

Tesis Doctoral

# Rol del metabolismo de flavinas en la virulencia de *Brucella abortus*

Bonomi, Hernán Ruy

2010

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

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

Cita tipo APA:

Bonomi, Hernán Ruy. (2010). Rol del metabolismo de flavinas en la virulencia de *Brucella abortus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bonomi, Hernán Ruy. "Rol del metabolismo de flavinas en la virulencia de *Brucella abortus*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**“Rol del Metabolismo de Flavinas en la  
Virulencia de *Brucella abortus*”**

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

**Hernán Ruy Bonomi**

Director: Dr. Fernando A. Goldbaum

Consejera de estudios: Dra. Ángeles Zorreguieta

Fundación Instituto Leloir – IIBBA – CONICET

Buenos Aires, 2010

**a mis padres,  
Jorge y Luisa**

## Agradecimientos...

a mi familia: a mis padres, que me dieron todo el apoyo que un hijo puede pedir, estoy y estaré siempre agradecido, a mi abuela Amalia, a Lei, Juan y mis dos pequeños sobrinos, Emi e Ivancito, porque sólo puedo reír a su lado.

a mi director de Tesis, Fernando, por dejarme ser parte del laboratorio 304 (después de insistirle por meses y meses), por guiarme con libertad y mucha generosidad por el camino de la ciencia.

a Laurita, por la motivación, los consejos, las pilas, la generosidad, la música, la ayuda, y la paciencia, siempre con una hermosa sonrisa.

a mis "viejos" amigos del lab Gastón, Vani y Paulita, por tanto compartido durante tantos años, porque están siempre dispuestos a todo, por la infinita ayuda y generosidad.

a Dianim, por todo, desde el sushi hasta los viajes a pergamino, y los miles de proyectos compartidos.

a todos del lab 304/3: Naty, Vani, Pau, Marielita, Gastón, Gise, Gaby, Ine, Jime, Marisol, Nacho, Ana y los que pasaron por el 304/3: Pato, Víctor, Seba, Sergio, Juan, Guille, Meli, Marie U, Paula, Lucía, Daiana y Vane, por todo lo vivido juntos, por hacer del laboratorio un lugar al que se quiera ir todos los días.

a lab ex303, actual 204, o los AZ: Alf, Dianim, Nico, Piku, Rodri, Gastoncete, Fer, Pato, Walter y Daniela, por abrirme las puertas del lab.

a Ángeles, por acceder a ser mi consejera de estudio, parte del CST, siempre comprometida con todos y todo lo que hace, con vocación y ética dignas de imitar.

a Ine, Gaby y Vani por la ayuda con los últimos experimentos

a Gastón, Pau, Dianim y Lau por la ayuda con las correcciones de la Tesis.  $1 \times 10^6$  de gracias!

a Juli Maggini por el acceso a infinitos papers, me salvaste!

a mi amigos de la vida: Negro, David, Seba, Dami, Alfred, Beto, Willy, Pelu, Fer, Gili, Danita y Jen, por lo vivido y por vivir, siempre al pie del cañón.

a David, Sil y Juli, por estar siempre.

a Seba y Dami, porque me motivan desde lo que hacen, con la pasión que lo hacen.

al Negro...aunque no encuentro las palabras correctas ni suficientes del porqué...

a Lucas Sigman, por ser un gran amigo y mi gran compañero de estudios en la FCEyN.

a Lucas Bukata AKA Buken y Juan Manuel por las manos y lecciones a la hora de los ratones y otras yerbas respecto a *Brucella*.

a JaviT, por haber compartido, además de mucho sushi y ciberproyectos, la escritura en paralelo de la Tesis (sabé que siempre estuviste mejor que yo, incluso hoy ya sos Dr. y yo estoy escribiendo esto).

a Flora, por todo lo vivido y los años compartidos.

a todo el Staff FIL: Lili, Diego Álvarez, Marta, Susana Raffo, Juan Pocerroba, Mónica, Fátima, Dora, Bernabé, toda la gente de limpieza, mantenimiento, droguero, tesorería y administración porque gracias a ellos el Instituto funciona tan bien como lo hace.

a los colaboradores de este proyecto: Ángeles Zorreguieta, Diana Posadas, Inés Serer, Víctor García Angulo, Sebastián Klinke, Vanesa Zylberman, Mariela Urrutia, Diego Comerci, Inés Marchesini, Juan Ugalde y Rodolfo Ugalde.

al grupo de Diego Comerci y Rodolfo Ugalde, por abrirme las puertas de su laboratorio.

a la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) y al IIB-INTECH por permitirme el uso de los laboratorios e instalaciones.

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por haber financiado mi doctorado.

al Departamento de Qca. Biológica, FCEyN, UBA y la Fundación Instituto Leloir, por permitirme realizar esta Tesis.

Finalmente a los jurados por haber aceptado leer y evaluar este trabajo de tesis, al Dr. Néstor R. Cortez, al Dr. Pablo C. Baldi y a la Dra. Nancy López.

# **Título: “Rol del Metabolismo de Flavinas en la Virulencia de *Brucella abortus*”**

## **Resumen**

*Brucella* spp. son las bacterias causantes de la brucelosis, la enfermedad zoonótica con más incidencia en el mundo. *Brucella* es un patógeno exitoso que probablemente infecta animales desde hace millones de años, y se encuentra extremadamente adaptado al estilo de vida intracelular. La virulencia de este patógeno reside en su capacidad de invadir al hospedador, resistir los mecanismos de defensa y, establecerse y replicar en el inhóspito nicho replicativo. El nicho replicativo se caracteriza por ser escaso en nutrientes, tener baja tensión de O<sub>2</sub> y someter a *Brucella* al daño oxidativo. A pesar de que *Brucella* no posee factores de virulencia “clásicos” posee una batería de mecanismos fisiológicos y adaptaciones metabólicas que en definitiva son los que le permiten sortear las defensas de los hospedadores y adaptarse a la vida intracelular.

En este trabajo de tesis, se ha caracterizado y estudiado una parte de la fisiología básica de *Brucella*, como lo es el metabolismo de las flavinas. Se ha hecho foco en los genes *rib*, en particular en *ribH2* que codifica una enzima lumazina sintasa (LS) que cataliza el penúltimo paso la ruta biosintética de la riboflavina. Se describió la regulación de la expresión de *ribH2* por el elemento regulatorio riboswitch FMN, y se identificaron posibles proteínas que interactúan con RibH2 en *Brucella*. También, se estableció una relación directa entre virulencia y el metabolismo de flavinas en *Brucella*, resaltando la importancia de RibH2 para la supervivencia, tráfico y persistencia de las bacterias durante la infección en los modelos *in vitro* e *in vivo*. El rol de las flavinas en la simbiosis de *Rhizobium leguminosarum* con plantas, también fue estudiado. Los resultados muestran que el papel que juegan las proteínas RibH2 en el establecimiento bacteriano con el hospedador eucariota no está restringido sólo a *Brucella*, sino que parece ser compartido por otros *Rhizobiales*. Los hallazgos de este trabajo de tesis pueden dar lugar a nuevos estudios que lleven al desarrollo de vacunas y drogas contra la brucelosis y mejoras en las cepas bacterianas de inoculantes para uso agronómico.

**Palabras clave:** *Brucella abortus*; riboflavina; FMN; metabolismo; lumazina sintasa; RibH2; riboswitch; factor de virulencia; *Rhizobium leguminosarum*, simbiosis

## **Title: “The role of Flavin Metabolism in *Brucella abortus* virulence”**

### **Abstract**

*Brucella* spp. are the bacteria responsible for brucellosis, the most widespread zoonotic disease in the world. *Brucella* is a successful pathogen that has been infecting animals probably for millions of years and it is extremely adapted to the intracellular lifestyle. Its virulence lays in its ability to invade the host, resist defense mechanisms, establish and replicate in the inhospitable replicative niche. The replicative niche exhibits limited nutrients availability, low O<sub>2</sub> tension and exposes *Brucella* to oxidative damage. In spite of the fact that *Brucella* does not possess “classic” virulence factors, it displays a variety of physiological mechanisms and metabolic adaptations that let these bacteria cope with the host’s defenses and adapt to live inside the cell.

During this Thesis, part of the basic physiology of *Brucella*, the flavin metabolism, has been studied and characterized. The focus was laid on the *rib* genes, in particular on *ribH2* which codes for a lumazine synthase (LS), the enzyme that catalyses the penultimate step in the riboflavin biosynthetic pathway. The regulation of the *ribH2* gene expression by the FMN riboswitch was described, and some proteins that may interact with RibH2 were identified in *Brucella*. The direct relation between flavin metabolism and virulence was also established, highlighting the importance of RibH2 for survival, trafficking and persistence during infection in both *in vitro* and *in vivo* models. The role of flavins in the *Rhizobium leguminosarum*-plant symbiosis was also addressed. The results show that the part that RibH2 plays in the bacterial establishment in the eukaryotic host is not restricted only to *Brucella*, but it is shared with other *Rhizobiales*. The findings of this PhD Thesis, can lead to deeper and more specific studies culminating in the development of vaccines and drugs against brucellosis as well as improvements in the bacterial inoculants of agronomic use.

**Key words:** *Brucella abortus*; riboflavin; FMN; metabolism; lumazine synthase; RibH2; riboswitch; virulence factor; *Rhizobium leguminosarum*, symbiosis.

# Índice

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>11</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>12</b>
Brucelosis.....	13
Especies y biotipos de <i>Brucella</i> .....	14
Brucelosis humana.....	16
Brucelosis animal.....	17
Vacunas.....	18
Brucelosis en Argentina.....	18
Diagnóstico.....	19
Tratamiento.....	20
<i>Brucella</i> como arma biológica.....	20
Características del género <i>Brucella</i> .....	21
Relación con otros grupos taxonómicos.....	21
Tráfico Intracelular.....	24
Condiciones del brucelosoma.....	26
Mecanismos y factores de virulencia.....	27
El metabolismo riboflavina y flavocofactores.....	30
Lumazina Sintasa.....	33
RibH1 y RibH2 de <i>Brucella</i> spp.....	35
Regulación de la biosíntesis: riboswitch FMN.....	38
Transporte de flavinas.....	39
Organización genómica de los genes <i>rib</i> .....	41
Inhibición de la biosíntesis de riboflavina.....	42
<i>Rhizobium leguminosarum</i> .....	43
<b>Objetivos.....</b>	<b>46</b>
Objetivo general.....	47
Objetivos particulares.....	47
<b>Materiales &amp; Métodos.....</b>	<b>48</b>
Cepas de bacterias, plásmidos y oligonucleótidos.....	50
Líneas celulares.....	53
Medios y condiciones de cultivo.....	53
Amplificación por PCR.....	54
<i>Colony</i> -PCR.....	55
RT-PCR.....	56
Electroforesis en geles de agarosa.....	58



Secuenciación de ADN y análisis de secuencia .....	58
Electroforesis de proteínas .....	59
Western Blots .....	59
Construcción de plásmidos .....	59
Conjugación biparental .....	61
Construcción de las cepas mutantes en <i>B. abortus</i> .....	61
Obtención de la cepa mutante $\mu$ <i>ribH1</i> .....	61
Obtención de la cepa mutante $\mu$ <i>ribH2</i> .....	62
Obtención de la cepa mutante cromosómica en los dos genes <i>ribH</i> .....	62
<i>Panning</i> de la biblioteca de <i>display</i> en fagos .....	65
Obtención de fagos a partir de un único clon .....	66
Titulación de los fagos .....	67
Evaluación de la especificidad de los péptidos seleccionados .....	67
<i>Panning</i> .....	67
ELISA .....	68
Actividad transcripcional de <i>ribH2</i> .....	69
Ensayo de actividad $\beta$ -Galactosidasa .....	69
Barajado de plásmidos .....	70
Ensayos de infección bacteriana .....	70
Células J774.A1 .....	70
Células HeLa .....	71
Ratones BALB/C .....	71
Microscopía de Inmunofluorescencia .....	72
Anticuerpos y Reactivos .....	72
Determinación del contenido de flavinas intracelulares .....	73
Extracción de flavinas .....	73
Cromatografía en capa delgada (TLC) .....	73
Bioinformática .....	73
Predicción de riboswitches .....	73
Construcción de árboles filogenéticos .....	73
Modelos ocultos de Markov: generación del Logo .....	74
Predicción de dominios transmembrana .....	74
Análisis de archivos PDB .....	74
Ensayos de infección <i>Rhizobium</i> -arveja .....	74
Preparación de las plantas .....	75
Inoculación de las plantas .....	76
Cosecha de los nódulos .....	76
Recuentos intranodulares .....	76
Análisis estadístico .....	77
Recetas .....	78

<b>Resultados .....</b>	<b>80</b>
<b>CAPÍTULO 1: “Genes del metabolismo de flavinas en <i>B. abortus</i>” .....</b>	<b>81</b>
Genes del metabolismo de flavinas en <i>B. abortus</i> .....	82
Expresión de los genes del metabolismo de flavinas.....	83
Display en fagos.....	85
Rondas de <i>panning</i> .....	86
Caracterización del <i>binding</i> por ELISA.....	90
Caracterización del <i>binding</i> por <i>panning</i> .....	91
Expresión y regulación de <i>ribH2</i> .....	92
La expresión de RibH2 de <i>B. abortus</i> está regulada por el riboswitch FMN.....	92
Generación de la mutante RibH2_W22A.....	95
RibH1 y RibH2 poseen función enzimática LS <i>in vivo</i> .....	98
Experimentos de barajado de plásmidos .....	98
Anomalías en el ensayo de barajado de plásmidos.....	102
Auxotrofia y Transporte de Flavinas .....	103
Transporte de flavinas .....	104
Transportador RRT.....	105
<b>CAPÍTULO 2: “Rol de la biosíntesis de riboflavina en la virulencia .....</b>	<b>109</b>
RibH2 está involucrada en la virulencia de <i>B. abortus</i> .....	110
Ensayos de infección en células con las cepas $\mu$ <i>ribH1</i> y $\mu$ <i>ribH2</i> .....	110
El tráfico intracelular de la cepa $\mu$ <i>ribH2</i> .....	112
Ensayos de infección en ratón con las cepas $\mu$ <i>ribH1</i> y $\mu$ <i>ribH2</i> .....	114
La síntesis de riboflavina es necesaria para la replicación intracelular de <i>B. abortus</i> .....	116
Ensayos de infección en células con la cepa doble $\mu$ <i>ribH</i> .....	116
Ensayos de infección en ratón con la cepa doble $\mu$ <i>ribH</i> .....	116
La actividad enzimática LS de RibH2 es necesaria para la replicación intracelular de <i>B. abortus</i> .....	117
Ensayos de infección en células con complementaciones de la cepa $\mu$ <i>ribH2</i> .....	117
Ensayos de infección en ratón con complementaciones de la cepa $\mu$ <i>ribH2</i> .....	118
Flavinas en las <i>Brucella Containing Vacuoles</i> .....	121
Ensayos preliminares de protección.....	122
Estrategia de Inhibición de RibH2.....	125
Estrategia de inhibición por <i>intrabody</i> VHH.....	125
<b>CAPÍTULO 3: “Rol de las flavinas en la simbiosis de <i>R. leguminosarum</i>” .....</b>	<b>129</b>
Simbiosis de <i>R. leguminosarum</i> .....	130
La riboflavina aumenta la capacidad infectiva de <i>R. leguminosarum</i> .....	130
RibH2 de <i>R. leguminosarum</i> es un LS activa.....	131
RibH2_rle está involucrada en la simbiosis de <i>R. leguminosarum</i> .....	132

<b>Conclusiones &amp; Discusión</b> .....	<b>137</b>
Genes del metabolismo de flavinas .....	138
Rol de las flavinas en la virulencia de <i>B. abortus</i> .....	140
Diferencias en entre RibH1 y RibH2 en la virulencia de <i>B. abortus</i> .....	142
Transporte de flavinas .....	142
Potenciales vacunas contra la brucelosis .....	143
Blancos para quimioterapia .....	145
Rol de las flavinas en la simbiosis de <i>R. leguminosarum</i> .....	146
Mejora potencial para inoculantes .....	149
Comentarios finales .....	150
<b>Referencias</b> .....	<b>151</b>
<b>Publicaciones</b> .....	<b>165</b>
<b>Firmas</b> .....	<b>166</b>

## Abreviaturas

Amp	Ampicilina
BCV	Vacuola conteniendo a <i>Brucella</i> (por <i>Brucella Containing Vacuole</i> )
Cm	Cloranfenicol
ADNc	ADN copia, sintetizado a partir de ARNm
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
FAD	Flavín adenin dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
GW	Medio mínimo Gerhardt-Wilson
IP	Intraperitoneal
Km	Kanamicina
LAMP-1	Proteína endosomal-lisosomal (por <i>Lysosomal-Associated Membrane Protein</i> )
MOI	Multiplicidad de Infección
ONPG	o-Nitrofenil-β-galactósido
OPD	o-Fenilendiamino
ORF	Marco abierto de lectura (por <i>Open Reading Frame</i> )
p.i.	post-infección
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RE	Retículo endoplásmico
RT	Transcriptasa Reversa
TSA	Caldo tríptico de soja-agar (por <i>Tryptic Soy Agar</i> )
TSB	Caldo tríptico de soja (por <i>Tryptic Soy Broth</i> )
UFC	Unidades formadores de colonias
VHH	Dominio variable de los anticuerpos de dominio único de llama

# Introducción

## Brucelosis

En el año 1887, el médico escocés Sir David Bruce aísla por primera vez al agente etiológico de la Fiebre de Malta del bazo de un soldado británico muerto a causa de la enfermedad y lo denomina *Micrococcus melitensis*. En 1897, Lauritz Frederik Bernhard Bang descubre en Dinamarca al bacilo de Bang o *Bacillus abortus*, causante de abortos en ganado vacuno; y en 1914, en Estados Unidos, Traum aísla a un bacilo de aspecto similar al de Bang a partir de fetos porcinos abortados. En 1918 la microbióloga norteamericana Alice Evans determina que no existen diferencias morfológicas, bioquímicas o de cultivo entre los bacilos *Micrococcus melitensis* y *Bacillus abortus*; sin embargo, ambos presentan diferencias a nivel antigénico. En 1920, Meyer y Shaw confirman las observaciones de Evans, y proponen, en honor a David Bruce, que el género sea denominado *Brucella* [1,2,3].

