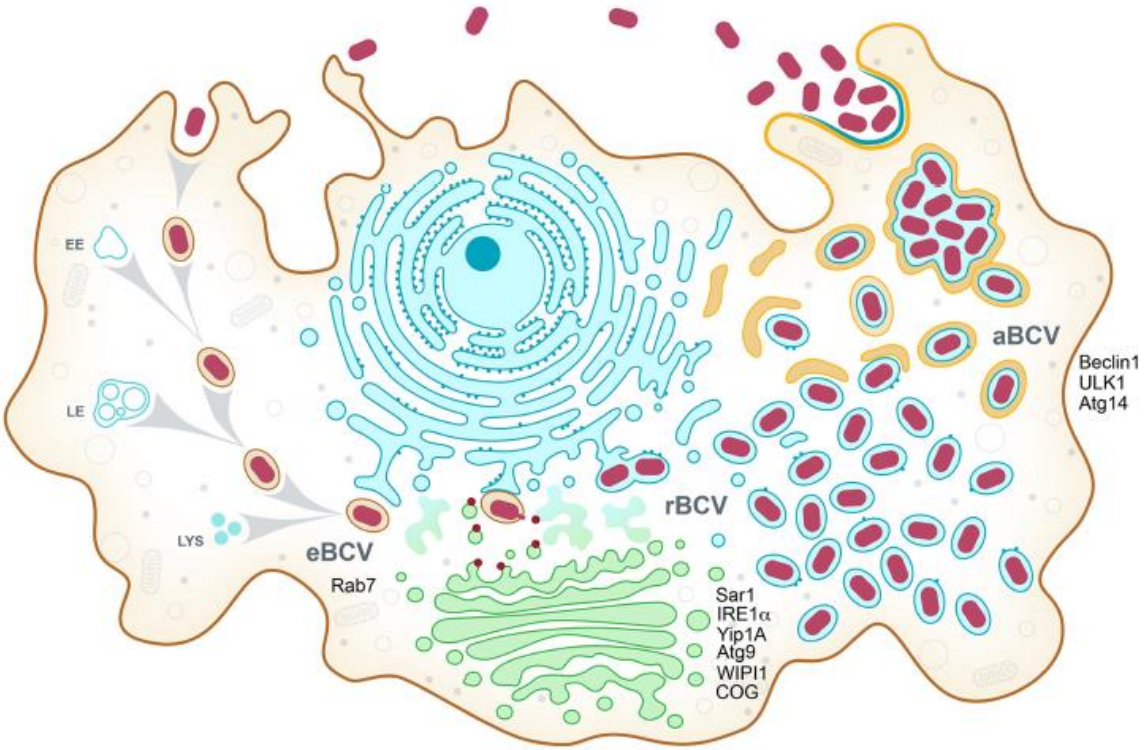


Figura 2. Ciclo de vida intracelular de *Brucella*. Tras la fagocitosis por los macrófagos, las especies de *Brucella* residen durante las primeras 8 a 12 horas post-infección dentro de una vacuola que sufre una maduración por la vía endocítica mediante interacciones secuenciales con endosomas tempranos (EE), tardíos (LE) y lisosomas (LYS) para convertirse en una eBCV acidificada. La GTPasa del hospedador Rab7 contribuye a la maduración de las eBCV, lo que proporciona señales fisicoquímicas que promueven la expresión del sistema de secreción tipo IV VirB (VirB SST4), que transloca proteínas efectoras (en rojo) que median las interacciones de las eBCV con el retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Estos eventos conducen a la biogénesis de rBCVs, las cuales son permisivas para la replicación. Las proteínas del hospedador Sar1, IRE1α, Yip1A, Atg9, y WIPI1, así como el complejo COG, contribuyen a la biogénesis de los rBCVs. Luego, las bacterias sufren una replicación extensa entre las 12 y las 48 horas post-infección, después de lo cual las rBCVs son capturadas dentro de estructuras similares a autofagosomas de manera dependiente del SST4 para convertirse en aBCVs. La formación de aBCVs requiere las proteínas de autofagia del hospedador beclin1, ULK1 y Atg14. Los aBCVs albergan características de autolisosomas y son necesarios para la salida bacteriana y los nuevos ciclos de infecciones intracelulares. Adaptado de Celli J, 2019 [42].

5. Sistema de secreción tipo IV VirB

El sistema de secreción de tipo IV (SST4) constituye el factor de virulencia más estudiado de *Brucella*. Consiste de 12 proteínas codificadas en el operón *virB*, 8 de las cuales forman la estructura central del sistema (VirB2, VirB3, y VirB5 hasta VirB10), 2 ATPasas (VirB4 y VirB11) que proveen la energía para el transporte de efectores, y una transglicosilasa (VirB1) que participa en el remodelamiento del peptidoglicano presente en el periplasma para permitir el correcto ensamblaje de la maquinaria proteica [43]. Se ha demostrado que la deleción de genes *virB* específicos resulta en la incapacidad de *Brucella* de convertir las eBCVs en rBCVs para así establecer su nicho replicativo; siendo las bacterias completamente degradadas en los fagolisosomas del hospedador

[31, 36, 44]. Además, recientemente se reportó la importancia de VirB11 en la generación de aBCVs, el egreso de la bacteria y la infección de células vecinas, lo cual indica que el sistema VirB cumple funciones a un nivel post-replicativo [45].

Teniendo en cuenta el rol de otros SST4 estudiados en bacterias como *Agrobacterium tumefaciens*, se postuló que el SST4 de *Brucella* podría transportar proteínas efectoras desde el interior del eBCV hacia el citoplasma de la célula hospedadora. En este sentido, diversos grupos han avanzado en la identificación y caracterización de estos efectores. Por ejemplo, los efectores BspB y RicA interaccionan con el aparato de Golgi y la GTPasa Rab2 respectivamente y, si bien los mecanismos involucrados aún no se encuentran del todo comprendidos, estas interacciones promueven el redireccionamiento de vesículas provenientes del aparato de Golgi hacia las rBCVs [46, 47]. Por otro lado, la proteína efectora SepA cumple un rol en la maduración de eBCVs a rBCVs, mediando la exclusión de marcadores lisosomales como LAMP-1 [48]. Por su parte, el efector VceC interacciona con la chaperona BiP presente en el retículo endoplásmico, lo cual desencadena estrés reticular e induce la respuesta a proteínas desplegadas UPR (del inglés, *unfolded protein response*), lo cual estimula la producción de citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF-α. La liberación de estas citoquinas induce la formación de granulomas, lo cual facilita la infección crónica [49–51].

Además de controlar el tráfico intracelular e inducir una respuesta inflamatoria controlada, se ha reportado que *Brucella* es capaz de inhibir la apoptosis de la célula hospedadora mediante la secreción del efector BspJ, que transloca al núcleo e interacciona con las proteínas NME2 y CKB [52].

5.1 Regulación transcripcional del operón *virB*

La regulación de la expresión de los genes *virB* ha sido motivo de estudio durante las últimas décadas. Los primeros análisis se realizaron en *B. abortus* y *B. suis*, observándose diferencias en la expresión en cultivos en medio rico: mientras que en *B. abortus* la expresión del operón *virB* fue máxima en fase estacionaria, en el caso de *B. suis* la expresión fue máxima en fase exponencial, y disminuyó en fase estacionaria [53]. A pesar de estas diferencias, en todas las especies de *Brucella* analizadas, se ha observado una inducción de la expresión del operón *virB* en condiciones de cultivo similares al ambiente intrafagosomal, esto es, un ambiente pobre en nutrientes y con un pH ácido [54]. El análisis de la expresión de *virB* en ensayos de infección de líneas macrofágicas ha revelado que este operón sufre una rápida inducción luego de la internalización de las bacterias, alcanzando su máximo nivel de expresión alrededor de las 5 h p.i. Pasado este punto, la expresión decae notoriamente, coincidiendo con el comienzo de la replicación intracelular [55]. Estas observaciones confirman que la acidificación de las eBCVs constituye una señal ambiental necesaria para la inducción de la expresión del operón *virB*, y que, una vez establecido el nicho replicativo, la represión de estos genes es necesaria para el correcto tráfico intracelular de *Brucella*. En efecto, se ha observado que la sobreexpresión del operón *virB* mediante el uso de un vector de expresión plasmídico provocó efectos deletéreos en la replicación intracelular [43].

La fina regulación de la expresión del operón *virB* refleja la importancia del correcto ensamblaje de este sistema de secreción para la supervivencia y replicación

intracelular de *Brucella*. Esto asegura la adecuada secreción, en un sentido espaciotemporal, de efectores hacia la célula hospedadora.

Hasta el momento, se han identificado y caracterizado un número considerable de factores de transcripción que regulan la expresión de los genes *virB.* A continuación, se detallan aquellos cuya regulación es directa:

- BvrS/BvrR: este sistema de dos componentes, compuesto por un sensor histidina kinasa ubicado en la membrana plasmática (BvrS), y un regulador transcripcional citoplasmático (BvrR) ha sido propuesto como un factor de virulencia importante de *Brucella*. Las mutantes en este sistema han exhibido fenotipos de virulencia atenuados [56, 57]. Entre los blancos transcripcionales de BvrR se encuentran proteínas de membrana externa (como Omp22/25) y genes involucrados en la síntesis del lipopolisacárido (LPS) [58]. Las envolturas celulares alteradas de las mutantes BvrS/BvrR las tornan más sensibles a ser eliminadas por el complemento [59], menos invasivas [60], y más susceptibles a los mecanismos bactericidas de macrófagos y células dendríticas [61, 62].
  En relación a la regulación del operón *virB*, BvrS/BvrR induce la expresión de estos genes, tanto directa como indirectamente. BvrS es capaz de detectar las condiciones de escasez nutricional y pH ácido del interior de las eBCVs, lo que lleva a la activación de BvrR, que a su vez interacciona directamente con el promotor *virB* activando la transcripción del operón [63]. La secuencia de ADN reconocida por BvrR en el promotor *virB* aún no se ha determinado con exactitud, ya que se han obtenido resultados contradictorios al implementar metodologías *in vivo* e *in vitro* [64]. Por otro lado, BvrR también induce la expresión del regulador global VjbR quien, a su vez, interacciona directamente con el promotor *virB*, induciendo su expresión [65].

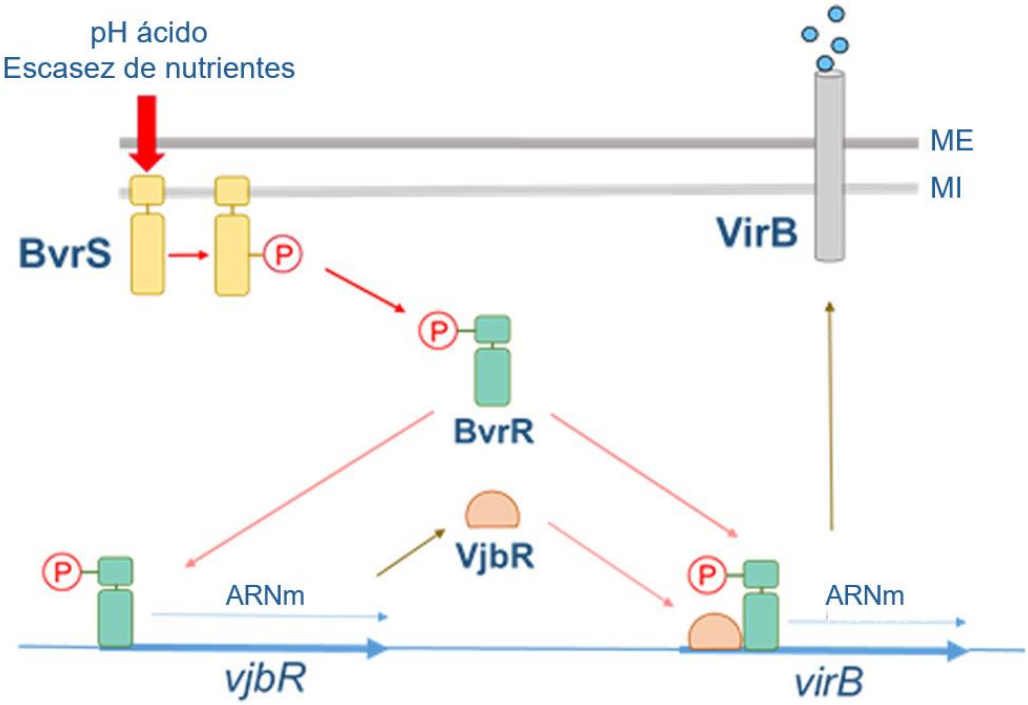


Figura 3. Regulación del operón *virB* por el sistema BvrS/BvrR. Regulación tanto directa como indirecta (mediante la expresión de VjbR) del sistema de secreción de tipo IV codificado por el operón *virB*. Los círculos celestes representan proteínas efectoras siendo secretadas hacia al exterior. ME: membrana externa. MI: membrana interna. ARNm: ARN mensajero. Adaptado de Altamirano-Silva *et al*, 2018 [65].

- VjbR: este regulador de la familia LuxR fue identificado en un screening de mutantes defectivas en ensayos de replicación intracelular de *B. melitensis* [66]. Es considerado el principal regulador de virulencia de *Brucella*, ya que no solo induce la expresión del operón *virB*, sino que también controla la transcripción de otros factores de virulencia, como la proteína de membrana externa Omp25, el autotransportador BtaE, el efector VceC, y el regulador de la expresión de genes flagelares, FtcR [67, 68]. Otros análisis más exhaustivos del regulón de VjbR han demostrado que se trata de un regulador global de *Brucella*, modulando la expresión de cientos de genes [68–70]. Una particularidad de VjbR es que pertenece al grupo de reguladores LuxR llamados "huérfanos", ya que no se ha identificado un gen *luxI* en el genoma de *Brucella*. En los sistemas canónicos de *quorum-sensing* en Gram-negativas, los reguladores LuxR son capaces de unirse al ADN y ejercer sus funciones regulatorias una vez que interactúan con una molécula de N-acilhomoserina lactona (AHL), sintetizada por LuxI [71]. A pesar de la aparente ausencia de una sintasa de AHL en *Brucella*, se ha corroborado la capacidad de VjbR de interactuar con una AHL de 12 carbonos, pero a diferencia del modelo canónico, esta interacción provoca la disociación de VjbR del promotor *virB* [72]. Dadas estas observaciones, se ha postulado que VjbR posee un accionar distinto al modelo clásico de *quorum-sensing*, en el cual permitiría a las bacterias intracelulares percibir el confinamiento dentro de las BCVs. Una vez comenzada la replicación en las rBCVs, la acumulación de la AHL de 12 carbonos permitiría su unión a VjbR, logrando así la disociación con el promotor *virB* y la correspondiente disminución de la expresión génica observada en estas etapas. A su vez, se ha descrito la presencia de un sistema de interferencia del *quorum-sensing* (denominado *quorum-quenching*) en el que la proteína AibP, una AHL-acilasa, degrada las AHLs producidas por *Brucella*, ejerciendo así un rol en la modulación de la actividad de VjbR [73]. La coexistencia de mecanismos de *quroum-sensing* y *quorum-quenching* demuestran la fina regulación en la concentración de AHLs producidos por *Brucella*, lo cual impacta en la expresión de factores de virulencia.

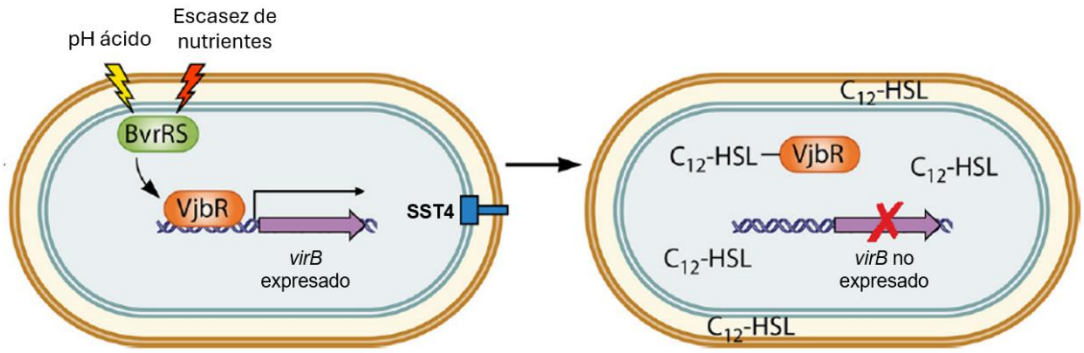


Figura 4. Regulación del operón *virB* por VjbR. En las condiciones presentes en las eBCVs, VjbR interacciona con el promotor *virB*, induciendo así su expresión (izquierda). Una vez comenzada la replicación bacteriana en las rBCVs (derecha), la acumulación de moléculas de N-acilhomoserina lactona de 12 carbonos (C12-HSL) promueve la interacción directa con VjbR, provocando la disociación del promotor *virB* y, por ende, su represión transcripcional. Adaptado de Roop II *et al.*, 2021 [74].

Mediante ensayos *in vitro* se determinó que la interacción de VjbR con el promotor *virB* es débil en comparación a otros casos de interacción de un regulador LuxR y sus secuencias de ADN blanco. Los ensayos de protección a la ADNasa I (*DNAse I footprinting)*, mostraron que el sitio de unión de VjbR al promotor *virB* es particularmente atípico: este consta de una secuencia de 30 pares de bases (pb) posicionada en la posición -94 relativa al inicio de la transcripción y, en lugar de ser palindrómica, posee una estructura de "hemisitio", conteniendo una secuencia de 9 pb (GCCCCCTCA) idéntica a una mitad del sitio de unión de MrtR, un regulador LuxR de *Mesorhizobium tianshanense* [72, 75]. Probablemente, la interacción débil entre VjbR y el promotor *virB* haya sido seleccionada debido a la necesidad de reprimir rápidamente la expresión del operón una vez establecido el nicho replicativo, aproximadamente a las 5 h p.i. Por otro lado, la mayoría de los reguladores LuxR estudiados exhiben un mecanismo de regulación en el cual se da una interacción directa con alguna subunidad de la ARN polimerasa (RNAP) [76, 77]. En el caso de VjbR, dada la lejanía de su sitio de interacción al inicio de la transcripción, se postuló la necesidad de factores adicionales que promuevan un remodelamiento de la cromatina, de manera de posibilitar la interacción VjbR - RNAP.

- IHF (*Integration Host Factor*): esta proteína heterodimérica de unión al ADN pertenece al grupo de proteínas asociadas al nucleoide (NAP, del inglés *nucleoid-associated proteins*), las cuales cumplen funciones estructurales, permitiendo la compactación de la cromatina y organización del cromosoma procariota en microdominios [78]. IHF se encuentra ampliamente distribuida en diversos géneros bacterianos y participa en el control de la transcripción de un gran número de genes. Se ha observado que IHF actúa induciendo una curvatura en el ADN como producto de su interacción, lo cual permite u obstaculiza la unión de reguladores transcripcionales a sus promotores blanco [79]. Este fenómeno se ha reportado en específico en relación a la interacción de IHF con el promotor *virB*, resultando la misma en una curvatura del ADN con un ángulo de 50º [55]. Ensayos de protección a la ADNasa I revelaron que el sitio de interacción de IHF se centra en la posición -162 relativa al inicio de la transcripción. Por otro lado, la introducción de una mutación en el sitio produjo una desregulación del patrón de expresión intracelular de *virB* en ensayos de infección de macrófagos, impidiendo alcanzar los niveles máximos de expresión observados a las 5 h p.i. en la cepa salvaje. Estos ensayos no sólo demostraron la regulación positiva de IHF en la expresión de *virB*, sino también que una mutación en el sitio de unión de IHF resulta en efectos deletéreos en la replicación intracelular de *Brucella* [55]. Análisis de actividad promotora realizados con bacterias cultivadas en distintas condiciones demostraron que la regulación positiva ejercida por IHF sobre el promotor *virB* sólo ocurre a pH neutro [55]. Este resultado sugiere que IHF interacciona con el promotor *virB* en un estadio de la eBCV previo a su acidificación, generando un cambio estructural del ADN que permita la interacción de VjbR y otros reguladores transcripcionales.
- HutC: regulador perteneciente a la familia GntR, caracterizado por un dominio N-terminal de unión al ADN con estructura *helix-turn-helix*, y un dominio C-terminal capaz de interactuar con moléculas efectoras [80]. La función canónica de este

regulador es reprimir la expresión de los genes *hut* (*histidine utilization*) que codifican enzimas involucradas en la utilización del aminoácido histidina como fuente de carbono [81]. En bacterias Gram-negativas, el inductor de la expresión de los genes *hut* es el ácido urocánico, el primer intermediario de la vía catabólica de histidina. La interacción del ácido urocánico con HutC promueve la disociación del mismo del promotor *hut*, permitiendo así la transcripción de dichos genes [82–84]. En *Brucella*, HutC reprime la expresión de los genes *hut* (tal como era esperado según su función canónica), pero ejerce un rol positivo en la expresión del operón *virB* [84]. Esta regulación fue observada en ensayos de actividad promotora, tanto en bacterias intracelulares (mediante infecciones de macrófagos), como en condiciones de incubación *in vitro*. Se demostró que HutC induce la expresión de los genes *virB* en condiciones de escasez de nutrientes, presencia de ácido urocánico, y pH ácido. Por otro lado, ensayos de protección a la ADNasa I indicaron que HutC reconoce una secuencia localizada en la posición -188 relativa al inicio de la transcripción del operón *virB*, adyacente al sitio de unión de IHF. Mediante ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA, del inglés, *electrophoretic mobility shift assay*), se observó que ambos reguladores compiten por la unión al promotor *virB*, probablemente debido a un fenómeno de impedimento estérico dada la cercanía de los sitios de unión [84]. Estas observaciones apoyan un modelo en el que los reguladores se reclutan de forma secuencial al promotor *virB* a medida que *Brucella* transita por diferentes compartimentos intracelulares. Al inicio, previo a la acidificación de la eBCV, IHF se uniría al promotor *virB* induciendo un cambio estructural en el ADN, de manera de favorecer el reclutamiento de reguladores adicionales. Una vez producida la acidificación de la eBCV, HutC reemplazaría a IHF en el promotor *virB* [84].

- MdrA: regulador perteneciente a la familia MarR, involucrado en la regulación de la virulencia y respuesta al estrés por antibióticos [85]. Ensayos *in vitro* determinaron que MdrA posee dos sitios de unión al promotor *virB*: un sitio centrado en la posición - 323, y un segundo sitio centrado en la posición -175. Este último se superpone con los sitios de unión de HutC e IHF. Mas aún, ensayos de EMSA revelaron una competencia por la unión al ADN entre estos reguladores [86]. Se ha observado en bacterias cultivadas *in vitro* que MdrA actúa como un coactivador de los genes *virB*, sin embargo, su rol *in vivo* aún no ha sido dilucidado [86]. A su vez, MdrA es capaz de interactuar con desoxicolato de sodio, y ensayos *in vitro* han demostrado que esta interacción induce su disociación del ADN [86]. Esta evidencia sugiere que MdrA podría ejercer un rol similar al de HutC en la regulación del promotor *virB*, aunque las condiciones intracelulares bajo las cuales MdrA podría ejercer su función regulatoria aún no han sido determinadas [86].
- BabR: este regulador (también conocido como BlxR) pertenece a la familia LuxR, al igual que VjbR. Más aún, ambos reguladores se encuentran íntimamente relacionados funcionalmente, ya que sus regulones se encuentran superpuestos, e incluso se ha demostrado que ejercen una función regulatoria el uno sobre el otro [69, 70, 87]. La deleción de *babR* afecta la virulencia y supervivencia intracelular de *Brucella*, aunque en un grado menor a la que produce la deleción de *vjbR* [87]. Se demostró que BabR ejerce una regulación directa y negativa sobre el operón *virB*, cumpliendo entonces un rol antagónico

al de VjbR [88]. Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado discernir el sitio de interacción de este regulador en el promotor *virB*.

- MucR: este regulador es miembro de una amplia familia de proteínas que regulan la expresión de genes de virulencia y simbiosis en α-proteobacterias. Estudios recientes lo han reclasificado como una proteína estructural del nucleoide similar a las histonas, que reconoce y se une a regiones genómicas ricas en AT [89–91].

  El gen *mucR* de *Brucella* fue identificado como un factor necesario para la supervivencia y replicación intracelular en macrófagos murinos [92], y se ha demostrado que es esencial para la virulencia completa de diversas especies de *Brucella* en el modelo murino de infección crónica [93–97].

  Análisis transcriptómicos por microarreglos indicaron que MucR controla la expresión de más de 90 genes en *B. abortus* 2308 [97]. Por otro lado, un análisis de inmunoprecipitación de cromatina seguido de secuenciación (ChIP-seq, del inglés, *chromatin immunoprecipitation followed by sequencing*) identificó 546 picos de enriquecimiento de MucR a lo largo del genoma de esta bacteria [90]. Entre los genes cuyos promotores mostraron evidencia de interacción directa con MucR se incluyen los que codifican las adhesinas autotransportadoras BtaE y BmaC, los que codifican los reguladores BabR y VjbR, *virB*, y los genes de los efectores BspJ, VceC y BtpA, entre otros. Notablemente se observó superposición de picos de ChIP-seq de MucR con los sitios de unión previamente descritos para los reguladores VjbR y BvrR, lo que sugiere que estos reguladores actúan como competidores de MucR y que funcionarían en conjunto para coordinar la expresión de genes de virulencia [90]. En particular, se demostró *in vitro* la competencia entre MucR y MdrA por la unión al ADN en el promotor del gen *btaE* [90].

  Se identificaron 2 picos de ChIP-Seq de MucR en el operón *virB*, centrados en las posiciones -88 y -403 relativas al sitio de inicio de la transcripción de los genes *virB1* y *virB2*, respectivamente [90]. La ubicación exacta de la secuencia de unión de MucR al ADN no ha sido determinada, así como tampoco se ha observado un rol regulatorio sobre los genes *virB* en los estudios transcriptómicos previamente mencionados. En este sentido, serán necesarios futuros análisis para determinar las condiciones específicas en las cuales la interacción de MucR con el operón *virB* provoca un efecto transcripcional.

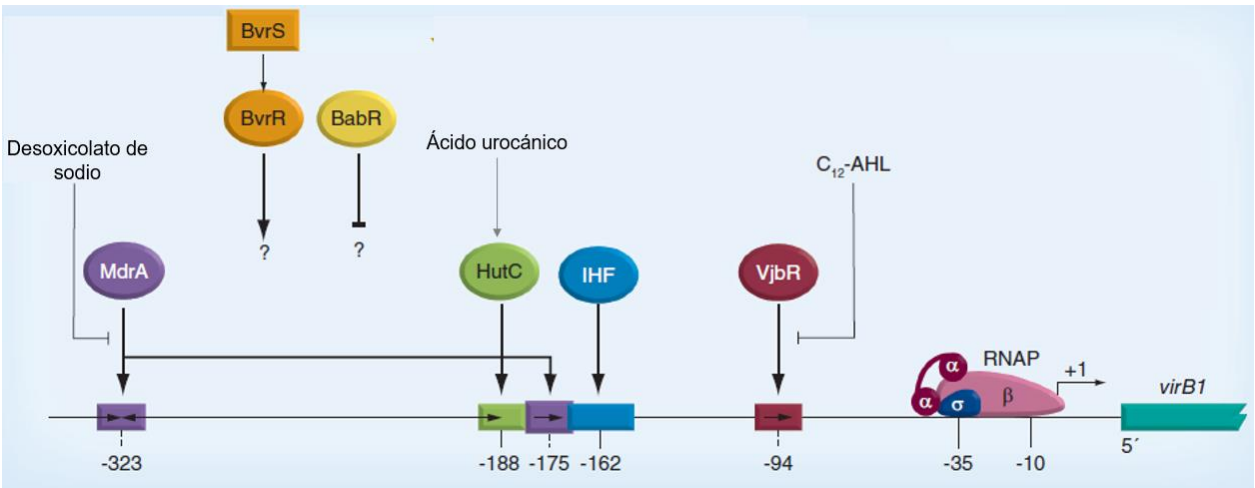


Figura 5. Regulación transcripcional directa sobre el operón *virB*. Se señalan los sitios de unión de los respectivos reguladores en relación al inicio de la transcripción. Flechas opuestas y simples en los sitios de unión representan sitios palindrómicos y hemisitios, respectivamente. RNAP: ARN polimerasa. C12-AHL: N-acilhomoserina lactona de 12 carbonos. Adaptado de Sieira, 2013 [98].

6. Adaptación de *Brucella* al ambiente intracelular del hospedador

A lo largo de su coevolución con los hospedadores, los patógenos bacterianos intracelulares han desarrollado adaptaciones especializadas que les permiten enfrentar eficazmente el estrés del entorno intracelular eucariota. Estas adaptaciones incluyen estrategias que facilitan la evasión de los mecanismos bactericidas del hospedador y la formación de nichos intracelulares favorables para su replicación. Además, modulan el grado de daño causado al hospedador, lo que favorece el establecimiento de infecciones crónicas y garantiza tanto la supervivencia como la diseminación del patógeno.

Una de las claves para una adaptación *in vivo* exitosa de un patógeno es su capacidad de ajustar el metabolismo para utilizar los nutrientes específicos que se encuentran disponibles en cada etapa presente durante el ciclo infeccioso. En este sentido, la adquisición de metales resulta de vital importancia para asegurar el correcto funcionamiento de todas las vías metabólicas implicadas. A continuación, se desarrolllará en mayor detalle el rol de estos micronutrientes, y las estrategias empleadas por *Brucella* para controlar su metalostasis.

6.1 Homeostasis de metales y virulencia

Todas las células requieren magnesio (Mg), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), cobalto (Co) y níquel (Ni) como micronutrientes para sostener su metabolismo [99, 100]. Estos metales cumplen roles estructurales y/o catalíticos en proteínas, así como en otras biomoléculas y compartimentos celulares. Metales como el Fe y Cu actúan como cofactores fundamentales en proteínas que cumplen funciones en reacciones de oxido-reducción, como por ejemplo las cadenas de transporte de electrones.

Aunque los metales son micronutrientes esenciales, pueden resultar tóxicos cuando sus concentraciones superan los niveles necesarios para satisfacer las demandas fisiológicas de las células [99]. Esto se debe principalmente a dos razones: por un lado, el aumento en la concentración de un metal muy reactivo, como por ejemplo el Cu, puede llevar a una interacción inespecífica con proteínas que requieren de otro cofactor metálico, comprometiendo así sus funciones. Por otro lado, metales como el Fe y Cu, pueden participar en reacciones de Fenton, reaccionando con especies reactivas de oxígeno, como el ion superóxido (O_2^-), para formar radicales hidroxilo altamente reactivos, los cuales pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos [101].

Para evitar la toxicidad de los metales, los organismos procariotas y eucariotas han desarrollado sistemas de homeostasis altamente regulados que controlan rigurosamente los niveles intracelulares de estos elementos [102]. Estos sistemas están compuestos por proteínas de membrana que actúan como canales de importación y exportación de metales, proteínas de almacenamiento y desintoxicación, metalochaperonas, y factores de transcripción que regulan la expresión de los genes

que codifican para estas proteínas en respuesta a las concentraciones intracelulares de metales [103].

Los hospedadores vertebrados han desarrollado diversas estrategias de limitación e intoxicación por metales que previenen la proliferación bacteriana, un proceso conocido como inmunidad nutricional. A su vez, los patógenos bacterianos han desarrollado mecanismos adaptativos para sobrevivir en condiciones de escasez o exceso de metales.

La captación y secuestro del Fe es, por ejemplo, una estrategia ampliamente documentada que los mamíferos utilizan para limitar la proliferación de patógenos microbianos [104]. El Fe que no se incorpora a las proteínas del hospedador se une a proteínas como la transferrina y la lactoferrina en el espacio extracelular. A nivel intracelular, la ferritina es la principal proteína de almacenamiento de Fe. Durante la infección, la proteína hepcidina también bloquea la capacidad del exportador de Fe ferroportina para liberar este metal hacia el torrente sanguíneo [105, 106]. Por otro lado, los macrófagos expresan la proteína Nramp1 en las membranas de los fagosomas, la cual funciona como una bomba que extrae cationes divalentes como Fe^{2+} y Mn^{2+} del compartimento intrafagosomal, privando así a los patógenos de estos micronutrientes esenciales [107].