Si bien la bacteria causante de la brucelosis se descubrió hace 124 años, ésta es actualmente la enfermedad zoonótica con más incidencia en el mundo. Se la encuentra distribuida en todos los continentes y se estima que produce 500.000 nuevos enfermos de brucelosis humana anualmente en todo el mundo [4].

Varios estudios demostraron que la brucelosis acompaña al hombre desde tiempos remotos, descubriendo evidencia paleopatológica del patógeno en restos fósiles humanos que datan desde la Edad Media hasta la Edad de Bronce [5]. Aparentemente la brucelosis acompaña a los homínidos desde tiempos anteriores a la aparición del *Homo sapiens*. D'Anastasio *et al.* (2009) diagnosticaron por métodos paleopatológicos brucelosis en *Australopithecus africanus*, un homínido antecesor a los humanos que vivió hace 2,3 - 2,5 millones de años [5,6]

La brucelosis es causada por bacterias Gram-negativas del género *Brucella*, facultativas, no móviles, que no forman esporas y no contienen plásmidos, cuyas especies infectan a diversos mamíferos. Aunque estas bacterias son de vida intracelular principalmente, pueden ser cultivadas *in vitro* con facilidad o pueden encontrarse libres en el medio ambiente. Actualmente hay 6 especies de *Brucella* "clásicas" caracterizadas, las cuales se han clasificado en función del hospedador de preferencia, patogenicidad y características microbiológicas, bioquímicas y antigénicas: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* [7,8,9]. Entre estas, *B. melitensis* y *B. abortus* son las causantes de la brucelosis en caprinos y bovinos respectivamente; *B. suis* y *B. canis* causan la brucelosis porcina y canina, mientras que *B. ovis* infecta carneros causándoles epididimitis. *B. neotomae* solamente fue encontrada en ratas del desierto. Cuatro de esas especies son patogénicas para el hombre: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* y *B. canis*, mencionadas en orden decreciente de virulencia. En los últimos años se realizaron nuevos aislamientos a partir de mamíferos marinos y de roedores de campo, incorporando 3 nuevas especies: *B. ceti*, *B. pinnipedialis* y *B. microti*. No está claro el grado de

virulencia ni de infectividad de las cepas marinas *B. ceti* y *B. pinnipedialis*, pero sí ha sido demostrado que *B. pinnipedialis* es capaz de infectar al hombre [10]. Aunque cada especie tiene un hospedador de preferencia, la mayoría son capaces de infectar a más de un hospedador alternativo, siendo sólo unas pocas las que poseen un único hospedador (**Tabla I-1**) [11]. En los últimos años se reportaron nuevos aislamientos de *Brucella* de mandriles y pacientes humanos, constituyendo cepas novedosas que no pueden agruparse con ninguna de las especies descritas hasta el momento **Tabla I-1**) [8]. Aunque el ser humano es susceptible a la infección con algunas especies de *Brucella*, no es en ningún caso su reservorio natural, ya que el contagio humano-humano es prácticamente inexistente.

**Tabla I-1. Características de las especies que componen el género *Brucella*.**

Especie	Animales hospedadores	Morfología	Dosis infectiva	Virulencia	Biotipos	Año	Ref.
<b>Clásicas</b>							
<i>B. melitensis</i>	Ovejas, cabras, camellos	lisa	10 – 10 <sup>3</sup>	muy alta	1-3	1897	[7]
<i>B. suis</i>	Cerdos, jabalíes, renos, caribúes, roedores, liebres	lisa	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>4</sup>	alta	1-5	1914	[7]
<i>B. abortus</i>	Ganado bovino, búfalos, yaks, camellos	lisa	10 <sup>5</sup>	media	1-7*, 9	1897	[7]
<i>B. canis</i>	Caninos	rugosa	10 <sup>6</sup>	baja	-	1968	[12]
<i>B. ovis</i>	Ovejas, cabras, camellos	rugosa	NR	NR	-	1953	[13]
<i>B. neotomae</i>	Ratas del desierto	lisa	NR	NR	-	1957	[14]
<b>Recientes</b>							
<i>B. ceti</i>	Marsopas, delfines, ballenas	lisa	NR	NR	-	1994	[15]
<i>B. pinnipedialis</i>	Focas	lisa	NR	?**	-	1994	[16]
<i>B. microti</i>	Zorros rojos, roedores de campo	lisa	NR	NR	-	2007	[17]
<b>Futuras?</b>							
<i>B. inopinata</i>	NR	lisa	NR	?**	-	2008	[18]
Aislamientos de mandriles	Mandriles	NR	NR	NR	-	2008	[19]
BO2	NR	lisa	NR	?**	-	2009	[20]

NR: No reportado. Dosis infectiva expresada como bacterias por persona. Año: año de aislamiento. \*Biotipo 7 bajo revisión, podría tratarse de un cultivo mixto. \*\* Aunque algunos pocos casos de brucelosis humana han sido reportados, el grado de la virulencia no está determinado.

## Especies y biotipos de *Brucella*

Como ya se mencionó, el género *Brucella* está comprendido por 9 especies: 6 especies “clásicas” y 3 especies “recientes”. Los primeros estudios de hibridación de ADN-ADN realizados sobre las 6 especies clásicas revelaron un altísimo grado de identidad entre las mismas (>90%). Con el advenimiento de la secuenciación y comparación de genomas entre las diferentes especies, se observó una amplia conservación en la sintonía y secuencia de los genes. Por ejemplo, los análisis de los genomas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, muestran que estas especies poseen más del 98% de identidad en más del 90% de los genes

[9,11]. Incluso se ha propuesto, basándose en el alto nivel de conservación a nivel genético, que debería existir un único género monoespecífico, denominado *Brucella melitensis* y que el resto de las especies deberían considerarse biovariedades del mismo. Sin embargo, las marcadas diferencias entre los hospedadores y otras evidencias obtenidas con técnicas moleculares más recientes hicieron que la propuesta fuera desechada [9,11,21,22,23].

Dentro de las principales especies se reconoce la existencia de biotipos. A saber, *B. melitensis* presenta 3 biotipos (1-3), *B. abortus* 7 (1-6, 9) y *B. suis* 5 (1-5) (**Tabla I-1**). Las técnicas clásicas de tipificación de especie y biotipo se basan en las diferencias de preferencia de hospedador y patogenicidad, sensibilidad a fagos, producción de H<sub>2</sub>S, requerimiento de CO<sub>2</sub>, tinciones y aglutinación con antisueros monoespecíficos entre otras. Por ejemplo, *B. suis* es la especie más heterogénea con 5 biotipos, además cada biotipo tiene hospedadores preferenciales y diferentes grados de virulencia en humanos (**Tabla I-2**) [24].

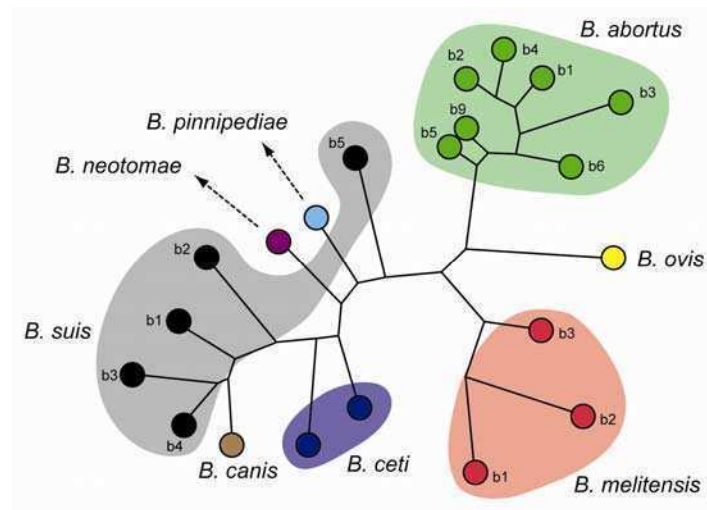
**Tabla I-2. Características de los biotipos *Brucella suis*.**

Biotipo	Animales hospedadores	Virulencia en humanos
1, 3	Cerdos	alta
2	Jabalíes, liebres	baja
4	Renos, caribúes	alta
5	Roedores	NR

NR: No reportado.

Con el desarrollo de la secuenciación de genomas completos, nuevas técnicas moleculares de tipificación están siendo implementadas, las cuales permiten distinguir diferencias genéticas incluso a nivel de biotipo. La tipificación por métodos clásicos de las especies de *Brucella* y sus biotipos correlacionan casi a la perfección con la tipificación realizada por métodos moleculares (**Figura I-1**) [21,25].





adaptado de [25]

**Figura I-1. Relación filogenética entre especies y biotipos de *Brucella*.**

Análisis de máxima parsimonia de 21 cepas de referencia de *Brucella* usando información obtenida a partir de 71 marcadores moleculares VNTRs (por *Variable Tandem Repeats*). Las relaciones entre las especies y sus biotipos reproducen casi exactamente lo observado por métodos clásicos de tipificación.

## Brucelosis humana

La brucelosis humana puede ser considerada una enfermedad socioeconómica ya que su incidencia está correlacionada con el estatus económico de diferentes regiones y países en todo el mundo. En países como Estados Unidos o Suiza, las tasas de infección son menores a 0,5 casos por millón, considerándose libres de brucelosis. Países como Siria tienen tasas superiores a 1600 casos por millón, donde la enfermedad es endémica. Muchos países se encuentran libres de brucelosis gracias a grandes inversiones y programas de vacunación extensiva [4].

El contagio entre humanos no es significativo y se considera a la brucelosis como una zoonosis estricta. Sin embargo, se han reportado casos esporádicos de transmisión lateral y congénita, o por transfusiones sanguíneas y trasplantes de médula ósea [26,27,28,29,30,31]. Virtualmente todas las infecciones derivan del contacto con animales infectados o consumo de productos derivados de los mismos. Es frecuente el contagio por consumo de lácteos contaminados no pasteurizados y, en menor medida, por carnes infectadas no cocidas [7,32]. Además, lo más frecuente es el contagio por contacto con las secreciones, fluidos y tejidos de animales infectados. En países desarrollados, la brucelosis es considerada una enfermedad ocupacional, ya que trabajadores de diferentes áreas relacionadas con la ganadería suelen tener mayor incidencia de contagio. Estos son trabajadores rurales, veterinarios, transportistas de ganado y leche, lavadores de los coches de transporte y trabajadores de mataderos, frigoríficos y curtiembres [33,34,35,36]. También ocurren casos de contagio por manipulación

del patógeno, como ocurre con trabajadores de plantas de producción de vacunas y antígenos, o con personal de laboratorio, siendo este último el que presenta el mayor número de reportes las mayores cifras de contagio laboral reportadas [37,38,39]. *B. melitensis* es la especie encontrada en la mayoría de los casos de brucelosis humana, seguida por *B. abortus*.

Las vías más comunes de entrada de *Brucella* suelen ser a través de las mucosas, la vía oral y nasal, por laceraciones en la piel, y también a través de las membranas conjuntival y vaginal [35,40]. *Brucella* puede atravesar el epitelio de las mucosas, localizarse en nódulos linfáticos y colonizar células fagocíticas. En los días subsiguientes a la infección, la bacteria replica dentro de las células hasta lizarlas, alcanzando el sistema circulatorio. Una vez que esto ocurre, el patógeno puede colonizar los sistemas nervioso central y periférico, gastrointestinal, hepatobiliar, genitourinario, musculoesquelético, cardiovascular y linforeticular. Los síntomas clínicos del cuadro agudo pueden ser una subida abrupta de la temperatura corporal, fiebre ondulante, sudoración nocturna, fatiga, anorexia, pérdida de peso, jaqueca, mialgia o artralgia. El tiempo de incubación puede durar entre 7 a 60 días, siendo lo más usual experimentar síntomas desde el día 14 al 30 [1,36,41,42]. La tasa de mortalidad por brucelosis es muy baja (< 0,1%). En los casos en que resulta fatal, las causas suelen ser un diagnóstico o tratamiento tardío: cuando *Brucella* ya dañó el endocardio produciendo endocarditis o se generó una neurobrucelosis produciendo meningitis o abscesos cerebrales [43].

## Brucelosis animal

Los signos de la brucelosis en animales pueden variar de acuerdo a la especie animal infectada y la especie y cepa de *Brucella* involucrada. La infección raramente es letal; suele tener desde síntomas suaves y subclínicos hasta manifestaciones más severas, principalmente en animales preñados. Tanto los animales de granja como los animales salvajes pueden ser infectados por *Brucella*, siendo estos últimos un reservorio natural para la bacteria. La mayoría de los animales de granja en el mundo son susceptibles a *Brucella*. La brucelosis bovina, caprina, porcina y ovina tienen un alto impacto en la industria ganadera, siendo *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* los principales responsables de pérdidas millonarias en todo el mundo. Se estima que sólo la brucelosis bovina causa pérdidas anuales por u\$s 600 millones en América Latina [44].

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

la enfermedad. La bacteria permanece en los fluidos de la madre perpetuando la infección en el rodeo [21,45,46].

Esta enfermedad disminuye la productividad de los rodeos infectados, tanto en los animales destinados para faena como para tambos, impactando fuertemente en la economía. Además, genera importantes restricciones y trabas nacionales e internacionales para el comercio de animales y productos derivados.

## Vacunas

En la actualidad, las vacunas más comercializadas para la prevención de la brucelosis en animales están basadas en las cepas *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 y *B. melitensis* Rev1. En bovinos se utilizan las cepas S19 y RB51 mientras que en caprinos y ovinos, la cepa Rev1. No existen vacunas disponibles para otros animales o para humanos. Las 3 vacunas son cepas vivas atenuadas e inducen una fuerte respuesta celular. Las vacunas de bacterias muertas suelen inducir una respuesta principalmente humoral y, en el caso de *Brucella*, la respuesta celular es mucho más protectora que la respuesta humoral, y por ello se utilizan cepas vivas de *Brucella* como vacunas. Las desventajas que presentan las cepas vacunales de *Brucella* son que al ser aplicadas en animales preñados pueden causar abortos y son potencialmente patogénicas para humanos [35,47,48,49,50].

Las cepas S19 y Rev1 son lisas y generan anticuerpos contra el antígeno-O del lipopolisacárido (LPS), haciendo más difícil y costosa la distinción entre animales vacunados e infectados. La cepa RB51 es rugosa y no presenta este problema; sin embargo es resistente a rifampicina, un antibiótico ampliamente empleado en el tratamiento para brucelosis (ver sección Tratamiento). RB51 tiene además mucha variabilidad en sus efectos protectores contra los abortos, dependiendo de la dosis y la vía de administración [51,52,53,54].

## Brucelosis en Argentina

En Argentina, la brucelosis bovina es un problema sanitario y económico de gran importancia. En un estudio realizado en el año 2002 se estimó que entre el 10-13% de los rodeos se encuentran infectados con *B. abortus*, siendo la tasa individual del 4-5%. Las pérdidas anuales sólo asociadas a brucelosis bovina se estimaron en u\$s 60 millones para dicho año. También se han reportado casos de brucelosis en cabras, ovejas, cerdos y perros, aunque no existen datos precisos acerca de la incidencia nacional de la brucelosis en los animales mencionados. Entre 1993 y 1995 se reportaron 212 casos de brucelosis humana en Argentina. La mayoría de los casos están localizados en zonas rurales que carecen de control

sobre la enfermedad en los animales y se considera que la incidencia de esta enfermedad en regiones aisladas está bastante subestimada [55]. La prevalencia de muestras positivas para brucelosis en bancos de sangre en el país es del 1% aproximadamente, estimando una incidencia de 10.000 a 20.000 casos totales en la población, un número mucho mayor que los reportados (Wallach, Comerci, comunicación oral) [4,7,55].

En la Argentina es obligatorio vacunar a las terneras entre los 3 y 8 meses de edad con la vacuna S19, y en el caso de animales adultos sin vacunar, como ocurre con la mayoría de los rodeos en Argentina, también se puede usar la vacuna RB51. Si bien la campaña de vacunación ha sido intensa, aún no se ha logrado eliminar completamente a *B. abortus* del ganado bovino [56]. La aparición de la brucelosis en humanos se encuentra asociada a la enfermedad en el ganado. Para lograr un adecuado control de la enfermedad en el hombre es fundamental el desarrollo de programas de vacunación de ganado. Asimismo, la vigilancia epidemiológica en la población expuesta es fundamental, ya que un diagnóstico y tratamiento temprano permite mayor efectividad en la cura, recuperación más rápida y evita complicaciones secundarias. La vigilancia se torna un elemento clave dentro de los programas de prevención y control [57].

## Diagnóstico

Hay una gran cantidad de técnicas utilizadas para la detección de *Brucella* en pacientes y animales. A éstas se las puede dividir en ensayos serológicos (detección indirecta) que detectan anticuerpos contra *Brucella*, ensayos moleculares que detectan algún componente molecular del patógeno (detección directa) y cultivo (prueba definitiva). Algunos ejemplos de pruebas serológicas son el ensayo estandarizado de aglutinación (SAT o Wright) y variaciones del mismo con el agregado de EDTA o reductores como  $\beta$ -mercaptoetanol (2-ME) o ditiotreitól (DTT), prueba de Rosa Bengala (RB), prueba de Fijación del Complemento (FC), ELISA indirecto para anticuerpos anti-LPS y Ensayo de Polarización de la Fluorescencia (FPA). En lo que respecta a las pruebas moleculares, las más utilizadas son la PCR o PCR en Tiempo Real. El diagnóstico por cultivo se suele realizar con la técnica de Ruiz-Castañeda y es considerado la prueba definitiva; aunque es un método poco sensible, son necesarios varios días para obtener el resultado y se requiere de personal calificado e infraestructura apropiada para manejar un patógeno de Nivel de Bioseguridad-3 como es *Brucella* [7,58,59]. En la confirmación del diagnóstico de brucelosis se utiliza más de una técnica de detección indirecta [3,41,58,59,60].

El ensayo de seroaglutinación (SAT) es el método de diagnóstico más común y fue desarrollado hace más de 110 años por Writgh y Smith [61]. El SAT detecta principalmente la presencia de anticuerpos contra el antígeno-O del LPS de *Brucella*. Gracias a la reactividad

cruzada, la prueba es capaz de detectar a la mayoría de las cepas de *Brucella*, con excepción de las rugosas. Algunas de las desventajas del método son que no sirve para pacientes que no presentan seroconversión, la imposibilidad de detectar cepas rugosas (como *B. canis* y *B. ovis*) y la eventual reactividad cruzada con los antígenos-O de otras bacterias lisas como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia hermanni*, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30 y *Vibrio cholerae* O:1, entre otras. Tampoco es útil para hacer un seguimiento de la bacteriemia, ya que los títulos pueden mantenerse elevados por tiempos prolongados. Algunas variaciones del SAT, como el agregado de EDTA, DTT ó 2-ME, se utilizan para disminuir los falsos positivos [3,7,41,58,60].

## Tratamiento

Los casos de brucelosis suelen tratarse con la administración de antibióticos. También se suministran drogas capaces de paliar la sintomatología y se realizan intervenciones quirúrgicas para tratar las focalizaciones infecciosas en casos graves, como por ejemplo, endocarditis, abscesos cerebrales, epidurales, esplénicos o hepáticos u otros casos que involucren cepas resistentes a antibióticos [43,62]. Aunque *Brucella* suele ser sensible a la mayoría de los antibióticos, los más efectivos son Doxiciclina, Estreptomina, Rifampicina, Ofloxacina, Ciprofloxacina, Gentamicina y Trimetoprima-sulfametoxazol. Los tratamientos suelen constar de administraciones orales, intramusculares o intravenosas de un solo antibiótico o combinaciones de ellos. El tiempo de la terapia dura, típicamente, 6 semanas aunque puede extenderse hasta un año para casos graves como los de endocarditis. La efectividad de la antibioticoterapia es del 80%, fracasa en el 1-5% de los casos y la re-aparición de la infección ocurre en el 5-10% de los pacientes. La persistencia de la infección puede ser explicada porque los antibióticos no alcanzan los focos de infección [3,7,43,62].

## **Brucella como arma biológica**

*Brucella* es considerado un agente potencial de bio y agroterrorismo. Tiene las características adecuadas para ser usado contra poblaciones humanas y agropecuarias: altamente infectiva, fácilmente aerosolizable, estable en la producción, almacenamiento y liberación, causante de alta morbilidad pero baja mortalidad, ausencia de vacunas preventivas para humanos y producción de elevadas pérdidas económicas. Además, se pueden generar cepas multiresistentes a antibióticos y, una vez liberada la bacteria, el foco infeccioso queda relativamente contenido en la zona atacada ya que no es transmitido de humano a humano y las bacterias no suelen sobrevivir en estado libre por un tiempo prolongado. Debido a sus características, *Brucella* fue incluida en la mayoría de los programas de desarrollo de armas biológicas de diversos países. Estados Unidos hizo con *B. suis* su primer arma biológica, y las

primeras pruebas con bombas cargadas con el patógeno se hicieron en 1952. También la URSS generó armas con cepas multiresistentes de *Brucella* y perfeccionó tecnologías para la diseminación de las bacterias, haciendo extensivas pruebas a campo. Sin embargo, en la actualidad ninguno de estos países cuenta con un programa ofensivo de investigación activo en *Brucella* [63,64,65].

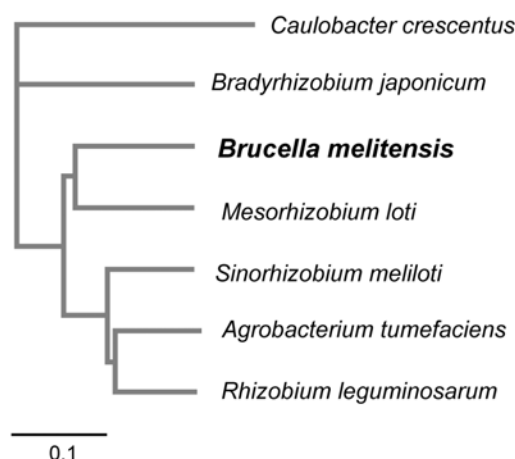
## Características del género *Brucella*

### Relación con otros grupos taxonómicos

Según el análisis de la secuencia de la subunidad 16S del ARNr, el género *Brucella* se ubica en la clase  $\alpha$ -proteobacterias, en el subgrupo  $\alpha 2$ , dentro del orden *Rhizobiales* en la familia *Brucellaceae*. El subgrupo  $\alpha 2$  está compuesto por miembros muy similares genéticamente, que presentan diferencias en la secuencia 16S ARNr menores al 7%. La mayoría de ellos tienen tendencia a formar interacciones estrechas, muchas veces intracelulares, con células eucariotas [66,67].

Las  $\alpha$ -proteobacterias son bacterias Gram-negativas con una vasta variedad de subdivisiones, formas de vida y nichos ecológicos. Es la clase bacteriana conocida con mayor diversidad y abundancia en el planeta, encontrándose en hábitats tan diversos como suelos terrestres, aguas superficiales, suelos oceánicos y áreas volcánicas entre otros. Los microorganismos que pertenecen a esta división son de vida libre o asociados a diversos organismos eucariotas de manera extra o intracelular. Las bacterias pertenecientes a esta clase han desarrollado diversas estrategias para establecerse intracelularmente, ya sea como patógenos o simbioses en plantas, mamíferos, nematodos, artrópodos y amebas (**Figura I-2**) [68,69]. La tendencia a la asociación con células eucariotas puede incluso llevar a una vida intracelular obligada. El estilo de vida intracelular y las evidencias basadas en los análisis de secuencias llevaron a la postulación de la Teoría Endosimbiote la cual sostiene que un ancestro de las  $\alpha$ -proteobacterias dio origen a las mitocondrias [70,71].





adaptado de [73]

**Figura I-3. Relación filogenética entre distintas *Rhizobiales*.**

Análisis filogenético basado en 648 proteínas ortólogas de diferentes  $\alpha$ -proteobacterias completamente secuenciadas. La escala muestra sustituciones por sitio.

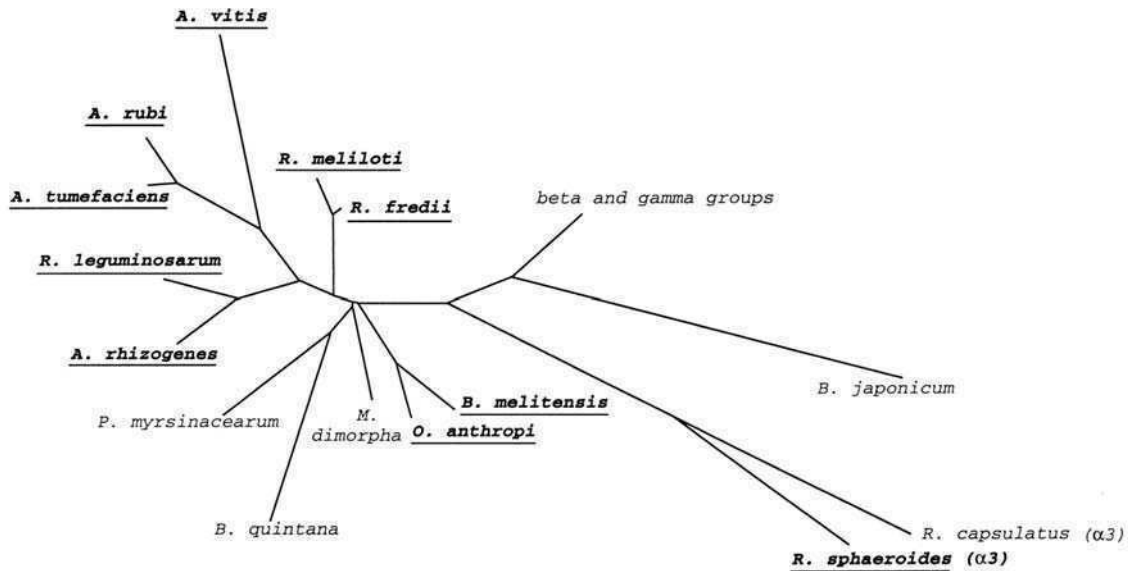
Por muchos años se pensó que todas las bacterias poseían un único cromosoma circular en el que estaban codificadas todas las funciones celulares esenciales. Sin embargo, desde comienzo de los años 90 se fueron descubriendo cada vez más bacterias con más de un cromosoma. Todas las cepas de *Brucella* conocidas poseen un genoma complejo conformado por 2 cromosomas, con la excepción del biotipo 3 de *B. suis* que posee un único cromosoma [74,75]. La característica de poseer 2 cromosomas es también compartida con otras proteobacterias patógenas, en especial  $\alpha$ -proteobacterias (Tabla I-3) [76]. Aunque todavía el debate continúa, se postula que la función del cromosoma II reside en la adaptación al estilo de vida intracelular de dichos patógenos. El cromosoma I es usualmente más grande que el cromosoma II y alberga en proporción una mayor cantidad de genes asociados a funciones vitales. El cromosoma II, aunque también contiene genes vitales, codifica una mayor proporción de genes con funciones aún no caracterizadas [76].

**Tabla I-3. Características genómicas de diferentes especies de proteobacterias.**

Especie	Clase	CI (Mpb)	CII (Mpb)	relación CI/CII	Patogénica
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Alfa	2,84	2,08	1,37	Si
<i>Brucella abortus</i> S19	Alfa	2,12	1,16	1,83	No
<i>Brucella melitensis</i> 16M	Alfa	2,12	1,18	1,80	Si
<i>Brucella abortus</i> 2308	Alfa	2,12	1,16	1,83	Si
<i>Brucella suis</i> 1330	Alfa	2,11	1,21	1,75	Si
<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	Alfa	2,89	1,90	1,52	Si
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	Alfa	2,85	1,73	1,65	No
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2,4,1	Alfa	3,19	0,94	3,38	No
<i>Burkholderia mallei</i> NCTC 10229	Beta	3,46	2,28	1,51	Si
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	Beta	4,13	3,18	1,30	Si
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	Beta	4,05	2,91	1,39	No
<i>Vibrio cholerae</i> O395	Gamma	3,02	1,11	2,73	Si
<i>Vibrio fischeri</i> ES114	Gamma	2,90	1,33	2,18	No
<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	Gamma	3,28	1,84	1,78	Si



Este tipo de organización genética es común entre las  $\alpha$ 2-proteobacterias, de hecho varios otros miembros del grupo presentan genomas complejos con más de un replicón, como es el caso de los simbioses de plantas *R. leguminosarum* y *S. meliloti* o del fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens* (Figura I-4) [75,76].



adaptado de [75]

**Figura I-4. Relación filogenética entre distintas  $\alpha$ 2-proteobacterias.**

Árbol filogenético donde se muestra la organización genómica de organismos que pertenecen al subgrupo  $\alpha$ 2-proteobacterias (se incluyen a las especies de *Rhodobacter* que son del subgrupo  $\alpha$ 3). Los organismos con genomas complejos se encuentran subrayados.

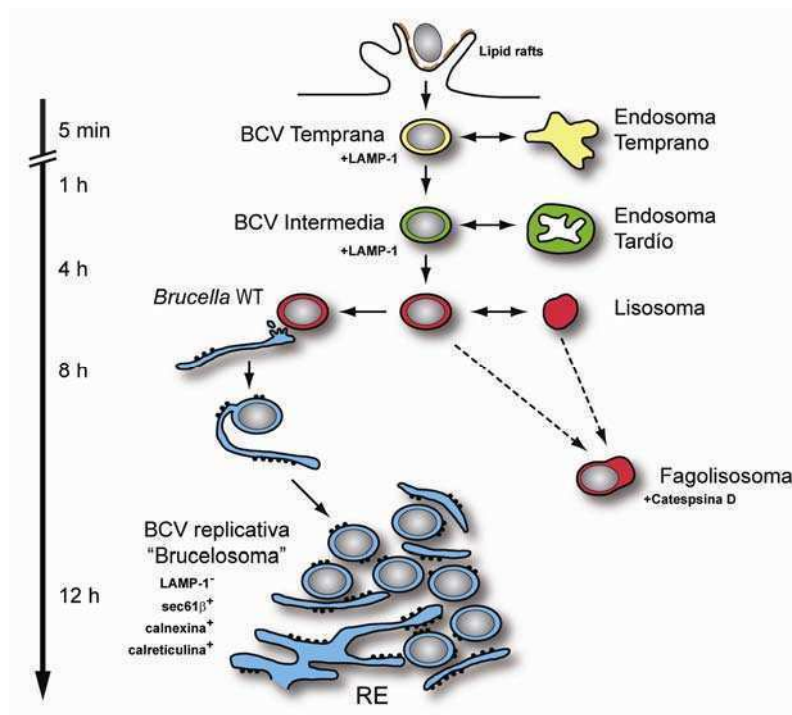
El cromosoma I de *Brucella* tiene en promedio 2,095 Mpb y el cromosoma II 1,202 Mpb, sumando un total de 3,297 Mpb [74]. Los patrones de expresión de un cromosoma y otro difieren significativamente. Como ocurre en otros taxones, el cromosoma I codifica en general las funciones de mantenimiento celular mientras que el cromosoma II codifica en mayor proporción, factores involucrados en la virulencia de *Brucella* [77].

## Tráfico Intracelular

*Brucella* tiene la capacidad de invadir y replicar dentro de una gran variedad de células de mamíferos, incluyendo a macrófagos, células dendríticas (CDs), células epiteliales y trofoblastos placentarios [40]. En macrófagos, *Brucella* redirige la vía endocítica para evitar la muerte por los mecanismos bactericidas de la misma y logra establecerse en su nicho replicativo intracelular, el cual es un compartimento membranoso derivado de retículo endoplásmico (RE).

Al establecer contacto con la membrana celular, las bacterias adheridas se acumulan, formando microcolonias [78]. Posteriormente ingresan a la célula por macropinocitosis. En este proceso es necesaria la presencia de *lipid rafts* (balsas lipídicas) en la membrana. Los *lipid rafts* se caracterizan por ser porciones de membrana o microdominios, ricos en esfingolípidos y colesterol [79]. Una vez dentro de la célula, *Brucella* se localiza en una vacuola especializada denominada BCV (por *Brucella* *C*ontaining *V*acuole) (**Figura I-5**). Las bacterias que ingresan a la célula por interacción con *lipid rafts* son capaces de evitar la vía endocítica degradativa, mientras que las BCVs que se forman a partir de *Brucella* opsonizada (*lipid raft*-independiente) o con la estabilidad de los *lipid rafts* comprometida, no pueden controlar el tráfico correctamente y derivan en fagolisosomas [80,81,82].

Las BCVs tempranas son rápidamente acidificadas por la ATPasa vacuolar de H<sup>+</sup> y por la interacción transitoria con lisosomas, que disminuyen el pH hasta 4-5, lo cual es esencial para la activación de los genes de virulencia de *Brucella*, como el Sistema de Secreción Tipo IV (SST4) [83,84]. Hay evidencias que muestran que las BCVs interactúan con elementos de la vía endocítica, formando interacciones con endosomas tempranos, tardíos y fusiones limitadas con lisosomas. Luego, las BCVs intermedias interactúan con los sitios de salida del RE (ERES), captando las vesículas de transporte recubiertas de COPII y fusionándose al RE. Allí forman BCVs multimembranosas con numerosos marcadores de RE (como sec61β, calnexina y calreticulina) y no presentan marcadores lisosomales típicos, como LAMP-1. Este es el nicho replicativo de *Brucella*, que se denomina BCV replicativa o brucelosoma [84,85]. Luego de 12 horas de la entrada a la célula, *Brucella* replica extensivamente sin restringir las funciones celulares básicas ni inducir daño aparente al hospedador. Las BCVs replicativas se multiplican, dando origen a nuevas BCVs hijas individuales. Probablemente este sea un proceso de fisión de una BCV madre en dos BCVs hijas luego de tomar membranas derivadas de RE [80].



adaptado de [84]

**Figura I-5. Modelo simplificado del tráfico intracelular de *Brucella***

Después de la entrada a través de los *lipid rafts* de la membrana celular, las bacterias se localizan en vacuolas especializadas llamadas *Brucella Containing Vacuoles* (BCVs) que trafican por parte de la ruta endocítica. Estas interactúan secuencialmente con los compartimentos tempranos (amarillo) donde la vacuola adquiere marcadores como LAMP-1. Luego interactúa con los endosomas tardíos (verde) antes de fusionarse limitadamente con lisosomas (rojo). Si el proceso de maduración de los fagosomas no puede ser modificado y éstos derivan en fagolisosomas, como ocurre con algunas mutantes, las bacterias son eliminadas. Las BCVs intermedias interactúan con los sitios de salida del RE (ERES) para luego fusionarse al RE (azul) y generar BCVs replicativas derivadas de RE (bruceloso).