Por su parte, *Brucella* posee distintos mecanismos para superar la privación de Fe, Mn y Zn que encuentran en sus huéspedes mamíferos. Entre ellos se destacan el sideróforo brucebactina (implicado en la captación y transporte de Fe^{3+}) [108], el transportador de Fe^{2+} FtrABCD [109], el transportador de hemo BhuA [110], el transportador de Mn MntH [111] y el transportador de Zn ZnuA [112, 113]. A lo largo de su tráfico intracelular, *Brucella* no sólo debe afrontar la escasez de metales debido a los mecanismos de privación del hospedador, sino que también debe evitar que se acumulen en exceso. Hallazgos recientes revelaron que la inducción de la ferritinofagia (mecanismo de degradación de la ferritina) es un mecanismo de virulencia crucial utilizado por *Brucella* para promover el crecimiento intracelular y la necrosis de la célula hospedadora [114]. Mediante la secreción de la proteína efectora Dps, *Brucella* logra disminuir los niveles de Fe en la infección temprana (primeras 12 h p.i.), lo que desencadena la autoactivación de la ferritinofagia para aumentar el Fe libre intracelular en la infección tardía (24 h p.i. en adelante) [114]. Las concentraciones elevadas de Fe libre permiten que *Brucella* intracelular capte el hierro necesario para la replicación y contribuyen a la producción de ROS para iniciar la ferroptosis celular [34].

Para mantener su metalostasis, *Brucella* emplea reguladores transcripcionales sensibles a la concentración de metales de transición, proteínas de almacenamiento y transportadores. Los reguladores transcripcionales Irr, RirA, Mur y Zur (cuyas funciones se describirán en mayor profundidad en la siguiente sección) aseguran que los genes que codifican para importadores de metales de alta afinidad se expresen selectivamente solo cuando los niveles de metales específicos caen por debajo de ciertos umbrales [115–120]. Por su parte, el regulador ZntR regula negativamente la expresión del exportador de Zn ZntA [120]. Johnsrude *et al* (2019) han demostrado la relevancia del exportador de Mn EmfA en la resistencia a la toxicidad de este metal y la virulencia en *B. abortus* [121]. En este sentido, se ha reportado una capacidad de replicación intracelular atenuada en ensayos de infección de ratones para las cepas mutantes *irr* [117], *rirA* [122], *emfA* [121] y *zntR* [120].

El transporte de Ni y Mg también es importante en la virulencia de *Brucella*. Dos transportadores de Ni de alta afinidad, NikABCDE y NikKLMQO, desempeñan papeles

funcionalmente redundantes al suministrar a las cepas de *Brucella* el Ni necesario para sustentar la actividad de la enzima ureasa, la cual se postula que es necesaria para la supervivencia de *Brucella* en el tracto gastrointestinal del hospedador [123, 124].

Si bien el Mg es un micronutriente esencial para *Brucella*, no se han caracterizado en profundidad transportadores para este metal. Sin embargo, se ha reportado que una mutante en el gen *mgtB*, implicado en el transporte de Mg en *B. melitensis* presenta una virulencia atenuada tanto en ensayos de infección de células en cultivo como en ratones [125].

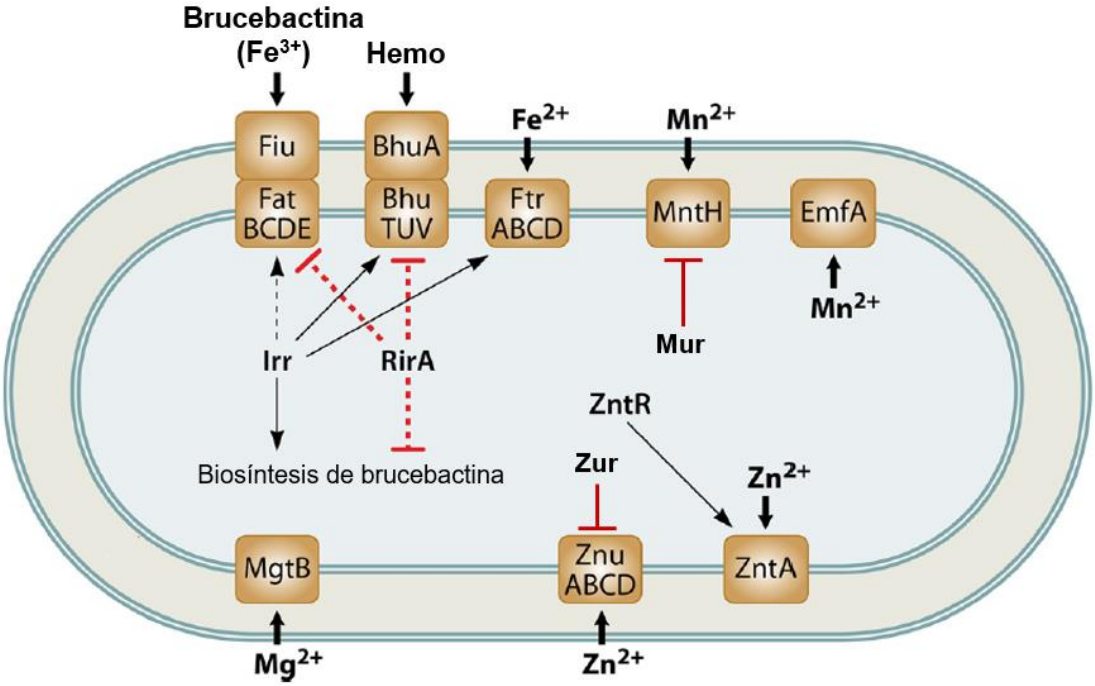


Figura 6. Regulación de homeostasis de Fe, Mn, Mg y Zn en *Brucella*. Se esquematizan los principales transportadores de metales caracterizados, junto a los factores de transcripción que regulan su expresión. Las flechas negras indican regulación positiva (inducción), mientras que las líneas rojas indican regulación negativa (represión). Las líneas punteadas indican potencial regulación indirecta. Adaptado de Roop II *et al*., 2021 [74].

Como se mencionó previamente, *Brucella* cuenta con factores de transcripción que regulan la expresión de sistemas de transporte de metales de transición, así como proteínas involucradas en el almacenamiento de estos micronutrientes. A continuación, se detallarán los reguladores pertenecientes a la familia Fur (*ferric uptake regulator*) presentes en este género bacteriano, junto a los reguladores ZntR y RirA.

7. Reguladores de la familia Fur en *Brucella*

El regulador transcripcional Fur (*Ferric uptake regulator*) fue inicialmente descrito en *E. coli* como un represor de los sistemas de importación de Fe [126–128]. El modelo canónico de funcionamiento de este regulador establece que, en condiciones de repleción de Fe^{2+}, Fur utiliza este metal como cofactor para interactuar con secuencias específicas denominadas “Fur-box” en sus promotores blanco y así reprimir la transcripción de estos genes. De esta manera, Fur cumple un rol en la percepción de la

concentración intracelular de Fe^{2+}: en condiciones de depleción de este metal, apo-Fur permite la transcripción de los genes codificantes para los sistemas de importación de Fe^{2+}. Por otro lado, al alcanzarse una concentración umbral de Fe^{2+}, holo-Fur interacciona con los promotores de dichos genes, impidiendo el ensamblaje de la maquinaria transcripcional, de manera de evitar los efectos tóxicos de los productos de la acumulación de este micronutriente [129]. Hoy en día, el conocimiento sobre los mecanismos de regulación génica mediados por Fur mostraron que este regulador es capaz de inducir o reprimir la transcripción de genes blanco tanto en su forma apo como holo dependiendo, en cada caso, de la presencia de Fur-boxes específicos para cada conformación.

En las últimas décadas, la identificación de genes homólogos *fur* en una gran cantidad de genomas procariotas ha dado lugar al establecimiento de la familia Fur. La caracterización funcional y estructural de sus miembros ha llevado a la expansión de esta familia, de manera de incluir a los reguladores Mur (*manganese uptake regulator*), Irr (*iron responsive regulator*), Zur (*zinc uptake regulator*), PerR (*peroxide response regulator*), Nur (*nickel uptake regulator*) y BosR (*Borrelia oxidative stress regulator*). De modo similar al modelo propuesto para Fur, los reguladores Mur, Zur y Nur emplean manganeso, zinc y níquel como cofactores, respectivamente. Por otro lado, Irr es particular ya que, en lugar de emplear Fe^{2+} directamente como cofactor, es capaz de interactuar con el grupo hemo. PerR es capaz de emplear tanto Fe^{2+} como Mn^{2+} como cofactores, y se caracteriza por su capacidad de percibir el estado redox de la célula, ya que su mecanismo de acción implica la oxidación de un residuo de histidina en su sitio regulatorio. Por su parte, BosR (exclusivo de *Borrelia*, tal como su nombre lo indica) actuaría de manera similar a PerR, con la diferencia de emplear Fe^{2+} y Cu^{2+} como cofactores [130].

Más allá de las diferencias funcionales entre los reguladores Fur mencionados, todos poseen una estructura similar, con un largo promedio de 120 aminoácidos. Actúan como homodímeros, uniéndose al ADN en secuencias ricas en A/T (Figura 7). El dominio de unión al ADN se encuentra en el extremo N-terminal y se compone de una estructura de tipo *helix-turn-helix*. Seguido a esta, se encuentra una región flexible que conecta con el dominio de dimerización, presente en el extremo C-terminal. Es característico de la familia Fur la presencia del motivo HHHXHXXCXXC presente al comienzo del extremo C-terminal, luego de la región flexible. Este motivo rico en histidina conforma en parte el sitio regulatorio donde tiene lugar la interacción con el cofactor metálico. A su vez, un segundo motivo CXXC más cercano al C-terminal se encuentra presente en varios ortólogos Fur, PerR y Zur. Los motivos CXXC presentes en ortólogos fur han sido relacionados con la coordinación de Zn^{2+}, que aportaría estabilidad al dímero.

Generalmente, más de un tipo de regulador Fur se encuentra presente en un mismo organismo, y es común la presencia de autorregulación, regulación cruzada entre reguladores y solapamiento de regulones [131–135].

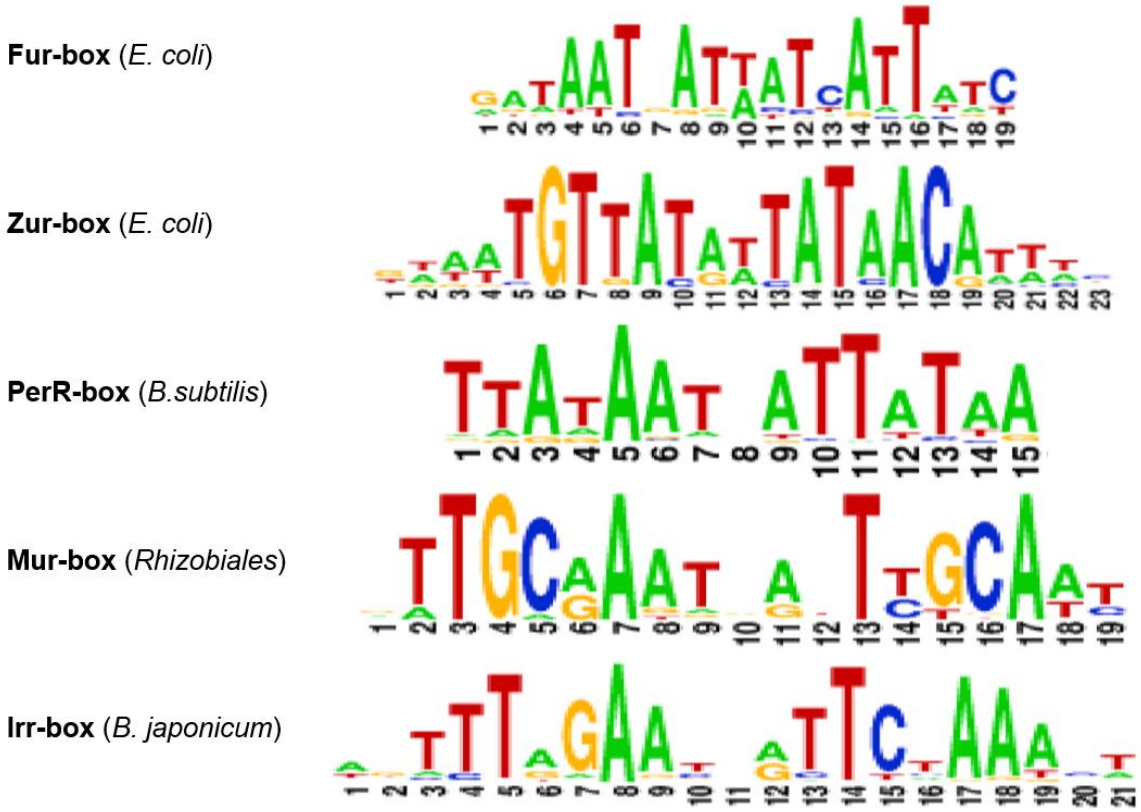


Figura 7. Secuencias de unión al ADN de reguladores de la familia Fur. Se detallan los logos obtenidos para distintos ortólogos Fur. Adaptado de Sevilla *et al*., 2021 [130].

En *Brucella abortus* 2308, se han identificado 4 genes codificantes para proteínas de la familia Fur. Los *loci* denominados *bab1_1668, bab1_2175 y bab2_1082* codifican para los reguladores Mur, Irr y Zur, respectivamente. El *locus bab1_0393* codifica para una proteína Fur previamente no caracterizada, cuyo estudio será abordado en este trabajo de Tesis. A continuación, se describen en detalle estos reguladores:

7.1 Irr

El regulador Irr (*Iron response regulator*) es el principal regulador de los genes relacionados con la homeostasis del hierro (Fe) en α-proteobacterias, incluyendo *Brucella*. En esta bacteria, Irr se mantiene estable en condiciones de deficiencia de Fe, pero se degrada rápidamente cuando hay abundancia de este metal [115, 116]. A diferencia de otros reguladores de la familia Fur, Irr no solo es capaz de utilizar Mn como cofactor, sino que también interactúa directamente con hemo. Irr-Mn posee la capacidad de unirse a sus sitios operadores en los promotores blanco, mientras que la interacción con hemo provoca un cambio conformacional que resulta en la disociación del ADN [136]. Su capacidad para unirse al hemo y la dependencia de su degradación de la vía biosintética del hemo sugieren que Irr detecta indirectamente los niveles celulares de Fe a través de la disponibilidad de hemo, en lugar de detectar directamente el Fe como lo hacen otros reguladores como Fur. Irr puede actuar como activador o represor transcripcional, dependiendo de su unión en la región promotora de un gen, regulando así genes implicados en la importación y exportación de Fe [109, 115–117].

Irr es crucial para la capacidad de *Brucella* de mantener infecciones crónicas en ratones [117], debido a su papel en la expresión de genes que codifican los sistemas de transporte de Fe relacionados con la virulencia, como los de sideróforo Fe^{3+} (brucebactina), transporte de hemo (*bhuA*) y Fe^{2+} (*ftrABCD*). Además, Irr reprime genes que participan en la exportación y almacenamiento de Fe, como la bacterioferritina codificada por el gen *bfr* [109, 116, 117]. Así, Irr es esencial para la supervivencia y replicación intracelular de *Brucella*, permitiendo su adaptación a las condiciones de hierro limitante durante la infección.

7.2 Mur

El regulador Mur (*Manganese uptake regulator*) es un miembro de la familia Fur, identificado exclusivamente en α–proteobacterias. Inicialmente fue descrito en *Rhizobium leguminosarum*, donde su función consiste en reprimir la transcripción del operón transportador de Mn^{2+} *mntABCD* en presencia de manganeso, pero no en condiciones de exceso de hierro [137]. El modelo de acción canónico de Mur consiste en la represión de sus genes blanco una vez que interacciona con su cofactor metálico. Ensayos *in vitro* han demostrado que Mur de *R. leguminosarum* es capaz de interactuar no solo con Mn^{2+}, sino también con Fe^{2+}, Zn^{2+} y Co^{2+}, uniéndose al ADN con niveles de afinidad similar [138]. Por este motivo, se estima que el cofactor metálico que Mur utiliza *in vivo* está relacionado con la biodisponibilidad de este en el citoplasma bacteriano.

Previo a la realización de este trabajo de Tesis, fueron identificados 2 blancos regulatorios de Mur en *Brucella*: el transportador de Mn *mntH* [111], y la adhesina trimérica *btaE* (Ramis *et al*, no publicado). En ambos casos, Mur reprime la expresión de sus genes blanco en respuesta a niveles crecientes de Mn [119], (Ramis *et al*, no publicado). Un análisis bioinformático llevado a cabo por el grupo de Rodionov [139], logró identificar tan sólo 2 sitios de unión de Mur en el genoma de *B. abortus* 2308. Uno de ellos es aquel presente en el promotor del *locus mntH*, mientras que el otro se ubica en el promotor del *locus bab1_0393*, el cual codifica para una proteína de la familia Fur no caracterizada, tal como se informó anteriormente.

Si bien una deleción de *mur* no mostró efectos deletéreos en la virulencia de *Brucella*, no puede decirse lo mismo para las cepas mutantes de sus blancos regulatorios. Una cepa mutante *mntH* de *B. abortus* 2308 mostró una capacidad de supervivencia y replicación intracelular notoriamente afectada, tanto en ensayos de infección de macrófagos *in vitro*, como en ensayos de infección de ratones. Además, la mutante *mntH* mostró mayor sensibilidad al estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno, así como un crecimiento aletargado en condiciones de escasez de Mn, en comparación a la cepa salvaje [111, 119].

Por su parte, la adhesina BtaE ha mostrado cumplir un rol importante en la adhesión de *Brucella* a células HeLa y A579, así como a componentes específicos de la matriz extracelular, como el ácido hialurónico [140]. Por otro lado, el gen *btaE* de *B. abortus* 2308 comparte los mismos reguladores transcripcionales con el operón *virB*: VjbR, HutC, IHF, MdrA y MucR han mostrado interactuar directamente con este promotor y regular positivamente su expresión [141], lo cual permite especular con que BtaE pueda cumplir un rol intracelular, más allá de su rol en la adhesión.

7.3 PerR

El regulador PerR (*Peroxide response regulator*) es un miembro muy particular de la familia Fur, ya que su función canónica comprende la regulación de la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, integrando para ello la disponibilidad de metales y la presencia de peróxido de hidrógeno en el citoplasma bacteriano. Se han identificado ortólogos de PerR tanto en bacterias Gram-positivas (*B. subtilis* [142], *Listeria monocytogenes* [143], *Staphylococcus aureus* [144], *Clostridium acetobutylicum* [145] y *Staphylococcus pyogenes* [146]), como Gram-negativas (*N. gonorrhoeae* [147], *Campylobacter jejuni* [148]), siendo PerR de *B. subtilis* el estudiado con mayor profundidad.

La caracterización de este regulador demostró que posee un sitio de interacción con Zn^{2+} (implicado en otorgar estabilidad estructural al homodímero), y un sitio regulatorio, el cual puede coordinar tanto Fe^{2+} como Mn^{2+} como cofactores. Llamativamente, al interactuar con Mn^{2+} (PeR:Zn,Mn), la proteína resulta insensible al agregado de H_2O_2, manteniendo su función represiva sobre la expresión del gen blanco *katA*. La situación contraria fue observada al exponer a H_2O_2 a la proteína coordinada con Fe^{2+} (PeR:Zn,Fe). Estas observaciones llevaron al establecimiento de un modelo, en el cual la regulación de PerR sobre sus genes blanco es dependiente del cociente Fe/Mn y el estado redox de la célula, percibido de acuerdo a la presencia de H_2O_2. Cuando el cociente Fe/Mn aumenta en la célula, la forma PeR:Zn,Fe es predominante, y participa en la represión de sus genes blanco. En presencia de H_2O_2, PeR:Zn,Fe sufre una oxidación catalizada por el Fe^{2+} presente en su sitio regulatorio, lo cual provoca la disociación del ADN, permitiendo así la transcripción de genes blanco, entre ellos catalasas y peroxidasas involucradas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno. Luego, la forma oxidada de PerR (oxo-PerR) es degradada por la proteasa LonA [149]. De esta manera, la regulación de PerR sobre sus genes blanco transduce en simultáneo dos señales: la presencia de Fe^{2+} y H_2O_2, compuestos implicados en la generación de estrés oxidativo debido a la catálisis de reacciones de Fenton. Por otro lado, si el cociente Mn/Fe aumenta, PerR se encontrará predominantemente en la forma PeR:Zn,Mn, la cual es insensible al H_2O_2, tal como se mencionó anteriormente.

Se ha descrito que los promotores blanco de PerR poseen diferencias en sus sitios operadores, lo cual daría lugar a sitios de alta y baja afinidad. En este sentido, en condiciones aeróbicas y de presencia de Fe, PeR:Zn,Fe ejerce su función regulatoria sobre sus genes blanco, principalmente interactuando con aquellos promotores de alta afinidad. En condiciones de alto Mn, PeR:Zn,Mn se acumula en la célula (ya que es insensible a la oxidación y posterior degradación) permitiendo así la regulación tanto de promotores de alta como baja afinidad [149–151].

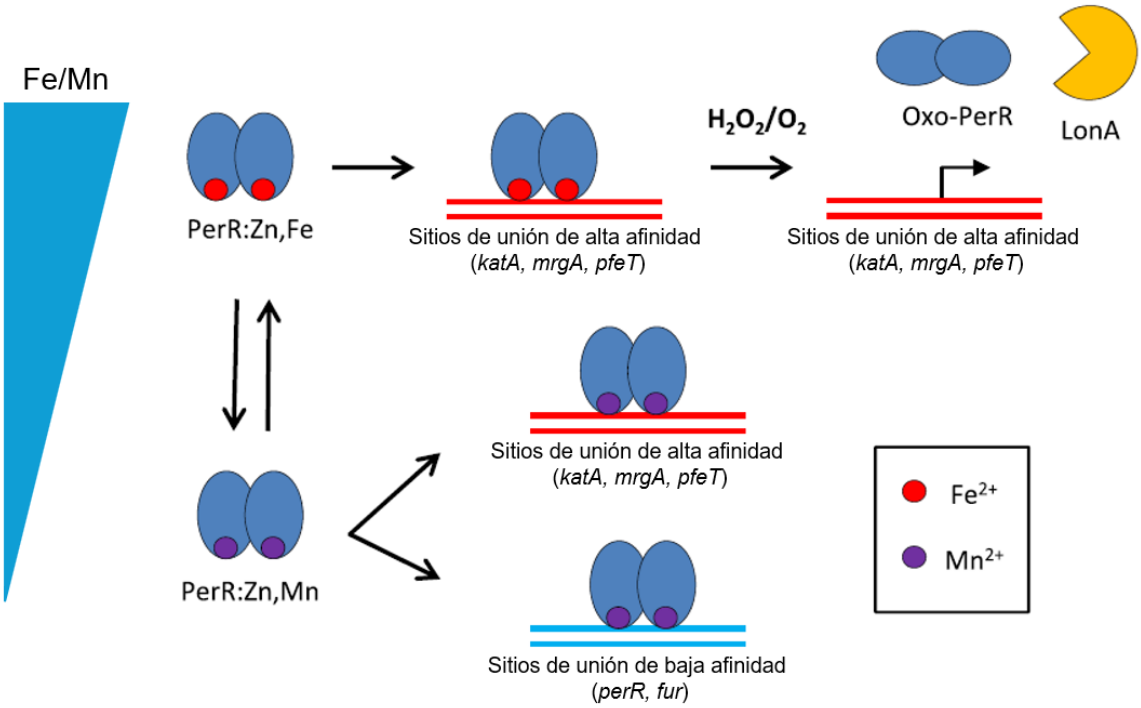


Figura 8. Mecanismo de acción de PerR. En condiciones de alta relación Fe/Mn, PerR:Zn,Fe interacciona con promotores blanco con sitios de unión de alta afinidad. La presencia de especies reactivas de oxígeno gatilla la oxidación de PerR (oxo-PerR), lo cual provoca la disociación del ADN, permitiendo así la expresión génica. Por el contrario, en condiciones de baja relación Fe/Mn, PerR:Zn,Mn interacciona tanto con sitios de alta y baja afinidad en promotores blanco. La incorporación de Mn^{2+} como cofactor torna a PerR insensible a la oxidación por ROS. Adaptado de Sevilla *et al*., 2021 [130].

Dada su función en la homeostasis de Fe y respuesta al estrés oxidativo, no es sorpresivo que PerR sea relevante para la patogénesis. Se ha reportado que PerR de *S. pyogenes* es importante para su virulencia, controlando la expresión de *sodA* (superóxido dismutasa A) y *mrgA* (proteína de resistencia al peróxido similar a Dps) [152, 153]. En *S. aureus*, PerR reprime la transcripción de *katA* (catalasa A), *ahpC* (alquil hidroperóxido reductasa), *mrgA* (homólogo de Dps similar a ferritina), *ftn* (proteína de almacenamiento de hierro), *bcp* (bacterioferritina) y *trxB* (tiorredoxina reductasa), siendo éstas también necesarias para la virulencia de este patógeno [154].

Hasta el momento, no se ha reportado la presencia de un regulador PerR en ninguna especie del género *Brucella*. Sin embargo, en este trabajo se abordará la caracterización de la proteína codificada por el *locus bab1_0393*, la cual posee ciertas características similares a las de un regulador PerR.

7.4 Zur

La principal vía para controlar la incorporación de zinc en *Brucella* es a través del regulador Zur (Zinc uptake regulator), que está codificado en el *locus znuABC*, río abajo de *znuBC*.

La evidencia experimental ha demostrado que Zur funciona de manera sensible al zinc para controlar la expresión de *znuABC* en *Brucella* [120]. Una cepa de *B. abortus* con deleción de *zur* exhibió niveles significativamente mayores de ARNm de *znuA*, *znuB* y *znuC*, lo que indica que Zur es un represor transcripcional de este sistema de

importación de Zn, en presencia de dicho metal. Los ensayos *in vitro* mostraron que Zur interactúa directamente con el promotor *znuABC* de una manera dependiente de zinc. Con respecto a la virulencia, la deleción de *zur* no afectó la capacidad de *Brucella* para sobrevivir y replicarse en macrófagos peritoneales murinos primarios ni para producir infección crónica en ratones BALB/c [120]. Similar a lo expuesto en relación a Mur y sus blancos regulatorios, si bien la deleción de Zur no mostró implicancias para la virulencia de *Brucella*, no puede decirse lo mismo del sistema *znuABC*. La deleción de este sistema de importación de zinc en *B. abortus* afecta la capacidad de supervivencia y replicación intracelular en células HeLa, macrófagos RAW 264.7, y en ratones BALB/c [112, 113, 155].

8. Reguladores de homeostasis de metales adicionales: RirA y ZntR

RirA es un miembro de la familia Rrf2 de reguladores transcripcionales. Estos reguladores normalmente dependen de los grupos Fe-S para su actividad y, por lo tanto, se ha propuesto que, al igual que Irr, RirA no detecta los niveles de Fe en la célula directamente, sino que monitorea el estado del ensamblaje de grupos Fe-S como un medio indirecto de detectar los niveles celulares de Fe [156]. En *Brucella*, el gen *rirA* reside en un operón con el gen que codifica la hemooxigenasa BhuQ [118], el cual es reprimido por Irr en condiciones de bajo contenido de Fe. Se ha observado que los genes de transporte de Fe y hemo muestran una expresión elevada en un mutante *rirA* de *B. abortus* durante el crecimiento en presencia de Fe [117]. A partir de estas observaciones, se puede especular que Irr y RirA de *Brucella* podrían colaborar en la formación de un circuito regulador integrado, similar al propuesto para la α-proteobacteria *Agrobacterium tumefaciens* [157]. En este modelo, Irr activa los genes responsables de la adquisición de Fe y reprime los involucrados en el almacenamiento, transporte y utilización de Fe cuando los niveles de hierro son bajos. Por su parte, RirA reprime los genes de captación de Fe cuando los niveles de hierro son elevados.

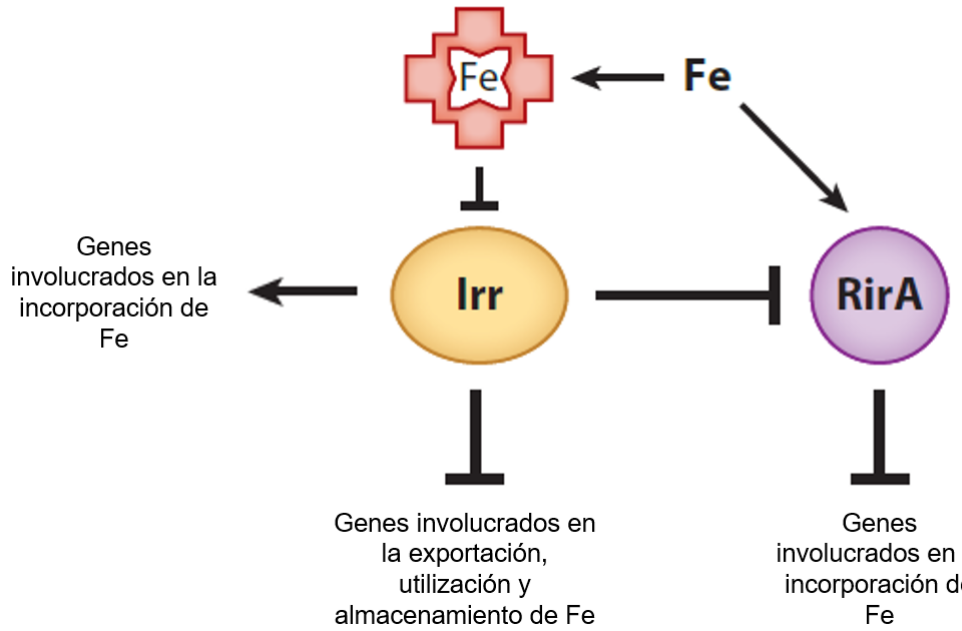


Figura 9. Roles de Irr y RirA en el control de la homeostasis de hierro. Circuito regulatorio propuesto para *Brucella*, basado en datos experimentales [118] y en el modelo regulatorio de *Agrobacterium tumefaciens* [157]. Adaptado de O'Brian, 2015 [158].

ZntR es un integrante de la familia de reguladores MerR y juega un papel en la regulación transcripcional del exportador de zinc ZnuA. En una cepa de *B. abortus* con una deleción de *zntR*, se observaron niveles elevados de ARNm de *zntA*, lo que sugiere que ZntR en *Brucella* activa la transcripción según el modelo de los activadores transcripcionales de tipo MerR [159]. Se ha demostrado que la proteína ZntR de *Brucella* se une de manera directa al promotor de *zntA*; sin embargo, esta interacción no depende de zinc, ya que la adición de quelantes en los EMSA no alteró la unión entre ZntR y el promotor de *zntA* [120]. Es probable que ZntR esté constantemente unido al promotor de zntA, y que, cuando los niveles de zinc intracelular son altos, ZntR detecta y responde al zinc curvando el ADN, lo que permite la expresión de zntA. Un aspecto relevante es que la eliminación de *zntR* condujo a la atenuación de la cepa en un modelo murino de infección por *Brucella*, aunque la mutante *zntR* no presentó alteraciones en su capacidad para sobrevivir y replicar en macrófagos peritoneales primarios [120].

9. Antecedentes Experimentales

9.1 Análisis global de la red regulatoria de VjbR

Tal como se mencionó anteriormente, VjbR es un regulador global de *Brucella*, siendo fundamental para la supervivencia y replicación intracelular debido a su rol como principal inductor del SST4 codificado por el operón *virB*, entre otros factores de virulencia. En este sentido, en el año 2010 dos grupos de investigación publicaron estudios abordando la red regulatoria de VjbR mediante técnicas de transcriptómica por microarrays y/o proteómica en bacterias incubadas en medios bacteriológicos ricos en nutrientes [69, 70]. Ambos estudios mostraron un gran número de genes diferencialmente expresados entre las cepas salvaje y mutante *vjbR*, sin embargo, sólo un porcentaje menor al 10% de estos genes coincidieron en ambos trabajos, lo cual fue atribuido a las diferencias entre las condiciones experimentales empleadas. Por otro lado, dado que estas técnicas no son capaces de distinguir entre genes directa o indirectamente regulados por VjbR, no fue posible determinar el motivo de unión al ADN de este regulador en las secuencias promotoras de los genes diferencialmente expresados.