## Condiciones del bruceloso

Las BCVs replicativas tienen un pH cercano a 5, un poco mayor que el de las BCVs tempranas e intermedias. Dentro del bruceloso hay poca disponibilidad de nutrientes, baja tensión de oxígeno, presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) y estrés nitrosativo [86,87,88]. Aunque se sabe poco sobre la composición de nutrientes disponibles en las BCVs replicativas, analizando los genes de síntesis y transporte de metabolitos que *Brucella* requiere para la replicación intracelular se puede inferir que el bruceloso es pobre en nutrientes, principalmente en aminoácidos (valina, leucina, isoleucina, aspartato, treonina, histidina, fenilalanina, glicina, serina, lisina, prolina, alanina, glutamato, triptofano, tirosina, metionina, cisteína), purinas, pirimidinas, iones inorgánicos ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Fe$ ), cofactores (hemo, coenzima A), azúcares y vitaminas (pantotenato, piridoxal fosfato) [87,88,89,90,91,92].

## Mecanismos y factores de virulencia

Hasta la actualidad no se han descrito factores de virulencia clásicos en *Brucella* como exotoxinas, exoenzimas, citolisinas, cápsulas, fimbrias, plásmidos, fagos lisogénicos, formas de resistencia a antibióticos, variación antigénica, LPS endotóxico, inductores de la apoptosis o islas de patogenicidad [88,93]. La patogenicidad de *Brucella* reside en la habilidad para entrar al organismo, invadir “silenciosamente” las células y adaptarse a las condiciones ambientales intracelulares de los diferentes compartimentos. Las condiciones encontradas intracelularmente son muy variadas y hostiles, como el pH ácido del fagosoma, péptidos antimicrobianos lisosomales, baja tensión de oxígeno, presencia de ROS y RNS, estrés nitrosativo y escasez de nutrientes [86,87]. A continuación se enumeran algunos factores de virulencia de *Brucella* descritos en la literatura, que ayudan a la bacteria a sortear los obstáculos ya mencionados encontrados durante la infección del hospedador, y cuya eliminación deriva en cepas con fenotipos atenuados de infección de células o animales.

*Brucella* puede ingresar por vía oral, y en ese caso la actividad ureasa, producto del gen *ure-2*, es vital para que la bacteria sobreviva al pH ácido del tracto digestivo. Esta enzima hidroliza urea, generando una molécula de ácido carbónico y dos moléculas de amoníaco, protonándose el amoníaco a amonio y basificando consecuentemente el pH [94,95].

El LPS liso de *Brucella* es un débil inductor de la respuesta inflamatoria, de la activación del complemento y tiene baja actividad endotóxica. El lípido-A del LPS, cuyas modificaciones son moduladas por el sistema de dos componentes BvrR/BvrS y BacA, tiene ácidos grasos más extensos que los lípidos-A clásicos. Este componente del LPS sería el responsable de evitar que *Brucella* genere una respuesta inflamatoria a escala general en el hospedador. Por otro lado, la cadena-O del LPS es particularmente resistente a la degradación por los macrófagos y se transporta a los MHC-II formando macrodominios que disminuyen la capacidad de activar células T CD4<sup>+</sup>. Además, la cadena-O es inusualmente larga, con aproximadamente 100 repeticiones del antígeno-O. La cadena-O es la que le confiere a *Brucella* la capacidad de entrar a la célula usando *lipid rafts*, inhibir la fusión fagosoma-lisosoma y prevenir la apoptosis del macrófago [68,88]. Además del LPS, *Brucella* cuenta con otros moduladores de la respuesta inmune que son necesarios para el establecimiento en el hospedador. La prolinracemasa (PrpA) promueve la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 provocando una inmunosupresión transitoria [96]. La proteína TcpB, que contiene un dominio Receptor Toll/Interleuquina-1, interactúa con los receptores de Tipo-Toll TLR2 y TLR4 suprimiendo la respuesta inmune del hospedador [97,98,99].

En la membrana de *Brucella*, se pueden encontrar los fosfolípidos fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE). La FC es un componente habitual de las membranas celulares eucariotas, pudiendo ser hallada también en  $\alpha$ -proteobacterias. En *Brucella*, la FC es

sintetizada a partir de colina tomada del hospedador, y la FE se sintetiza a partir de FC. La presencia de estos lípidos en la membrana de *Brucella* es necesaria para la exitosa infección de células en cultivo o ratones [100,101].

En el periplasma de *Brucella* se encuentran glucanos cíclicos  $\beta$ -1,2 (C $\beta$ G), tal como sucede en otros *Rhizobiales* simbiotes y patógenos de plantas [102]. En todos los casos, es necesaria la presencia de C $\beta$ G para que se establezca correctamente la infección. Los C $\beta$ G le permiten a las bacterias patógenas o simbiotes interactuar con sus respectivos hospedadores eucariotas por un mecanismo aún desconocido. En el caso de *Brucella*, se propone que desestabiliza los *lipid rafts* de las BCVs durante el tráfico para evitar la fusión extensiva con lisosomas y la correcta maduración de los mismos [81].

Las condiciones de las BCVs tempranas (pH 4-4,5 y poca disponibilidad de nutrientes), son las señales que disparan la transcripción de los 13 genes del operón *virB* [103]. Éste codifica un Sistema de Secreción Tipo IV (SST4) y está involucrado en la maduración de las BCVs [104]. Las BCVs de mutantes de *Brucella* deficientes en SST4, no realizan un tráfico ni maduran de manera normal ya que sufren fusión extensiva con lisosomas y no pueden interactuar con el RE. No se conocían efectores del SST4 VirB hasta el año 2008, momento en el que se identificaron 2 posibles proteínas sustrato: VceA y VceC, aunque sus funciones biológicas aún no se conocen [105].

*Brucella* posee una Cu/Zn superóxido dismutasa en el espacio periplásmico denominada SodC, que la protege del O<sub>2</sub><sup>-</sup> exógeno proveniente del ataque del macrófago. [106,107]. SodA, una Mn-superóxido dismutasa citoplasmática, protege a la bacteria del O<sub>2</sub><sup>-</sup> de origen endógeno, generado por la respiración aeróbica [87,108]. En *Brucella* el sistema de reparación RecA es el único factor de virulencia identificado en la reparación de los daños causados al ADN por ROS, infiriéndose que el ambiente intracelular es altamente oxidante [109].

En las BCVs replicativas, los complejos Citocromo c oxidasa tipo-cbb3 y Citocromo bd ubiquinol oxidasa son necesarios para mantener la respiración de las bacterias a bajas concentraciones de O<sub>2</sub>. El óxido nítrico (NO) producido por la iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) del macrófago tiene efectos microbicidas sobre *Brucella* [110]. La enzima óxido nítrico reductasa NorD de *Brucella* es un elemento clave en la detoxificación de NO. Además, debido a que la bacteria puede reducir nitrato, nitrito y óxido nitroso, *Brucella* podría usar NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en lugar de O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones en la respiración [111].

*Brucella* genera una adaptación metabólica en el bruceloma: se produce la activación de diversos genes involucrados en el metabolismo y el transporte de varios metabolitos. Los productos de estos genes resultan necesarios para la replicación intracelular, por lo que se los

podría considerar factores de virulencia. Las rutas de biosíntesis de las purinas, pirimidinas y de varios aminoácidos son esenciales para la replicación de *Brucella*. También resulta necesaria la expresión de genes relacionados con el transporte de cationes divalentes:  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  [87]. En el brucelosoma el hierro es captado por sideróforos como el ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) y la brucebactina (un derivado del 2,3-DHBA), o a través de la incorporación del grupo hemo por el transportador BhuA. Las mutantes en *Brucella* de BhuA son atenuadas y probablemente su función sea incorporar grupos hemo disponibles en el RE de los macrófagos [112].

Los genes regulatorios claves en la adaptación metabólica son también importantes en la virulencia de *Brucella*. La proteína LOV-histidina quinasa, un sensor de luz azul con una flavina como cromóforo, está involucrada en la virulencia. La activación de LOV-HK por la luz incrementa la virulencia en *Brucella*. Se especula que las bacterias, una vez fuera del hospedador, podrían sentir la luz traduciéndose en cambios que las harían aptas para volver a infectar nuevamente [113]. Resultados aún no publicados de nuestro laboratorio muestran una cascada de interacciones entre LOV-HK, reguladores de respuesta y proteínas del aparato flagelar. Aunque *Brucella* es considerada una bacteria no móvil, se ha observado la presencia de un flagelo en ciertas condiciones de cultivo [114,115]. La función del flagelo no está determinada aún pero mutantes flagelares en *Brucella* son atenuadas en la infección de ratón [114]. Debido a la semejanza del flagelo con los Sistemas de Secreción de Tipo III, se postula que el flagelo podría funcionar como un sistema de secreción en *Brucella*.

El sistema de dos componentes BvrR/BvrS está codificado en el operón *bvrRS* y regula de forma directa o indirecta decenas de genes. Algunos de estos genes están relacionados con la envoltura celular y la membrana externa: proteínas de membrana externa, chaperonas, lipoproteínas, enzimas de síntesis de LPS y ácidos grasos, sistemas de transporte y genes flagelares [116,117]. Un ejemplo es SST4 VirB que estaría regulado de forma directa por BvrR y de forma indirecta a través de VjbR [118]. El sistema BvrR/BvrS también regula la acilación correcta del lípido A del LPS y los genes del metabolismo del carbono y el nitrógeno [119]. Además, este sistema es necesario para la entrada celular, el tráfico y la protección contra péptidos catiónicos provenientes de las interacciones transitorias de las BCVs tempranas con los lisosomas y la activación de metabolismos necesarios para replicar en el brucelosoma. Sin embargo, la señal que sensa la quinasa BvrR aun no se conoce.

A la fecha, han sido reportados varios genes reguladores de la transcripción, importantes en el establecimiento y la replicación intracelular de *Brucella*. Generalmente, estos reguladores son factores de transcripción que regulan a algunos de los factores de virulencia ya mencionados. Un ejemplo de este tipo de control son los reguladores VjbR, NoIR y BlxR, que regulan el operón *virB* y a Hfq que a su vez regula al gen *sodC*. Otro regulador de la transcripción que no es un factor de transcripción, cuya mutación atenúa la virulencia en

*Brucella*, es la enzima guanosina 5'-difosfato 3'-difosfato (ppGpp) sintetasa (Rsh). Rsh sintetiza la alarmona ppGpp cuando las bacterias se encuentran en escasez severa de nutrientes. La molécula ppGpp se une a la ARN polimerasa (subunidades  $\beta$  y  $\beta'$ ) modificando su preferencia por ciertos promotores, disminuyendo la transcripción de una gran cantidad de genes (incluyendo ARNr), y aumentando la expresión genes están involucrados en la síntesis de aminoácidos y otros metabolismos importantes para sobrellevar la privación de nutrientes. También, Rsh regula la transcripción del mensajero de *virB*, cuya transcripción es disparada por la baja disponibilidad de nutrientes [120,121].

En resumen, los factores de virulencia de *Brucella* son un conjunto complejo de determinantes moleculares que le confieren al patógeno la habilidad de sensar el ambiente y producir cambios drásticos en su metabolismo y en el perfil de expresión de genes. Dichos cambios le permiten a *Brucella* invadir células, modular y evadir al sistema inmune del hospedador, sobrevivir a los mecanismos microbicidas y a las condiciones oxidantes para finalmente construir el nicho replicativo y multiplicarse en ausencia de nutrientes dentro de la célula infectada.

## El metabolismo riboflavina y flavocofactores

### La ruta biosintética

La riboflavina (vitamina B2) es un compuesto esencial y ubicuo en la naturaleza. Bacterias, plantas, hongos y arqueobacterias son capaces de sintetizarla. Es el precursor directo de los cofactores esenciales redox: flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenin dinucleótido (FAD) [122]. Los organismos que no producen riboflavina deben, indefectiblemente, obtenerla mediante la dieta como un micronutriente, o a través de bacterias saprófitas, para sintetizar FMN y FAD. Éstos son cofactores de flavoproteínas que participan en una enorme cantidad de procesos fisiológicos de la célula: en reacciones de deshidrogenación, oxidación, transferencia de 1 ó 2 electrones o hidroxilación. Por ejemplo, las flavoproteínas están involucradas en procesos de respiración celular, síntesis de macromoléculas como ácidos grasos, reparación de ADN y sensado de luz [123,124].

La ruta de síntesis de la riboflavina en eubacterias y plantas es esencialmente igual a la de hongos y arqueobacterias, con diferencias en la secuencia de eventos [122]. En eubacterias, la biosíntesis de riboflavina comienza con una molécula de GTP cuyo ciclo imidazol es hidrolizado por la enzima GTP ciclohidrolasa II (GCH), dando lugar a 4,5-diaminopirimidina. Ésta es convertida en 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona por una secuencia de deaminación, reducción de la cadena lateral y desfosforilación. Las enzimas fosforibosilamino pirimidina deaminasa (FPD), fosforibosilamino pirimidina reductasa (FUR) y

monoéster fosfórico hidrolasa (MFH) catalizan los pasos de dicha secuencia de reacciones respectivamente. La ribulosa-5-fosfato, proveniente de la ruta de las pentosas fosfato, es transformada a 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato por la butanona fosfato sintasa (BFS). La lumazina sintasa (LS) condensa 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona y 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato dando como resultado 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (lumazina). La dismutación de la lumazina, que es catalizada por la riboflavina sintasa (RS), resulta en una molécula de riboflavina y una de 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona, la cual es reciclada en la ruta metabólica. La biosíntesis de una molécula de riboflavina requiere en total una molécula de GTP y dos moléculas de ribulosa-5-fosfato. Finalmente, la riboflavina es fosforilada por la riboflavina quinasa (RK) para generar FMN, el cual es adenilado por la FAD sintetasa (FS) para dar FAD (**Figura I-6**).

Las enzimas involucradas en la ruta biosintética de la riboflavina suelen denominarse con el nombre de Rib, seguido por el agregado de una letra (con la excepción de la enzima monoéster fosfórico hidrolasa (MFH)). Debido a la falta de un consenso explícito en la nomenclatura de los genes *rib*, en muchos de los organismos anotados suele haber algunas discrepancias en la letra usada para identificar a cada enzima. La notación empleada en esta Tesis es la encontrada más frecuentemente en las bases de datos y en la literatura (**Tabla I-4**).

**Tabla I-4. Enzimas de la ruta biosintética de la riboflavina.**

Nombre	Enzima	Número EC
<b>HADasa*</b>	Monoéster Fosfórico Hidrolasa	<a href="#">3.1.3.-</a>
<b>RibA</b>	GTP Ciclohidrolasa II	<a href="#">3.5.4.25</a>
<b>RibD</b>	Fosforibosilamino Pirimidina Deaminasa	<a href="#">3.5.4.26</a>
	Fosforibosilamino Pirimidina Reductasa	<a href="#">1.1.1.193</a>
<b>RibB</b>	Butanona Fosfato Sintasa	<a href="#">4.1.99.12</a>
<b>RibH</b>	Lumazina Sintasa	<a href="#">2.5.1.-</a>
<b>RibE</b>	Riboflavina Sintasa	<a href="#">2.5.1.9</a>
<b>RibC</b>	Riboflavina Kinasa	<a href="#">2.7.1.26</a>
<b>RibF</b>	FAD Sintetasa	<a href="#">2.7.7.2</a>

\* por HAD *family hydrolase*  
EC: *Enzyme Commission*



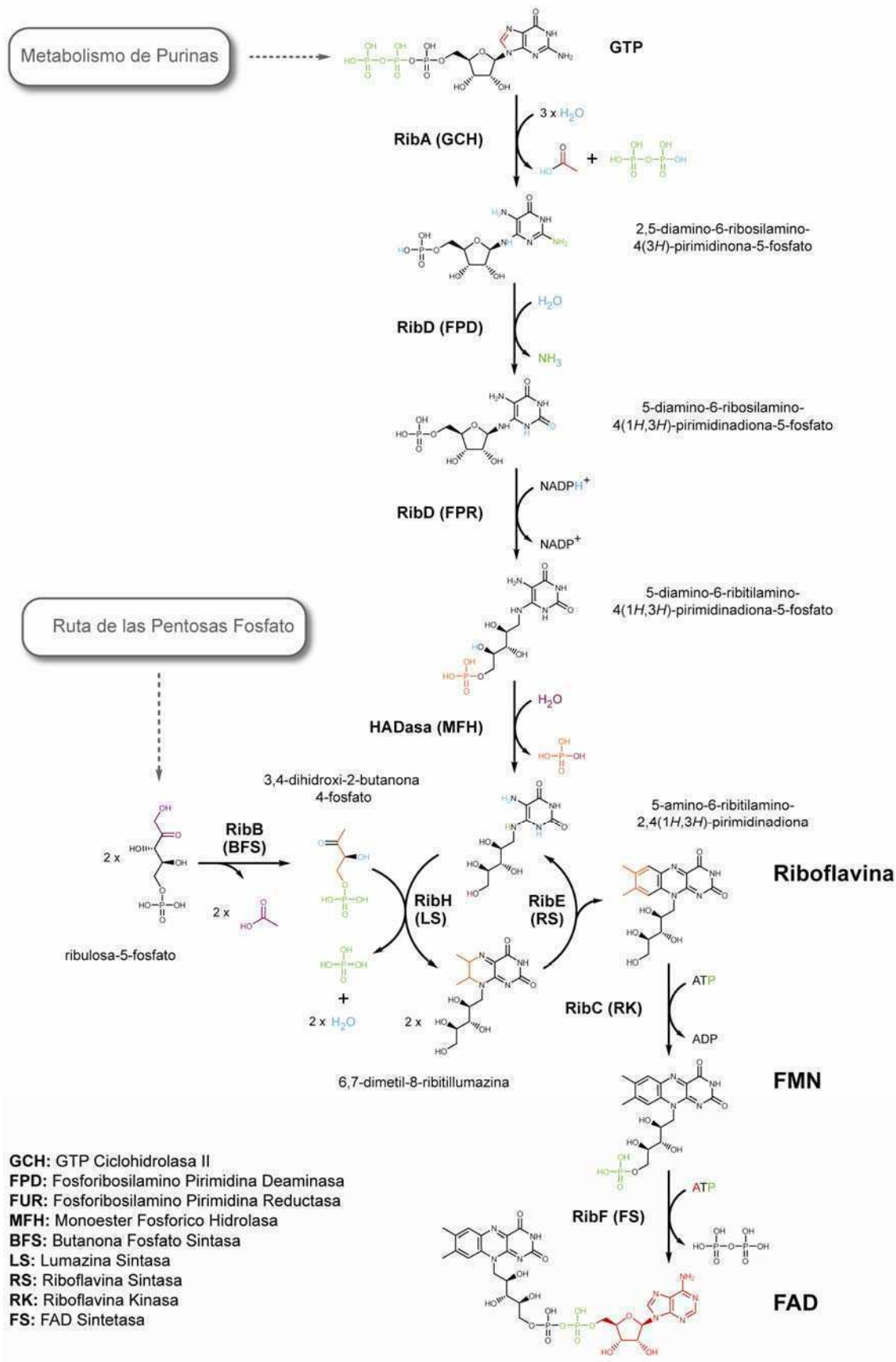
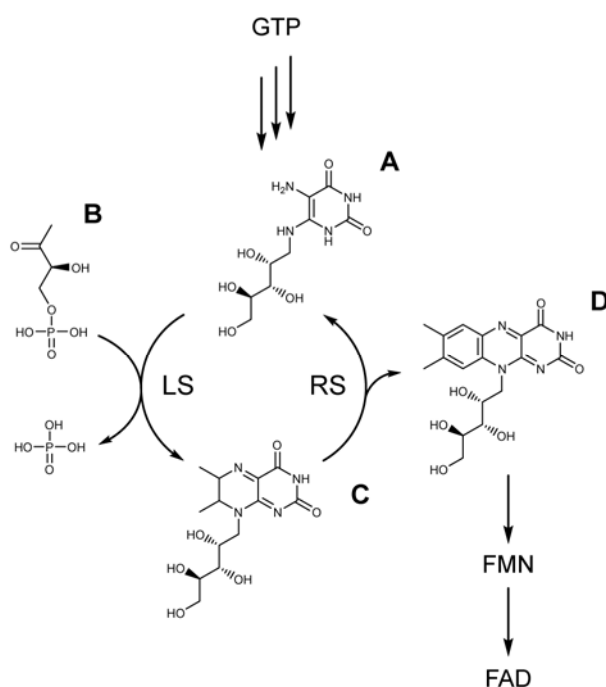


Figura I-6. Ruta de biosíntesis de riboflavina, FMN y FAD en eubacterias y plantas.

Una molécula de GTP y dos moléculas de ribulosa-5-fosfato son necesarias para la biosíntesis de una molécula de riboflavina, finalmente los cofactores FMN y FAD son obtenidos luego de la fosforilación y adenilación de la riboflavina.

## Lumazina Sintasa

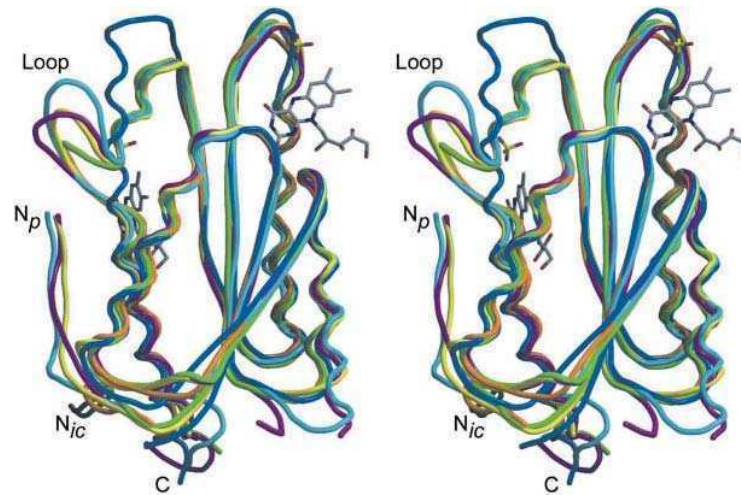
La enzima 6,7-dimetil-8-ribitillumazina sintasa (lumazina sintasa, LS) cataliza el penúltimo paso en la biosíntesis de la riboflavina, condensando 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona y 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato, para generar 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (**Figura I-7**). Las rutas de biosíntesis de riboflavina en eubacterias, hongos, plantas o arqueobacterias presentan pequeñas variaciones en los primeros pasos enzimáticos, pero los dos pasos que catalizan la LS y la RS están estrictamente conservados en todos los organismos.



### Figura I-7. Síntesis de riboflavina.

La 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona (**A**) y la 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato (**B**) son condensadas en 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (lumazina) (**C**) por la lumazina sintasa (**LS**). La riboflavina (**D**) es finalmente sintetizada por la riboflavina sintasa (**RS**), la cual condensa dos moléculas de lumazina para dar una molécula de riboflavina y reciclar una molécula de 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona de vuelta a la ruta.

Las LSs son homopolímeros de una misma unidad monomérica que se asocia en homopentámeros. A su vez, los homopentámeros pueden estar libres, asociados en un arreglo de 12 pentámeros formando una cápside icosaédrica o enfrentados por la misma cara formando un dímero de pentámeros. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* posee una LS icosaédrica, mientras que *Saccharomyces cerevisiae*, una pentamérica [125,126]. Si bien las secuencias primarias y los arreglos cuaternarios de las diferentes LS pentaméricas, icosaédricas y decaméricas son muy distintos, la estructura terciaria de los monómeros es esencialmente la misma (**Figura I-8**) [127].

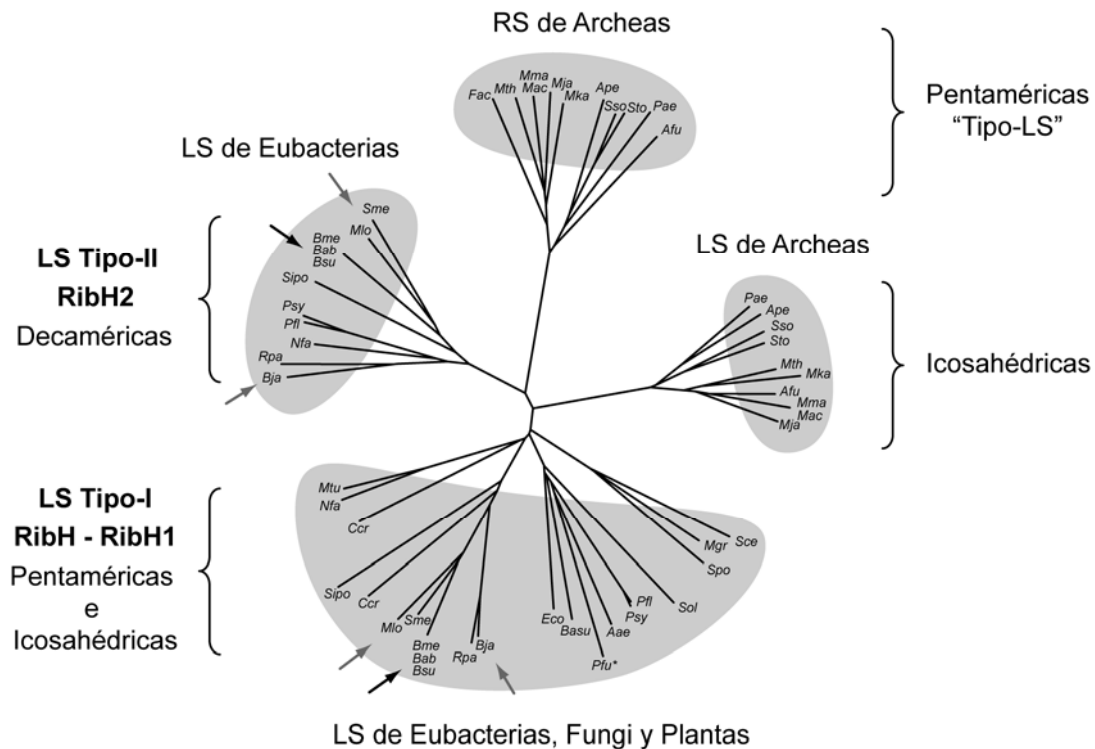


adaptado de [127]

**Figura I-8. Superposición estructural de monómeros de varias LSs.**

Enzimas pentaméricas de *S. pombe* (amarillo), *S. cerevisiae* (celeste) y *M. grisea* (magenta). LSs icosaédricas de *B. subtilis* (verde) y *S. oleraceaspinach* (naranja). Se muestra a la LS decamérica de *B. abortus* en azul oscuro.

Un análisis filogenético y estructural de las LSs de eubacterias, hongos y plantas realizado en nuestro laboratorio las clasifica en dos categorías: LSs Tipo-I, pentaméricas o icosaédricas y LSs Tipo-II, decaméricas [128]. Se denomina RibH o RibH1 a las LSs de Tipo-I y RibH2 a las LSs de Tipo-II. Los organismos que poseen una LS Tipo-II también poseen necesariamente otra LS Tipo-I. Este grupo está constituido por eubacterias, mayoritariamente  $\alpha$ -proteobacterias, entre las que se encuentra *Brucella* spp. y los simbiontes de plantas *Rhizobium leguminosarum*, *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti* (**Figura I-9**) [129].



adaptado de [128]

**Figura I-9. Análisis filogenético y de estructura cuaternaria de la familia de proteínas LS**

Para el análisis se tomaron en cuenta únicamente las especies con genomas secuenciados que poseen dos genes homólogos que codifican proteínas de esta familia. Fueron incluidos en el estudio las RSs relacionadas de arqueobacterias por tener estructura terciaria y cuaternaria similar a las LSs y todas aquellas LSs provenientes de organismos que presentan una sola copia en sus genomas pero cuya estructura ya había sido caracterizada previamente. Las flecha negra muestran a las proteínas RibH de *Brucella* spp. las flechas grises indican sus ortólogos en rizobacterias. La RibH de *Pfu*\* es la única arqueobacteria analizada que se agrupa con las LSs Tipo-I.

Abreviaturas: **Aae**: *Aquifex aeolicus*, **Afu**: *Archaeoglobus fulgidus*, **Ape**: *Aeropyrum pernix*, **Bab**: *Brucella abortus*, **Basu**: *Bacillus subtilis*, **Bja**: *Bradyrhizobium japonicum*, **Bme**: *Brucella melitensis*, **Bsu**: *Brucella suis*, **Ccr**: *Caulobacter crescentus*, **Eco**: *Escherichia coli*, **Fac**: *Ferroplasma acidarmanus*, **Mac**: *Methanosarcina acetivorans*, **Mgr**: *Magnaporthe grisea*, **Mja**: *Methanococcus jannaschii*, **Mka**: *Methanopyrus kandleri*, **Mlo**: *Mesorhizobium loti*, **Mma**: *Methanosarcina mazei*, **Mth**: *Methanobacterium thermoautotrophicum*, **Mtu**: *Mycobacterium tuberculosis*, **Nfa**: *Nocardia farcinica*, **Pae**: *Pyrobaculum aerophilum*, **Pfl**: *Pseudomonas fluorescens*, **Pfu**\*: *Pyrococcus furiosus*, **Psy**: *Pseudomonas syringae*, **Rpa**: *Rhodopseudomonas palustris*, **Sce**: *Saccharomyces cerevisiae*, **Sipo**: *Silicibacter pomeroyi*, **Sme**: *Sinorhizobium meliloti*, **Sol**: *Spinacea oleracea*, **Spo**: *Schizosaccharomyces pombe*, **Sso**: *Sulfolobus solfataricus*, **Sto**: *Sulfolobus tokodaii*.

## RibH1 y RibH2 de *Brucella* spp.

RibH2 (en su momento denominada proteína citoplasmática de 18 KDa) fue originalmente aislada por el Dr. Goldbaum en el año 1993 por inmunoabsorción y separación por SDS-PAGE de una fracción citoplasmática de *B. abortus* S19, usando un anticuerpo monoclonal. RibH2 puede ser utilizada como antígeno en un ELISA de captura para discriminar serológicamente entre paciente humanos con brucelosis activa e inactiva (asintomática), y entre bovinos infectados y vacunados. Si bien 3 fragmentos polipeptídicos de la proteína fueron secuenciados, hasta ese momento no se encontró similitud con ninguna proteína conocida [130].

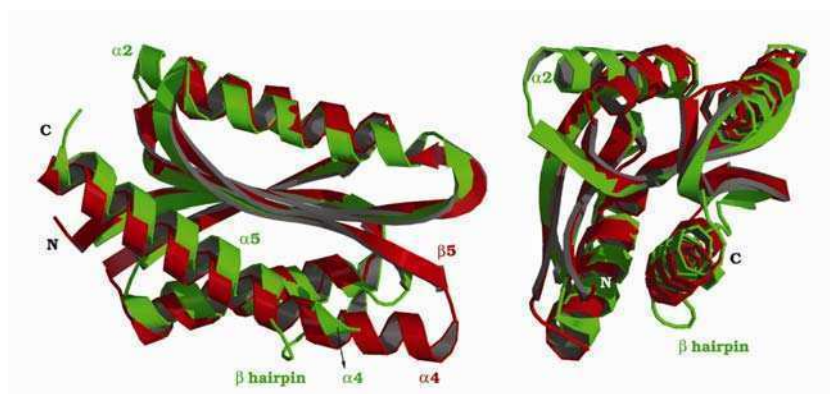
Luego se publicaron trabajos que permitieron identificar al ORF que codifica al antígeno. La secuencia completa de RibH2 de *Brucella* permitió identificarla como LS, aunque con baja identidad de secuencia [131,132]. En el año 1998 se logró clonar el ORF y se expresó la proteína de forma recombinante [133]. Ésta fue caracterizada extensivamente a nivel estructural, estableciendo un novedoso arreglo cuaternario de dímero de pentámeros [133,134,135,136]. Además, algunos estudios preliminares sobre la actividad enzimática de RibH2 indicaron que posee actividad de LS [137]. La proteína fue renombrada *Brucella Lumazine Synthase* (BLS). La actividad enzimática LS *in vitro* de BLS es muy baja comparada con la de otras LSs ya caracterizadas (**Tabla I-5**) [136]. En el año 2005, al completarse la secuenciación de los dos cromosomas de *Brucella abortus* 2308, se identificó otro gen parálogo a BLS. Los genes fueron nombrados *ribH1* y *ribH2* por sus ubicaciones en el cromosoma I y II respectivamente. RibH1 fue clonada, expresada, cristalizada y se determinó su estructura tridimensional, estableciendo que cuenta con un arreglo cuaternario tipo pentamérico [136]. Debido a la baja actividad enzimática LS *in vitro* y la novedosa estructura que presenta RibH2, se especuló con que no era una verdadera LS. Con el descubrimiento de RibH1, con estructura pentamérica “normal”, se postuló que ésta podría ser la “verdadera” LS de *Brucella* y que debería poseer una actividad enzimática LS similar a las LS conocidas. Sin embargo, al igual que RibH2, esta enzima presenta una baja actividad LS, ambas con una  $k_{cat}$  10-15 veces menor a las LS conocidas (**Tabla I-5**).

**Tabla I-5. Propiedades enzimológicas de diferentes LS.**

Enzima	$K_M1$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_M2$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M1$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M2$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
<i>Brucella</i> spp. RibH1	90	125	0,006	67	48
<i>Brucella</i> spp. RibH2	10	4000	0,006	600	1,5
<i>B. subtilis</i> LS	8,6	55	0,056	6500	1020
<i>S. cerevisiae</i> LS	4,0	90	0,080	20000	880

Sustrato 1: 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona. Sustrato 2: 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato. En gris se resalta las bajas  $k_{cat}$  de las RibH de *Brucella* en comparación con otras LS.