En este sentido, con el objetivo de conocer en detalle el regulón de este factor de transcripción, nuestro grupo llevó a cabo ensayos de ChIP-Seq y RNA-Seq en bacterias incubadas en condiciones que imitan el ambiente intrafagosomal durante los primeros estadios de infección, es decir, cuando *Brucella* se encuentra confinada dentro de eBCVs [68]. Para ello, se empleó el “medio mínimo 1” (MM1), el cual posee pH ácido (5,5) escasez de nutrientes y ácido urocánico para inducir la expresión de VjbR [160]. Este trabajo, publicado en el año 2017, permitió identificar 235 sitios de interacción directa de VjbR en el genoma de *Brucella abortus* 2308 (“picos” de ChIP-Seq), de los cuales 129 (55%) se hallaron en regiones intergénicas. Este dato confirmó el enriquecimiento de sitios de unión de VjbR en regiones promotoras, ya que el 88% del genoma de *Brucella* se compone de secuencias codificantes.

Gracias al análisis de secuencias correspondientes a los 129 picos de ChIP-Seq en regiones promotoras con el software MEME (Multiple Em for Motif Elicitation), fue posible determinar el motivo de unión al ADN de VjbR. Este consistió en una secuencia asimétrica de 16 pb, con una región de 6 pb rica en G/C, flanqueada por regiones ricas en A/T de 8 pb y 2 pb, respectivamente (Figura 10A). En cuanto a los resultados del

ensayo de RNA-Seq, se identificaron 71 genes diferencialmente expresados al comparar las cepas salvaje y Δ*vjbR*, de los cuales 37 evidenciaron una regulación directa por VjbR dada la presencia de un pico de ChIP-Seq en sus respectivos promotores. La diferencia entre el número de genes diferencialmente expresados y los promotores con los cuales VjbR interactuó directamente señala que en varios *loci* la unión de VjbR no resultó suficiente para generar un efecto transcripcional asociado. Esto podría deberse a que sean requeridos reguladores adicionales para desencadenar dichos efectos, y que éstos podrían estar ausentes y/o inactivos en las condiciones experimentales empleadas.

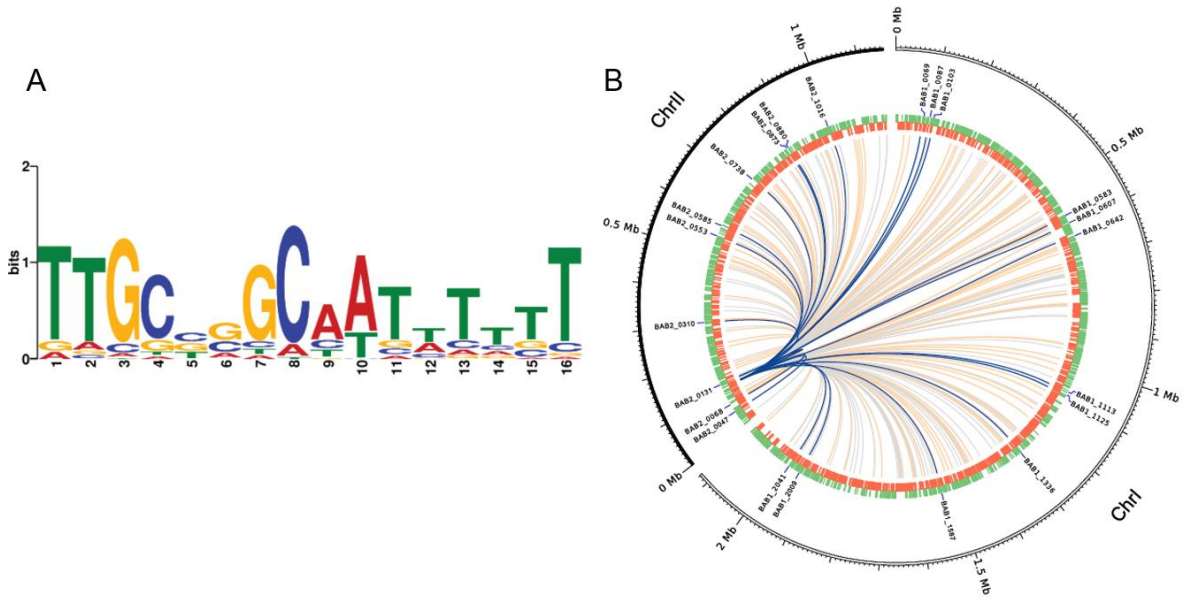


Figura 10. Análisis global de la red regulatoria de VjbR. A) Motivo de unión al ADN de VjbR obtenido mediante el uso del software MEME. B) Circos plot representando los cromosomas I (blanco) y II (negro) de Brucella abortus 2308. A partir de la posición del *locus vjbR* (cromosoma II, posición 117848) se proyectan líneas que conectan con los 235 sitios identificados de unión al ADN de VjbR por ChIP-Seq. Líneas grises indican eventos de unión de VjbR a secuencias codificantes, donde no se observaron efectos transcripcionales por RNA-Seq. Líneas naranjas indican eventos sin efectos transcripcionales, pero en los cuales VjbR mostró unión a zonas intergénicas (regiones promotoras). Las líneas azules indican eventos de unión de VjbR a regiones intergénicas donde se observaron efectos transcripcionales asociados a *loci* cercanos. Adaptado de Kleinman *et al*, 2017 [68].

Habiendo determinado el motivo de unión al ADN de VjbR, se empleó el software FIMO para identificar todas las secuencias pertenecientes al genoma de *B. abortus* 2308 que mostrasen un ajuste significativo (*p*-valor < $1x10^{-4}$) a dicho motivo. De esta manera, se identificaron 259 regiones intergénicas con motivos de unión de VjbR. El 44 % de estas regiones mostraron asociación a picos de ChIP-seq de VjbR, mientras que el 56% restante no mostró interacción con VjbR en las condiciones experimentales empleadas. Por otro lado, se identificaron un total de 121 picos de ChIP-Seq que carecían de la secuencia de reconocimiento de VjbR. Estas observaciones apuntaron a que la red regulatoria de VjbR sería aún más compleja de lo pensado, dado que en posiciones específicas del genoma la interacción de VjbR con sus sitios blanco podría estar

bloqueada por proteínas que reconocen secuencias adyacentes o solapantes, compitiendo con el mismo por la unión al ADN. De forma análoga, los casos en los que se observó interacción directa de VjbR a pesar de carecer de sitio de unión, podrían ser indicativo de la presencia de proteínas que auxilian la interacción VjbR-ADN.

Con el objetivo de abordar la hipótesis de la existencia de proteínas competidoras y/o auxiliares de la unión de VjbR al ADN, se procedió a realizar un análisis bioinformático apuntado a identificar secuencias de ADN conservadas, adyacentes a los sitios de unión de VjbR. Estas secuencias podrían constituir sitios de unión para las potenciales proteínas que intervendrían, tanto positiva como negativamente, con la interacción VjbR-ADN.

En el grupo de promotores con motivos conservados de unión de VjbR pero que no fueron capaces de unir dicho factor transcripcional *in vivo*, se identificaron 3 motivos distintos, altamente conservados a los que denominamos A, B y C (Fig. 11B). Por otro lado, en el grupo de promotores donde se observó interacción de VjbR *in vivo*, pero no se detectó su motivo de unión, se identificó un motivo al cual denominamos A' (dada su similitud al motivo A en algunas de sus posiciones) y un segundo motivo al cual denominamos D (Fig. 11C). En cambio, en el grupo control de promotores con sitios de VjbR que sí fueron capaces de interaccionar con dicho regulador (Fig. 11A) no se hallaron motivos significativamente conservados.

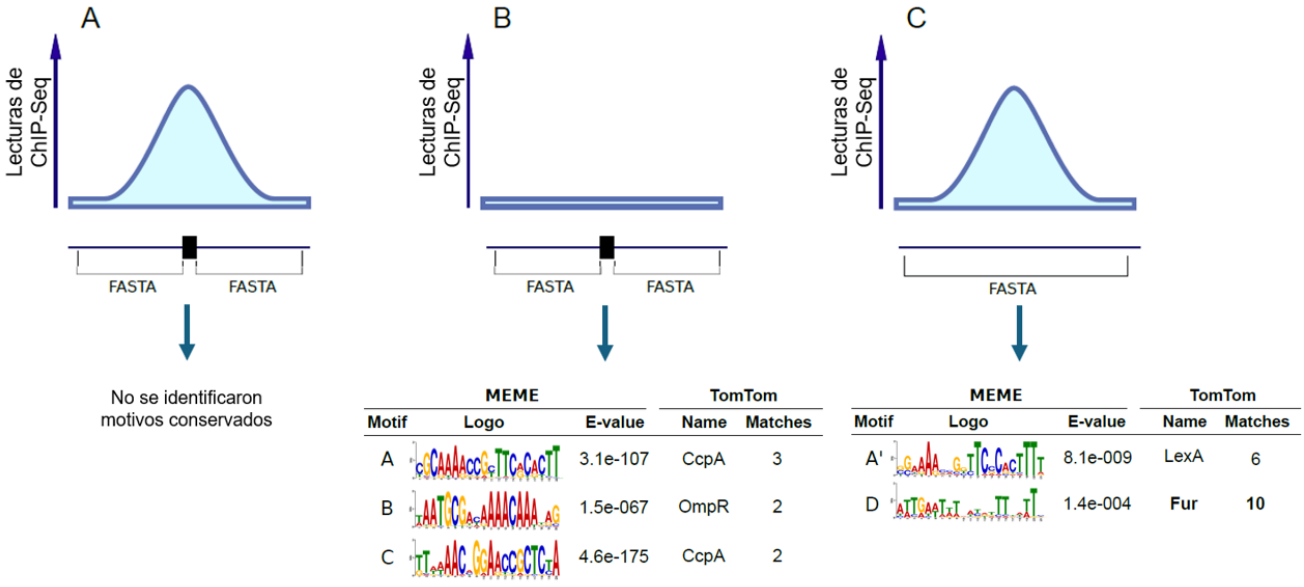


Figura 11. Identificación de motivos de ADN conservados flanqueantes a los sitios de unión de VjbR. Representaciones esquemáticas de regiones promotoras que muestran (A) unión de VjbR y presencia de su motivo de unión, (B) coincidencia con el motivo de unión de VjbR pero sin unión *in vivo* del regulador, y (C) secuencias genómicas que unieron a VjbR pero no presentaron su motivo de unión. Las líneas horizontales sólidas representan regiones genómicas de *B. abortus* 2308. Los rectángulos negros representan la posición de las secuencias que coinciden con el motivo de unión de VjbR. Las secuencias de ADN fueron extraídas en formato FASTA y utilizadas para el análisis con MEME para identificar motivos conservados. Las matrices de posición sitio-específicas de los motivos resultantes con valores E < 0.5 se usaron como entradas para las búsquedas en TomTom. Las tablas muestran los logos de los motivos conservados identificados por MEME junto con sus respectivos valores de coeficiente E, y el nombre del acierto con el mayor número de coincidencias en cada búsqueda de TomTom. Los softwares MEME y TomTom forman parte de MEME Suite [161].

Con el objetivo de descartar que los motivos identificados pudiesen corresponder a ARNs no codificantes, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos Rfam, obteniendo resultados negativos. Por lo tanto, mediante el uso del software TomTom, se procedió a evaluar si los motivos hallados mostraban similitud con sitios de unión de factores de transcripción procarióticos conocidos. El resultado del análisis indicó que aquellos motivos con un alto contenido de información (motivos A, B, C y A') mostraron similitud con sitios de unión de factores de transcripción de diversas familias (CcpA, OmpR y LexA), presentando coincidencias (*matches*) con un número de aciertos que osciló entre 2 y 6. Sorprendentemente, a pesar de tener el contenido de información más bajo, el motivo D obtuvo la coincidencia con el mayor número de aciertos significativos, en este caso con sitios de unión de homólogos del regulador Fur de diferentes especies bacterianas. Dado este resultado, renombramos el motivo D como "motivo tipo Fur" y se procedió a estudiar su localización a nivel global en el genoma de *B. abortus* 2308, mediante el uso del software FIMO.

De un total de 285 ocurrencias en el genoma de *Brucella*, el 66% de los casos mostraron que el motivo tipo Fur se localizó en secuencias intergénicas, lo que sugiere un notable enriquecimiento en regiones promotoras. Específicamente, se identificaron 47 genes blanco directo de VjbR que contenían motivos tipo Fur en sus promotores. Uno de estos fue *btaE*, un autotransportador trimérico con función de adhesina, ampliamente estudiado por nuestro grupo de investigación [140, 141]. Nuestros estudios demostraron que *btaE* comparte los reguladores transcripcionales VjbR, MdrA, HutC e IHF con el promotor de *virB* (Fig 12A), el cual también presenta un sitio tipo Fur (este aspecto se analizará más a fondo en esta tesis). Notablemente, se detectaron cuatro repeticiones del motivo tipo Fur en el promotor de *btaE*, lo que suscitó la pregunta de si la presencia de este motivo podría conferir al *locus* una regulación dependiente de metales.

Para abordar esta hipótesis, se analizó la expresión de este gen tanto a nivel proteína por *western blot* (Fig. 12B) como a nivel de actividad promotora en bacterias incubadas en medio MM1, con y sin el agregado de hierro (50 µM $FeCl_3$), observando un fuerte efecto represor en presencia del metal. Con el fin de identificar el factor de transcripción responsable de este efecto, se construyeron cepas mutantes por deleción de los reguladores Irr y RirA. Sin embargo, ambos resultados fueron negativos, ya que las deleciones no impidieron el efecto represivo del hierro sobre la expresión de *btaE* (Fig. 12C).

Dado que esta reportado que el hierro y el manganeso pueden tener actividades cruzadas sobre Fur y Mur [162], se construyó una cepa *B. abortus ⊿mur*, en la que se observó una pérdida del efecto dependiente de metales sobre la actividad promotora de *btaE*, tanto con Fe como con Mn (Fig. 12E).

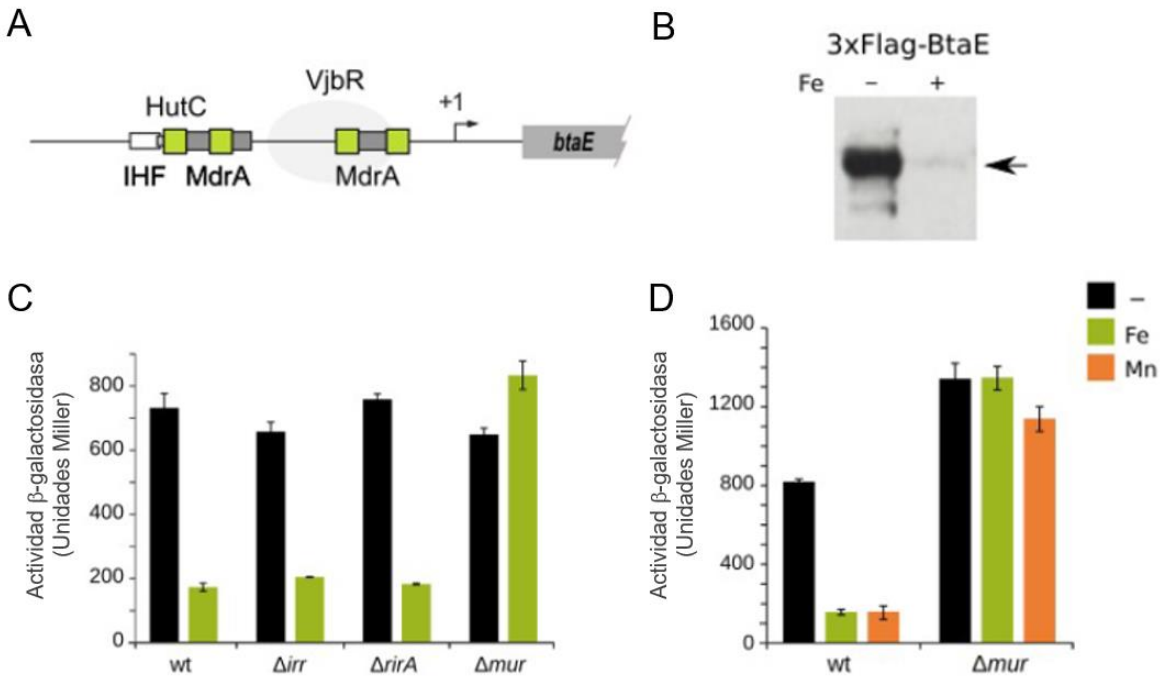


Figura 12. BtaE es regulado por Mur. A) Representación esquemática a escala del promotor *btaE* indicando la posición de los sitios de unión de distintos factores de transcripción, incluyendo los motivos tipo Fur (verde). B) Western blot con anticuerpo anti-Flag de extractos totales de la cepa *B. abortus 3xflag-btaE*, la cual contiene una única copia cromosómica de *btaE* etiquetada con el epitope 3xflag bajo su propio promotor, incubada a pH ácido con bajos nutrientes + urocanato en presencia o ausencia de $FeCl_3$ C) Análisis de actividad promotora en bacterias que contienen una fusión transcripcional cromosómica de copia única del promotor *btaE* a lacZ, incubadas bajo las mismas condiciones que en (B) en ausencia o presencia de $FeCl_3$. D) Idem (C) en presencia o ausencia de $FeCl_3$ o $MnCl_2$.

Estos resultados, que forman parte de la Tesis Doctoral de la Dra. Lila Ramis (realizada en nuestro laboratorio), indican que el promotor de *btaE*, un blanco directo de VjbR, está sujeto a una regulación negativa mediada por Mur. Además de validar nuestro enfoque bioinformático para identificar factores de transcripción asociados a la red regulatoria de virulencia de *Brucella*, estas observaciones constituyen la primera evidencia de una conexión entre la red regulatoria transcripcional de VjbR y la percepción de cambios en la concentración de metales de transición en el interior de la célula eucariota. Esto podría ser parte del mecanismo de *Brucella* para detectar respuestas de inmunidad nutricional en el hospedador mamífero, coordinando la expresión génica bacteriana para generar una respuesta adaptativa.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis de Trabajo

En base a los estudios preliminares de la red de VjbR presentados en la sección 9.1, que sugieren secuencias conservadas adyacentes a sitios de unión de VjbR, planteamos como Hipótesis de Trabajo que los motivos A, B, C y D constituyen sitios de unión al ADN de factores de transcripción cuyos regulones se solapan con la red regulatoria de VjbR.

Objetivo General

Identificación y caracterización funcional de factores de transcripción hipotéticos que podrían interactuar con los motivos de ADN identificados *in silico*.

Objetivos Particulares

1. Análisis de los motivos A, B y C:
    - Identificación *de novo* de factores de transcripción que puedan interactuar con los motivos.
    - Evaluación del rol regulatorio de los hipotéticos reguladores identificados.
    - Determinación de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de genes blanco.

2. Expansión del estudio del motivo tipo Fur:
    - Análisis de regulación transcripcional dependiente de la concentración de metales de transición en genes adicionales a *btaE*, cuyos promotores también presenten el motivo mencionado.
    - Evaluación del motivo tipo Fur como sitio de unión directo de Mur u otros reguladores de la familia Fur.
    - Determinación de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de genes blanco.

Resultados

1. Análisis de los motivos A, B, y C presentes en promotores blanco de VjbR

Este trabajo de Tesis se inició estudiando el posible rol de los motivos A, B y C, estadísticamente enriquecidos en un conjunto de regiones intergénicas que presentaron secuencias con similitud al motivo de unión de VjbR pero que no evidenciaron unión del mencionado regulador en ensayos de ChIP-seq (Fig 11B). Dadas estas observaciones, hipotetizamos que los motivos A, B y C podrían constituir sitios de unión al ADN de competidores que bloquearon la interacción VjbR-ADN en las condiciones ensayadas. Como se mencionó anteriormente, mediante el análisis con el software TomTom encontramos similitud entre los motivos A, B, C y motivos de unión al ADN de los factores de transcripción CcpA y OmpR, aunque el número de coincidencias (*matches*) resultó ser bajo, lo cual podría ser indicativo de falsos positivos (Fig. 11B). Con respecto a CcpA, se ha descripto su rol en la regulación de un número importante de genes, incluyendo factores de virulencia, en bacterias como *Streptococcus pyogenes* [163] y *Streptococcus agalactiae* [164]. Análogamente, el regulón de OmpR ha sido estudiado en profundidad en bacterias como *Vibrio cholerae* [165], *Escherichia coli* [166] *y Salmonella entérica* [167]. Además, como se muestra en la Figura 13A, el análisis con el software FIMO evidenció una marcada coocurrencia de los motivos en las secuencias promotoras analizadas, lo cual podría ser indicativo de la unión de varios competidores en un mismo promotor.

Con el objetivo de identificar posibles proteínas competidoras de VjbR que pudiesen interaccionar con los motivos hallados, se prepararon extractos proteicos de *B. abortus* 2308 en las mismas condiciones experimentales que las ensayados en el análisis previo de ChIP-Seq bajo condiciones de acidez y escasez de nutrientes. Luego, dichos extractos fueron sometidos a fraccionamiento con sulfato de amonio, y cada fracción fue empleada para realizar ensayos de EMSA. Para los mismos, se empleó como sonda de ADN a la región promotora del *locus bab1_1970*, que contenía los motivos en estudio (representada en la disposición “a” de la Fig. 13A). Como resultado, fue posible evidenciar una interacción específica a la sonda empleada (Fig. 13B), y mediante el uso de técnicas de *pull-down* seguido de espectrometría de masa, logramos identificar a la proteína IHF como el interactor directo responsable de la señal observada por EMSA en la Fig. 13B. Este resultado no fue sorpresivo, ya que, tal como se mencionó en la Introducción, nuestro grupo identificó sitios de unión de IHF en otros genes blanco de VjbR, como ser el operón *virB* y *btaE*.

A continuación, se realizó un ensayo de protección a la ADNasa I para identificar con precisión el sitio de unión de IHF. Para ello, se empleó la sonda P_{bab1_1970} marcada con un fluoróforo 6-FAM en su extremo 5’, y la proteína IHF recombinante. Como se observa en la Figura 13C, el sitio identificado comprende 21 pb, de las cuales 17 se superponen con el motivo B. A su vez, la comparación de este sitio de unión de IHF con los determinados previamente en los promotores *virB* y *btaE* evidencia una notable conservación de secuencia (Fig. 13D).

Habiendo determinado que el motivo B actúa como sitio de unión de IHF, se procedió a generar una versión de la sonda P_{bab1_1970} carente de dicho motivo (sonda

$P_{bab1_1970\Delta B}$), con el objetivo de emplearla en ensayos de EMSA a fin de detectar señales de interacción específica a los motivos A y/o C que previamente pudieran estar enmascaradas debido a la interacción con IHF. Si bien la sonda $P_{bab1_1970\Delta B}$ resultó útil para evitar la interacción con IHF (Fig. 13E), los ensayos de EMSA empleando dicha sonda y extractos proteicos de *Brucella* no evidenciaron ninguna señal de interacción específica (datos no mostrados).

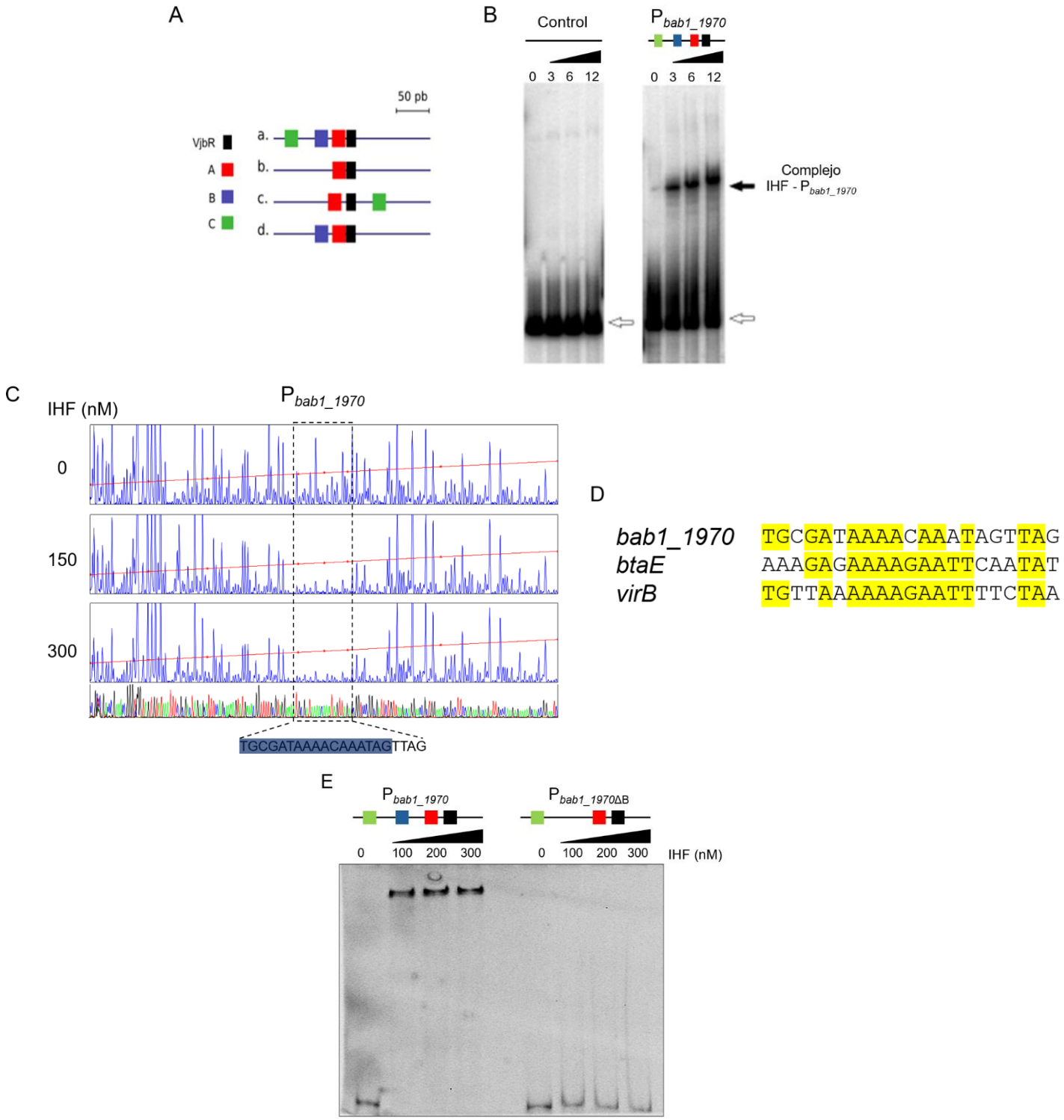


Figura 13. IHF interacciona directamente con el motivo B. A) Representación esquemática de las distintas disposiciones (a-d) de los motivos identificados en regiones promotoras del genoma de *B. abortus* 2308. B) Ensayos de EMSA empleando extractos proteicos de *Brucella* y

las sondas P_{bab1_1970} (que posee los motivos A, B y C) o sonda control (carente de motivos en estudio). La flecha blanca señala la posición de la sonda libre, mientras que la flecha negra indica la posición del complejo IHF - P_{bab1_1970}. C) Ensayo de protección a la ADNasa I empleando la sonda P_{bab1_1970} e IHF recombinante. El rectángulo de líneas punteadas determina la región protegida de la digestión, cuya secuencia se presenta en la zona inferior de la imagen. La secuencia subrayada coincide con el motivo B. D) Alineamiento de secuencias correspondientes a sitios de unión de IHF determinados en los promotores de los *loci bab1_1970*, *btaE* y *virB*. Se resaltan en amarillo aquellas posiciones en donde se observan coincidencias. E) Ensayo de EMSA empleando sondas P_{bab1_1970} o $P_{bab1_1970\Delta B}$ e IHF recombinante.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el motivo B no funciona como un sitio de unión a OmpR, sino a IHF. Por otro lado, no fue posible identificar interacción del regulador CcpA (ni ningún otro tipo de regulador transcripcional) a los motivos A y C. En base a estos resultados negativos, y teniendo en cuenta la marcada coocurrencia de los motivos, evaluamos la posibilidad de que estos no constituyan entidades separadas, donde cada una actuaría como sitio de unión para reguladores diferenciales. En este sentido, reevaluamos los niveles de ajuste del motivo de VjbR en las secuencias donde fue identificado junto a los motivos A, B y C. Tal como se observa en la Figura 13A, el motivo A fue hallado con un alto nivel de ajuste (*p*-valor ≤ $1x10^{-13}$) siempre en proximidad de un sitio de VjbR de bajo nivel de ajuste (*p*-valor ≥ $1x10^{-5}$). Esta observación nos impulsó a realizar un nuevo análisis con el software MEME, de manera de considerar a ambos sitios como uno solo. Este análisis resultó positivo, identificando entonces un nuevo motivo, más extenso, al cual denominamos E (*p*-valor ≤ $1x10^{-18}$. Fig. 14A).

Con el fin de descartar que el motivo E pudiera formar parte de un ARN no codificante, se realizó un análisis en la base de datos Rfam. Si bien esta última arrojó resultados negativos, logramos identificar una secuencia con ajuste al motivo E en BSRD (*Bacterial Small Regulatory RNA Database*). Dicha secuencia forma parte de un "loop facultativo" (de función desconocida) de un *riboswitch* de tiamina pirofosfato (TPP), presente en la región 5'UTR del *locus bab1_1770*, el cual codifica para una proteína periplásmica de unión a tiamina (Fig. 14B). Consecuentemente, estos *riboswitches* son estructuras de ARN regulatorias que, al interactuar con TPP, sufren un cambio conformacional el cual afecta la expresión del ARNm, generalmente interrumpiendo la transcripción y/o inhibiendo la traducción. Si bien esta observación sugiere que los motivos podrían entonces formar parte de estructuras de ARN regulatorio, los motivos B y C no mostraron similitud con ningún ARN depositado en bases de datos.

Dada la coocurrencia de los motivos E, B y C en regiones intergénicas en *Brucella* (Fig. 13A), procedimos a evaluar la conservación de las secuencias presentes entre motivos. Para nuestra sorpresa, logramos identificar un alto nivel de conservación a nivel nucleotídico, lo cual nos llevó a realizar un nuevo análisis MEME, esta vez considerando como una unidad a los motivos E, B, C y las secuencias entre estos. Este nuevo análisis logró identificar un nuevo motivo (denominado motivo EBC), de cerca de 110 pb, con un alto nivel de conservación (Fig. 14C). Llamativamente, un análisis con el software FIMO indicó la presencia de 99 secuencias en el genoma de *Brucella*, que evidenciaron un alto nivel de ajuste a este motivo (*p*-valor < $1x10^{-10}$).

Teniendo en cuenta que un TPP *riboswitch* mostró ajuste al motivo E, nos preguntamos si el motivo EBC podría actuar como un ARN regulatorio. Un análisis de nuestros datos de RNA-Seq evidenció la presencia de transcriptos en varios de los sitios del genoma de *B. abortus* 2308 que mostraron ajuste al motivo EBC (datos no

mostrados). Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se evaluó la posible estructura secundaria de EBC como ARN. Este análisis *in silico* predijo una estructura de alta estabilidad (Fig 14D).

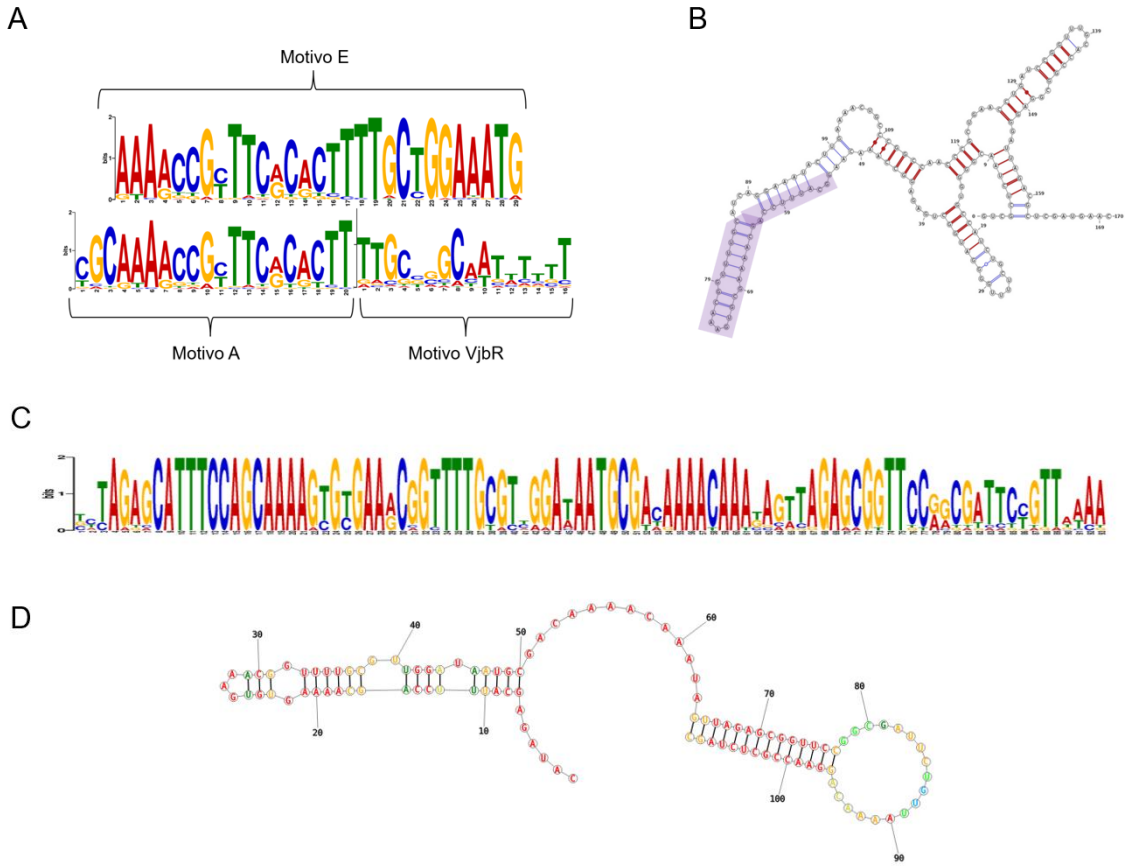


Figura 14. Identificación del elemento EBC. A) Motivo E obtenido a partir de la reevaluación de los motivos A y VjbR. B) TPP riboswitch presente en el extremo 5'UTR del *locus bab1_1770*. La región resaltada presenta un ajuste significativo al motivo E. Modelo extraído de la base de datos "RiboD". C) Motivo EBC identificado al analizar mediante el software MEME aquellos promotores con presencia (con un buen nivel de ajuste) de los motivos E, B y C. D) Estructura de ARN predicha para la secuencia río arriba del *locus bab1_1279* identificada con un alto nivel de ajuste al motivo EBC. Estructura secundaria obtenida mediante el uso del software "RNAstructure".

Teniendo en cuenta estas observaciones, postulamos que los motivos A, B y C identificados no constituyen sitios de unión al ADN de factores de transcripción, sino que éstos forman parte de un elemento genómico con un alto nivel de conservación y múltiples copias en el genoma de *Brucella*, denominado aquí como elemento EBC. Estas características apuntan a que podría tratarse de un elemento BIME (del inglés, *bacterial interspersed mosaic element*). Los BIMEs han sido inicialmente caracterizados en enterobacterias, principalmente en *E. coli*, como elementos genómicos presentes en un gran número de copias, constituidos por motivos de secuencia corta llamados unidades palindrómicas (PUs, por sus siglas en inglés), siendo éstos palíndromos imperfectos de alrededor de 40 pb de longitud [168, 169]. Las PUs se encuentran ya sea como ocurrencias individuales o en agrupamientos, donde alternan en orientación y tipo. En este sentido, los motivos E, B y C podrían considerarse PUs (o fragmentos de PUs) constituyentes del elemento EBC.

Se ha descripto el rol de los BIMEs en la estructuración del cromosoma bacteriano, mediante la interacción con proteínas de tipo histona, como ser HU e IHF [168, 170]. En particular, en *E. coli*, se ha identificado un subtipo de BIME denominado RIB, el cual posee una secuencia con un sitio de unión para IHF flanqueado por PUs [171]. Nuestros resultados demostraron la interacción directa de IHF con el motivo B presente en el elemento EBC, lo cual apoya la caracterización de este elemento como un BIME. Por otro lado, se ha reportado la función del ARN transcripto a partir de un BIME en la estructura del cromosoma procariota. En *E. coli*, el BIME nc5 interacciona con HU tanto como ADN y ARN, estableciendo así complejos ADN-proteína-ARN que potencialmente desempeñan un papel como puntos de anclaje, definiendo diferentes dominios cromosómicos [172]. Como se mencionó anteriormente, nuestros resultados de RNA-Seq evidenciaron transcripción del elemento EBC, y análisis *in silico* predijeron una estructura estable como ARN.

Dado que los BIMEs descriptos en la literatura fueron identificados principalmente en enterobacterias, evaluamos la presencia del elemento EBC en géneros bacterianos evolutivamente cercanos a *Brucella*. Un análisis mediante el uso de los softwares FIMO y BLAST, permitió la identificación del elemento EBC en otros géneros del orden Rhizobiales, como ser *Agrobacterium, Ochrobactrum, Rhizobium, Shinella* y *Mesorhizobium*, con un nivel de conservación de secuencia superior al 70% (Tabla 1).

Organismo	Identidad (%)	Nº de copias (*p*-valor < $1x10^{-10}$)
Brucella abortus	100	99
Ochrobactrum anthropi	91	78
Agrobacterium tumefaciens	74	9
Mesorhizobium jarvisii	80	32
Rhizobium leguminosarum	77	45
Shinella zoogloeoides	78	12

Tabla 1. Identificación del elemento EBC en el orden Rhizobiales. El número de copias del elemento EBC presente en los genomas de cada género y especie mostrados fue obtenido mediante el uso del software FIMO. Por su parte, el porcentaje de identidad fue calculado mediante el uso del software BLAST, generando un alineamiento entre la secuencia de mayor ajuste al motivo EBC en *Brucella* y su correspondiente en cada género bacteriano detallado.

Dado que estos resultados indican que el elemento EBC sería un BIME, esta línea de trabajo se aleja de los objetivos generales de esta Tesis, y llegado a este punto se decidió profundizar el análisis del motivo D, renombrado motivo tipo Fur, el cual sí evidenció estar vinculado a una regulación ejercida por el regulador Mur en el *locus btaE*. A continuación, se detallan los procedimientos realizados.

2. Análisis funcional del motivo tipo Fur en promotores blanco de VjbR

Como se mencionó en la Introducción, el motivo tipo Fur fue identificado en los promotores de 47 blancos directos de VjbR. Los análisis llevados a cabo en uno de estos genes, el correspondiente a la adhesina *btaE*, demostraron una correlación entre la presencia del motivo y una regulación transcripcional dependiente de Fe y Mn, llevada a cabo por el regulador Mur (Fig. 12D). Siendo esta observación el primer caso reportado

de un promotor controlado por VjbR y un regulador de la familia Fur, decidimos explorar el vínculo entre estas redes regulatorias mediante la expansión de nuestro análisis a un número mayor de genes. Para ello, construimos fusiones transcripcionales cromosómicas de copia única al gen *lacZ* para tres promotores candidatos.

En primer lugar, seleccionamos al promotor del gen *virB1*, primer gen del operón *virB*. Como se mencionó en la introducción, este promotor comparte reguladores transcripcionales con el *locus btaE* (IHF, MdrA, HutC y VjbR), además de poseer un sitio tipo Fur. Dada su relevancia respecto a la virulencia de *Brucella*, y las características mencionadas en común con *btaE*, el promotor *virB1* resultó la primera elección para el abordaje de su potencial regulación por metales. En segundo lugar, seleccionamos al promotor del *locus bab2_0131*, que codifica una fosfatasa de la familia PAP2, probablemente involucrada en el reciclaje de transportadores de lípidos durante la biosíntesis de peptidoglicano. Finalmente, en tercer lugar, se seleccionó al *locus bab2_0738*, que codifica un supuesto antiportador K^+/H^+ con homología con oxidorreductasas NADH:ubiquinona.

De forma análoga a lo expuesto en la Figura 12, estas construcciones se utilizaron para determinar la actividad promotora en bacterias incubadas en medio MM1 (condiciones de acidez con bajos nutrientes que imitan el entorno intrafagosómico), con y sin la adición de Fe. Como se muestra en la Tabla 2, en presencia de Fe, observamos una reducción significativa en la actividad promotora en los tres casos evaluados, lo que indica una correlación entre la presencia del motivo tipo Fur y la modulación dependiente de metal de la actividad promotora.

		Motivo tipo Fur		**Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller)**	
Locus tag	**Nombre**	***p*-valor**	**Coordenadas**	**- Fe**	**+ Fe**
bab2_0068	*virB1*	$3{,}04 \times 10^{-6}$	Cromosoma II: 67279-67299	1216,90 ± 78,91	249,65 ± 15,83
bab2_0131	-	$8{,}11 \times 10^{-5}$	Cromosoma II: 128767-128787	116,39 ± 7,69	56,92 ± 4,10
bab2_0738	-	$7{,}75 \times 10^{-5}$	Cromosoma II: 735858-735878	165,43 ± 14,73	89,33 ± 10,36

Tabla 2. La presencia de un motivo tipo Fur en promotores blanco de VjbR está asociada a una regulación transcripcional dependiente de metales. Efecto de la adición de $FeCl_3$ (100 μM) en la actividad promotora de tres genes candidatos que muestran el motivo tipo Fur en sus regiones promotoras. Los valores mostrados corresponden a medias ± desviaciones estándar de tres réplicas biológicas independientes. La significancia estadística de la actividad β-galactosidasa se determinó mediante una prueba *t* pareada por razón (*ratio paired t test*).

2.1 Mur y Fur4 están involucrados en la represión dependiente de metales de la actividad de promotores blanco de VjbR

Dado lo observado en el promotor *btaE*, el siguiente paso consistió en evaluar si el regulador Mur es responsable de la represión mediada por Fe en los *loci* analizados. En primer lugar, se confirmó que, al igual que en el promotor *btaE*, la adición de Mn también genera una marcada represión transcripcional. Sin embargo, los ensayos de actividad promotora en una mutante isogénica Δ*mur* no mostraron diferencias respecto a la cepa salvaje para el promotor *virB1*, mientras que se observó un leve aumento en la actividad transcripcional del promotor *bab1_0131* (Fig. 15A y 15B). En ambos casos, la represión en presencia de Fe y Mn se mantuvo, lo cual indica que Mur no es el regulador detrás de dicha represión en las condiciones ensayadas. Por lo tanto, si bien

la presencia de un motivo tipo Fur correlaciona con una regulación dependiente de metales, estos resultados evidencian variabilidad en cuanto al factor de transcripción específico involucrado en dicha regulación.

Con el objetivo de identificar el regulador responsable de esta represión, se extendió el análisis a mutantes Δ*irr*, Δ*rirA* (datos no mostrados) y a una mutante por deleción para un gen al que denominamos *fur4*, el cual corresponde al *locus bab1_0393*, que codifica para el ortólogo de la familia Fur aún no caracterizado en *Brucella* y que, según un grupo colaborador, responde a Fe y/o Mn (comunicación personal con el Dr. Roop II, datos no publicados). Sorpresivamente, la deleción de *fur4* provocó un leve aumento en la actividad promotora de *virB1* y un incremento más pronunciado en *bab2_0131*, lo que sugiere que este regulador participa en la represión transcripcional de dichos genes. No obstante, la represión inducida por Fe y Mn persistió en la cepa Δ*fur4* (Fig. 15A y 15B), lo que indica que podría existir un regulador adicional sensible a estos metales que actúe de forma redundante con Fur4.

Para explorar esta posibilidad, se evaluó el efecto de ambos metales en una cepa doble mutante Δ*fur4* Δ*mur*. Como se muestra en la Figura 15A, esta doble deleción resultó en un aumento en la actividad promotora de *virB1* y en la abolición completa de la represión por Fe y Mn, lo que sugiere que Mur y Fur4 actúan de manera redundante en la represión mediada por metales de *virB*. En el caso del promotor *bab2_0131*, la cepa doble mutante mostró un perfil de actividad similar al de las mutantes simples (Fig. 15B), lo que indica que este promotor está regulado por Fur4 y por un represor transcripcional adicional, aún no identificado, sensible a Fe y Mn.

En conjunto, estos resultados sugieren un mecanismo de regulación en el que Fur4 y Mur, u otro regulador sensible a metales, actúan de forma redundante para antagonizar la activación mediada por VjbR de promotores que contienen motivos tipo Fur.

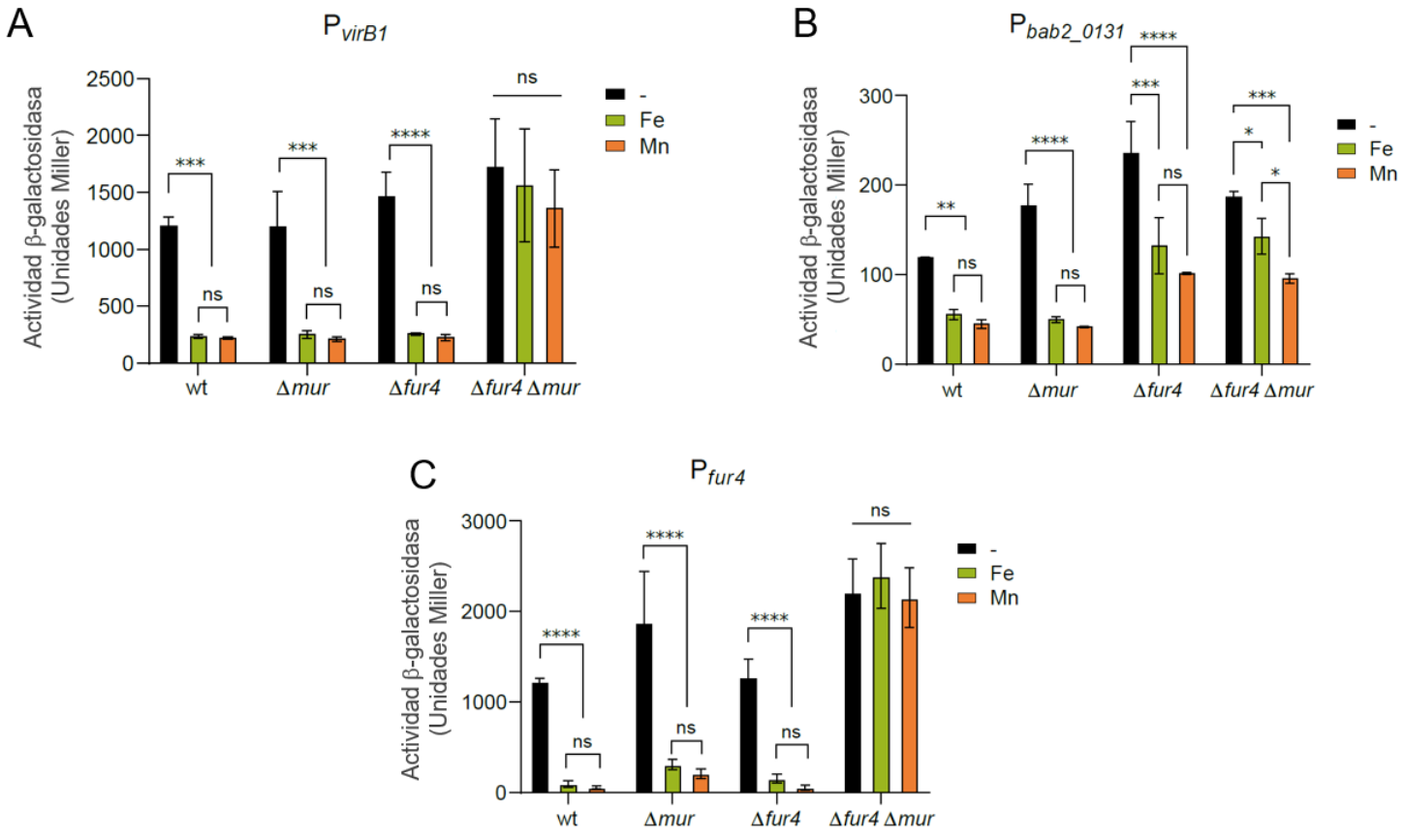


Figura 15. Rol de Mur y/o Fur4 en la represión dependiente de metales de promotores que contienen el motivo tipo Fur. Actividad β-galactosidasa de las cepas salvaje *(*wt*)* o mutantes isogénicas Δ*mur*, Δ*fur4* o Δ*fur4* Δ*mur* que contienen fusiones transcripcionales cromosómicas de copia única del gen *lacZ* a la región promotora del gen *virB1* (A), *bab2_0131* (B) o *fur4* (*bab1_0393*) (C). Las cepas se incubaron en medio MM1 (pH 5,5) con o sin la adición de 100 μM $FeCl_3$ o 100 μM $MnCl_2$. Los valores mostrados son medias ± desviaciones estándar de réplicas biológicas independientes (n = 3 para P_{virB1} y P_{fur4}; n = 2 para P_{bab2_0131}). Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparación post hoc de Tukey. *, p < 0,05; ****, p < 0,0001.

Como se mencionó en la Introducción, la región promotora de *fur4* contiene un sitio predicho de unión para Mur. Adicionalmente, nuestro análisis bioinformático identificó un motivo de unión tipo Fur, aunque con un nivel de ajuste menos estricto (*p*-valor $1x10^{-3}$). Debido a esto, procedimos a analizar el promotor de *fur4* para caracterizar este ortólogo de Fur y evaluar si también está sujeto a una regulación dual por factores de transcripción sensibles a metales. Como se muestra en la Figura 15C, la deleción de *fur4* no afectó significativamente la actividad del promotor, mientras que la mutante Δ*mur* presentó un aumento en la actividad promotora. Sin embargo, en estos contextos genéticos, la represión por Fe y Mn se mantuvo inalterada. Al igual que en *virB1*, la represión mediada por metales fue suprimida en la cepa doble mutante Δ*fur4* Δ*mur* (Fig. 15C), lo que demuestra que Mur y Fur4 también actúan de forma redundante en la regulación del promotor *fur4*.

3. Fur4 y Mur interaccionan directamente con promotores blanco de VjbR

Para determinar si la regulación transcripcional observada por Fur4 y/o Mur es resultado de interacciones directas con los promotores antes mencionados, realizamos ensayos de protección a la ADNasa I utilizando diferentes concentraciones de los factores de transcripción en presencia de Mn, uno de los dos metales de transición que permiten que ambos reguladores se unan al ADN.

Como se muestra en la Fig. 16A y 17A, nuestros ensayos *in vitro* mostraron que Fur4 interacciona con dos regiones centradas en las posiciones -193 y -45 con respecto al inicio de la secuencia codificante de *virB1*, que se designaron como sitios de unión I y II, respectivamente. Dichas designaciones se basaron en la aparente jerarquía de afinidades de unión, deducida a partir del orden de ocupación observado en los patrones de digestión con diferentes concentraciones de Fur4 (Fig. 16A). El sitio de unión I de Fur4, de 48 pb de longitud, se superpone con los sitios de unión de IHF, HutC y MdrA (Fig. 17A); lo que sugiere un mecanismo de represión de la expresión de *virB* en el que Fur4 compite con tres activadores transcripcionales diferentes por la unión al promotor. Por otro lado, el sitio de unión II de Fur4, de 28 pb de longitud, se encuentra 5 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) determinado previamente, y se superpone con el elemento -10 del promotor de *virB1*. Por lo tanto, estas observaciones respaldan un modelo en el que Fur4 reprime la expresión de *virB* no solo compitiendo con activadores transcripcionales sino también bloqueando el acceso de la holoenzima ARN polimerasa (RNAP) al promotor en respuesta a niveles crecientes de Fe y/o Mn.

Por otra parte, observamos interacción directa de Mur con el promotor *virB1* en tres sitios de unión diferentes centrados en 223, 129 y 52 pb río arriba del inicio de la

secuencia codificante de *virB1*, que fueron designados como sitios I, II y III, respectivamente, siguiendo los mismos criterios que se describieron anteriormente (Fig. 16B y 17A). Como se muestra en la Fig. 16B, el sitio de unión I de Mur es extenso, abarcando una secuencia de 108 pb de longitud que mostró una región central de 41 pb completamente protegida de la digestión con ADNasa I a una concentración de 150 nM, mientras que las secuencias flanqueantes de 30 y 37 pb mostraron protección completa solo a concentraciones más altas del factor de transcripción (300 nM). Probablemente, estas observaciones son indicativas de la unión inicial de los dímeros de Mur a la región central del sitio I, para luego dar lugar a eventos de unión de menor afinidad a secuencias contiguas. En la Fig. 17A podemos observar que la región central del sitio de unión I de Mur se superpone totalmente con el sitio de unión de HutC y con porciones significativas de las regiones de unión de MdrA e IHF. A concentraciones más altas de Mur, la región completa protegida se superpone con los sitios de unión de los tres factores de transcripción. Por lo tanto, de manera similar a lo observado con el sitio de unión I de Fur4, Mur también podría reprimir la expresión de *virB* a través de la competencia con los activadores transcripcionales antes mencionados. En otra similitud con Fur4, el sitio de unión III de Mur se halló muy cerca del TSS de *virB1*, en este caso abarcando los elementos -10 y -35 del promotor de *virB*. Además, el sitio de unión II de Mur se superpone casi por completo con el sitio de unión de VjbR (Fig. 17A).

Cabe destacar que los sitios I tanto de Mur como Fur4 han mostrado una región de solapamiento, la cual contiene la secuencia que coincide con el motivo tipo Fur predicho *in silico* en el promotor *virB1* (Fig. 16B y 17A). Este resultado respalda la aplicabilidad de nuestro enfoque para identificar factores de transcripción que impactan en el regulón de VjbR. Tomadas en conjunto, nuestras observaciones apuntan a un mecanismo robusto de represión de la expresión del operón *virB*, en el que dos factores de transcripción diferentes de la familia Fur compiten de manera redundante con distintos activadores transcripcionales directos y, además, bloquean el acceso de la ARN polimerasa al promotor.

En *bab2_0131*, los ensayos de protección a la ADNasa I mostraron que Fur4 interactúa con dos secuencias operadoras ubicadas en las posiciones -232 y -291 pb con respecto al inicio de la secuencia codificante, designadas como sitios de unión I y II, respectivamente (Fig. 16C y 17B). Como se muestra en la Fig. 16C, la región del sitio de unión I comprende una secuencia de 50 pb de longitud. De manera similar a lo observado con Mur en el promotor *virB1*, el sitio de unión I de Fur4 en el promotor *bab1_0131* mostró una región central de 16 pb totalmente protegida de la digestión con ADNasa I y dos secuencias flanqueantes de 19 y 15 pb con protección notable pero no completa (Fig. 16C). Por otro lado, el sitio de unión II de Fur4 exhibió una longitud de 22 pb (Fig. 16C). Es importante destacar que, de manera similar a lo observado en los sitios de unión I de Mur y Fur4 en el promotor *virB1*, el sitio de unión I de Fur4 incluye el motivo tipo Fur predicho en el promotor *bab2_0131* (Fig. 16C y 17B), lo que proporciona un respaldo adicional a la aplicabilidad de nuestro análisis *in silico*. Para examinar el posible mecanismo regulador por el cual Fur4 contrarresta la activación transcripcional de *bab2_0131* mediada por VjbR, utilizamos ensayos de protección a la ADNasa I para determinar la ubicación precisa del sitio de unión de VjbR en este promotor, lo que condujo a la identificación de una secuencia de 40 pb centrada en la posición -217 (Fig. 16D). Como se muestra en la Fig. 17B, el sitio de unión I de Fur4 se superpone con 30 pb de la región protegida por VjbR, lo que respalda un modelo de regulación por

competencia directa, en el que Fur4 desplaza a VjbR de su sitio de unión, reprimiendo así la expresión del gen *bab2_0131*.

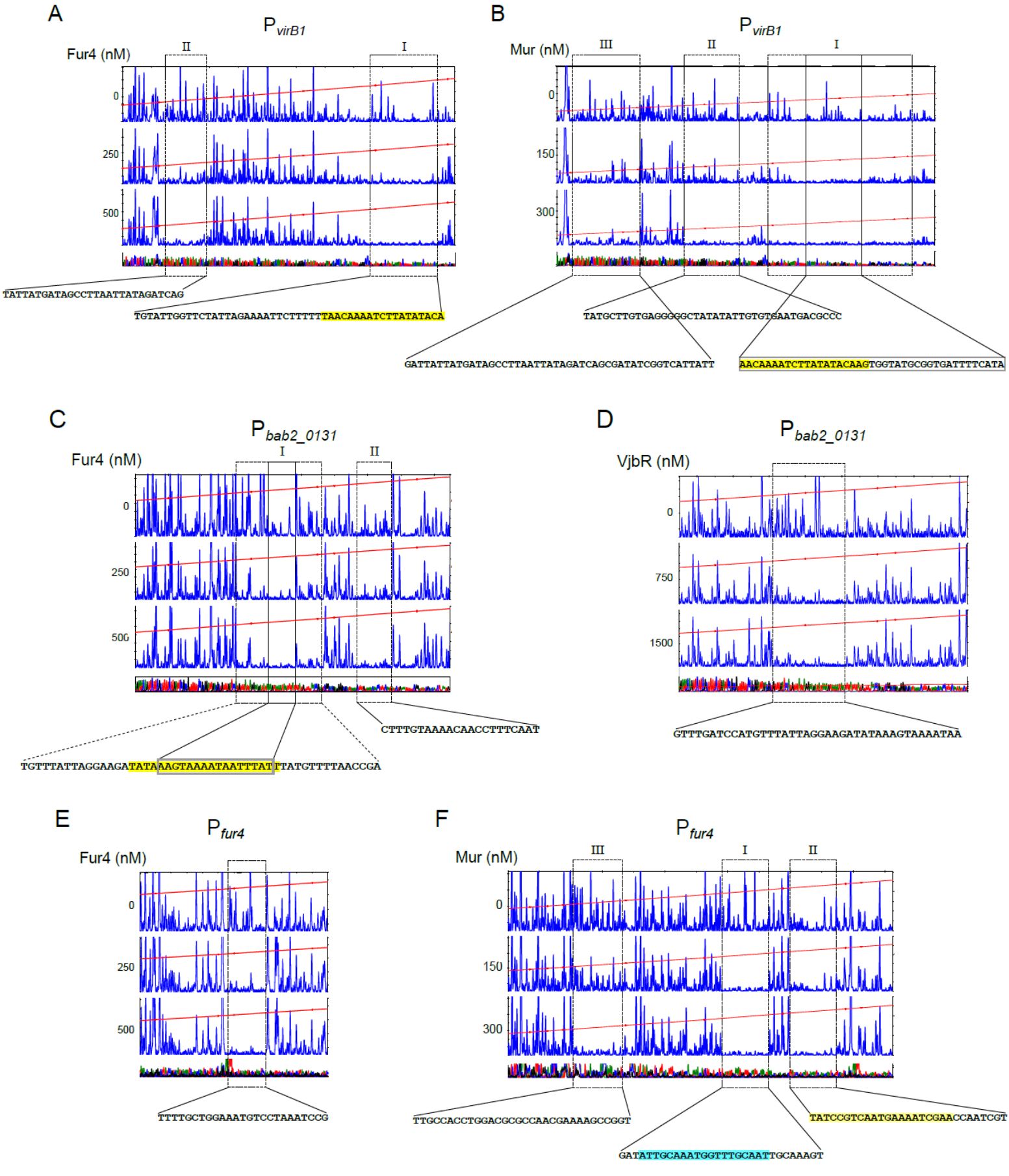


Figura 16. Determinación de los sitios de unión de Fur4, Mur y VjbR en los promotores seleccionados. Ensayos de protección a la ADNAsa I. Las sondas de ADN marcadas con 6-FAM correspondientes a las regiones promotoras de *virB1* (A y B), *bab2_0131* (C y D) o *fur4* (E y F) se incubaron con o sin Fur4 recombinante (A, C y E), Mur (B y F) o VjbR (D) a las concentraciones nanomolares indicadas. Las reacciones de unión se sometieron luego a digestión con ADNasa I. Las figuras muestran electroferogramas junto con reacciones de secuenciación de Sanger realizadas con los mismos primers marcados con 6-FAM utilizados para construir las diferentes sondas de ADN. Los rectángulos discontinuos indican las regiones protegidas de la ADNasa I por los factores de transcripción correspondientes. Los rectángulos de línea gris sólida encierran las secuencias centrales completamente protegidas de la digestión con ADNasa I por Mur o Fur4. Los rectángulos amarillos encierran secuencias que coinciden con el motivo tipo Fur determinado en este trabajo. El rectángulo celeste encierra la secuencia que coincide con el motivo Mur-box determinado previamente por Rodionov *et al.* (2006) [139].

Para obtener más información sobre la red regulatoria que involucra a Fur4 y Mur, analizamos los sitios de interacción de estos reguladores con el promotor *fur4*. En este caso, nuestros análisis de protección a la ADNasa I revelaron que Fur4 interactúa con un único sitio de 25 pb de longitud centrado en la posición -277 en relación con el inicio de la secuencia codificante (Fig. 16E y 17C). Por otro lado, Mur exhibió tres sitios de unión centrados en las posiciones -193, -238 y -98 (Fig. 16F), designados como I, II y III, respectivamente, también en función de su aparente jerarquía de afinidades de unión. De manera similar a lo observado en *virB1*, el sitio II de Mur abarcó un motivo tipo Fur. Además, el sitio de unión de Mur con mayor afinidad aparente (sitio I) abarcó por completo el sitio de unión predicho previamente *in silico* por Rodionov et al. (2006) [139] (Fig. 17C).

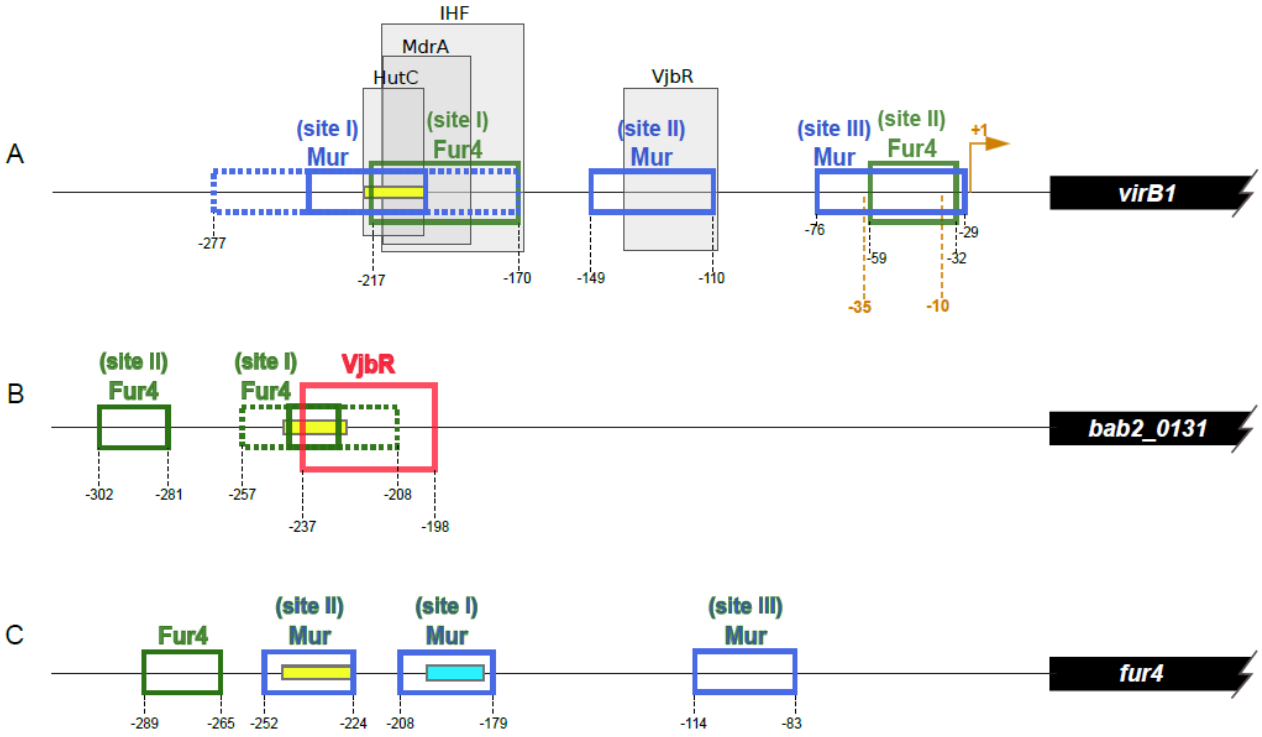


Figura 17. Representaciones esquemáticas de promotores en estudio y disposición de los sitios de unión de factores de transcripción. Representación esquemática (se conserva la escala) de las regiones promotoras de *virB1* (A), *bab2_0131* (B) o *fur4* (C). Las regiones

codificantes de los genes se representan mediante rectángulos negros sólidos. Los rectángulos abiertos indican la posición de los sitios de unión determinados en este trabajo para Mur (azul), Fur4 (verde) y VjbR (rojo). Los rectángulos abiertos discontinuos indican las regiones que muestran protección frente a la ADNasa I solo a altas concentraciones del regulador correspondiente. Rectángulos grises sólidos indican la posición de los sitios de unión previamente determinados para HutC, MdrA, IHF y VjbR. Se indican las posiciones de las secuencias que coinciden con el motivo tipo Fur determinado en este trabajo (rectángulos amarillos) o el motivo de unión a Mur determinado previamente por Rodionov *et al*. (2006) [139] (rectángulo celeste).