Todas las especies de *Brucella* secuenciadas hasta el momento codifican RibH1 y RibH2, y sus secuencias se encuentran conservadas. La identidad de secuencia entre ambas proteínas es sumamente baja, alcanzando sólo el 21%. Sin embargo, ambos monómeros se pueden superponer relativamente bien, con una desviación cuadrática media de 1,50 Å para 128 C $\alpha$  alineados (**Figura I-10**) [138].



adaptado de [138]

**Figura I-10. Superposición estructural de monómeros de RibH1 y RibH2 de *Brucella* spp.**

Elementos de estructura secundaria clave en la estructura de los monómeros. Se pueden observar algunas diferencias en la región  $\beta 5$ - $\alpha 4$  y en la hélice  $\alpha 2$ . La hélice  $\alpha 4$  está involucrada en la asociación pentámero-pentámero.

La caracterización estructural y bioquímica de las proteínas RibH de *Brucella* fue objeto de dos tesis de doctorado del laboratorio [138,139]. En ellas, se destacan los hechos de que RibH2 tiene una organización cuaternaria de dímero de pentámero, novedosa para una LS y propia de todas las RibH2, mientras que RibH1 tiene una estructura pentamérica. Además, RibH2 es capaz de unir riboflavina, tal como lo hace la LS de *Schizosaccharomyces pombe*, presentando constantes de disociación ( $K_d$ ) similares:  $7 \mu\text{M}$  para RibH2 y  $1,2 \mu\text{M}$  *S. pombe* [127,140,141]. También se demostró que RibH2 une hemina (protoporfirina IX-  $\text{Fe}^{3+}$ ) con una  $K_d$  de  $0,3 \text{ nM}$  y que es capaz de coordinar al metal. Esto se evidenció por la presencia de la Banda de Soret a  $412 \text{ nm}$ . Además, el  $\text{Fe}^{3+}$  se reduce a  $\text{Fe}^{2+}$  con el agregado de ditionito y después es re-oxidado en presencia de  $\text{O}_2$  (datos no publicados).

El resumen de las características y diferencias entre RibH1 y RibH2 de *Brucella* al momento de empezar esta Tesis se muestra en la **Tabla I-6**.

**Tabla I-6. Resumen de las características diferenciales entre RibH1 y RibH2 de *Brucella*.**

Característica	RibH1	RibH2	Referencia
Longitud del Monómero (residuos)	157	158	[129,134]
Clasificación	LS Tipo-I	LS Tipo-II	[128,129]
Arreglo cuaternario	Pentámero	Decámero	[128,129,135]
Actividad LS <i>in vitro</i> $k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$0,006 \text{ s}^{-1}$ (muy baja)	$0,006 \text{ s}^{-1}$ (muy baja)	[128]
Localización genómica	Cromosoma I	Cromosoma II	[128]
Conforma el operón <i>rib</i>	Si	No	[128]
Elemento regulatorio	-	Riboswitch RFN	[128]
$K_d$ Hemina	-	$0,3 \text{ nM}$	[139]
$K_d$ Riboflavina	-	$7 \mu\text{M}$	[139]
Involucrada en respuesta inmune	No	Si	[139]

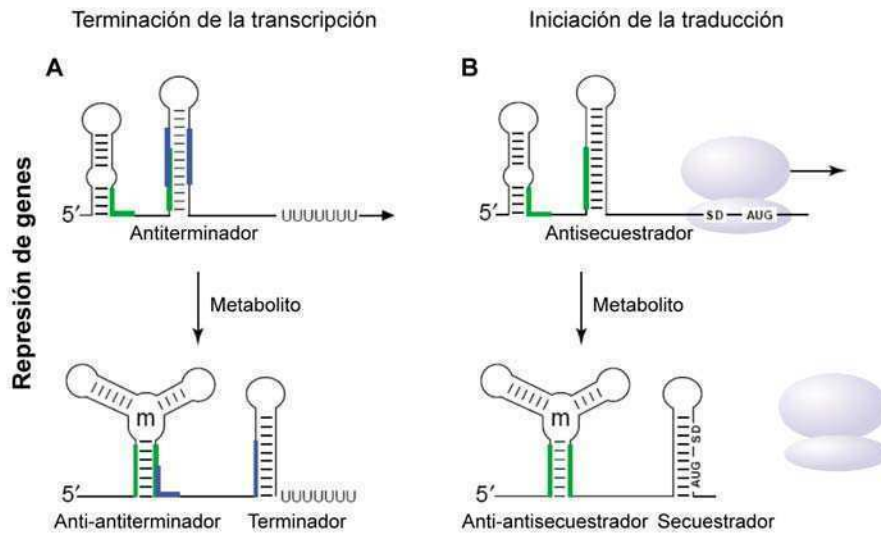
## Regulación de la biosíntesis: riboswitch FMN

En *B. subtilis* mutaciones en el gen *ribC/F* (flavoquinasa/FAD sintetasa), que disminuyen la actividad enzimática, o mutaciones en una secuencia conservada que se encuentra río arriba del operón *rib*, denominada *ribO*, desregulan la síntesis generando una sobreproducción de riboflavina. Estas evidencias sugieren que la presencia de los derivados de la riboflavina, FMN o FAD, inhiben la síntesis de riboflavina [142]. La secuencia denominada *ribO* es en realidad una secuencia muy conservada y distribuida en eubacterias. Se determinó que *ribO* codifica un ARNm que pertenece a una familia de ARNm regulatorios, denominados “riboswitches”.

Los riboswitches son elementos regulatorios que se ubican en la región 5' no codificante de ARNm y que regulan la expresión de genes en respuesta a la concentración de diversos metabolitos celulares. El sensado de los metabolitos por los riboswitches es realizado por el dominio aptámero, el cual es responsable de la alta afinidad y especificidad entre el complejo riboswitch-ligando. Otros dos dominios regulatorios en el ARNm no codificante son los encargados de modular la transcripción o traducción. Se han descrito riboswitches en la naturaleza capaces de sensar diversos metabolitos, a saber: adenina, adenosilcobalamina (B12), FMN, guanina, 2'-deoxyguanosina, glucosamina-6-fosfato, glicina, lisina,  $Mg^{2+}$ , 7-aminometil-7-deazaguanina (preQ1), S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), tiamina pirofosfato (TPP) y di-GMP-cíclico [143,144]. Ya han sido resueltas tridimensionalmente algunas estructuras de dominios sensores con sus metabolitos (guanina, adenina, TPP, SAM,  $Mg^{2+}$ , lisina y FMN), obteniéndose valiosa información acerca de su selectividad y funcionamiento [144]. La gran mayoría de los riboswitches descritos funcionan modulando la expresión de los genes por medio de atenuación transcripcional o traduccional [145,146,147]. Los riboswitches suelen ser hallados en eubacterias, aunque también existen en eucariotas y arqueobacterias, como es el caso de *thi*-box que codifica para un ARNm que sensa TPP [146]. En general, regulan a los genes negativamente; sin embargo hay excepciones en donde los riboswitches actúan como activadores luego de la unión con el metabolito [145,148].

El riboswitch que sensa FMN, denominado “riboswitch FMN”, está codificado en una secuencia conocida como *rfn*-box (por *riboflavin*-box, antes *ribO*). Dicha secuencia puede regular genes de biosíntesis o transporte de riboflavina. El riboswitch FMN funciona a través de un *feedback-loop* negativo sobre el producto de los genes regulados, en donde se propone que la unión de FMN al riboswitch inhibe la expresión del gen a nivel transcripcional o traduccional. En general, las bacterias Gram-positivas se valen de la estrategia de represión transcripcional: en presencia de FMN, el riboswitch puede formar una estructura terminadora de la transcripción (**Figura I-11.A**). Si el mecanismo fuera de represión traduccional, como en general ocurre en bacterias Gram-negativas, la estructura formada en presencia del metabolito sería un

secuestrador que captura la secuencia de unión al ribosoma Shine-Dalgarno (SD) o el codón AUG de iniciación (**Figura I-11.B**). En ausencia de FMN, esas estructuras son reemplazadas por otras, un antiterminador o un antisequestrador, que permiten la transcripción y traducción del gen respectivamente (**Figura I-11**).



adaptado de [145]

**Figura I-11. Esquema general de la regulación por el riboswitch FMN.**

**(A)** Formación de una estructura antiterminadora de la transcripción en ausencia de FMN (m): hay transcripción. Cuando se une el FMN al dominio adaptador se estabiliza la conformación anti-antiterminadora dando lugar a la estructura terminadora de la transcripción e inhibiendo la transcripción. Estrategia utilizada por bacterias Gram-positivas. **(B)** Con la misma lógica, la estructura anti-antisequestrador existe en ausencia de FMN exponiendo al ribosoma a la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) y AUG inicial. Cuando el FMN está presente se une al dominio aptámero, estabiliza la conformación anti-antisequestrador permitiendo la aparición de la estructura secuestradora que esconde SD y el AUG inicial del ribosoma, interrumpiendo la traducción. Estrategia utilizada por bacterias Gram-negativas.

## Transporte de flavinas

La gran mayoría de las bacterias son autótrofas y no poseen sistemas de transporte para la riboflavina. Sin embargo, existen algunas pocas bacterias que naturalmente son auxótrofas para riboflavina y que dependen enteramente de riboflavina exógena, como es el caso de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* y algunos lactobacilos que no poseen genes biosintéticos para la vitamina [149]. Todas ellas dependen del transporte de riboflavina para subsistir. En 1939 se desarrolló uno de los primeros biosensores para detectar riboflavina, basado en el crecimiento de *Lactobacillus casei*, que requiere riboflavina para crecer y es capaz de transportarla muy eficientemente [149]. Asimismo existe otro grupo de bacterias, que posee los genes necesarios para la biosíntesis de riboflavina, así como también transportadores para la misma. Los transportadores suelen estar codificados dentro del operón *rib* o aislados en el genoma. En la mayoría de los casos, un riboswitch FMN suele gobernar su expresión. Los dos transportadores de riboflavina estudiados



experimentalmente hasta la fecha son los denominados RibU y RibM, sólo descriptos en bacterias Gram-positivas [150].

RibU es un miembro de la superfamilia de transportadores BART (*Bile/Arsenite/Riboflavin Transporter*) y de la recientemente descrita familia de transportadores ECF (*Energy Coupled Factor*). Cada transportador ECF contiene una proteína integral de membrana que une al sustrato (componente S), de 5 ó 6 dominios transmembrana (TM), un módulo de acople energético formado por 2 proteínas de unión a ATP (componentes A y A9), y otra proteína transmembrana (componente T). RibU es el componente S de este sistema de transporte [151]. Por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* y *Staphylococcus aureus* poseen este tipo de transportadores. Las Km reportadas para riboflavina se encuentran en el rango de 5-20 nM. El componente S (RibU) puede mediar el transporte en ausencia de los otros componente del sistema, aunque con menor eficiencia [150]. Recientemente se determinó la estructura tridimensional de RibU de *S. aureus* unido a riboflavina [151]. RibM es una proteína de membrana con 6-7 dominios transmembrana que posee una Km para riboflavina de 11  $\mu$ M y, a diferencia de RibU, funciona como facilitador ya que no requiere energía metabólica para realizar el transporte. RibM se encuentra en *Corynebacterium glutamicum* y en *Streptomyces davawensis*, entre otros organismos [149,152].

Existen otros dos posibles transportadores bacterianos hallados por técnicas bioinformáticas, aunque su función todavía no fue confirmada experimentalmente. Estos genes se encuentran río abajo de secuencias que codifican para riboswitches RFN y poseen dominios transmembrana predichos. De esta manera se identificaron 2 transportadores putativos, que fueron denominados ImpX (8-10 dominios TM) y RfnT (10-12 dominios TM). ImpX fue encontrado en los genomas de *Fusobacterium nucleatum* y *Desulfitobacterium hafniense* y presenta similitud con miembros de la familia de proteínas transportadoras tipo-EamA. Por otro lado, RfnT fue hallado en los genomas de algunos *Rhizobiales*: *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti* y *Ochrobactrum anthropi* [147]. En el caso particular de las rizobacterias, RfnT está ubicado dentro de sus operones *rib* (**Figura I-12**).

**Tabla I-7. Resumen de los diferentes sistemas de transporte de flavinas en bacterias.**

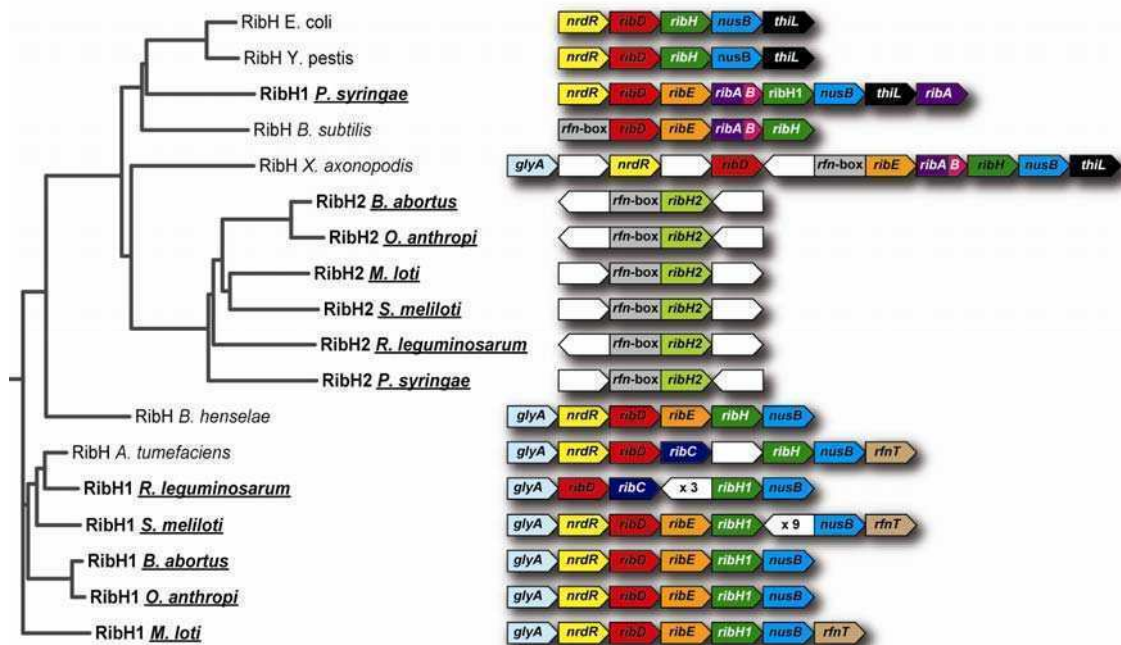
Transportador	Gen ej.	Especie ej.	Dominios TM	Energía	Km	Característica	Sustratos
<b>Descriptos</b>							
RibU	<i>Ypa</i>	<i>B. subtilis</i>	5-6	Si	5-20 nM	Superfamilia BART, flia ECF	RF, RoRF, FMN, FAD
RibM	<i>PnuX</i>	<i>C. glutamicum</i>	6-7	No	11 $\mu$ M	Exporta?	RF, RoRF, FMN
<b>Putativos</b>							
ImpX	<i>FN1498</i>	<i>F. nucleatum</i>	8-10	?	?	Tipo-EamA	?
RfnT	<i>Mlr8412</i>	<i>M. loti</i>	10 - 12	?	?	encontrado en <i>Rhizobiales</i>	?

RoRF: Roseoflavina, análogo de la RF.

## Organización genómica de los genes *rib*

Como se mencionó antes, algunos de los genes de biosíntesis de riboflavina están localizados en una misma unidad transcripcional denominada “operón *rib*”. Los genes que componen al operón *rib* no son siempre los mismos y varían según el taxón. Es común encontrar a los genes *ribD*, *ribE* y *ribH* dentro de estos operones conservando el orden (**Figura I-12**). En proteobacterias, además de los genes *rib*, suelen encontrarse en el mismo *cluster* genómico a *glyA*, *nrdR*, *nusB* y *thiL*. El gen *glyA* está involucrado en el metabolismo de glicina, *nrdR* es un represor transcripcional de los operones RNR (ribonucleótido reductasa), *nusB* es un factor de antiterminación y *thiL* está involucrado en la biosíntesis de tiamina [153,154,155]. En la literatura no existen reportes que involucren funcionalmente a estos genes con el operón *rib*. Un ejemplo es NrdR, que se une a una secuencia específica denominada *nrdR*-box la cual no se encuentra presente en el operón *rib* [153].

Las enzimas RibA y RibB pueden estar fusionadas formando sola una enzima bifuncional RibA/B al igual que RibC y RibF pueden ser encontradas como RibC/F. Los genes que codifican estas proteínas pueden o no formar parte del operón *rib*. El gen *ribH2* es un caso particular de genes *rib* aislados, ya que en todos los genomas analizados se lo encuentra aislado y antecedido por una secuencia *rfn*-box. Como ya se mencionó, esta secuencia puede actuar como regulador del operón *rib* completo, de genes aislados *rib* o genes de transporte de riboflavina. En algunos operones *rib* de rizobacterias se encuentra el transportador putativo RfnT (**Figura I-12**).



**Figura I-12. Organización genómica del operón *rib* en distintas eubacterias**

A la izquierda se muestra un árbol filogenético hecho a partir de un alineamiento múltiple de las proteínas RibH. A la derecha se muestra la disposición y orientación de los genes vecinos en los correspondientes genomas (no en escala). Los genes en blanco son genes no relacionados, x3 y x9 significa 3 y 9 genes no relacionados en esa orientación. La secuencia *rfn*-box codifica para el riboswitch FMN.