Aunque la ubicación precisa del TSS de *fur4* aún se desconoce, datos previos de RNA-Seq sugieren que este *locus* posee una región 5' UTR extensa. En base a las posiciones de los sitios de unión I y II de Fur4 y Mur en relación con la posible posición del TSS, es probable que estos dos miembros de la familia Fur repriman la expresión de *fur4* al impedir el acceso de la ARN polimerasa en respuesta a un aumento en los niveles de Fe y/o Mn (Fig. 18). En consecuencia, de acuerdo con lo observado en las regiones promotoras *virB1* y *bab2_0131*, estos resultados indican que el promotor *fur4* también está bajo el control directo de dos factores de transcripción sensibles a Fe y Mn, lo que respalda la idea de que una represión robusta de la expresión genética dependiente de metales es de particular importancia para la biología de *Brucella*.

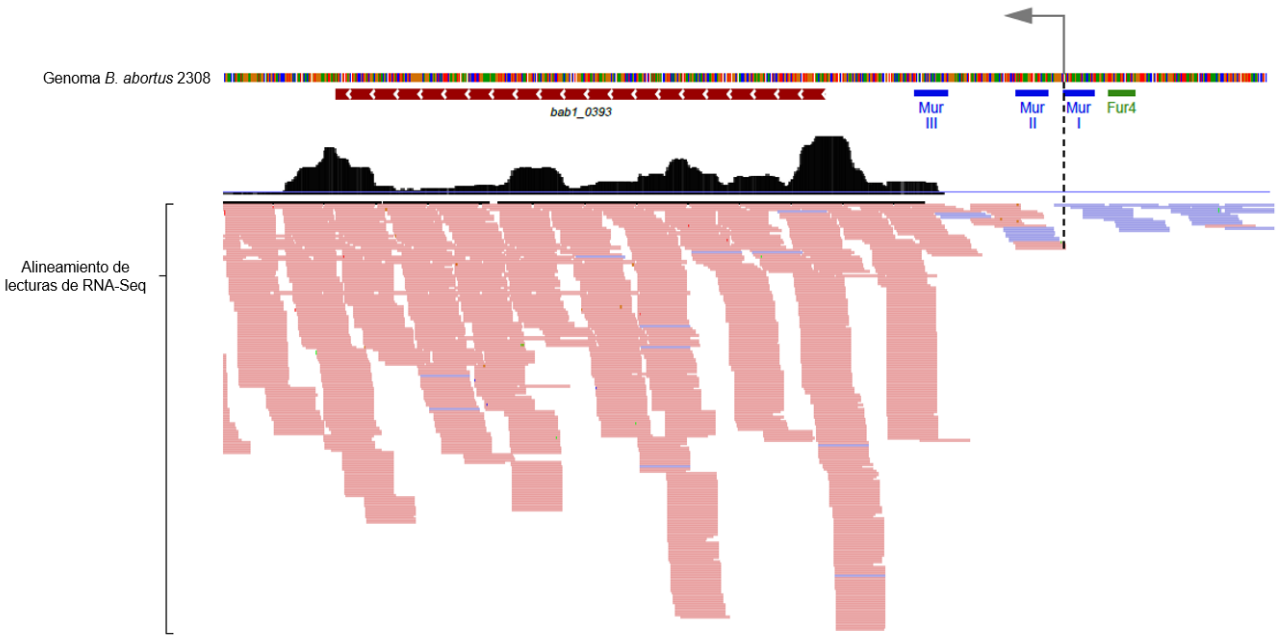


Figura 18. Fur4 y Mur podrían reprimir la transcripción de *fur4* impidiendo el acceso de la ARN polimerasa. Representación esquemática del *locus fur4* (*bab1_0393*). La secuencia codificante de *fur4* se encuentra representada con un rectángulo rojo con flechas blancas, indicando el sentido de la transcripción. Los sitios de unión de Mur y Fur4 se encuentran representados con rectángulos celestes y verde, respectivamente. Las lecturas de RNA-Seq en la cadena – y + se representan con rectángulos finos rosas y celestes, respectivamente. La línea punteada indica el potencial inicio de la transcripción.

4. Determinación de secuencias consenso de unión de Fur4 y Mur

Las secuencias de ADN protegidas frente a la digestión con ADNasa I determinadas experimentalmente fueron analizadas en busca de motivos de unión conservados para Fur4 y Mur. Este análisis se llevó a cabo utilizando el algoritmo MEME

para identificar motivos de ADN estadísticamente enriquecidos dentro de los sitios de unión identificados en este estudio (Fig. 16), junto con el sitio de unión de Mur previamente reportado en el promotor del transportador de manganeso *mntH* de *B. abortus* 2308, y los sitios de unión de Fur4 y Mur identificados por nuestro grupo en el promotor *btaE* (Lila Y. Ramis, Tesis Doctoral). Como se muestra en la Fig. 19A, este enfoque permitió la identificación de un motivo de unión de Fur4 (Fur4-box) de 11 pb, cuya secuencia consenso (TTATAAADCAA; D=A/G/T) se asemeja notablemente a las repeticiones invertidas del motivo de unión palindrómico heptamérico (7-1-7) del regulador PerR en *Bacillus subtilis* (PerR-box; TTATAATNATTATAA). Además, la comparación del Fur4-box obtenido con bases de datos de sitios de unión conocidos de factores de transcripción procariotas mostró una coincidencia significativa con el sitio de unión de otro regulador de la familia Fur, el ortólogo Zur de *Pseudomonas protegens* (*E*-valor $1.55x10^{-1}$). Cabe destacar que, en el sitio de unión I de Fur4 del promotor *bab2_0131*, el motivo Fur4-box se alineó con el centro de la región protegida frente a ADNasa I y se superpuso con el motivo de unión tipo Fur predicho *in silico* (Fig. 20A). Sin embargo, en otros sitios de unión de Fur4, las secuencias coincidentes con el Fur4-box se localizaron cerca de los extremos de las regiones protegidas frente a la ADNasa I (Fig. 20A).

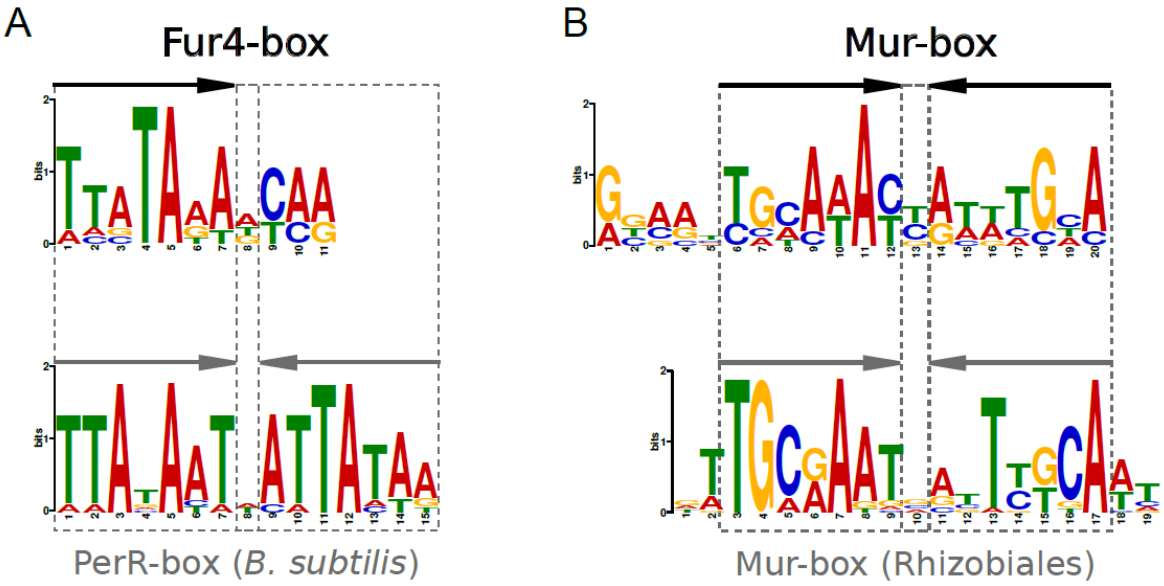
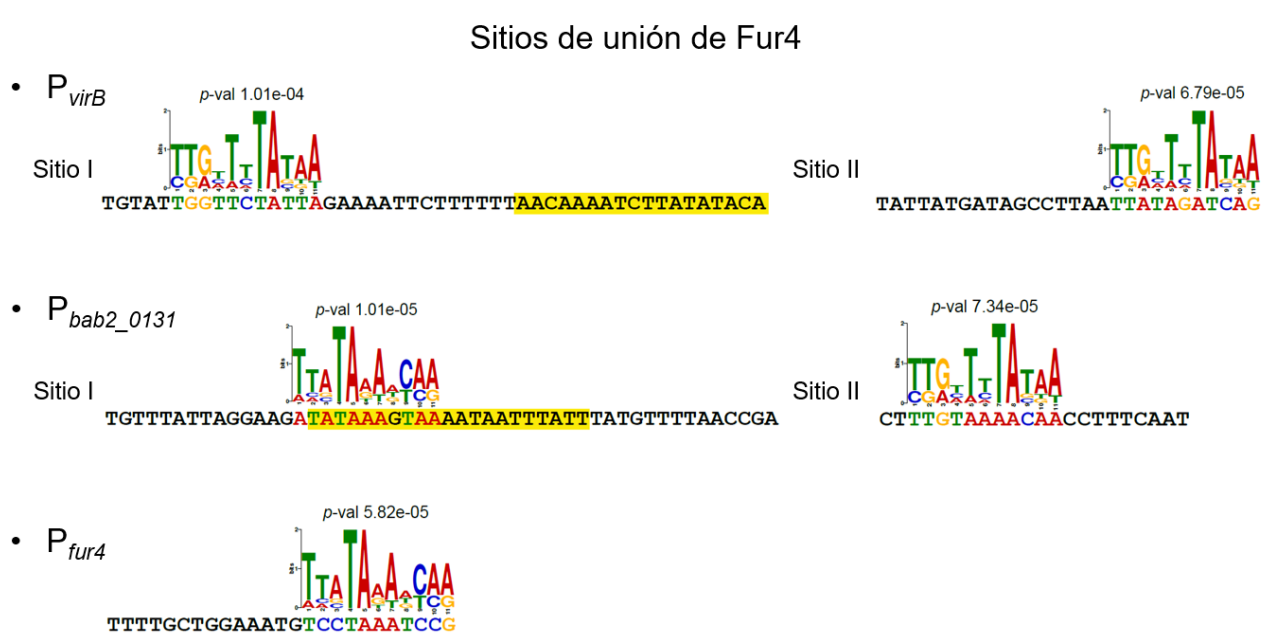


Figura 19. Determinación de los motivos Fur4-box y Mur-box en *Brucella*. Los logos de los motivos de secuencia fueron generados utilizando el algoritmo MEME a partir de las secuencias correspondientes a siete sitios de unión para Fur4 (A) y ocho sitios de unión para Mur (B). Los motivos Fur4-box y Mur-box obtenidos fueron alineados manualmente con el PerR-box de *B. subtilis*, determinado por Pinochet-Barros y Hellmann (2020) [173], y con el Mur-box predicho en Rhizobiales por Rodionov et al. (2006) [139], respectivamente, con el objetivo de ilustrar las similitudes con sitios de unión conocidos de factores de transcripción de la familia Fur. Las flechas indican repeticiones invertidas con simetría palindrómica.

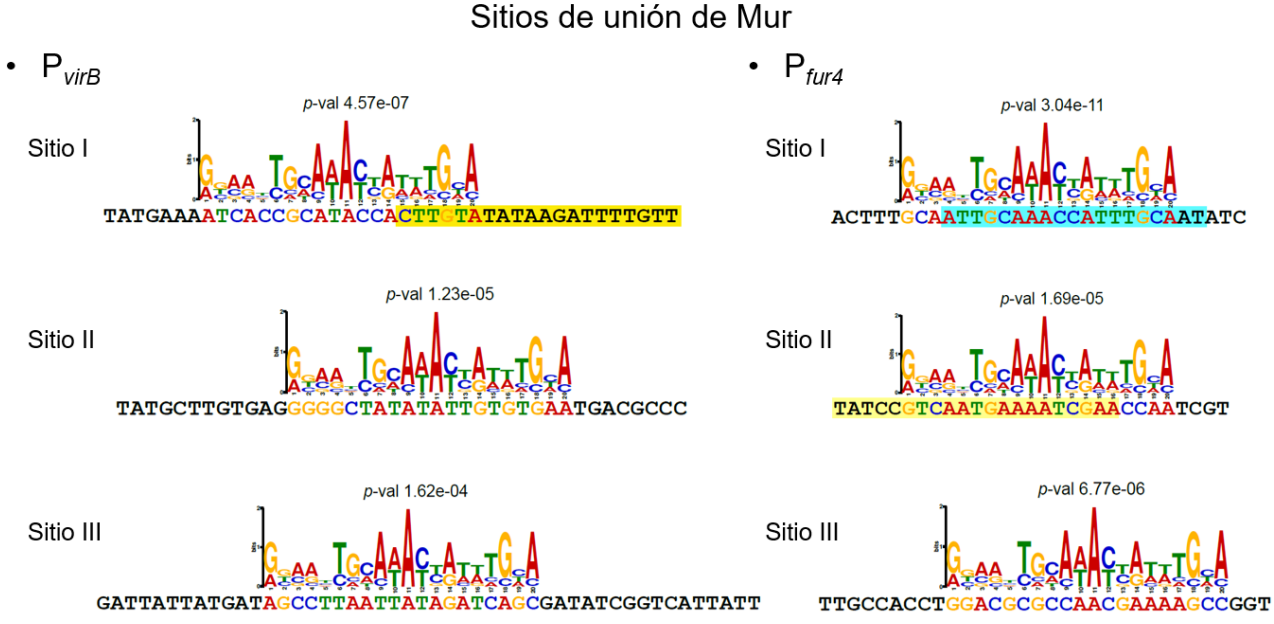
En cuanto a los sitios de unión de Mur determinados experimentalmente, el análisis MEME nos llevó a identificar un motivo Mur-box de 20 pb que exhibió una estructura palindrómica similar a la simetría heptamérica (7-1-7) característica de los sitios de unión de los miembros de la familia Fur de *B. subtilis* (Fig. 19B). Además, una comparación del Mur-box obtenido con bases de datos de sitios de unión conocidos de factores de transcripción procariotas reveló una similitud significativa (*E*-valor $3.38x10^{-2}$) con el sitio de unión del regulador Fur de *Salmonella enterica*. El análisis manual del

motivo Mur-box también reveló una similitud notable con el palindrómico Mur-box de Rhizobiales determinado previamente *in silico* por Rodionov *et al*. (2006) [139] (Fig. 19B). En concordancia con esta última observación, el algoritmo MEME colocó el hit más significativo de Mur-box de *Brucella* precisamente en la ubicación predicha anteriormente para el sitio de unión de Mur en el promotor *fur4 (*Fig. 20B*)*. Cabe destacar que todas las coincidencias determinadas por MEME ubicaron el Mur-box cerca del centro de las regiones protegidas por Mur frente a la DNasa I, lo que sugiere una mayor resolución y capacidad predictiva que el motivo Fur4-box (Fig. 20A-B).

A



B



C

Sitios de unión de VjbR

- P_{bab2_0131}

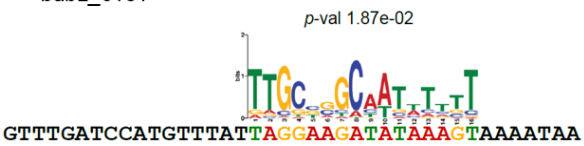


Figura 20. Posición de los motivos de unión al ADN de factores de transcripción con relación a los sitios de unión identificados. Regiones protegidas frente a la ADNasa I determinadas en este estudio para Fur4 (A), Mur (B) y VjbR (C). Se indican las posiciones de los motivos de unión de Fur4, Mur y VjbR, junto con los *p*-valores correspondientes al nivel de ajuste de las secuencias coincidentes determinados mediante FIMO. Los rectángulos amarillos enmarcan las secuencias que coinciden con el motivo tipo Fur identificado en este trabajo. El rectángulo azul enmarca la secuencia que coincide con la Mur-box previamente determinada en Rhizobiales [139].

5. Replicación intracelular de mutantes *mur* y *fur4*

Hasta ahora, hemos demostrado que, en condiciones de pH ácido y escasez de nutrientes, Fur4 y Mur funcionan como componentes de una red transcripcional regulatoria que contrarresta la activación mediada por VjbR de genes blanco específicos. Para investigar las funciones de estos miembros de la familia Fur en la adaptación intracelular de *Brucella*, analizamos la supervivencia intracelular de la cepa salvaje *B. abortus* 2308, las mutantes simples isogénicas Δ*mur* y Δ*fur4* y la cepa doble mutante Δ*fur4* Δ*mur*.

Las bacterias se cultivaron en medio rico en nutrientes (TSB) y se utilizaron para infectar monocapas de macrófagos J774. Como se muestra en la Fig. 21A, tanto la cepa salvaje como todas las cepas mutantes replicaron intracelularmente a las 24 y 48 h post infección. Notablemente, en todas las réplicas biológicas del experimento, la cepa doble mutante mostró consistentemente recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) ligeramente más bajos, aunque no significativos, en comparación a las cepas salvaje y mutantes simples a las 5 h p.i pero recuentos de UFC más altos a las 48 h p.i., sugiriendo que Fur4 y Mur son activos durante el tráfico intracelular (Fig. 21A).

Como se mostró anteriormente, en bacterias cultivadas *in vitro*, las funciones regulatorias de Fur4 y Mur en la modulación de la expresión génica se revelaron tras la adición de Fe o Mn (Fig. 15). Para abordar la posible participación de estos miembros de la familia Fur en el proceso de adaptación intracelular de *Brucella*, realizamos ensayos de infección de células J774 con bacterias previamente incubadas en condiciones de acidez y escasez de nutrientes, ya sea con (repleción) o sin (limitación) el agregado de Fe. La Fig. 21B muestra que, en condiciones de limitación de Fe, todas las cepas exhibieron un comportamiento intracelular similar al observado en el ensayo con bacterias cultivadas en medio rico en nutrientes (Fig. 21A). Sin embargo, en condiciones de repleción de hierro, mientras la cepa doble mutante Δ*fur4* Δ*mur* permaneció inafectada, la supervivencia intracelular de la cepa salvaje y ambas mutantes simples se vio severamente comprometida a las 24 h p.i. (Fig. 21B). Cabe destacar que todas las cepas mostraron recuentos de UFC similares a las 5 h p.i., independientemente de la incubación previa con Fe, lo que sugiere que los fenotipos

observados no se debieron a una reducción en la internalización bacteriana en los macrófagos J774, sino a defectos en la evasión de los mecanismos de defensa de la célula hospedadora.

Teniendo en cuenta estos resultados, planteamos la hipótesis de que los fenotipos observados podrían reflejar una implicación directa de Fur4 y Mur en el control de la expresión de genes de virulencia necesarios para la supervivencia intracelular, como el operón *virB*, identificado en este estudio como un blanco directo de ambos factores de transcripción de la familia Fur. De acuerdo con esta hipótesis, en condiciones de repleción de Fe, la expresión intracelular de *virB* podría haberse visto afectada debido a la represión transcripcional dependiente de Fe por parte de Fur4 y/o Mur, lo que llevaría a una menor supervivencia bacteriana tanto de la cepa salvaje como de las mutantes simples.

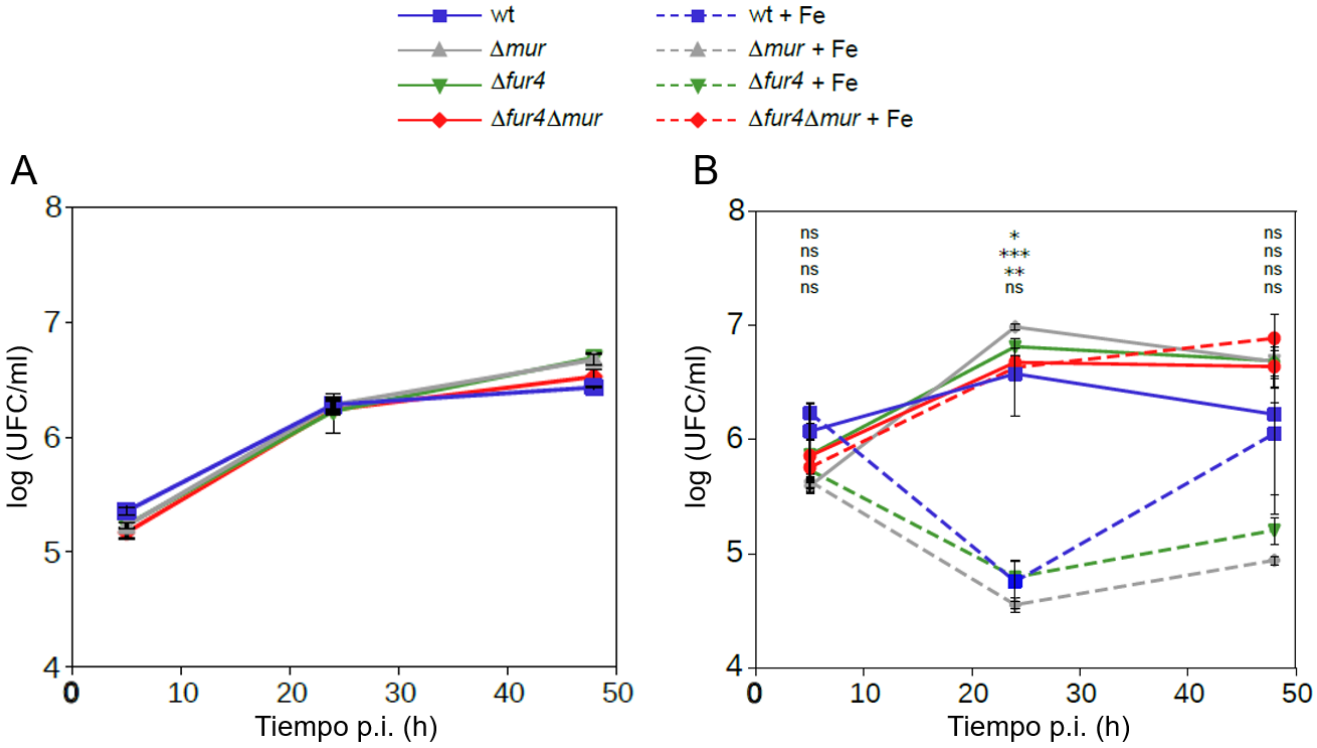
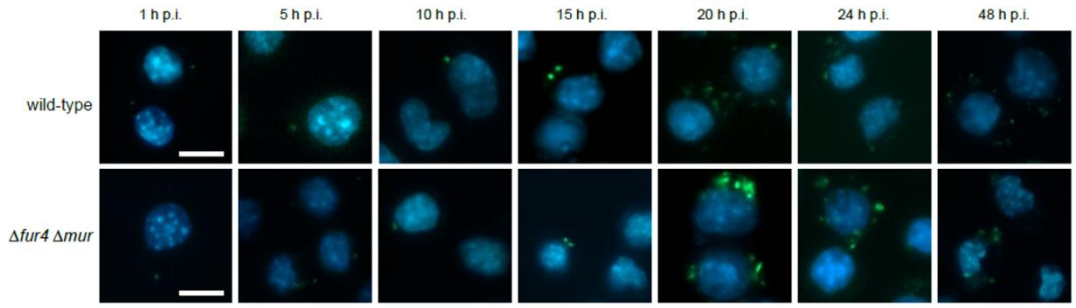


Figura 21. Rol de Fur4 y Mur en la supervivencia intracelular de *Brucella*. Curvas de replicación intracelular en macrófagos J774 de *B. abortus* 2308 salvaje (wt), Δ*mur*, Δ*fur4* y Δ*fur4* Δ*mur.* Las bacterias fueron incubadas en medio rico (TSB) hasta alcanzar fase exponencial previo a la infección de células J774 en monocapa (A); o, una vez alcanzada la fase exponencial, se preincubó el cultivo bacteriano en medio MM1 pH 5,5 bajo en nutrientes, con o sin agregado de 100 μM $FeCl_3$ por 24h (B). En ambos casos, la multiplicidad de infección fue de 50. Los valores mostrados corresponden a medias ± desviaciones estándar de pocillos duplicados de un experimento representativo de dos réplicas biológicas independientes. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de un factor, seguido de una prueba de comparación post hoc de Tukey. Las diferencias estadísticas entre condiciones con y sin hierro se indican de arriba hacia abajo para las cepas salvaje, Δ*mur*, Δ*fur4* y Δ*fur4* Δ*mur*. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, no significativo.

6. Rol de Fur4 y Mur en la regulación de la expresión intracelular del operón *virB*

Para examinar el posible papel de Fur4 y Mur en la regulación de la expresión intracelular de los genes *virB*, se infectaron macrófagos J774 con la cepa salvaje o doble mutante Δ*fur4* Δ*mur,* portando ambas un plásmido con una fusión transcripcional del promotor *virB1* al gen reportero *gfp*. Posteriormente, mediante el uso de microscopía de fluorescencia, se cuantificó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la señal de GFP en bacterias intracelulares individuales a diferentes tiempos p.i. (Fig. 22A). Como se muestra en la Fig. 22B, tras la internalización, la cepa salvaje mostró un aumento en la actividad del promotor *virB1* que alcanzó su máximo a las 15 h p.i. y luego disminuyó abruptamente, manteniéndose en niveles basales hasta las 48 h p.i. Este patrón fue consistente con el perfil de expresión intracelular previamente reportado, utilizando plásmidos con fusiones transcripcionales a *lacZ* [55], respaldando así el enfoque utilizado en este trabajo para medir la actividad promotora en bacterias intracelulares. Como se muestra en la Fig. 22B, la cepa Δ*fur4* Δ*mur* exhibió un patrón notablemente alterado de expresión de *virB*, ya que, a diferencia del pico pronunciado observado en la cepa salvaje, mostró un aumento gradual y tardío en la actividad promotora, la cual alcanzó su punto máximo a las 20 h p.i. y se mantuvo elevada hasta las 24 h p.i., disminuyendo finalmente a niveles similares a los de la cepa salvaje a las 48 h p.i.

A



B

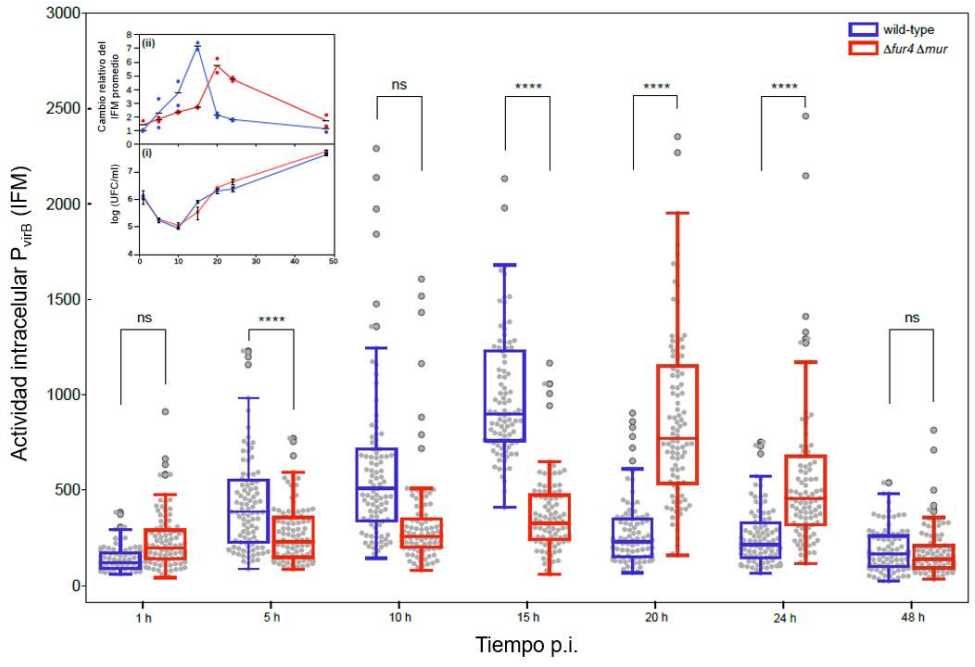


Figura 22. Fur4 y Mur regulan la expresión intracelular de *virB*. Macrófagos J774 sembrados sobre cubreobjetos fueron infectados con la cepa salvaje *B. abortus* 2308 o con la doble mutante Δ*fur4* Δ*mur*, portadoras de una fusión transcripcional entre el promotor *virB1* (P_{virB}) y *gfp*. En los tiempos indicados post-infección (p.i.), las células fueron fijadas y teñidas con DAPI.
(A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia muestran la actividad del promotor *virB1* en bacterias intracelulares. Verde: GFP (reportero); azul: ADN. Barras de escala: 10 µm.
(B) Cuantificación de la actividad del promotor *virB1*. El diagrama de caja muestra la intensidad de fluorescencia media (IFM) de GFP en bacterias intracelulares individuales (n = 100; puntos grises). Los valores mostrados corresponden a un experimento representativo de dos réplicas biológicas independientes. Para cada punto temporal, se evaluaron diferencias estadísticamente significativas en ambas réplicas independientes mediante la prueba de Mann-Whitney U. ****, $p < 0.0001$; ns, no significativo.
Insets: (i) Cinética de replicación intracelular. Se realizaron infecciones paralelas en pocillos duplicados con las mismas cepas, y se determinaron los recuentos de UFC en cada punto temporal. Los valores mostrados son medias ± desviaciones estándar de réplicas técnicas de un experimento representativo de dos réplicas biológicas independientes. (ii) Cambio relativo de la actividad del promotor *virB1* normalizada (IFM) en relación a la cepa salvaje a 1 h p.i. Puntos: promedios de IFM de réplicas biológicas independientes. Barras negras horizontales: media general (n = 2).

Estos resultados indican que Fur4 y Mur cumplen un rol en la regulación de la expresión intracelular del operón *virB.* Si bien se observaron diferencias entre las cepas ensayadas durante las primeras etapas de la infección intracelular, la significancia de este resultado radica en que la cepa Δ*fur4* Δ*mur* perdió la capacidad de reprimir rápidamente la actividad del promotor *virB1* tras su inducción. Estos resultados demuestran la participación de Fur4 y Mur en la regulación de la expresión intracelular de un factor de virulencia esencial de *Brucella*.

Discusión

La regulación de la expresión génica en respuesta a condiciones cambiantes del ambiente es un proceso fundamental en la adaptación y supervivencia de todas las formas de vida. En este sentido, los patógenos bacterianos han desarrollado diversas estrategias para establecer un proceso infeccioso de manera exitosa. Esto implica, por un lado, evitar la eliminación por parte de los mecanismos de defensa del hospedador, y por otro, el establecimiento de un nicho replicativo. La adecuada expresión espaciotemporal de factores de virulencia resulta indispensable para la concreción de dichos procesos.

Tal como se ha desarrollado en la Introducción de esta Tesis, *Brucella* es capaz de reorganizar la vía secretora del hospedador para establecer su nicho replicativo. Distintas condiciones presentes en el ambiente intracelular del hospedador, como acidez y escasez de nutrientes, son percibidas como señales que gatillan la expresión de genes de virulencia. Entre los reguladores transcripcionales involucrados en la orquestación de estos procesos fisiológicos se destaca VjbR, considerado el principal regulador de virulencia de *Brucella*. Un análisis exhaustivo de la red regulatoria de VjbR nos llevó a la identificación de motivos de ADN conservados, los cuales, según nuestra hipótesis de trabajo, podrían actuar como motivos de unión al ADN de factores de transcripción cuyos regulones se solaparían con el regulón de VjbR. De esta manera, se estableció como objetivo general de este trabajo de Tesis la identificación y caracterización funcional de tales reguladores.

Los motivos A, B y C fueron identificados en regiones intergénicas donde se no se observó una interacción *in vivo* de VjbR mediante ChIP-Seq, a pesar de la presencia del motivo de unión de dicho regulador (Fig. 11). Esto nos llevó a postular que los motivos en cuestión podrían ser sitios de unión de reguladores que habrían actuado como competidores, bloqueando la interacción VjbR-ADN en las condiciones ensayadas debido a impedimento estérico. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que los motivos forman parte de un elemento genético, denominado elemento EBC, altamente conservado y presente en un alto número de copias en el genoma de *B. abortus* 2308 (Fig. 14). Estas características, sumadas al hecho de actuar como sitio de unión directo de IHF y presentar evidencias de transcripción, apuntaron a que el elemento EBC se trataría de un BIME. Además, hemos identificado la presencia del elemento EBC en otros géneros del orden Rhizobiales, con un alto nivel de conservación de secuencia. Esta observación apunta a que el elemento EBC constituiría un BIME presente a lo largo de la historia evolutiva de dicho orden. Estos resultados refutan la hipótesis de trabajo para los motivos A, B y C; razón por la cual nuestra atención se centró en el motivo D (renombrado como motivo tipo Fur).

El motivo tipo Fur fue inicialmente descubierto en un conjunto de promotores en los que, si bien hubo interacción directa de VjbR evidenciada por ChIP-Seq, no se identificó el motivo de unión de dicho regulador (Fig. 11). Esta situación nos llevó a postular inicialmente que, en estos casos, el regulador que interactuase con el motivo tipo Fur podría actuar como un activador transcripcional, asistiendo la unión de VjbR en estos promotores con sitios operadores de baja afinidad. Sin embargo, el análisis previo realizado en el *locus btaE* (Fig. 12) y en otros promotores estudiados en esta Tesis, nos han llevado a identificar dos represores transcripcionales, Fur4 y Mur, como

componentes de una red regulatoria que se superpone con el regulón de VjbR, contrarrestando la activación de genes blanco específicos mediada por dicho regulador en respuesta a Fe o Mn. Atribuimos este resultado al hecho de que nuestro estudio previo de ChIP-seq para determinar el regulón de VjbR se realizó sin la adición de Fe o Mn, condiciones que no permiten la unión de Fur4 y Mur al ADN y, por lo tanto, contrarrestar la activación mediada por VjbR. Así, a pesar de la premisa original de nuestra estrategia, identificamos un motivo conservado de unión a represores, estadísticamente enriquecido en un subconjunto menor de secuencias en comparación con la lista completa de regiones de unión a VjbR identificadas por ChIP-seq.

El motivo tipo Fur identificado en este trabajo fue eficaz para predecir genes regulados por factores de transcripción dependientes de metales, dado que todos los promotores analizados fueron reprimidos en respuesta a Mn y Fe. Además, varios de los sitios de unión de Fur4 y/o Mur determinados experimentalmente mediante ensayos de protección a la ADNasa I mostraron un solapamiento parcial o total con los motivos tipo Fur identificados *in silico* (Fig. 16, 17 y 20). Los motivos Fur4-box y Mur-box definidos en este estudio presentaron una notable similitud con los sitios de unión reportados para PerR de *Bacillus subtilis* y Mur de *Rhizobiales*, respectivamente (Fig. 19). Cabe destacar que, entre las 170 Fur4-box y 482 Mur-box detectadas en el genoma de *Brucella abortus* 2308 (utilizando un *p*-valor de corte de $1x10^{-4}$), el 45% y el 20%, respectivamente, se localizaron en regiones intergénicas, superando significativamente el 8% esperado por azar, lo que sugiere que un número considerable de dichos sitios serían funcionales. Por lo tanto, si bien el número e identidad exactos de los genes blanco directos de Mur y Fur4 aún deben definirse mediante análisis a escala genómica, estas observaciones sugieren la existencia de dos regulones amplios que podrían controlar la expresión de numerosos genes. En consecuencia, actualmente estamos evaluando la utilidad de los nuevos motivos Fur4-box y Mur-box determinados en esta Tesis para identificar genes adicionales regulados por estos factores de transcripción, y así profundizar nuestro entendimiento del solapamiento entre la regulación de la homeostasis de metales y las redes de expresión génica asociadas a la virulencia en *Brucella*.

De los dos reguladores identificados en este trabajo que contrarrestan la activación mediada por VjbR, Mur tiene una función definida en la homeostasis de metales en *Brucella*. En concreto, se ha demostrado que Mur actúa como represor transcripcional de MntH, un transportador de Mn de alta afinidad necesario para la supervivencia intracelular y la virulencia en ratones [119]. Por otro lado, el homólogo Fur4 codificado por *bab1_0393* no había sido caracterizado previamente. Las características desconcertantes de la estructura y función de Fur4, hacen que clasificar este regulador dentro de una de las subfamilias Fur conocidas constituya un desafío importante.

Entre los cuatro reguladores Fur codificados en el genoma de *Brucella*, el producto proteico predicho de *fur4* muestra la mayor similitud (46% de identidad) con el regulador Irr. Notablemente, Fur4 muestra una similitud aún mayor con homólogos Irr de otras bacterias, como *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium leguminosarum*, con identidades del 48% y 49%, respectivamente. Esto ha llevado a que en el trabajo publicado por Rodionov *et al*., (2006) [139] el *locus bab1_0393* haya sido considerado como una segunda copia del *locus irr*. No obstante, los resultados experimentales obtenidos en este trabajo demuestran que el mecanismo regulatorio ejercido por Fur4 difiere del modelo descripto para reguladores Irr, según el cual este regulador ejerce su

rol en condiciones de depleción de Fe, interactuando directamente con los promotores de sus genes blanco [136]. En presencia de altos niveles de Fe disponible, Irr interacciona con hemo, lo cual provoca un cambio conformacional que desencadena la disociación del regulador del ADN. En *Bradyrhizobium japonicum*, esta interacción gatilla la degradación de Irr [174], a diferencia del mecanismo observado en *Rhizobium leguminosarum*, en el que Irr se disocia del ADN al interaccionar con hemo pero no sufre degradación [175]. En *B. abortus*, se ha reportado la degradación de Irr en condiciones de repleción de Fe [115], lo cual indica una similitud con el modelo establecido para *B. japonicum*. En cuanto a Fur4, si bien sus niveles proteicos no fueron analizados en este trabajo, la evidencia de su acción regulatoria en presencia de hierro indica que esta proteína se mantiene estable en dichas condiciones, demostrando así una marcada diferencia con el modelo propuesto para reguladores Irr. A su vez, no puede descartarse un posible rol regulatorio de Fur4 en condiciones de depleción de Fe. Análisis ómicos en distintas condiciones de cultivo serán necesarios para explorar esta posibilidad.

Una notoria diferencia entre Fur4 e Irr radica en sus mecanismos de autorregulación transcripcional. Martinez *et al*., (2005) [115] demostraron que la transcripción del *locus irr* no se alteró al aumentar los niveles de Fe presentes en el cultivo. En condiciones de depleción de Fe, el regulador se mantiene estable y regula negativamente su propia transcripción. Por el contrario, tal como fue mencionado previamente, Irr es degradado en condiciones de repleción de Fe. El *locus fur4*, en cambio, mostró una autorregulación a nivel transcripcional dependiente de las concentraciones de Fe y Mn, ejerciendo Fur4 una marcada represión transcripcional en condiciones de repleción de dichos metales, en conjunto con Mur (Fig. 15C). Este modelo regulatorio es similar al descripto para el *locus irr* de *B. japonicum* [176], aunque deben señalarse algunas diferencias notables en relación a los roles ejercidos por los reguladores. En *B. japonicum*, Mur reprime la transcripción de *irr* en condiciones de repleción de Fe y Mn. En cambio, en condiciones de depleción de Fe, Irr es capaz de unirse a su promotor en un sitio solapante al sitio de unión de Mur, evitando así la interacción de este último. En otras palabras, Irr actúa como un anti-represor, induciendo su propia transcripción al imposibilitar la acción represora ejercida por Mur [176]. En *Brucella abortus*, tal como se mencionó anteriormente, tanto Fur4 como Mur ejercen un rol como represores de la transcripción de *fur4* en presencia de Fe/Mn. Tal como se observa en las figuras 16 y 17, los ensayos de protección a la ADNasa I evidenciaron 3 sitios de unión de Mur y un sitio de unión de Fur4; no existiendo solapamiento alguno entre los mismos. Estas observaciones sugieren que, circuitos regulatorios con un posible origen evolutivo en común, han divergido y especializado en los distintos géneros dentro de la clase alfa-proteobacteria.

Por otro lado, Fur4 e Irr difieren en las secuencias de aminoácidos de su hélice α de unión al ADN. Mientras los homólogos Irr rizobiales, así como el Irr de *Brucella*, comparten un motivo SLATVYN altamente conservado [177], Fur4 presenta un motivo SVATVYN idéntico al del homólogo PerR de *B. subtilis* [149], lo cual es consistente con la similitud observada entre los motivos Fur4-box de *B. abortus* y PerR-box de *B. subtilis* (Fig. 19). A la luz de estas semejanzas entre Fur4 y PerR, tanto en los motivos de unión al ADN como en su respuesta a Mn y Fe, inicialmente propusimos que Fur4 podría funcionar en *Brucella* como un regulador del estrés por peróxidos. Sin embargo, esta hipótesis fue desestimada dado que nuestros intentos por demostrar su posible papel como regulador sensible al peróxido de hidrógeno no tuvieron éxito. Por lo tanto, si bien no se puede descartar que Fur4 detecte alguna señal adicional aún desconocida del

hospedador, la evidencia acumulada hasta ahora sugiere que su función se limita a detectar y transducir cambios en la concentración de Mn y Fe, de forma redundante con Mur.

Estudios recientes han revelado que *Brucella* modula activamente los niveles de Fe celular en los macrófagos infectados para evitar la producción de especies reactivas de oxígeno y el daño inducido por estrés oxidativo [114]. Esto se logra en parte mediante la secreción de la proteína tipo ferritina Dps, que reduce el reservorio de Fe libre de la célula hospedadora dentro de las primeras 12 horas p.i. Además, los mecanismos de inmunidad innata de los hospedadores mamíferos restringen aún más el acceso de *Brucella* a los metales de transición. Por ejemplo, el transportador Nramp1 transloca cationes divalentes de Fe y Mn fuera del lumen intrafagosomal, privando al patógeno de estos micronutrientes esenciales [107]. Posteriormente, una vez establecido el nicho replicativo en un compartimiento similar al retículo endoplásmico, *Brucella* obtiene acceso a todos los nutrientes necesarios para su crecimiento bacteriano. Diferentes enfoques experimentales, tanto de este como de estudios previos [55], mostraron de forma consistente que, tras alcanzar el nivel máximo de expresión intracelular, los genes *virB* de *Brucella* sufren una rápida represión, que ocurre de forma concomitante con el inicio de la replicación bacteriana. En este trabajo, demostramos que un mecanismo regulador dependiente de Mn y Fe es responsable del apagado de la expresión intracelular de este factor de virulencia clave de *Brucella*. En conjunto, nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de que Fur4 y Mur modulan la expresión de genes de virulencia de *Brucella* en respuesta a fluctuaciones en las concentraciones de Fe y Mn durante la transición de un entorno fagolisosomal ácido y pobre en nutrientes a condiciones permisivas para la replicación.

Cabe destacar que los tres promotores blanco de Fur4 analizados hasta ahora también están controlados por un segundo regulador sensible a Mn y Fe: Mur en los promotores de *virB1* y *fur4*; y, en el caso de *bab2_0131*, un regulador hipotético que aún no hemos podido identificar. En línea con estas observaciones, nuestros análisis *in silico* de la ocurrencia de motivos Mur-box y Fur4-box a lo largo del genoma de *B. abortus* 2308, sugieren que la lista de promotores sensibles a Mn y Fe con regulación doble podría ser aún mayor. Esto plantea la posibilidad de que la redundancia funcional sea una característica necesaria en *Brucella* para la regulación génica intracelular dependiente de Mn y Fe. Ya se ha demostrado que otras bacterias poseen miembros redundantes de la familia Fur, como PerRA y PerRB en *Leptospira interrogans* [178, 179], los tres paralogos PerR en *Bacillus licheniformis* [180], IrrA e IrrB en *Rhizobium leguminosarum* [181], y FurA1-3 en *Mycobacterium smegmatis* [182]. Se propone que algunos de estos paralogos tienen diferentes sensibilidades a señales de estrés como H_2O_2 o a diferentes concentraciones de metales percibidos en el hospedador, permitiendo una regulación más fina de la expresión de distintos grupos de genes de virulencia. De manera similar, la regulación dual por Fur4 y otro regulador sensible a Mn y Fe podría permitir un ajuste fino de la expresión génica intracelular en respuesta a las concentraciones cambiantes y/o las proporciones de estos metales de transición durante el tráfico intracelular en la célula hospedadora. Además, esta regulación dual también podría reflejar la importancia de una respuesta transcripcional intracelular robusta frente a las fluctuaciones de Mn y Fe durante el proceso infeccioso.

En conclusión, en este trabajo de tesis se han identificado reguladores transcripcionales cuyas redes regulatorias se solapan con el regulón de VjbR. Fur4 y Mur, ambos miembros de la familia Fur de reguladores transcripcionales, actúan de

forma antagónica a VjbR, reprimiendo la transcripción de genes blanco en respuesta al aumento de las concentraciones de Fe y/o Mn en el ambiente. El conocimiento de redes regulatorias de virulencia no solo permite comprender en mayor profundidad los mecanismos mediante los cuales *Brucella* ejerce su patogénesis, sino que también constituye un primer paso para el desarrollo racional de potenciales estrategias antimicrobianas. En este sentido, dada su importancia en la virulencia y su amplia distribución en los organismos procariotas, los reguladores Fur han sido propuestos como blancos atractivos para el diseño de inhibidores con aplicabilidad terapéutica. Por ejemplo, se ha reportado la obtención de péptidos capaces de interactuar con Fur de *Escherichia coli*, lo que resulta en la inhibición de su unión al ADN y en una reducción de su virulencia en un modelo de infección en moscas [183].

Teniendo esto en cuenta, la información aportada por esta tesis podría ser de utilidad para futuras investigaciones, no solo orientadas a profundizar el conocimiento básico sobre la fisiología de *Brucella*, sino también para aquellas que apunten al desarrollo de estrategias terapéuticas contra la brucelosis.

Conclusiones

Dados los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral, se enuncian las siguientes conclusiones:

1. Análisis de los motivos A, B y C:

- Los motivos mencionados forman parte de un elemento genético altamente conservado denominado EBC.
- El elemento EBC está presente en un número alto de copias en el genoma de *Brucella abortus* 2308, así como en otros géneros bacterianos dentro del orden Rhizobiales.
- La proteína IHF es capaz de interactuar directamente con el elemento EBC.
- EBC es transcripto y, según predicciones *in silico*, el ARN resultante posee una estructura estable.
- EBC podría constituir un elemento BIME, posiblemente involucrado en la organización estructural del cromosoma bacteriano.

2. Expansión del estudio del motivo tipo Fur:

- La presencia del motivo tipo Fur correlacionó con la existencia de una regulación transcripcional dependiente de Fe y Mn en todos los genes analizados.
- El motivo tipo Fur funciona como sitio de unión de los reguladores transcripcionales Fur4 y Mur.
- Fur4 y Mur ejercen un rol antagónico a VjbR, reprimiendo la expresión de genes blanco en respuesta a un aumento en las concentraciones de Fe y/o Mn.
- A pesar de su similitud con el regulador Irr, Fur4 ejerce sus funciones regulatorias en condiciones de repleción de Fe y/o Mn.
- Fur4 y Mur median la represión transcripcional del operón *virB* al establecer *Brucella* su nicho replicativo, lo que sugiere que la disponibilidad de Fe y/o Mn en este estadio constituye la señal ambiental específica transducida por estos reguladores.
- Fur4 actúa en redundancia con Mur o con reguladores dependientes de Fe y Mn aún no identificados. Esto sugiere que la adaptación intracelular de *Brucella* requiere un mecanismo robusto de regulación de la expresión génica para responder a las fluctuaciones en los niveles de estos metales de transición durante el tráfico intracelular.

Materiales y Métodos

1. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas *B. abortus* 2308 salvaje o las mutantes isogénicas, *B. abortus* Δ*mur, B. abortus* Δ*fur4 y B. abortus* Δ*fur4* Δ*mur,* se cultivaron en caldo de triptona y soja (TSB, del inglés *Tryptic Soy Broth*) suplementado con 5 µg/ml de ácido nalidíxico, o se incubaron en medio MM1 [33 Mm KH_2PO_4, 60,3 mM K_2HPO_4, 0,1% extracto de levadura] pH 5.5, en presencia de 5 mM de ácido urocanico, a 37 °C en un agitador rotatorio (250 r.p.m.), con o sin la adición de 100 µM de $FeCl_3$ o 100 µM de $MnCl_2$. Las cepas de *Escherichia coli* S17 y DH5α se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C en un agitador rotatorio a 250 r.p.m. Se añadió kanamicina (50 µg/ml) para el cultivo de cepas que portaban los plásmidos derivados de pK18mob-*lacZ* o pPROBE'-*gfp*[ASV]; o ampicilina (100 µg/ml) para las cepas portantes de plásmidos derivados de pGEM-T Easy o pDEST565. Todas las cepas utilizadas en este trabajo se encuentran detalladas en la Tabla suplementaria 1, y la manipulación de cepas de *Brucella* fue realizada en un laboratorio de bioseguridad presente en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires, Fundación Instituto Leloir.

Los medios de cultivo SOC y 2xYT fueron empleados para la transformación por shock térmico y preparación de *E. coli* electrocompetentes, respectivamente. Los medios LB, TSB y 2xYT fueron esterilizados mediante autoclave. Para la esterilización de medios MM1 y SOC se emplearon filtros de 0,22 µm.

1.2 Conservación de cepas bacterianas

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó mediante congelamiento rápido de cultivos líquidos en fase estacionaria en medio LB (para *E. coli*) o TSB (para *Brucella*), en presencia de antibióticos cuando correspondía. Los cultivos se mezclaron con glicerol estéril hasta una concentración final del 20% (v/v) y se almacenaron en criotubos a −80 °C.

2. Aislamiento, purificación y manipulación de ADN

2.1 Preparación de ADN genómico de *Brucella*

Se inocularon 25 ml de TSB con 0,25 ml de un cultivo de *Brucella* en fase estacionaria. Al alcanzar una DO_{600}= 0,6, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 8.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C (o hasta obtener un pellet compacto). Luego, se realizaron dos lavados con 5 ml de buffer TE [10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA], centrifugando por 5 minutos a 8.000 rpm en cada lavado. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 1,5 ml de TE.

A continuación, se añadieron 30 µl de lisozima (50 mg/ml), 90 µl de SDS al 10% y 15 µl de proteinasa K (20 mg/ml). La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora (o a temperatura ambiente durante la noche). Luego, se añadieron 300 µl de NaCl 5 M y se homogeneizó la solución previo al agregado de 50 µl de ARNasa (10 mg/ml). Una vez cumplidos 15 minutos de incubación a 37 °C, se añadieron 240 µl de CTAB al 10%

preparado en NaCl 0,7 M, y la mezcla se incubó nuevamente durante 10 minutos a 65 °C.

La preparación fue sometida a una extracción con un volumen de cloroformo y centrifugada a 5.000 rpm durante 15 minutos. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo limpio y se realizó una segunda extracción con un volumen de fenol:cloroformo (1:1), incubando la mezcla 10 minutos a 60 °C. Posteriormente, se añadieron 0,6 volúmenes de isopropanol y se incubó la muestra *overnight* a -20 ºC para precipitar el ADN. La mezcla se centrifugó a máxima velocidad durante 30 minutos, y el pellet fue lavado con 500 µl de etanol al 70%. Tras descartar el etanol, el pellet se dejó secar al aire y, finalmente, el ADN fue resuspendido en buffer TE.

2.2 Preparación de ADN plasmídico de *E. coli*

Las bacterias se cultivaron en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, hasta alcanzar la fase estacionaria (incubación *overnight* a 37 °C con agitación a 250 r.p.m). Luego, las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en solución P1 [Tris-HCl 50 mM; EDTA 10 mM pH=8,0] con el agregado de RNasa (30 μg/ml). Luego, se agregó un volumen de solución P2 [NaOH 200 mM; SDS 1%] para provocar la lisis celular. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió solución P3 [acetato de sodio 2,55 M, pH=4,8] en un volumen idéntico al añadido de solución P2, y se centrifugó la mezcla a 16.000 g durante 15 minutos. En todos los pasos, la homogeneización de la mezcla se produjo mediante inversión manual de forma controlada y suave, de manera de evitar la contaminación del producto final con ADN genómico de *E. coli*.

El sobrenadante fue sometido a una extracción con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (relación 24:1), seguido de centrifugación a 5.000 rpm durante 15 minutos. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo limpio. Para precipitar el ADN, se agregó etanol absoluto y la muestra se incubó durante 25 minutos a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 16.000 g durante 30 minutos. El pellet resultante se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se dejó secar y, finalmente, el ADN se resuspendió en un volumen apropiado de agua apirógena, según se tratara de plásmidos de bajo o alto número de copias.

2.3 Electroforesis de ADN

La separación de plásmidos, fragmentos de ADN obtenidos por PCR y/o productos de digestión por enzimas de restricción fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa, generalmente entre 0.8 y 1.2% (p/v), conteniendo 1,5 µg/ml de Bromuro de Etidio. Los geles y la corrida electroforética fueron realizados en *buffer* TAE [40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA].

Para la purificación de sondas de ADN marcadas con fluoróforo 6-FAM o ensayos de EMSA, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en *buffer* TBE [89 mM Tris-borato, 89 mM ácido borico, 2 mM EDTA].

2.4 Clonado de fragmentos de ADN en vectores plasmídicos

Las reacciones de digestión o ligación de fragmentos de ADN y/o plásmidos se realizaron según protocolos estandarizados. Todas las enzimas de restricción, T4 ADN ligasa, y buffers empleados fueron adquiridos de Promega o New England Biolabs.

Para los clonados en vectores pGEM-T Easy (Promega), se realizó, en primera instancia, un proceso de *A-tailing* del inserto a clonar (previamente amplificado por PCR con Pfu ADN polimerasa y purificado mediante gel de agarosa). A continuación, se procedió a realizar la ligación con pGEM-T Easy. Todos los protocolos fueron realizados según indicación del fabricante.

En todos los casos, posterior a la reacción de ligación, se procedió a transformar bacterias *E. coli* DH5α mediante shock térmico. Los procedimientos de transformación y selección de transformantes se detallan en su correspondiente sección.

3. Transferencia de vectores plasmídicos a cepas bacterianas

3.1 Preparación de *E. coli* DH5α competentes por shock térmico y transformación

Cinco mililitros de un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* DH5α en medio LB fueron utilizados para inocular 50 ml de medio LB fresco. Al alcanzar una DO_{600} de 0,5–0,6, las bacterias se transfirieron a botellas de centrífuga previamente esterilizadas. A partir de este punto, todas las manipulaciones se realizaron manteniendo las células en hielo.

Las células se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C en un rotor previamente enfriado. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 25 ml de una solución fría y estéril de $CaCl_2$ 0,1 M, incubándose luego durante 20 minutos en hielo. Posteriormente, las células se centrifugaron nuevamente a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, sin freno, y se resuspendieron en 2 ml de $CaCl_2$ 0,1 M estéril y frío. A continuación, se agregaron 2 ml de glicerol al 30 % estéril, y la suspensión final se alicuotó en volúmenes de 100 µl. Las alícuotas se conservaron a -80 °C.

Para la transformación, se añadió el ADN plasmídico al tubo que contenía las bacterias competentes y se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo. Luego se sometió a un shock térmico de 90 segundos a 42 °C, seguido de una incubación adicional en hielo durante 5 minutos. Se añadió 1 ml de medio SOC estéril y se incubó la mezcla durante 1 hora a 37 °C con agitación. Finalmente, las bacterias se sembraron en placas de Petri con medio LB agar suplementado con el antibiótico apropiado para la selección de transformantes.

3.2 Preparación de *E. coli* S17 electrocompetentes y transformación

Para obtener células electrocompetentes, se inocularon 25 ml de medio LB con bacterias provenientes de cultivos en medios semi-sólidos y se procedió a incubar *overnigh*t a 37ºC con agitación. 5 ml de este cultivo fueron utilizados para inocular 500 ml de medio 2xYT. Cuando se alcanzó una 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 punto, todas las manipulaciones se realizaron manteniendo las células en hielo.

Las células fueron centrifugadas a 4.000g durante 20 min a 4ºC 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. Luego el *pellet* se resuspendió en un volumen apropiado de glicerol 10% frío. Las células fueron inmediatamente fraccionadas de a 50 µl en tubos previamente enfriados. Rápidamente se congelaron los tubos con nitrógeno líquido y se los conservó a -80ºC.

Para la electroporación se emplearon 50 µl de células electrocompetentes y aproximadamente 25 ng de ADN plasmídico en agua apirógena, previamente purificado. El electroporador utilizado fue *Gene Pulser Transfection System* (Bio-Rad) junto a cubetas de electroporación de 2 mm (Bio-Rad).

Luego de la electroporación, se añadió 1 ml de medio SOC estéril y se incubó la mezcla durante 1 hora a 37 °C con agitación. Finalmente, las bacterias se sembraron en placas de Petri con medio LB agar suplementado con el antibiótico apropiado para la selección de transformantes.

3.3 Conjugación biparental en placa

Se utilizó la conjugación biparental para transferir plásmidos conjugables desde cepas de *E. coli* S17 (dadoras) a cepas de *B. abortus* (receptoras). Para ello las cepas dadora y receptora fueron cultivadas *overnight* a 37ºC con agitación (cada una por separado, con el agregado de los antibióticos apropiados). Se tomó un volumen de 500 µl de cada cultivo, y las células fueron centrifugadas a 5000 r.p.m. por 7 minutos. Los *pellets* bacterianos fueron lavados 3 veces con 500 µl de medio TSB para eliminar posibles restos de antibióticos. Luego, ambos *pellets* fueron resuspendidos en 15 µl de TSB, y la mezcla fue sembrada en forma de gota en una placa de Petri con TSB sin antibióticos. La placa con la mezcla bacteriana fue incubada *overnight* en estufa a 37ºC, para luego resuspender el cultivo en 500 µl de medio TSB. Para lograr la selección de bacterias *B. abortus* transconjugantes, se plaqueó, por duplicado, 100 µl del cultivo en placas con medio TSB suplementadas con el antibiótico apropiado. Las placas fueron incubadas en estufa a 37 ºC hasta la visualización de colonias de *B. abortus* transconjugantes. Las colonias seleccionadas fueron repicadas a placas frescas (con medio TSB y antibiótico apropiado), para luego evaluar la presencia del plásmido de interés mediante *colony* PCR.

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

Las reacciones de PCR fueron realizadas en tubos de 200 µl, empleando las enzimas Taq Pegasus o Pfu (Productos Bio-Lógicos). Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.1 *Colony* PCR

Para la preparación del ADN molde para *colony* PCR, se picaron las colonias de interés con escarbadientes estériles. Las bacterias presentes en la punta del escarbadientes fueron resuspendidas en 100 µl de H_2O apirógena. Para lograr la lisis

celular, se incubaron las suspensiones a 100 ºC durante 10 (para *E. coli*) o 20 minutos (para *Brucella*). Luego, los lisados fueron centrifugados a 16000 g durante 20 minutos. Se emplearon 2,5 µl del sobrenadante como molde para reacciones de PCR realizadas con las mismas proporciones descriptas en el punto anterior, empleando enzima Taq Pegasus.

4.2 PCR de extensión por superposición

Esta técnica fue empleada con el objetivo de fusionar 2 fragmentos de ADN, paso necesario para la construcción de mutantes por deleción (ver Construcción de mutantes) o la sonda $P_{bab1_1970\Delta B}$. En primera instancia, se amplificaron mediante reacciones de PCR estándar los fragmentos A y B. Como se esquematiza en la Fig. 23, el oligonucleótido denominado Rva posee una region 5' (de aprox. 15 nucleótidos) complementaria al extremo 5' fragmento B; mientras que, análogamente, el oligonucleótido FwB posee una región 5' complementaria al extremo 3' fragmento A. De esta forma, los fragmentos A y B poseen regiones complementarias en sus extremos.

Una vez purificados los fragmentos A y B, se procedió a fusionar los mismos mediante PCR de extensión por superposición. Inicialmente, se realizó una reacción de PCR utilizando como ADN molde 300 ng de cada fragmento, sin el agregado de oligonucleótidos. Luego de 10 ciclos de reacción, se agregó a la misma los oligonucleótidos FwA y RvB, de manera de permitir la amplificación exponencial del fragmento AB. Luego de 30 ciclos adicionales, se purificó el fragmento AB mediante electroforesis en gel de agarosa. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas con enzima Pfu ADN polimerasa, siguiendo los protocolos descritos previamente.

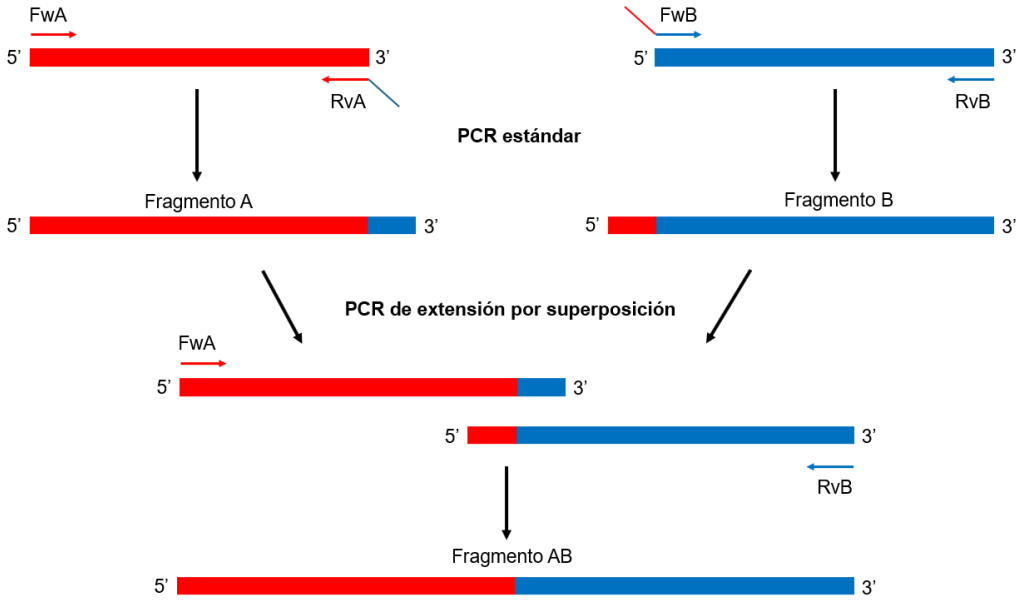


Figura 23. Fusión de fragmentos de ADN mediante PCR de extensión por superposición. Esquema de la estrategia empleada.

5. Construcción de vectores plasmídicos

Las regiones promotoras de los *loci bab1_1970*, *bab2_0131*, *bab2_0738*, *fur4* y *virB* fueron amplificadas por PCR utilizando los oligonucleótidos pbab1_1970fw y pbab1_1970rv (para P_{bab1_1970}), pbab2_0131fw y pbab2_0131rv (para P_{bab2_0131}),

pbab2_0738fw y pbab2_0738rv (para P_{bab2_0738}), promfur4_fw y promfur4_rv (para P_{fur4}) y pvu144 y pvirdown (para P_{virB}), empleando la ADN polimerasa Pfu y ADN genómico de *Brucella abortus* 2308 como molde. Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega), generando los plásmidos pGEM-T-P_{bab1_1970}, pGEM-T-P_{bab2_0131}, pGEM-T-P_{bab2_0738}, pGEM-T-P_{fur4} y pGEM-T-P_{virB}.