## Inhibición de la biosíntesis de riboflavina

Las enzimas biosintéticas de la riboflavina de los patógenos bacterianos son potenciales blancos para el desarrollo de drogas. Con la excepción de *Listeria monocytogenes*, todos los patógenos bacterianos intracelulares dependen exclusivamente de la riboflavina endógena, por lo que la inhibición de su biosíntesis implicaría la inanición del patógeno [156]. La ausencia de esta ruta metabólica en mamíferos hace que las enzimas involucradas sean atractivos blancos con potencial terapéutico. De hecho, los primeros antibióticos utilizados con éxito a comienzos de la década de 1930 fueron las sulfonamidas, las cuales inhiben competitivamente a la enzima dihidropteroato sintasa, interrumpiendo así la síntesis del ácido fólico (vitamina B9). La gran mayoría de los antibióticos modernos actúa sobre pocos puntos de la fisiología bacteriana. Pueden actuar a nivel de la pared celular o membrana ( $\beta$ -lactámicos y péptidos catiónicos), síntesis de proteína (macrólidos, tetraciclinas y aminoglicósidos), transcripción y síntesis de ADN (rifamicinas y quinolonas) y síntesis de ácido fólico (sulfonamidas y pirimidinas).

La inhibición de los metabolismos de vitaminas bacterianas es una estrategia probada, aunque poco explotada. LS y RS son los principales blancos para desarrollo de drogas inhibitorias de la síntesis de riboflavina lo cual se debe a que ambas enzimas han sido estudiadas en gran detalle y están resueltas varias estructuras tridimensionales de diversos organismos. Un amplio conocimiento acerca de la estructura de las proteínas LS y RS, así como de su química de reacción, hacen que el diseño racional de drogas sea posible. Ambas enzimas tienen sustratos estructuralmente similares, y pequeñas modificaciones químicas en ellos pueden generar una gran variedad de análogos llamados "antimetabolitos". Los antimetabolitos inhiben la actividad enzimática compitiendo por el sitio activo de la enzima con los sustratos naturales [157].

Se diseñaron y sintetizaron varios análogos de 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona y 6,7-dimetil-8-ribitillumazina, sustratos de la LS y RS respectivamente. Los análogos pueden ser de sustrato, producto o asimilarse a un estado de transición o a un intermediario de reacción. Las constantes de inhibición y estructuras de complejos fueron determinadas para varios de estos análogos de sustrato inhibidores [158,159,160]. De los numerosos inhibidores de LSs y RSs hallados *in vitro* por diseño racional, ninguno muestra actividad antibiótica *in vivo*. Esto se debe a la baja biodisponibilidad y permeabilidad de la membrana celular para este tipo de compuestos. En los últimos años se han comenzado a emplear métodos de *screening* masivos de inhibidores en bibliotecas de compuestos químicos [161,162,163]. Recientemente, algunos compuestos inhibitorios provenientes de una búsqueda masiva, mostraron ser inhibidores de la RS de *M. tuberculosis* y tener actividad antibiótica moderada para *M. tuberculosis* en sus formas replicativa y no replicativa [164]. Estos hallazgos

resultan promisorios y abren aún más la puerta al desarrollo de antibióticos terapéuticos basados en la inhibición de la biosíntesis de riboflavina.

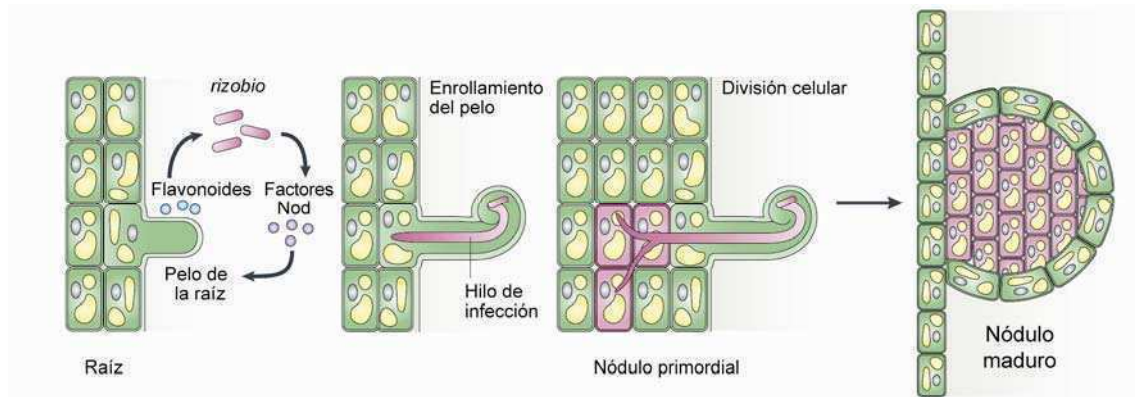
## ***Rhizobium leguminosarum***

La fijación biológica de  $N_2$  es catalizada únicamente por procariotas, tanto eubacterias como arqueobacterias. La enzima más importante de este proceso es la nitrogenasa, que funciona en ausencia de  $O_2$ . Algunas plantas presentan nódulos en sus raíces capaces de contener bacterias fijadoras de  $N_2$  en un microambiente con muy baja tensión de  $O_2$ . Esta relación simbiótica está restringida a un grupo reducido de bacterias del orden *Rhizobiales* (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*), *Azorhizobium* y *Frankia* (actinomicete, Gram-positivo). Los rizobios tienen como hospedadores a plantas de la familia *Leguminosae* (o *Fabaceae*) [165,166].

*Rhizobium leguminosarum* es un simbiote fijador de  $N_2$  perteneciente al grupo  $\alpha$ -proteobacteria y al subgrupo  $\alpha 2$ , cuyo genoma ha sido completamente secuenciado en el año 2006. Posee un cromosoma circular, el cual codifica las funciones celulares básicas y algunas islas con funciones accesorias. Además del cromosoma, *R. leguminosarum* posee 6 plásmidos accesorios [73]. Esta bacteria es el simbiote natural de la planta hospedadora *Pisum sativum* (arveja). El sistema *Rhizobium*-leguminosa es ampliamente utilizado como modelo de estudio de simbiosis en el laboratorio.

La simbiosis entre bacterias y plantas superiores consiste en un desarrollo conjunto entre ambos organismos. Comienza con un “diálogo molecular” entre las partes: la planta exuda de las raíces una mezcla de moléculas denominadas flavonoides que son reconocidas por su simbiote particular. Los flavonoides son moléculas quimioattractantes para las bacterias y modifican su patrón de expresión, encendiendo genes involucrados en simbiosis. Los rizobios también secretan factores Nod (lipoquitooligosacáridos) como moléculas de comunicación que son sensadas por receptores especializados de la planta que la preparan para recibir al huésped (**Figura I-13**) [167]. La entrada de la bacteria ocurre en los pelos radiculares, que se curvan sobre las bacterias. Una vez dentro del pelo de la raíz, la bacteria se divide generando hilos de infección, hasta que una célula endocita a la bacteria. En el interior de la célula vegetal, la bacteria se rodea de membrana plasmática modificada, denominada membrana peribacteroide, y se establece en un simbiosoma. El proceso culmina con la organogénesis de nódulos especializados (**Figura I-13**); en los cuales las bacterias se diferencian en bacteroides, cambian su metabolismo y expresan la nitrogenasa, que puede reducir  $N_2$  atmosférico a  $NH_3$ . Esto sucede gracias a la barrera difusional al  $O_2$  que presenta el propio nódulo y la presencia de la hemoproteína leghemoglobina, provista por la planta, que secuestra  $O_2$ . En recompensa

la planta recibe  $\text{NH}_3$  y alanina. A cambio, la leguminosa brinda nutrientes, fuentes de carbono y energía, y un lugar físico para el establecimiento del nicho replicativo de la bacteria [166,168].



adaptado de [169]

### Figura I-13. Proceso del desarrollo del nódulo.

Una mezcla de flavonoides es liberada por las raíces de la leguminosa, la cual es sensada por el rizobio simbiote específico. A su vez, éste dispara la síntesis de los factores de nodulación Nod. Éstos inducen la curvatura del pelo radicular, la penetración bacteriana en el centro del bolsillo de infección y estimula la división de las células corticales (CCs) de la raíz. Los hilos de infección se extienden desde los pelos de la raíz hacia las CCs, ramificándose en el nódulo primordial (derivado CCs) en donde las bacterias son liberadas al citoplasma celular.

Como ya se mencionó, varios rizobios y *Brucella* tienen una gran cercanía filogenética (Figura I-3) y poseen conservados diversos mecanismos utilizados para la colonización del hospedador [67,73]. A pesar de que los rizobios son simbioses de plantas y *Brucella* es patógena de mamíferos, existe una fuerte analogía en las etapas de invasión y establecimiento en el hospedador. Por ejemplo, durante las infecciones hay un aumento de ROS y RNS, y ambas bacterias se establecen rodeadas de una membrana eucariota modificada dentro de la célula hospedadora [110,170]. Ambos nichos replicativos tienen baja tensión de  $\text{O}_2$ , y los rizobios sufren una adaptación metabólica al diferenciarse en bacteroides en su simbiosoma, al igual que *Brucella* lo hace al establecerse en el brucelosoma. Un ejemplo de factor de virulencia en *Brucella* y simbiosis en los rizobios es el LPS. En *S. meliloti* el LPS puede suprimir la producción de ROS por parte de la planta, y en *Brucella* funciona como un débil activador del sistema inmune y permite la entrada a la célula vía *lipid rafts*. Los distintos componentes del LPS de los rizobios tienen diferentes roles en la interacción con el hospedador, como ocurre en *Brucella*. A saber, alteraciones en el lípido A de *R. leguminosarum* pueden llevar a simbiosis débiles y alteraciones en el antígeno-O de *S. meliloti* impiden establecerse crónicamente en la planta. También en rizobacterias, los C $\beta$ G participan en la interacción con el hospedador: mutantes de síntesis de C $\beta$ G en *M. loti* producen nódulos pequeños y vacíos, y los nódulos de *B. japonicum* defectivos en C $\beta$ G no fijan  $\text{N}_2$ . También es necesaria la presencia del esfingolípido PC en la membrana externa de *B. japonicum* para establecerse en su respectivo hospedador, al igual que sucede en *Brucella* [171]. Otros ejemplos de conservación de factores de virulencia son el Sistema de Secreción Tipo-III de *Rhizobium* NGR234, involucrado en simbiosis, el cual es análogo al flagelo de *Brucella*, involucrado en virulencia [68]. Como en la

infección de *Brucella*, donde la alarmona ppGpp es necesaria para una infección normal, en *Rhizobium etli* es necesaria para una simbiosis efectiva [172]. Por último, datos de nuestro laboratorio aún no publicados, confirman que la proteína LOV-HK de *R. leguminosarum*, al igual que en *Brucella*, estaría sensando la luz azul y preparando a la bacteria para la infección.

Es importante destacar nuevamente que *R. leguminosarum*, al igual que otros *Rhizobiales*, posee la particularidad de tener dos genes *ribH* en su genoma, conservando en cierto grado la sintonía, donde ambos muestran elementos regulatorios y genes vecinos parcialmente conservados con *Brucella* [128].

## Objetivos

## Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis de doctorado es estudiar el metabolismo de flavinas de *Brucella abortus*, y determinar si las flavinas o sus actores enzimáticos están involucrados, de forma directa o indirecta, en la virulencia de la bacteria y en su interacción con su hospedador.

## Objetivos particulares

- Analizar que enzimas componen la ruta metabólica de las flavinas en *B. abortus* y confirmar la expresión de las mismas.
- Confirmar si los dos genes *ribH* de *B. abortus* codifican para isoenzimas con actividad lumazina sintasa (LS) *in vivo*.
- Determinar si la unión de RibH2 a riboflavina es importante para su función biológica por medio de la obtención y estudio de una RibH2 mutante incapaz de unir la vitamina.
- Estudiar que otras posibles funciones biológicas puede tener RibH2 explorando las proteínas de *Brucella* que interaccionan con ella.
- Determinar si *B. abortus* posee actividades de transporte de flavinas por medio de la obtención y estudio de una cepa mutante auxótrofa para riboflavina.
- Analizar si el putativo riboswitch FMN que regula RibH2 lo hace transcripcional o traduccionalmente.
- Determinar si los genes RibH están involucrados en la virulencia de *B. abortus*.
- Evaluar si la función LS de RibH2 es relevante para la infección de *B. abortus*.
- Estudiar si es necesaria la síntesis de riboflavina durante la infección de *B. abortus*.
- Investigar si el metabolismo de flavinas o RibH2, juegan un papel en la infección de otros *Rhizobiales*.



## **Materiales & Métodos**

En esta Tesis se describen muchos experimentos llevados a cabo con el patógeno *Brucella abortus*. Este microorganismo está clasificado dentro del grupo de patógenos de Bioseguridad de nivel 3, por lo que toda manipulación de estas especies debe realizarse con los más estrictos controles de bioseguridad. En el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires, Fundación Instituto Leloir (FIL), se cuenta con el equipamiento básico necesario para estas tareas. Asimismo, todos los procedimientos operacionales que se desarrollan en las áreas de bioseguridad han sido evaluados y aprobados por una comisión de bioseguridad y los investigadores que trabajan en estas áreas han sido entrenados para tal fin. Todos los experimentos que excedían las capacidades del área de Bioseguridad de la FIL, por ejemplo las infecciones en animales, fueron llevados a cabo en el laboratorio BSL-3 del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la UNSAM.

## Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Tabla M-1. Cepas bacterianas utilizadas durante la Tesis.

Cepas	Parental	Características	Resistencias			Ref.-
<b><i>B. abortus</i> 2308</b>						
WT		cepa salvaje, lisa, virulenta	Nal			Stock de laboratorio
WT + pGFP	2308		Nal	Km		Esta Tesis
WT + pVHH	2308		Nal	Amp		Esta Tesis
WT + pREP	2308		Nal	Amp	Gm	Esta Tesis
$\mu$ ribH1	2308	2308, deleción sin marcar de <i>ribH1</i> , $\Delta$ <i>ribH1</i>	Nal			Esta Tesis
$\mu$ ribH1 + p <i>ribH1</i> Km	$\mu$ ribH1		Nal	Km		Esta Tesis
$\mu$ ribH1 + pVHH	$\mu$ ribH1		Nal	Amp		Esta Tesis
$\mu$ ribH2	2308	inserción del cassette acc(3)-I cassette en <i>ribH2</i> ( <i>ribH2</i> ::Gm <sup>r</sup> )	Nal		Gm	Esta Tesis
$\mu$ ribH2 + p <i>ribH1</i>	$\mu$ ribH2		Nal	Amp	Gm	Esta Tesis
$\mu$ ribH2 + p <i>ribH2</i>	$\mu$ ribH2		Nal	Amp		Esta Tesis
$\mu$ ribH2 + p <i>ribH2</i> _W22A	$\mu$ ribH2		Nal	Amp	Gm	Esta Tesis
$\mu$ ribH2 + pLS	$\mu$ ribH2		Nal	Cm	Gm	Esta Tesis
$\mu$ ribH2 + pGFP	$\mu$ ribH2		Nal	Km	Gm	Esta Tesis
doble $\mu$ ribH	$\mu$ ribH1 + p <i>ribH1</i> Km	$\Delta$ <i>ribH1</i> , <i>ribH2</i> ::Gm <sup>r</sup>	Nal	Amp		Esta Tesis
doble $\mu$ ribH + p <i>ribH1</i>	doble $\mu$ ribH + p <i>ribH1</i> Km		Nal	Amp		Esta Tesis
doble $\mu$ ribH + p <i>ribH2</i>	doble $\mu$ ribH + p <i>ribH1</i> Km		Nal	Amp		Esta Tesis
doble $\mu$ ribH + p <i>ribH2</i> _W22A	doble $\mu$ ribH + p <i>ribH1</i> Km		Nal	Amp		Esta Tesis
doble $\mu$ ribH + pLS_sce	doble $\mu$ ribH + p <i>ribH1</i> Km		Nal	Amp		Esta Tesis
doble $\mu$ ribH + pRRT	doble $\mu$ ribH		Nal	Cm	Gm	Esta Tesis
<b><i>R. leguminosarum</i> 3841</b>						
Rle			Str			Stock de laboratorio
Rle + p <i>ribH2</i> _rle	Rle 3841		Str			Esta Tesis
Rle + pBBR1_LS_sce	Rle 3841		Str			Esta Tesis
<b><i>E. coli</i></b>						
DH5 $\alpha$		F- $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\lambda$ -				Invitrogen
BL21-DE3		F- <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> , m <sub>B</sub> ) <i>gal dcm rne131</i>				Invitrogen
TG-1		$\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) $\Delta$ ( <i>mcrB-hsdSM</i> )5 (r <sub>k</sub> , m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) <i>thi-1 supE</i> [F' <i>traD36 proAB lacIqZ</i> $\Delta$ M15]				Stratagene
S17-1		<i>recA pro hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	Str			[173]
S17 + p <i>ribH1</i> Km	S17-1		Str	Km		Esta Tesis
S17 + p <i>ribH1</i>	S17-1		Str	Amp		Esta Tesis
S17 + p <i>ribH2</i>	S17-1		Str	Amp		Esta Tesis
S17 + p <i>ribH2</i> _W22A	S17-1		Str	Amp		Esta Tesis
S17 + pLS_sce	S17-1		Str	Amp		Esta Tesis
S17 + pBBR4	S17-1		Str	Amp		Esta Tesis
S17 + pVHH	S17-1		Str	Amp		Esta Tesis
S17 + pGFP	S17-1		Str	Amp		Esta Tesis
S17 + pRRT	S17-1		Str	Cm		Esta Tesis

Tabla M-2. Plásmidos utilizados durante la Tesis.