Para generar fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ*, los insertos de los plásmidos mencionados fueron digeridos con BamHI (para P_{bab2_0131}), EcoRI (para P_{bab2_0738}) o ambas enzimas (para P_{fur4}), y clonados en el sitio de restricción correspondiente del plásmido pK18mob-*lacZ*, obteniéndose los plásmidos pK18mob-P_{bab2_0131}-*lacZ*, pK18mob-P_{bab2_0738}-*lacZ* y pK18mob-P_{fur4}-*lacZ*.

El plásmido pPROBE'-P_{virB}-*gfp*[ASV] se generó subclonando un fragmento EcoRI de 450 pb desde pBluescript- P_{virB} (Sieira et al., 2004) al vector pPROBE'-*gfp*[ASV] (Miller et al., 2000) en los mismos sitios de restricción. La proteína GFP[ASV] es una variante que presenta una vida media intracelular reducida como consecuencia de la incorporación de la secuencia peptídica ASV (Ala-Ser-Val), la cual actúa como señal de degradación. Esta característica permite un monitoreo más sensible y con mayor resolución temporal de los cambios en la actividad transcripcional, ya que la fluorescencia disminuye rápidamente en respuesta al cese de la expresión génica.

Para construir el plásmido pK18mob-*sacB*-Δ*fur4*, se realizaron dos reacciones de PCR utilizando la ADN polimerasa Pfu y ADN genómico de *B. abortus* 2308 como molde, con los oligonucleótidos mut_fur4_fwA y mut_fur4_rvA o mut_fur4_fwB y mut_fur4_rvB, respectivamente. Los productos obtenidos, correspondientes a regiones flanqueantes de aproximadamente 500 pb del ORF de *fur4*, se utilizaron como molde en una tercera PCR de extensión por superposición, con los oligonucleótidos mut_fur4_fwA y mut_fur4_rvB. El producto final se digirió con BamHI y se clonó en el vector resistente a kanamicina pK18mob-*sacB*.

El plásmido pGEM-T-$P_{bab1_1970\Delta B}$ se obtuvo mediante el clonado de la secuencia correspondiente a la sonda $P_{bab1_1970\Delta B}$ en pGEM-T Easy. La misma fue generada mediante PCR de extensión por superposición, empleando los oligonucleótidos pbab1_1970fw y 1970ΔBrv o 1970ΔBfw y pbab1_1970rv para la síntesis de los fragmentos a fusionar.

Para la construcción del plásmido pDEST565-His-GST-Fur4 se realizó una primera PCR con la ADN polimerasa Pfu, ADN genómico de *B. abortus* 2308 y los oligonucleótidos Fw_fur4_prot y Rv_fur4_prot. El producto amplificado se usó como molde para una segunda PCR con los oligonucleótidos fw_gateway y rv_gateway, obteniéndose un fragmento que contiene el ORF de *fur4*, flanqueado por sitios *attB* y con un sitio de corte para la proteasa TEV. Este fragmento se clonó en el plásmido pDEST565 mediante el sistema Gateway, obteniéndose pDEST565-His-GST-Fur4.

6. Construcción de cepas mutantes

La cepa *B. abortus* Δ*fur4* se obtuvo mediante la transferencia del plásmido pK18mob-*sacB*-Δ*fur4* a *B. abortus* 2308 (cepa salvaje) por conjugación biparental con *E. coli* S17. Las colonias recombinantes por integración simple fueron seleccionadas al ser resistentes a kanamicina. Colonias individuales fueron cultivadas *overnight* en agitación a 37 ºC en medio TSB sin antibióticos. Luego, éstas fueron sembradas en placas de TSB agar suplementado con 10% de sacarosa, con el fin de seleccionar bacterias en las que el plásmido pK18mob-*sacB*-Δ*fur4* se hubiera escindido mediante

recombinación homóloga simple. Las colonias individuales se sembraron en TSB agar o TSB agar con kanamicina. Aquellas colonias sensibles a kanamicina se analizaron por *colony* PCR para confirmar la deleción de *fur4* (usando los oligonucleótidos mut_fur4_fwA y mut_fur4_rvB). La cepa *B. abortus* Δ*fur4* Δ*mur* se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento, transfiriendo el plásmido pK18mob-*sacB*-Δ*mur* a la cepa *B. abortus* Δ*fur4*. La deleción de *mur* se corroboró por *colony* PCR usando los oligonucleótidos Fw_mur_1 y Rv_mur_2.

7. Construcción de cepas con fusiones transcripcionales cromosómicas de copia única

Los plásmidos pK18mob-P_{virB}-*lacZ*, pK18mob-P_{bab2_0131}-*lacZ*, pK18mob-P_{bab2_0738}-*lacZ* o pK18mob-P_{fur4}-*lacZ* fueron transferidos por conjugación biparental a las cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* Δ*mur*, *B. abortus* Δ*fur4* o *B. abortus* Δ*fur4* Δ*mur*. Las colonias resistentes a kanamicina se seleccionaron como recombinantes por integración simple.

. **8. Medición de la actividad β-galactosidasa**

Las bacterias se cultivaron en TSB, se recolectaron durante la fase exponencial de crecimiento (DO_{600} = 0,5), se lavaron una vez y se resuspendieron en medio MM1 pH 5,5 en presencia de 5 mM de ácido urocanico (Sigma-Aldrich), con o sin la adición de 100 µM de $FeCl_3$ o 100 µM de $MnCl_2$. Luego de 24 h, se midió la absorbacia de los cultivos a 600 nm (A_{600}), y las células fueron centrifugadas (800 µl de cultivo para la medición de actividad promotora de P_{bab2_0131} y P_{bab2_0738}; 100 µl para P_{virB} y P_{fur4}) y resuspendidas en 1 ml de *buffer Z* [0,06 M Na_2HPO_4, 0,04 M NaH_2PO_4, 0,01 M KCl, 0,001 M $MgSO_4$, 0,05 M β-mercaptoetanol]. Para la permeabilización de las células, se adicionaron 30 µl de SDS 0,1% y 60 µl de cloroformo, y se vortexeó durante 10 seg. Luego de una incubación por 5 minutos, los tubos conteniendo las células permeabilizadas fueron incubados en un baño térmico a 28 ºC y se adicionaron 50 µl de ONPG 30 mM. En este punto, cada tubo fue homogeneizado rápidamente mediante vortex, y se cronometró el tiempo transcurrido hasta la visualización de coloración amarillenta. Para finalizar la reacción, se agregaron 500 µl de Na_2CO_3 1 M. Por último, los tubos fueron centrifugados y se tomaron 600 µl del sobrenadante para medir absorbancia a 420 nm (A_{420}) mediante un espectrofotómetro. Las unidades Miller se expresaron utilizando la siguiente fórmula: [A_{420} / (volumen cultivo x tiempo de reacción x A_{600})] × 100.

9. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y tinciones

Las muestras fueron resuspendidas en *buffer de siembra* [30 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 10% glicerol, 0.01% azul de bromofenol] y calentadas a 100ºC por 5 min. Luego fueron sometidas a electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, cuya composición se describe en la Tabla 3. La electroforesis se realizó en *buffer de corrida* [25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% SDS] a 100 V hasta que las muestras penetraron el gel de corrida. Pasado ese punto, la electroforesis se realizó a 120 – 130 V.

Para la visualización de bandas, los geles fueron teñidos con solución *de Coomasie Brilliant Blue* R250 al 0,25% (disuelto en metanol 45%, agua bidestilda 45%, ácido acético glacial 10%) durante 30 min a temperatura ambiente con agitación. Luego, se empleó *solución decolorante* (metanol 45%, agua bidestilda 45%, ácido acético glacial 10%) para aumentar el contraste entre las bandas y el *background*.

10. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

La proteína recombinante Fur4 se preparó de la siguiente manera. El plásmido pDEST565-His-GST-Fur4 fue transferido a *E. coli* BL21 (DE3). Las bacterias se cultivaron a 37 °C en medio LB hasta alcanzar la fase exponencial (DO_{600} = 0,8). Posteriormente, los cultivos fueron inducidos con 0,1 mM de IPTG e incubados durante la noche a 20 °C con agitación. Las bacterias fueron cosechadas, resuspendidas en *buffer de lisis* [20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 1 M NaCl] y lisadas por sonicación. Luego de una centrifugación y filtrado con filtro de 0,22 μm, el sobrenadante se aplicó a una columna Hi-Trap de afinidad con níquel (Amersham Biosciences). Después de un lavado con el *buffer A* [20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,5 M NaCl], la columna se eluyó con un gradiente lineal de *buffer B* [20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol]. Los eluatos se analizaron por SDS-PAGE al 12,5%, y las fracciones que contenían His-GST-Fur4 (con una pureza cercana al 75%) se combinaron y se dializaron *overnight* contra el *buffer A* a 4 °C. Para remover las etiquetas His-GST, a las muestras se les agregó 1 mM de DTT y se trataron con proteasa TEV (en una proporción 1:20 entre TEV y His-GST-Fur4) durante 3 h a temperatura ambiente. Luego, se repitió la diálisis contra buffer A para eliminar el DTT de las muestras. Después de la diálisis, las muestras se volvieron a aplicar a una columna Hi-Trap de afinidad con níquel y se siguió el mismo procedimiento de purificación descrito previamente para obtener la proteína Fur4 (pureza cercana al 90%). La proteína recombinante Mur se obtuvo mediante un proceso equivalente (Tesis Lila Ramis).

La proteína recombinante VjbR se preparó según lo descrito previamente [72].

Las muestras se almacenaron a -80 °C.

11. Preparación de extractos proteicos de *Brucella*

Las bacterias se cultivaron en 300 ml de medio TSB, se recolectaron durante la fase exponencial de crecimiento (DO_{600} = 0,5), se lavaron una vez y se resuspendieron en medio MM1 pH 5,5 en presencia de 5 mM de ácido urocanico. Luego de 24 h de incubación, el cultivo fue centrifugado (10 minutos a 7000 r.p.m) para luego resuspender las células en *buffer protoplasto* [15 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,45 M sacarosa, 8 mM EDTA, 0,4 mg/ml lisozima], donde fueron incubadas por 15 minutos a 0 ºC. A continuación, las células feron nuevamente centrifugadas y resuspendidas en *buffer de sonicación* [20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 3 mM β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF] para llevar a cabo la disrupción por sonicación de las mismas. Luego de dos centrifugaciones consecutivas (30 minutos a 14000 r.p.m y 2,5 h a 35500 r.p.m) el sobrenadante fue fraccionado mediante el agregado de $(NH_4)_2SO_4$. Las proteínas precipitadas correspondientes a cada fracción fueron resuspendidas en *buffer de resuspensión* [20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 3 mM β-mercaptoetanol, 50 mM NaCl] y dializadas *overnight* (a 4 ºC) contra el mismo buffer. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -80 ºC.

12. Ensayo de protección a la ADNasa I

Las sondas marcadas con 6-FAM se obtuvieron por PCR utilizando la ADN polimerasa Taq Pegasus (Productos Bio-Lógicos) con el oligonucleótido T7-FAM y pvu144 (para la sonda P_{virB}), pbab2_0131fwshort (para la sonda P_{bab2_0131}), pbab1_1970 (para la sonda P_{bab1_1970}) o promfur4_fw (para la sonda P_{fur4}). Se utilizaron como templados los plásmidos pGEM-T-P_{virB}, pGEM-T-P_{bab2_0131}, pGEM-T-P_{bab1_1970} o pGEM-T-P_{fur4}, respectivamente. Las sondas se purificaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida nativos. Luego, la sonda marcada con 6-FAM purificada se incubó con las proteínas recombinantes Mur, Fur4 o VjbR a las concentraciones indicadas, en *buffer de unión al ADN* [15 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 10 µg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), 30 mM KCl] con concentración ajustada de NaCl (40 mM para VjbR, 10 mM para Mur y 90 mM para Fur4). Tras una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la unión proteína-ADN, se ajustaron las concentraciones de $MgCl_2$ y $CaCl_2$ a 1.5 y 0.5 mM, respectivamente, y cada mezcla de reacción se incubó con ADNasa I RQ1 (Promega) durante 4 minutos a temperatura ambiente (la concentración final de ADNasa I fue ajustada para cada reacción luego de varios ensayos de optimización). Las reacciones se detuvieron mediante la adición de *solución de finalización* [30 mM EGTA (pH 8.0)]. Los productos digeridos se extrajeron mediante el agregado de un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico, para luego ser precipitados agregando acetato de sodio (3M, pH 5,2) y etanol absoluto. Los *pellets* fueron lavados con etanol 70% para finalmente ser resuspendidos en agua pirogénica.

Las reacciones de secuenciación de ADN se llevaron a cabo utilizando el kit *Thermo Sequenase Cycle Sequencing* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el oligonucleótido T7-FAM y los plásmidos correspondientes pGEM-T-P_{bab1_1970}, pGEM-T-P_{virB}, pGEM-T-P_{bab2_0131} o pGEM-T-P_{fur4} como templados.

Los fragmentos de ADN marcados con 6-FAM se analizaron mediante el servicio de Análisis de Fragmentos provisto por Macrogen. Los electroferogramas se visualizaron utilizando el software PeakScanner 2.0.

13. Ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*)

Las sondas P_{bab1_1970} o $P_{bab1_1970\Delta B}$ (10 ng) fueron incubadas con extractos proteicos de *Brucella* o proteína IHF recombinante en *buffer de EMSA* [15 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 10 µg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), 30 mM KCl, 80 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 6% glicerol], en un volumen final de 20 µl. Luego de una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, las muestras fueron sembradas en geles de poliacrilamida al 6% en buffer TBE para llevar a cabo la electroforesis. Una vez finalizada la misma, los geles fueron incubados en *buffer* TBE con 1 µg/ml de bromuro de etidio durante 15 minutos en agitación. La visualización de las bandas se realizó mediante el uso de un transiluminador UV.

14. Ensayos de infección celular

Las células J774 (línea celular modelo de macrófagos de origen murino) se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2 mM de L-glutamina. Las células, sembradas en placas de 24 pocillos (10^5 células por pocillo), fueron inoculadas con 1 ml de medio de cultivo celular (RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino y 2 mM de L-glutamina, sin antibióticos) conteniendo bacterias a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 (para experimentos de replicación intracelular) o 700 (para ensayos de actividad intracelular del promotor *virB1*). Las placas *multiwell* fueron centrifugadas durante 10 minutos a 141 g a temperatura ambiente y luego incubadas en estufa a 37 ºC con atmósfera de 5% CO_2.

Tras 30 minutos, las células fueron lavadas tres veces con PBS estéril (pH 7.4) y posteriormente incubadas con medio de cultivo celular conteniendo gentamicina (100 µg/ml) y estreptomicina (50 µg/ml) para eliminar las bacterias extracelulares.

14.1 Experimentos de replicación intracelular

A diferentes tiempos post-infección (p.i.), las células fueron lavadas tres veces con PBS y tratadas durante 10 minutos con Tritón X-100 al 0,1% en agua estéril desionizada. El número de bacterias viables intracelulares se determinó como UFC/ml mediante diluciones seriadas y plaqueo en medio TSB sólido suplementado con los antibióticos requeridos.

14.2 Actividad intracelular del promotor *virB1*

A diferentes tiempos p.i., las células se lavaron tres veces con PBS y se trataron durante 15 minutos con una solución de paraformaldehído 4 % (p/v) en PBS a 37 °C. Las células fijadas en cubreobjetos de 12 mm se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con DAPI (Invitrogen) antes de montarlas en portaobjetos con aceite de montaje BacLight (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se observaron con un microscopio invertido Zeiss Axio Observer 3 y el software Zen 2.3 para la adquisición de imágenes. Para cada réplica biológica, se midió la intensidad de fluorescencia de GFP en todos los puntos temporales utilizando parámetros fijos de tiempo de exposición y ganancia. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ para determinar la intensidad de fluorescencia media (IFM) de 100 bacterias individuales para cada punto temporal y cepa. La fluorescencia de fondo de cada imagen se determinó calculando la intensidad media de los píxeles en las regiones libres de células, que luego se restó de las mediciones de fluorescencia de las bacterias individuales.

15. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 10.4.1 (GraphPad Software Inc). Se utilizaron pruebas *t*, análisis de varianza de uno y dos factores (ANOVA), y la prueba de Mann-Whitney, según se indica. Todos los análisis fueron bilaterales, con un umbral de significancia de $\alpha = 0,05$. Para las pruebas *t* y ANOVA, la normalidad de los datos fue evaluada mediante la prueba de D'Agostino-Pearson. Cuando se indica significancia estadística con un asterisco, el *p*-valor se proporciona en la leyenda.

Anexo

Tabla Suplementaria 1. Lista de cepas empleadas

Cepa	Descripción	Referencia
Escherichia coli DH5α	*lacZΔM15 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA relA1*	Invitrogen
Escherichia coli S17-1 λpir	Movilización de plásmidos a *B. abortus* mediante conjugación biparental. *TpR SmR recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir.*	ATCC-BAA-2428
Brucella abortus 2308	Cepa salvaje. Virulenta, lisa, Nal^r	Stock de laboratorio
Brucella abortus Δ*mur*	Cepa obtenida por deleción de la secuencia codificante del *locus mur* en *B. abortus* 2308	Tesis Lila Ramis
Brucella abortus Δ*fur4*	Cepa obtenida por deleción de la secuencia codificante del *locus fur4* en *B. abortus* 2308	Esta Tesis
Brucella abortus Δ*fur4* Δ*mur*	Cepa obtenida por deleción de la secuencia codificante de los *loci fur4* y *mur* en *B. abortus* 2308	Esta Tesis

Tabla Suplementaria 2. Lista de plásmidos empleados

Nombre	Descripción	Referencia
pGEM-T Easy	Vector linealizado con adición de timidina en ambos extremos 3'-terminal. Amp^r.	Promega (A1360)
pGEM-T-P$_{bab1_1970}$	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene la región promotora del *locus bab1_1970*.	Esta Tesis
pGEM-T-P$_{bab1_1970\Delta B}$	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene la región promotora del *locus bab1_1970* con la introducción de una secuencia en reemplazo del motivo B	Esta Tesis
pGEM-T-P$_{bab2_0131}$	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene la región promotora del *locus bab2_0131*.	Esta Tesis
pGEM-T-P$_{bab2_0738}$	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene la región promotora del *locus bab2_0738*.	Esta Tesis
pGEM-T-P$_{fur4}$	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene la región promotora del *locus fur4*.	Esta Tesis
pGEM-T-P$_{virB}$	Derivado de pGEM-T Easy. Contiene la región promotora del *locus virB*.	Esta Tesis
pK18mob-*lacZ*	Vector no replicativo y movilizable en *Brucella*, contiene el gen reportero *lacZ*. Km^r.	[84]
pK18mob-P$_{bab2_0131}$-*lacZ*	Derivado de pK18mob-*lacZ*. Contiene una fusión transcripcional ente el promotor del *locus bab2_0131* y el gen reportero *lacZ*.	Esta Tesis
pK18mob-P$_{bab2_0738}$-*lacZ*	Derivado de pK18mob-*lacZ*. Contiene una fusión transcripcional ente el promotor del *locus bab2_0738* y el gen reportero *lacZ*.	Esta Tesis
pK18mob-P$_{fur4}$-*lacZ*	Derivado de pK18mob-*lacZ*. Contiene una fusión transcripcional ente el promotor del *locus fur4* y el gen reportero *lacZ*.	Esta Tesis
pK18mob-P$_{virB}$-*lacZ*	Derivado de pK18mob-*lacZ*. Contiene una fusión transcripcional ente el promotor del *locus virB* y el gen reportero *lacZ*.	Esta Tesis
pBluescript- P$_{virB}$	Derivado de pBluescript II KS. Contiene el promotor del *locus virB*. Amp^r.	[55]
pPROBE'-*gfp*[ASV]	Vector replicativo en *Brucella*. Contiene el gen reportero *gfp*[ASV]. Amp^r.	[184]
pPROBE'-P$_{virB}$-*gfp*[ASV]	Derivado de pPROBE'-*gfp*[ASV]. Contiene una fusión transcripcional ente el promotor del *locus virB* y el gen reportero *gfp*[ASV].	Esta Tesis
pK18mob-*sacB*	Vector no replicativo y movilizable en *Brucella*, contiene marcador de contraselección *sacB*. Km^r.	[185]
pK18mob-*sacB*-Δ*fur4*	Derivado de pK18mob-*sacB.* Contiene la secuencia codificante del *locus fur4*.	Tesis Lila Ramis
pK18mob-*sacB*-Δ*mur*	Derivado de pK18mob-*sacB.* Contiene la secuencia codificante del *locus mur*.	Tesis Lila Ramis

Tabla suplementaria 3. Lista de oligonucleótidos empleados

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Referencia
promfur4_fw	TAGAATTCAGCTTTCTCCTTTGCCCGAC	Esta Tesis
promfur4_rv	TAGGATCCGTCAGCCTCGTTTGCCTTG	Esta Tesis
pbab2_0131fw	AAGGATCCGCTGGAATTACGACCTGGTG	Esta Tesis
pbab2_0131rv	ATGGATCCTCGCGATCCTGTTCCATACG	Esta Tesis
pbab2_0131fwshort	TCATTAAGATGTGCGATATCCG	Esta Tesis
pbab1_1970fw	GCGCCGATGATACCTACTG	Esta Tesis
pbab1_1970rv	GGGACAATATATATCGCTTGG	Esta Tesis
1970ΔBfw	ATGCGATCTGTTGTCAGTCACAGAGCGGTCCCGGCGAT	Esta Tesis
1970ΔBrv	GTGACTGACAACAGATCGCATTTCCTACGCAAAACCGTTTC	Esta Tesis
pbab2_0738fw	ACCAAAGCCTGTTCAGCCG	Esta Tesis
pbab2_0738rv	GCCACTGGCCTCCAATCC	Esta Tesis
pvirdown	ATGAATTCGATCGTCTCTTCTCAGA	[55]
pvu144	CGGGATCCGATTCTTGGTCGGGTTAC	[55]
mut_fur4_fwA	TAGGATCCGCTGTGCGGCGATGAGCA	Esta Tesis
mut_fur4_rvA	GCAAACGAGGCTGACTCTAATCTTTTCCCCCACCG	Esta Tesis
mut_fur4_fwB	GGGGAAAAGATTAGAGTCAGCCTCGTTTGCCTTG	Esta Tesis
mut_fur4_rvB	TAGGATCCAGCCGCCTGATAGGGCAAA	Esta Tesis
Fw_mur_1	ATACTAGTGCGGTACGGAAATCATCGTC	Tesis Lila Ramis
Rv_mur_2	ATGGATCCTTCGGCGGTCTTTCGATCC	Tesis Lila Ramis
Fw_fur4_prot	GAGAACCTGTACTTTCAGGGTATGCTGTTCGACCCGCACAA	Esta Tesis
Rv_fur4_prot	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTATCAGATGCGCTTTGAGCCTG	Esta Tesis
fw_gateway	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGGAGAACCTGTACTTTCAG	Tesis Lila Ramis
rv_gateway	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTA	Tesis Lila Ramis
T7-FAM	(6-FAM)-TGTAATACGACTCACTATAGGGCG	Esta Tesis

Listado de abreviaturas

6-FAM	6-carboxifluoresceína
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANLIS	Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
ARN	Ácido Ribonucleico
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosina Trifosfato
BCV	*Brucella-containig vacuole* (vacuola contenedora de *Brucella)*
BIME	*Bacterial interspersed mosaic element* (elemento mosaico intercalado bacteriano)
BSA	Seroalbúmina bovina
DO_{600}	Densidad óptica determinada a 600 nanómetros
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
EMSA	*Electrophoretic mobility shift assay* (ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética)
GFP	*Green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
Kb	Kilo bases
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolisacárido
Mb	Megabases
ME	Membrana Externa
MI	Membrana interna
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	*Open Reading frame* (Marco abierto de lectura)
Pb	Pares de bases
PBS	*Phosphate-buffered saline* (buffer fosfato salino)
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Y Calidad Agroalimentaria
SST4	Sistema de secreción de tipo IV
TEMED	Tetrametiletilendiamina
UFC	Unidades formadoras de colonias

Bibliografía

1. Jeffery Allen Marston. British Army Medical Services and the Malta Garrison. https://www.maltaramc.com/regsurg/m/marstonja.html. Accessed 10 Mar 2025.

2. Bruce D. Note on the discovery of a microorganism in Malta fever. Bibliothèques de l'Université Paris Cité. https://numerabilis.u-paris.fr/medica/bibliotheque-numerique/resultats/index.php?do=page&cote=epo0017&p=1. Accessed 10 Mar 2025.

3. Wilkinson L. Brucellosis. In: The Cambridge World History of Human Disease. Cambridge University Press; 1993. p. 625–8.

4. Castro HA, Prat MI. Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2005;:203–16.

5. Thorne ET. Brucellosis. Infectious Diseases of Wild Mammals. 2001;:372–95.

6. Cook WE, Williams ES, Thorne ET, Kreeger TJ, Stout G, Bardsley K, et al. Brucella abortus strain RB51 vaccination in elk. I. Efficacy of reduced dosage. J Wildl Dis. 2002;38:18–26. https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.1.18.

7. Elzer PH, Hagius SD, Davis DS, DelVecchio VG, Enright FM. Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. Vet Microbiol. 2002;90:425–31. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00226-2.

8. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2014.

9. Acha PN. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud; 1986.

10. Ruben B, Band JD, Wong P, Colville J. Person-to-person transmission of Brucella melitensis. Lancet Lond Engl. 1991;337:14–5. https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93332-4.

11. Giannacopoulos I, Eliopoulou MI, Ziambaras T, Papanastasiou DA. Transplacentally transmitted congenital brucellosis due to Brucella abortus. J Infect. 2002;45:209–10. https://doi.org/10.1016/s0163-4453(02)91043-1.

12. Mesner O, Riesenberg K, Biliar N, Borstein E, Bouhnik L, Peled N, 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 Off Publ Infect Dis Soc Am. 2007;45:e135-140. https://doi.org/10.1086/523726.

13. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. Epidemiol Infect. 2008;136:496–503. https://doi.org/10.1017/S0950268807008795.

14. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. Lancet Infect Dis. 2007;7:775–86. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70286-4.

15. Córdoba Izquierdo A. Importancia de la brucelosis bovina y consecuencias económicas para el ganadero. Engormix. 2017.

16. Zambrano, Pérez Ruano. Seroprevalencia de brucelosis en ganado bovino y en humanos vinculados a la ganadería bovina en las zonas norte y centro de la provincia Manabí, Ecuador. Salud Animal. 2015;:164–72.

17. Arenas NE. Estudio económico de la infección por Brucella abortus en el ganado bovino de la región del Sumapaz. Med. Vet. Zoot. 2016.

18. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis. 2006;6:91–9. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6.

19. Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard J-P, Kohler S, Fretin D, Walravens K, 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;36:313–26. https://doi.org/10.1051/vetres:2005003.

20. Cárdenas L, Awada L, Tizzani P, Cáceres P, Casal J. Characterization and evolution of countries affected by bovine brucellosis (1996-2014). Transbound Emerg Dis. 2019;66:1280–90. https://doi.org/10.1111/tbed.13144.

21. Carrillo CG. Animal and human brucellosis in the Americas. Office International des Epizooties: Paris. 1990;:4–40.

22. Samartino LE. Brucellosis in Argentina. Vet Microbiol. 2002;90:71–80. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00247-x.

23. Aznar, M.N.L., Facundo José; Cosentino, Bernardo; Sago, Andrés Miguel; la Sala, Luciano, Francisco; León, Emilio; Duffy, Sergio; Peréz, Andrés,. Prevalencia y distribución espacial de brucelosis bovina en las provincias de San Luis y La Pampa. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de la República Argentina. 2013.

24. SENASA. Informe del muestreo para determinación de prevalencias de brucelosis bovina en la zona de mayor producción bovina en la Republica Argentina. 2014.

25. Nielsen KE. Bovine Brucellosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.

26. Garin-Bastuji B, Blasco JM. Caprine and ovine brucellosis (excluding Brucella ovis). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2008;:974–82.

27. Williams KP, Sobral BW, Dickerman AW. A Robust Species Tree for the Alphaproteobacteria. J Bacteriol. 2007;189:4578–86. https://doi.org/10.1128/JB.00269-07.

28. Gupta RS, Mok A. Phylogenomics and signature proteins for the alpha Proteobacteria and its main groups. BMC Microbiol. 2007;7:106. https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-106.

29. Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, Beckstrom-Sternberg JS, Chain PSG, Roberto FF, et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus Brucella. J Bacteriol. 2009;191:2864–70. https://doi.org/10.1128/JB.01581-08.

30. Chain PSG, Comerci DJ, Tolmasky ME, Larimer FW, Malfatti SA, Vergez LM, et al. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic Brucellae. Infect Immun. 2005;73:8353–61. https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8353-8361.2005.

31. Celli J, de Chastellier C, Franchini D-M, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel J-P. Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J Exp Med. 2003;198:545–56. https://doi.org/10.1084/jem.20030088.

32. Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goñi I, et al. Brucella abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infect Immun. 1998;66:5711–24. https://doi.org/10.1128/IAI.66.12.5711-5724.1998.

33. Porte F, Liautard J-P, Köhler S. Early Acidification of Phagosomes Containing Brucella suis Is Essential for Intracellular Survival in Murine Macrophages. Infect Immun. 1999;67:4041–7.

34. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J. Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. Traffic Cph Den. 2008;9:678–94. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x.

35. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, et al. The Brucella suis virB operon is induced intracellularly in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:1544–9. https://doi.org/10.1073/pnas.032514299.

36. Comerci DJ, Martínez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole. Cell Microbiol. 2001;3:159–68. https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00102.x.

37. Sedzicki J, Tschon T, Low SH, Willemart K, Goldie KN, Letesson J-J, et al. 3D correlative electron microscopy reveals continuity of Brucella-containing vacuoles with the endoplasmic reticulum. J Cell Sci. 2018;131:jcs210799. https://doi.org/10.1242/jcs.210799.

38. Starr T, Child R, Wehrly TD, Hansen B, Hwang S, López-Otin C, et al. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle. Cell Host Microbe. 2012;11:33–45. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.12.002.

39. Kimura T, Jia J, Claude-Taupin A, Kumar S, Choi SW, Gu Y, et al. Cellular and molecular mechanism for secretory autophagy. Autophagy. 2017;13:1084–5. https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1307486.

40. Spera JM, Guaimas F, Czibener C, Ugalde JE. Brucella Egresses from Host Cells Exploiting Multivesicular Bodies. mBio. 2023;14:e0333822. https://doi.org/10.1128/mbio.03338-22.

41. Verbeke J, Fayt Y, Martin L, Yilmaz O, Sedzicki J, Reboul A, et al. Host cell egress of Brucella abortus requires BNIP3L-mediated mitophagy. EMBO J. 2023;42:e112817. https://doi.org/10.15252/embj.2022112817.

42. Celli J. The Intracellular Life Cycle of *Brucella* spp. Microbiol Spectr. 2019;7:7.2.07. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0006-2019.

43. O'Callaghan D, Cazevieille C, Allardet-Servent A, Boschiroli ML, Bourg G, Foulongne V, et al. A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis. Mol Microbiol. 1999;33:1210–20. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01569.x.

44. Celli J, Salcedo SP, Gorvel J-P. Brucella coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:1673–8. https://doi.org/10.1073/pnas.0406873102.

45. Smith EP, Miller CN, Child R, Cundiff JA, Celli J. Postreplication Roles of the Brucella VirB Type IV Secretion System Uncovered via Conditional Expression of the VirB11 ATPase. mBio. 2016;7:e01730-16. https://doi.org/10.1128/mBio.01730-16.

46. Fugier E, Salcedo SP, de Chastellier C, Pophillat M, Muller A, Arce-Gorvel V, et al. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and the small GTPase Rab 2 are crucial for Brucella replication. PLoS Pathog. 2009;5:e1000487. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000487.

47. Miller CN, Smith EP, Cundiff JA, Knodler LA, Bailey Blackburn J, Lupashin V, et al. A Brucella Type IV Effector Targets the COG Tethering Complex to Remodel Host Secretory Traffic and Promote Intracellular Replication. Cell Host Microbe. 2017;22:317-329.e7. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.017.

48. Döhmer PH, Valguarnera E, Czibener C, Ugalde JE. Identification of a type IV secretion substrate of Brucella abortus that participates in the early stages of intracellular survival. Cell Microbiol. 2014;16:396–410. https://doi.org/10.1111/cmi.12224.

49. Roux CM, Rolán HG, Santos RL, Beremand PD, Thomas TL, Adams LG, et al. Brucella requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. Cell Microbiol. 2007;9:1851–69. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00922.x.

50. de Jong MF, Starr T, Winter MG, den Hartigh AB, Child R, Knodler LA, et al. Sensing of bacterial type IV secretion via the unfolded protein response. mBio. 2013;4:e00418-00412. https://doi.org/10.1128/mBio.00418-12.

51. Gomes MTR, Campos PC, Oliveira FS, Corsetti PP, Bortoluci KR, Cunha LD, et al. Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to Brucella abortus infection. J Immunol Baltim Md 1950. 2013;190:3629–38. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202817.

52. Ma Z, Li R, Hu R, Deng X, Xu Y, Zheng W, et al. Brucella abortus BspJ Is a Nucleomodulin That Inhibits Macrophage Apoptosis and Promotes Intracellular Survival

of Brucella. Front Microbiol. 2020;11:599205. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.599205.

53. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, et al. The Brucella suis virB operon is induced intracellularly in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:1544–9. https://doi.org/10.1073/pnas.032514299.

54. Rouot B, Alvarez-Martinez M-T, Marius C, Menanteau P, Guilloteau L, Boigegrain R-A, et al. Production of the type IV secretion system differs among Brucella species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. Infect Immun. 2003;71:1075–82. https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1075-1082.2003.

55. Sieira R, Comerci DJ, Pietrasanta LI, Ugalde RA. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the Brucella abortus virB operon. Mol Microbiol. 2004;54:808–22. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04316.x.

56. Sternon J-F, Godessart P, Gonçalves de Freitas R, Van der Henst M, Poncin K, Francis N, et al. Transposon Sequencing of Brucella abortus Uncovers Essential Genes for Growth In Vitro and Inside Macrophages. Infect Immun. 2018;86:e00312-18. https://doi.org/10.1128/IAI.00312-18.

57. Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, et al. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in Brucella abortus and controls cell invasion and virulence. Mol Microbiol. 1998;29:125–38. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00913.x.

58. Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckaert A, Garin J, et al. The two-component system BvrR/BvrS essential for Brucella abortus virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:12375–80. https://doi.org/10.1073/pnas.192439399.

59. Manterola L, Moriyón I, Moreno E, Sola-Landa A, Weiss DS, Koch MHJ, 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;187:5631–9. https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5631-5639.2005.

60. Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, von Eichel-Streiber C, López-Goñi I, Thelestam M, Arvidson S, et al. GTPases of the Rho subfamily are required for Brucella abortus internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. J Biol Chem. 2001;276:44435–43. https://doi.org/10.1074/jbc.M105606200.

61. Billard E, Dornand J, Gross A. Brucella suis prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. Infect Immun. 2007;75:4980–9. https://doi.org/10.1128/IAI.00637-07.

62. Billard E, Cazevieille C, Dornand J, Gross A. High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens Brucella suis, B. abortus, and B. melitensis. Infect Immun. 2005;73:8418–24. https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8418-8424.2005.

63. Martínez-Núñez C, Altamirano-Silva P, Alvarado-Guillén F, Moreno E, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E. The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in Brucella abortus. J Bacteriol. 2010;192:5603–8. https://doi.org/10.1128/JB.00567-10.

64. Rivas-Solano O, Van der Henst M, Castillo-Zeledón A, Suárez-Esquivel M, Muñoz-Vargas L, Capitan-Barrios Z, et al. The regulon of Brucella abortus two-component system BvrR/BvrS reveals the coordination of metabolic pathways required for intracellular life. PLoS ONE. 2022;17:e0274397. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274397.

65. Altamirano-Silva P, Meza-Torres J, Castillo-Zeledón A, Ruiz-Villalobos N, Zuñiga-Pereira AM, Chacón-Díaz C, et al. Brucella abortus Senses the Intracellular Environment through the BvrR/BvrS Two-Component System, Which Allows B. abortus To Adapt to Its Replicative Niche. Infect Immun. 2018;86:e00713-17. https://doi.org/10.1128/IAI.00713-17.

66. Delrue R-M, Deschamps C, Léonard S, Nijskens C, Danese I, Schaus J-M, et al. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of Brucella melitensis. Cell Microbiol. 2005;7:1151–61. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00543.x.

67. de Jong MF, Sun Y-H, den Hartigh AB, van Dijl JM, Tsolis RM. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the Brucella type IV secretion system. Mol Microbiol. 2008;70:1378–96. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06487.x.

68. Kleinman CL, Sycz G, Bonomi HR, Rodríguez RM, Zorreguieta A, Sieira R. ChIP-seq analysis of the LuxR-type regulator VjbR reveals novel insights into the Brucella virulence gene expression network. Nucleic Acids Res. 2017;45:5757–69. https://doi.org/10.1093/nar/gkx165.

69. Weeks JN, Galindo CL, Drake KL, Adams GL, Garner HR, Ficht TA. Brucella melitensis VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. BMC Microbiol. 2010;10:167. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-167.

70. Uzureau S, Lemaire J, Delaive E, Dieu M, Gaigneaux A, Raes M, et al. Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen Brucella melitensis 16 M. J Proteome Res. 2010;9:3200–17. https://doi.org/10.1021/pr100068p.

71. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol. 2001;55:165–99. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165.

72. Arocena GM, Sieira R, Comerci DJ, Ugalde RA. Identification of the quorum-sensing target DNA sequence and N-Acyl homoserine lactone responsiveness of the Brucella abortus virB promoter. J Bacteriol. 2010;192:3434–40. https://doi.org/10.1128/JB.00232-10.

73. Terwagne M, Mirabella A, Lemaire J, Deschamps C, De Bolle X, Letesson J-J. Quorum Sensing and Self-Quorum Quenching in the Intracellular Pathogen

Brucellamelitensis. PLoS ONE. 2013;8:e82514. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082514.

74. Roop RM, Barton IS, Hopersberger D, Martin DW. Uncovering the Hidden Credentials of Brucella Virulence. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. 2021;85:e00021-19. https://doi.org/10.1128/MMBR.00021-19.

75. Yang M, Giel JL, Cai T, Zhong Z, Zhu J. The LuxR family quorum-sensing activator MrtR requires its cognate autoinducer for dimerization and activation but not for protein folding. J Bacteriol. 2009;191:434–8. https://doi.org/10.1128/JB.01247-08.

76. White CE, Winans SC. Identification of amino acid residues of the Agrobacterium tumefaciens quorum-sensing regulator TraR that are critical for positive control of transcription. Mol Microbiol. 2005;55:1473–86. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04482.x.

77. Fuqua C, Winans SC. Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of Agrobacterium tumefaciens conjugal transfer genes. J Bacteriol. 1996;178:435–40. https://doi.org/10.1128/jb.178.2.435-440.1996.

78. Dillon SC, Dorman CJ. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. Nat Rev Microbiol. 2010;8:185–95. https://doi.org/10.1038/nrmicro2261.

79. Sheridan SD, Benham CJ, Hatfield GW. Activation of gene expression by a novel DNA structural transmission mechanism that requires supercoiling-induced DNA duplex destabilization in an upstream activating sequence. J Biol Chem. 1998;273:21298–308. https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.21298.

80. Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. J Biol Chem. 2002;277:12507–15. https://doi.org/10.1074/jbc.M110968200.

81. Bender RA. Regulation of the histidine utilization (hut) system in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. 2012;76:565–84. https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-12.

82. Zhang X-X, Rainey PB. Genetic analysis of the histidine utilization (hut) genes in Pseudomonas fluorescens SBW25. Genetics. 2007;176:2165–76. https://doi.org/10.1534/genetics.107.075713.

83. Goldberg RB, Magasanik B. Gene order of the histidine utilization (hut) operons in Klebsiella aerogenes. J Bacteriol. 1975;122:1025–31. https://doi.org/10.1128/jb.122.3.1025-1031.1975.

84. Sieira R, Arocena GM, Bukata L, Comerci DJ, Ugalde RA. Metabolic control of virulence genes in Brucella abortus: HutC coordinates virB expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters. J Bacteriol. 2010;192:217–24. https://doi.org/10.1128/JB.01124-09.

85. Ellison DW, Miller VL. Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. Curr Opin Microbiol. 2006;9:153–9. https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.003.

86. Sieira R, Arocena GM, Zorreguieta A, Comerci DJ, Ugalde RA. A MarR-Type regulator directly activates transcription from the Brucella abortus virB promoter by sharing a redundant role with HutC. J Bacteriol. 2012;194:6431–40. https://doi.org/10.1128/JB.01007-12.

87. Rambow-Larsen AA, Rajashekara G, Petersen E, Splitter G. Putative quorum-sensing regulator BlxR of Brucella melitensis regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. J Bacteriol. 2008;190:3274–82. https://doi.org/10.1128/JB.01915-07.

88. Caswell CC, Gaines JM, Roop RM. The RNA chaperone Hfq independently coordinates expression of the VirB type IV secretion system and the LuxR-type regulator BabR in Brucella abortus 2308. J Bacteriol. 2012;194:3–14. https://doi.org/10.1128/JB.05623-11.

89. Pirone L, Pitzer JE, D'Abrosca G, Fattorusso R, Malgieri G, Pedone EM, et al. Identifying the region responsible for Brucella abortus MucR higher-order oligomer formation and examining its role in gene regulation. Sci Rep. 2018;8:17238. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35432-1.

90. Barton IS, Ren Z, Cribb CB, Pitzer JE, Baglivo I, Martin DW, et al. Brucella MucR acts as an H-NS-like protein to silence virulence genes and structure the nucleoid. mBio. 2023;14:e0220123. https://doi.org/10.1128/mbio.02201-23.

91. Baglivo I, Malgieri G, Roop RM, Barton IS, Wang X, Russo V, et al. MucR protein: Three decades of studies have led to the identification of a new H-NS-like protein. Mol Microbiol. 2025;123:154–67. https://doi.org/10.1111/mmi.15261.

92. Wu Q, Pei J, Turse C, Ficht TA. Mariner mutagenesis of Brucella melitensis reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival. BMC Microbiol. 2006;6:102. https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-102.

93. Arenas-Gamboa AM, Rice-Ficht AC, Kahl-McDonagh MM, Ficht TA. Protective Efficacy and Safety of Brucella melitensis 16MΔmucR against Intraperitoneal and Aerosol Challenge in BALB/c Mice ▿. Infect Immun. 2011;79:3653–8. https://doi.org/10.1128/IAI.05330-11.

94. Sun J, Dong H, Peng X, Liu Y, Jiang H, Feng Y, et al. Deletion of the Transcriptional Regulator MucR in Brucella canis Affects Stress Responses and Bacterial Virulence. Front Vet Sci. 2021;8:650942. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.650942.

95. Tartilán-Choya B, Sidhu-Muñoz RS, Vizcaíno N. The Transcriptional Regulator MucR, but Not Its Controlled Acid-Activated Chaperone HdeA, Is Essential for Virulence and Modulates Surface Architecture and Properties in Brucella ovis PA. Front Vet Sci. 2022;8:814752. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.814752.

96. Mirabella A, Terwagne M, Zygmunt MS, Cloeckaert A, De Bolle X, Letesson JJ. Brucella melitensis MucR, an Orthologue of Sinorhizobium meliloti MucR, Is Involved in Resistance to Oxidative, Detergent, and Saline Stresses and Cell Envelope Modifications. J Bacteriol. 2013;195:453–65. https://doi.org/10.1128/JB.01336-12.

97. Caswell CC, Elhassanny AEM, Planchin EE, Roux CM, Weeks-Gorospe JN, Ficht TA, et al. Diverse genetic regulon of the virulence-associated transcriptional regulator MucR in Brucella abortus 2308. Infect Immun. 2013;81:1040–51. https://doi.org/10.1128/IAI.01097-12.

98. Sieira R. Regulation of virulence in Brucella: an eclectic repertoire of transcription factors defines the complex architecture of the virB promoter. Future Microbiol. 2013;8:1193–208. https://doi.org/10.2217/fmb.13.83.

99. Summers AO. Damage control: regulating defenses against toxic metals and metalloids. Curr Opin Microbiol. 2009;12:138–44. https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.02.003.

100. Waldron KJ, Robinson NJ. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? Nat Rev Microbiol. 2009;7:25–35. https://doi.org/10.1038/nrmicro2057.

101. Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. Nat Rev Microbiol. 2013;11:443–54. https://doi.org/10.1038/nrmicro3032.

102. Foster AW, Osman D, Robinson NJ. Metal preferences and metallation. J Biol Chem. 2014;289:28095–103. https://doi.org/10.1074/jbc.R114.588145.

103. Roop Ii RM, Caswell CC, editors. Metals and the Biology and Virulence of Brucella. Cham: Springer International Publishing; 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53622-4.

104. Nairz M, Schroll A, Sonnweber T, Weiss G. The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface. Cell Microbiol. 2010;12:1691–702. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01529.x.

105. Weiss G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. Best Pract Res Clin Haematol. 2005;18:183–201. https://doi.org/10.1016/j.beha.2004.09.001.

106. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. Science. 2004;306:2090–3. https://doi.org/10.1126/science.1104742.

107. Cellier MF, Courville P, Campion C. Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. Microbes Infect. 2007;9:1662–70. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.09.006.

108. González Carreró MI, Sangari FJ, Agüero J, Garcı A Lobo JM. Brucella abortus strain 2308 produces brucebactin, a highly efficient catecholic siderophore. Microbiol Read Engl. 2002;148 Pt 2:353–60. https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-353.

109. Elhassanny AEM, Anderson ES, Menscher EA, Roop RM. The ferrous iron transporter FtrABCD is required for the virulence of Brucella abortus 2308 in mice. Mol Microbiol. 2013;88:1070–82. https://doi.org/10.1111/mmi.12242.

110. Paulley JT, Anderson ES, Roop RM. Brucella abortus requires the heme transporter BhuA for maintenance of chronic infection in BALB/c mice. Infect Immun. 2007;75:5248–54. https://doi.org/10.1128/IAI.00460-07.

111. Anderson ES, Paulley JT, Gaines JM, Valderas MW, Martin DW, Menscher E, et al. The manganese transporter MntH is a critical virulence determinant for Brucella abortus 2308 in experimentally infected mice. Infect Immun. 2009;77:3466–74. https://doi.org/10.1128/IAI.00444-09.

112. Yang X, Becker T, Walters N, Pascual DW. Deletion of znuA virulence factor attenuates Brucella abortus and confers protection against wild-type challenge. Infect Immun. 2006;74:3874–9. https://doi.org/10.1128/IAI.01957-05.

113. Kim S, Watanabe K, Shirahata T, Watarai M. Zinc uptake system (znuA locus) of Brucella abortus is essential for intracellular survival and virulence in mice. J Vet Med Sci. 2004;66:1059–63. https://doi.org/10.1292/jvms.66.1059.

114. Hop HT, Huy TXN, Lee HJ, Kim S. Intracellular growth of Brucella is mediated by Dps-dependent activation of ferritinophagy. EMBO Rep. 2023;24:e55376. https://doi.org/10.15252/embr.202255376.

115. Martínez M, Ugalde RA, Almirón M. Dimeric Brucella abortus Irr protein controls its own expression and binds haem. Microbiol Read Engl. 2005;151 Pt 10:3427–33. https://doi.org/10.1099/mic.0.28213-0.

116. Martínez M, Ugalde RA, Almirón M. Irr regulates brucebactin and 2,3-dihydroxybenzoic acid biosynthesis, and is implicated in the oxidative stress resistance and intracellular survival of Brucella abortus. Microbiol Read Engl. 2006;152 Pt 9:2591–8. https://doi.org/10.1099/mic.0.28782-0.

117. Anderson ES, Paulley JT, Martinson DA, Gaines JM, Steele KH, Roop RM. The iron-responsive regulator irr is required for wild-type expression of the gene encoding the heme transporter BhuA in Brucella abortus 2308. J Bacteriol. 2011;193:5359–64. https://doi.org/10.1128/JB.00372-11.

118. Ojeda JF, Martinson DA, Menscher EA, Roop RM. The bhuQ gene encodes a heme oxygenase that contributes to the ability of Brucella abortus 2308 to use heme as an iron source and is regulated by Irr. J Bacteriol. 2012;194:4052–8. https://doi.org/10.1128/JB.00367-12.

119. Menscher EA, Caswell CC, Anderson ES, Roop RM. Mur regulates the gene encoding the manganese transporter MntH in Brucella abortus 2308. J Bacteriol. 2012;194:561–6. https://doi.org/10.1128/JB.05296-11.

120. Sheehan LM, Budnick JA, Roop RM, Caswell CC. Coordinated zinc homeostasis is essential for the wild-type virulence of Brucella abortus. J Bacteriol. 2015;197:1582–91. https://doi.org/10.1128/JB.02543-14.

121. Johnsrude MJ, Pitzer JE, Martin DW, Roop RM. The Cation Diffusion Facilitator Family Protein EmfA Confers Resistance to Manganese Toxicity in Brucella abortus

2308 and Is an Essential Virulence Determinant in Mice. J Bacteriol. 2019;202:e00357-19. https://doi.org/10.1128/JB.00357-19.

122. Zhang H, Wang B, Wu W, Deng X, Shao Z, Yi J, et al. Insights into irr and rirA gene regulation on the virulence of Brucella melitensis M5-90. Can J Microbiol. 2020;66:351–8. https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0393.

123. Jubier-Maurin V, Rodrigue A, Ouahrani-Bettache S, Layssac M, Mandrand-Berthelot MA, Köhler S, et al. Identification of the nik gene cluster of Brucella suis: regulation and contribution to urease activity. J Bacteriol. 2001;183:426–34. https://doi.org/10.1128/JB.183.2.426-434.2001.

124. Sangari FJ, Cayón AM, Seoane A, García-Lobo JM. Brucella abortus ure2 region contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system. BMC Microbiol. 2010;10:107. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-107.

125. Lestrate P, Delrue RM, Danese I, Didembourg C, Taminiau B, Mertens P, et al. Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of Brucella melitensis. Mol Microbiol. 2000;38:543–51. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02150.x.

126. Hantke K. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (fur) in Escherichia coli K 12: fur not only affects iron metabolism. Mol Gen Genet MGG. 1987;210:135–9. https://doi.org/10.1007/BF00337769.

127. Bagg A, Neilands JB. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in Escherichia coli. Biochemistry. 1987;26:5471–7. https://doi.org/10.1021/bi00391a039.

128. Bagg A, Neilands JB. Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. Microbiol Rev. 1987;51:509–18. https://doi.org/10.1128/mr.51.4.509-518.1987.

129. Lee J-W, Helmann JD. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med. 2007;20:485–99. https://doi.org/10.1007/s10534-006-9070-7.

130. Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Fur-like proteins: Beyond the ferric uptake regulator (Fur) paralog. Arch Biochem Biophys. 2021;701:108770. https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108770.

131. Horsburgh MJ, Ingham E, Foster SJ. In Staphylococcus aureus, Fur Is an Interactive Regulator with PerR, Contributes to Virulence, and Is Necessary for Oxidative Stress Resistance through Positive Regulation of Catalase and Iron Homeostasis. J Bacteriol. 2001;183:468–75. https://doi.org/10.1128/jb.183.2.468-475.2001.

132. Hernández JA, López-Gomollón S, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. Three fur homologues from Anabaena sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. FEMS Microbiol Lett. 2004;236:275–82. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09658.x.

133. Fuangthong M, Herbig AF, Bsat N, Helmann JD. Regulation of the Bacillus subtilis fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. J Bacteriol. 2002;184:3276–86. https://doi.org/10.1128/JB.184.12.3276-3286.2002.

134. Fuangthong M, Helmann JD. Recognition of DNA by Three Ferric Uptake Regulator (Fur) Homologs in Bacillus subtilis. J Bacteriol. 2003;185:6348–57. https://doi.org/10.1128/jb.185.21.6348-6357.2003.

135. Botello-Morte L, González A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Chapter Four - Functional Genomics of Metalloregulators in Cyanobacteria. In: Chauvat F, Cassier-Chauvat C, editors. Advances in Botanical Research. Academic Press; 2013. p. 107–56. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394313-2.00004-4.

136. Nam D, Matsumoto Y, Uchida T, O'Brian MR, Ishimori K. Mechanistic insights into heme-mediated transcriptional regulation via a bacterial manganese-binding iron regulator, iron response regulator (Irr). J Biol Chem. 2020;295:11316–25. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011855.

137. Díaz-Mireles E, Wexler M, Sawers G, Bellini D, Todd JD, Johnston AWB. The Fur-like protein Mur of Rhizobium leguminosarum is a Mn(2+)-responsive transcriptional regulator. Microbiol Read Engl. 2004;150 Pt 5:1447–56. https://doi.org/10.1099/mic.0.26961-0.

138. Bellini P, Hemmings AM. In vitro characterization of a bacterial manganese uptake regulator of the fur superfamily. Biochemistry. 2006;45:2686–98. https://doi.org/10.1021/bi052081n.

139. Rodionov DA, Gelfand MS, Todd JD, Curson ARJ, Johnston AWB. Computational reconstruction of iron- and manganese-responsive transcriptional networks in alpha-proteobacteria. PLoS Comput Biol. 2006;2:e163. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020163.

140. Ruiz-Ranwez V, Posadas DM, Van der Henst C, Estein SM, Arocena GM, Abdian PL, 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;81:996–1007. https://doi.org/10.1128/IAI.01241-12.

141. Sieira R, Bialer MG, Roset MS, Ruiz-Ranwez V, Langer T, Arocena GM, 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;103:553–65. https://doi.org/10.1111/mmi.13576.

142. Bsat N, Herbig A, Casillas-Martinez L, Setlow P, Helmann JD. Bacillus subtilis contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. Mol Microbiol. 1998;29:189–98. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00921.x.

143. Rea R, Hill C, Gahan CGM. Listeria monocytogenes PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. Appl Environ Microbiol. 2005;71:8314–22. https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8314-8322.2005.

144. Morikawa K, Ohniwa RL, Kim J, Maruyama A, Ohta T, Takeyasu K. Bacterial nucleoid dynamics: oxidative stress response in Staphylococcus aureus. Genes Cells Devoted Mol Cell Mech. 2006;11:409–23. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00949.x.

145. Hillmann F, Fischer R-J, Saint-Prix F, Girbal L, Bahl H. PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe Clostridium acetobutylicum. Mol Microbiol. 2008;68:848–60. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06192.x.

146. King KY, Horenstein JA, Caparon MG. Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of Streptococcus pyogenes. J Bacteriol. 2000;182:5290–9. https://doi.org/10.1128/JB.182.19.5290-5299.2000.

147. Wu H-J, Seib KL, Srikhanta YN, Kidd SP, Edwards JL, Maguire TL, et al. PerR controls Mn-dependent resistance to oxidative stress in Neisseria gonorrhoeae. Mol Microbiol. 2006;60:401–16. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05079.x.

148. van Vliet AH, Baillon ML, Penn CW, Ketley JM. Campylobacter jejuni contains two fur homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor. J Bacteriol. 1999;181:6371–6. https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6371-6376.1999.

149. Herbig AF, Helmann JD. Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the Bacillus subtilis PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. Mol Microbiol. 2001;41:849–59. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02543.x.

150. Fuangthong M, Herbig AF, Bsat N, Helmann JD. Regulation of the Bacillus subtilis fur and perR genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. J Bacteriol. 2002;184:3276–86. https://doi.org/10.1128/JB.184.12.3276-3286.2002.

151. Lee J-W, Helmann JD. The PerR transcription factor senses H2O2 by metal-catalysed histidine oxidation. Nature. 2006;440:363–7. https://doi.org/10.1038/nature04537.

152. Brenot A, King KY, Caparon MG. The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of Streptococcus pyogenes. Mol Microbiol. 2005;55:221–34. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04370.x.

153. Ricci S, Janulczyk R, Björck L. The regulator PerR is involved in oxidative stress response and iron homeostasis and is necessary for full virulence of Streptococcus pyogenes. Infect Immun. 2002;70:4968–76. https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.4968-4976.2002.

154. Horsburgh MJ, Clements MO, Crossley H, Ingham E, Foster SJ. PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in Staphylococcus aureus. Infect Immun. 2001;69:3744–54. https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3744-3754.2001.

155. Clapp B, Skyberg JA, Yang X, Thornburg T, Walters N, Pascual DW. Protective live oral brucellosis vaccines stimulate Th1 and th17 cell responses. Infect Immun. 2011;79:4165–74. https://doi.org/10.1128/IAI.05080-11.

156. Johnston AWB, Todd JD, Curson AR, Lei S, Nikolaidou-Katsaridou N, Gelfand MS, et al. Living without Fur: the subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium Rhizobium and other alpha-proteobacteria. Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med. 2007;20:501–11. https://doi.org/10.1007/s10534-007-9085-8.

157. Hibbing ME, Fuqua C. Antiparallel and interlinked control of cellular iron levels by the Irr and RirA regulators of Agrobacterium tumefaciens. J Bacteriol. 2011;193:3461–72. https://doi.org/10.1128/JB.00317-11.

158. O'Brian MR. Perception and Homeostatic Control of Iron in the Rhizobia and Related Bacteria. Annu Rev Microbiol. 2015;69:229–45. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104432.

159. Ansari AZ, Bradner JE, O'Halloran TV. DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. Nature. 1995;374:371–5. https://doi.org/10.1038/374370a0.

160. Arocena GM, Zorreguieta A, Sieira R. Expression of VjbR under nutrient limitation conditions is regulated at the post-transcriptional level by specific acidic pH values and urocanic acid. PloS One. 2012;7:e35394. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035394.

161. Bailey TL, Johnson J, Grant CE, Noble WS. The MEME Suite. Nucleic Acids Res. 2015;43:W39-49. https://doi.org/10.1093/nar/gkv416.

162. Hohle TH, O'Brian MR. Metal-specific control of gene expression mediated by Bradyrhizobium japonicum Mur and Escherichia coli Fur is determined by the cellular context. Mol Microbiol. 2016;101:152–66. https://doi.org/10.1111/mmi.13381.

163. DebRoy S, Aliaga-Tobar V, Galvez G, Arora S, Liang X, Horstmann N, et al. Genome-wide analysis of in vivo CcpA binding with and without its key co-factor HPr in the major human pathogen group A Streptococcus. Mol Microbiol. 2021;115:1207–28. https://doi.org/10.1111/mmi.14667.

164. Roux A-E, Robert S, Bastat M, Rosinski-Chupin I, Rong V, Holbert S, et al. The Role of Regulator Catabolite Control Protein A (CcpA) in Streptococcus agalactiae Physiology and Stress Response. Microbiol Spectr. 2022;10:e0208022. https://doi.org/10.1128/spectrum.02080-22.

165. Kunkle DE, Bina XR, Bina JE. Vibrio cholerae OmpR Contributes to Virulence Repression and Fitness at Alkaline pH. Infect Immun. 2020;88:e00141-20. https://doi.org/10.1128/IAI.00141-20.

166. Seo SW, Gao Y, Kim D, Szubin R, Yang J, Cho B-K, et al. Revealing genome-scale transcriptional regulatory landscape of OmpR highlights its expanded regulatory roles under osmotic stress in Escherichia coli K-12 MG1655. Sci Rep. 2017;7:2181. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02110-7.

167. Perkins TT, Davies MR, Klemm EJ, Rowley G, Wileman T, James K, et al. ChIP-seq and transcriptome analysis of the OmpR regulon of Salmonella enterica serovars Typhi and Typhimurium reveals accessory genes implicated in host colonization. Mol Microbiol. 2013;87:526–38. https://doi.org/10.1111/mmi.12111.

168. Gilson E, Saurin W, Perrin D, Bachellier S, Hofnung M. The BIME family of bacterial highly repetitive sequences. Res Microbiol. 1991;142:217–22. https://doi.org/10.1016/0923-2508(91)90033-7.

169. Bachellier S, Clément JM, Hofnung M, Gilson E. Bacterial interspersed mosaic elements (BIMEs) are a major source of sequence polymorphism in Escherichia coli intergenic regions including specific associations with a new insertion sequence. Genetics. 1997;145:551–62. https://doi.org/10.1093/genetics/145.3.551.

170. Qian Z, Adhya S. DNA repeat sequences: diversity and versatility of functions. Curr Genet. 2017;63:411–6. https://doi.org/10.1007/s00294-016-0654-7.

171. Boccard F, Prentki P. Specific interaction of IHF with RIBs, a class of bacterial repetitive DNA elements located at the 3' end of transcription units. EMBO J. 1993;12:5019–27. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06195.x.

172. Macvanin M, Edgar R, Cui F, Trostel A, Zhurkin V, Adhya S. Noncoding RNAs Binding to the Nucleoid Protein HU in Escherichia coli. J Bacteriol. 2012;194:6046–55. https://doi.org/10.1128/JB.00961-12.

173. Pinochet-Barros A, Helmann JD. Bacillus subtilis Fur Is a Transcriptional Activator for the PerR-Repressed pfeT Gene, Encoding an Iron Efflux Pump. J Bacteriol. 2020;202:e00697-19. https://doi.org/10.1128/JB.00697-19.

174. Yang J, Ishimori K, O'Brian MR. Two heme binding sites are involved in the regulated degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. J Biol Chem. 2005;280:7671–6. https://doi.org/10.1074/jbc.M411664200.

175. Singleton C, White GF, Todd JD, Marritt SJ, Cheesman MR, Johnston AWB, et al. Heme-responsive DNA binding by the global iron regulator Irr from Rhizobium leguminosarum. J Biol Chem. 2010;285:16023–31. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067215.

176. Hohle TH, O'Brian MR. Transcriptional control of the Bradyrhizobium japonicum irr gene requires repression by fur and Antirepression by Irr. J Biol Chem. 2010;285:26074–80. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.145979.

177. Rudolph G, Hennecke H, Fischer H-M. Beyond the Fur paradigm: iron-controlled gene expression in rhizobia. FEMS Microbiol Rev. 2006;30:631–48. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00030.x.

178. Grassmann AA, Zavala-Alvarado C, Bettin EB, Picardeau M, Benaroudj N, Caimano MJ. The FUR-like regulators PerRA and PerRB integrate a complex regulatory network that promotes mammalian host-adaptation and virulence of Leptospira interrogans. PLoS Pathog. 2021;17:e1009078. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009078.

179. Zavala-Alvarado C, G Huete S, Vincent AT, Sismeiro O, Legendre R, Varet H, et al. The oxidative stress response of pathogenic Leptospira is controlled by two peroxide stress regulators which putatively cooperate in controlling virulence. PLoS Pathog. 2021;17:e1009087. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009087.

180. Kim J-H, Ji C-J, Ju S-Y, Yang Y-M, Ryu S-H, Kwon Y, et al. Bacillus licheniformis Contains Two More PerR-Like Proteins in Addition to PerR, Fur, and Zur Orthologues. PloS One. 2016;11:e0155539. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155539.

181. Todd JD, Sawers G, Rodionov DA, Johnston AWB. The Rhizobium leguminosarum regulator IrrA affects the transcription of a wide range of genes in response to Fe availability. Mol Genet Genomics MGG. 2006;275:564–77. https://doi.org/10.1007/s00438-006-0115-y.

182. Lee H-N, Ji C-J, Lee H-H, Park J, Seo Y-S, Lee J-W, et al. Roles of three FurA paralogs in the regulation of genes pertaining to peroxide defense in Mycobacterium smegmatis mc2 155. Mol Microbiol. 2018;108:661–82. https://doi.org/10.1111/mmi.13956.

183. Cissé C, Mathieu SV, Abeih MBO, Flanagan L, Vitale S, Catty P, et al. Inhibition of the ferric uptake regulator by peptides derived from anti-FUR peptide aptamers: coupled theoretical and experimental approaches. ACS Chem Biol. 2014;9:2779–86. https://doi.org/10.1021/cb5005977.

184. Miller WG, Leveau JH, Lindow SE. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. Mol Plant-Microbe Interact MPMI. 2000;13:1243–50. https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1243.

185. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. 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;145:69–73. https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7.