Nombre	Vector	Características	Resistencias	Referencia
pBBR1	pBBR1MCS-1	pBBR1MCS-4 Vector de amplio rango de hospedador	Cm	[174]
pBBR2	pBBR1MCS-2	pBBR1MCS-2 Vector de amplio rango de hospedador	Km	[174]
pBBR4	pBBR1MCS-4	pBBR1MCS-4 Vector de amplio rango de hospedador	Amp	[174]
pGEM-T $ribH2$	pGEM-T Easy	0,9 Kbp EcoRI fragmento conteniendo a $ribH2$	Amp	Esta Tesis
$pribH1$	pBBR1MCS-4	1 Kbp EcoRI fragmento conteniendo a $ribH1$	Amp	Esta Tesis
$pribH1Km$	pBBR1MCS-2	1 Kbp EcoRI fragmento conteniendo a $ribH1$	Km	Esta Tesis
$pribH2$	pBBR1MCS-4	0,9 kb EcoRI fragmento conteniendo a $ribH2$	Amp	Esta Tesis
$pribH2\_W22A$	pBBR1MCS-4	gen de $ribH2$ de la mutante W22A	Amp	Esta Tesis
pLS_sce	pBBR1MCS-4	gen RIB4 de <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Amp	Esta Tesis
pGFP	pBBR1MCS-2	gfp-mut3	Km	Comerci, D.
pBluescript II KS	pBluescript II KS	Plásmido comercial	Amp	Stratagene
pGEM-T Easy	pGEM-T Easy	Plásmido comercial	Amp	Promega
pBlueIIKSsacB $\Delta ribH1$	pBluescript II KS	Alelo para delección $\Delta ribH1$ y gen $sacB$ de <i>Bacillus subtilis</i> para selección negativa	Amp	Esta Tesis
pGEM-T $ribH2::Gm^r$	pGEM-T Easy	Alelo para interrupción $ribH2::Gm^r$	Amp Gm	Esta Tesis
$pribH2\_rle$	pBBR1MCS-1	fragmento de 0,9 kb conteniendo a $ribH2$ de <i>Rhizobium leguminosarum</i>	Cm	Esta Tesis
pBBR1_LS_sce	pBBR1MCS-1	gen RIB4 de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , clonado en pBBR1MCS-1	Cm	Esta Tesis
pREP	pBBR1-MCS-4	275 pb de la región río arriba de $ribH2$ fusionada transcripcionalmente a $lacZ$	Amp Gm	Esta Tesis
pRRT	pBBR1-MCS-1	ORF RL1692 correspondiente al transportador de flavinas RRT de <i>Rhizobium</i>	Cm	Esta Tesis
pVHH	pBBR1-MCS-4	fragmento conteniendo VHH $\alpha$ RibH2 fusionado a MBP	Amp	Esta Tesis

Tabla M-3. Oligonucleótidos utilizados durante la Tesis.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	ER	Referencia
ribH1_Fwd_1	CGGGATCCGCGCCTTTCATCGCGCAGAA	BamHI	Esta Tesis
ribH1_Rev_1	TCCAGACTGCTACGTATCGCCTTGGACATGAGAACTCCAT		Esta Tesis
ribH1_Fwd_2	GCGATACGTAGCAGTCTGGACGCAAAAAATTCGGAGCCTGA		Esta Tesis
ribH1_Rev_2	GGA <u>CTAGT</u> CGCGACAGCGGCCAGTCTTC	SpeI	Esta Tesis
ribH1_Flank_Fwd	CCATATCGCAAGCGAATTC		Esta Tesis
ribH1_Flank_Rev	ACTGCCATTCCCATTTC		Esta Tesis
ribH2_Fwd	GGAGAATGCGTGATAAATTCAA		Esta Tesis
ribH2_Rev	TCAGACAAGCGCGGCAT		Esta Tesis
ribH2_Flank_Fwd	GGAGAATGCGTGATAAATTCAA		Esta Tesis
ribH2_Flank_Rev	TCAGACAAGCGCGGCAT		Esta Tesis
LS_sce_Fwd	ATTA <u>CTCGAGATGCATCACCATCACCATCAGTCAGTTAAAG</u> GATTAGGCAAAC	XhoI	Esta Tesis
LS_sce_Rev	CGATTCTAGATCAAAAAGCATTTTTACCGAAC	XbaI	Esta Tesis
W22A_Fwd	ATTCAGGCCCGCGCCACGCCGACATC		Esta Tesis
ribH2_Fwd_2	TTAAGGATCCATGGCTAGCAACCAAAGC	BamHI	Esta Tesis
ribH2_Rev_2	ATTAGGATCCGCTAGCTCAGACAAGCG	BamHI	Esta Tesis
rrt_Fwd	AATAGGATCCGATTCTAGA <u>ACTAGT</u> GCAACGTGCCGAAATTCA CGC	Clal XbaI SpeI	Esta Tesis
rrt_Rev	TTGGATCCTGACGTCTTCGTCGCGCTCATTTTC	BamHI	Esta Tesis
prom_ribH2_Fwd	TA <u>GGATCC</u> GATAGTTTCCGCGTGCTCG	BamHI	Esta Tesis
prom_ribH2_Rev	TA <u>AAGCTT</u> AGGTTCTCACGAACTAGAAT	HindIII	Esta Tesis
ribH2_rle_Fwd	CATCTAGACCGCGTAGGGAGTCCTGATG	XbaI	Esta Tesis
ribH2_rle_Rev	TGA <u>AAGCTT</u> TAAGAATGGCGATACATGTC	HindIII	Esta Tesis
Phage_Fwd	TATCTGGTGGCGTAACACCTGCT		[175]
Phage_Rev	GATCGTCACCCTCGGATCCCTAGG		[175]
IF_Fwd	GCCAGGTGGCCATAGACC		Martin, F.
IF_Rev	CACTCAAAGCCTGCATAGAC		Martin, F.
ribH1_RT_Fwd	ACGGTCGAGAATGAAGAGCA		Esta Tesis
ribH1_RT_Rev	GCAGGCCGATCATAGTCAAT		Esta Tesis
ribH2_RT_Fwd	TGCAGGTGCAGCTTGAAC		Esta Tesis
ribH2_RT_Rev	TGAGCATGGAAGAAGTCGTG		Esta Tesis
RibD_RT_Fwd	GAAAAGGCTTTGCCATTCTG		Esta Tesis
RibD_RT_Rev	ATTCAGATAGCCCGCAAGGT		Esta Tesis
GTPasa_RT_Fwd	GAACGATGTTTTCGGCAAG		Esta Tesis
GTPasa_RT_Rev	GGAGCCTTCACGCAGATAGA		Esta Tesis
HADasa_RT_Fwd	GGACGGCACGATATTGAGTT		Esta Tesis
HADasa_RT_Rev	AATGGTCGGCAGGAATGTC		Esta Tesis
ribE_RT_Fwd	GGCTGACCACAATCTCCAGT		Esta Tesis
ribE_RT_Rev	TGGCCGAAAACAAGATGAC		Esta Tesis
ribC/F_RT_Fwd	AAGTCTCAAGCACGGCATT		Esta Tesis
ribC/F_RT_Rev	GTCGTCCACTGTGGGTCTTC		Esta Tesis
bluB_RT_Fwd	AATGATTATCCGCGTTTTGC		Esta Tesis
bluB_RT_Rev	AGGCTTAACCAGATCGAGCA		Esta Tesis
cobT_RT_Fwd	GCCATCGATCATTGCATGT		Esta Tesis
cobT_RT_Rev	GCATTCCAAGGTCAAGAAGC		Esta Tesis
cobS_RT_Fwd	CAGACTGTGCATGGCAAAAA		Esta Tesis
cobS_RT_Rev	GGCCATGACAAGTCCGATAA		Esta Tesis
sacB_Fwd	GGCTACCACATCGTCTTTGC		Rigano, L.
sacB_Rev	CCTTTCGCTTGAGGTACAGC		Rigano, L.
T7	TAATACGACTCACTATAGGG		
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG		
SP6	TACGATTTAGGTGACACTATAG		
T3	AATTAACCCTCACTAAAGG		
M13_Fwd	GTA AAAACGACGGCCAGTG		
M13_Rev	AGCGGATAACAATTTACAC		

## Líneas celulares

Tabla M-4. Líneas celulares utilizadas durante la Tesis.

Nombre	Características básicas
J774.A1	Línea celular macrófaga derivada de <i>Mus musculus</i> , adherente (ATCC, TIB-67)
HeLa	Línea celular epitelial derivada de <i>Homo sapiens</i> , adherente (ATCC, HTB-54)

Para los ensayos de infección se utilizaron células HeLa (ATCC) y la línea derivada de macrófagos murinos J774.A1 (ATCC). Las células HeLa se cultivaron en medio DMEM (*Gibco Invitrogen Cell Culture*) suplementado con 2 mM glutamina (*Sigma-Aldrich*), 10% de suero fetal bovino (SFB, *Natocor Argentina*) en presencia de 100 µg/ml de penicilina y estreptomina. Los macrófagos J774.A1 se cultivaron en medio RPMI 1640 (*Gibco Invitrogen Cell Culture*) suplementado con 2 mM glutamina, 10% de SFB y 100 µg/ml de penicilina y estreptomina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub>. Para el mantenimiento las células se utilizaron botellas de 25 o 75 cm<sup>3</sup>. Todos los ensayos de infección con las diferentes cepas de *B. suis* se realizaron con células entre el pasaje 4 y 12 contados partir del descongelado de un stock mantenido en nitrógeno líquido.

## Medios y condiciones de cultivo

Todas las cepas vivas de *Brucella* fueron manipuladas en un BSL-3 en la Universidad de San Martín o en el laboratorio de Bioseguridad de la Fundación Instituto Leloir. Las cepas de *Brucella abortus* se crecieron en caldos trípticos de soja (*Tryptic Soy Broth*, *TSB*, *BD*), y trípticos de soja-agar (*Tryptic Soy Agar*, *TSA*, *BD*) o medio mínimo Gerhardt-Wilson a 37°C en un agitador rotativo (250 rpm) o en estufa para placas [176]. Las cepas de *Escherichia coli* fueron crecidas en caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C en agitador rotatorio (250 rpm). Las cepas de *Rhizobium leguminosarum* fueron crecidas en medio TY a 28°C en agitador rotatorio (250 rpm).

Cuando fue necesario, se agregó riboflavina (*Sigma*) y se calentó a ebullición por 5 minutos tanto los medios sólidos como los medios líquidos. Esto es porque la riboflavina es muy insoluble a temperatura ambiente, calentando es posible sobresaturar la solución de manera estable. Nos dimos cuenta de esto después de los intentos de mutagénesis para generar una cepa auxótrofa de riboflavina. De haber confeccionado los medios con concentraciones de 500 µM riboflavina, se hubiera podido obtener la cepa doble mutante  $\mu$ *ribH* sin la necesidad de la presencia de una copia plasmídica de *ribH1* previo a la mutagénesis.

Al prepara medios mínimos con riboflavina, el agregado de riboflavina y la posterior ebullición, se realiza antes del agregado de compuestos termosensibles. Se prepararon stocks concentrados en el orden mM de FMN (*Sigma*), FAD (*Sigma*) o lumazina (provista por Adelbert Bacher) a T°C amb esterilizándolos por filtración con Millipore 0,22 µm, para adicionar a los diferentes medios.

Cuando fue necesario, se utilizaron antibióticos a las siguientes concentraciones finales:

**Tabla M-5. Antibióticos y concentraciones finales utilizadas en los medios de cultivo.**

<b>Antibiótico (µg/ml)</b>	<b>Abreviación</b>	<b><i>B. abortus</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>R. leguminosarum</i></b>
Kanamicina	Km	50	50	-
Gentamicina	Gm	4	20	-
Ampicilina	Amp	50	100	-
Carbenicilina	Cb	50	-	-
Ácido nalidíxico	Nal	5	-	-
Cloranfenicol	Cm	25	25	10
Estreptomina	Str	-	25	200

## Amplificación por PCR

En todos los casos las reacciones de PCR fueron realizadas en microtubos de pared delgada de 0,2 ml. Para la amplificación de ADN donde los errores de la secuencia no era de crucial, se empleó la enzima *Taq pol* (sin *proof reading*).

**La composición de la mezcla de reacción por tubo fue la siguiente:**

<u>Componente:</u>	<u>Volumen:</u>
Buffer 10X libre de Mg <sup>2+</sup>	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1-2 µl
dNTPs (40 mM)	1 µl
Primer 1* (10 µM)	2,5 µl
Primer 2 * (10 µM)	2,5 µl
<i>Taq pol</i>	0,25 µl
ADN molde	1- 6 µl
H <sub>2</sub> O (milliQ)	hasta 50 µl
Vol. final	50 µl

\* Variaron de acuerdo a la reacción

**Tiempos y temperaturas en una reacción estándar con *Taq pol*:**

Desnaturalización inicial:

94°C x 4 min

x 33 ciclos:

94°C x 30 seg  
 57°C x 30 seg  
 72°C x 20 seg  
Extensión final:  
 72°C x 7 min

Se empleó la polimerasa Platinum *Pfx* DNA Polymerase (*Invitrogen*) para la amplificación de ADN donde es importante que no ocurran mutaciones, como por ejemplo: el clonado de genes para complementaciones o expresiones heterólogas, y construcción de cassettes de mutagénesis.

Componente	Volumen	Concentración final
10X <i>Pfx</i> Buffer de amplificación	5-10 µl*	1X-2X
10 mM dNTP mix	1,5 µl	0,3 mM de c/u
50 mM MgSO <sub>4</sub>	1 µl	1 mM
Mezcla de <i>primers</i> (10 µM c/u)	1,5 µl	0,3 µM de c/u
ADN molde (10 pg -200 ng)	≥1 µl	de acuerdo a lo necesario
Platinum <i>Pfx</i> ADN Polymerasa	0,4 µl	1 unidad
H <sub>2</sub> O (milliQ)	hasta 50 µl	

\*Se utiliza 5 µl del buffer (1X concentración final) como condición inicial

#### Tiempos y temperaturas en una reacción estándar con *Pfx*:

##### Desnaturalización inicial:

94°C x 2-5 minutos. Más de 5 min puede aumentar mucho la amplificación inespecífica.

##### x 25-35 ciclos por amplificación de PCR: Ciclo de 3 pasos

94°C x 15 sec  
 55°C x 30 sec  
 68°C x 1 min x kb

## Colony-PCR

#### Se preparó ADN total molde proveniente de colonias bacterianas:

1. Usando escarbadientes o tips estériles se picaron las colonias de los clones de interés. De ser necesario los clones se repicaron en una nueva placa.
2. Luego se las se resuspendió en 20-50 µl en un tubos de 1,5 ml en H<sub>2</sub>O milliQ estéril y se la incubó a 94° C durante 10 min
3. Finalmente se centrifugó esos tubos a 13.000 rpm x 30 seg
4. 3-5 µl del sobrenadante fueron utilizados en la reacción de amplificación (de la forma antes descripta).



**También se empleó como molde parte de las colonias bacterianas:**

1. Luego de ser repicados de ser necesario
2. Son directamente resuspendidos en la mezcla de reacción en los tubos de PCR.

## RT-PCR

Se utilizó esta técnica para amplificar secuencias correspondientes a secuencias de ARN. Consistió en purificar ARN, degradar el ADN genómico y sintetizar ADNc (ADN copia) por medio de la retro transcripción (RT). A continuación se detallan los pasos del protocolo:

**Purificación de ARN** (modificado a partir de QUIAGEN RNeasy Mini Kit Cat. No. 74106)

Este protocolo se empleó para la obtención de ARN de la cepa *B. abortus* 2308. Se adaptaron los procedimientos aconsejados por los manuales del *kit*.

1. Se centrifugaron 0,5 ml de cultivo (5000 rpm x 5 min).

Lisis:

2. Se resuspendió el *pellet* en:
3. + 84  $\mu$ l TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8)
4. + 15  $\mu$ l SDS 10%
5. + 1  $\mu$ l proteinasa K 10  $\mu$ g/ $\mu$ l
6. 37°C x 1 h.
7. + 600  $\mu$ l RLT
8. + 6  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol

Retención en la columna:

9. + 700  $\mu$ l EtOH 75% en H<sub>2</sub>O DEPC
10. Se mezcló por pipeteo.
11. 700  $\mu$ l a la columna RNeasy *spin column*.
12. 10.000 rpm por 30 seg
13. Se descartó el eluído.

Lavados:

14. + 500  $\mu$ l RW1
15. 10.000 rpm x 30 seg
16. Se descartó el eluído.
17. + 500  $\mu$ l RPE
18. 10.000 rpm x 30 seg
19. Se descartó el eluído.
20. + 500  $\mu$ l RPE

21. 10.000 rpm x 30 seg
22. Se descartó el eluído.
23. 10.000 rpm x 30 seg
24. Se descartó el eluído.

Elución

25. + 30 µl H<sub>2</sub>O DEPC
26. 10.000 rpm x 60 seg

Visualización:

4 µl en gel de agarosa 1% (se incubó a 65°C x 5 min antes de sembrar).

**Degradación de ADN genómico** (*Promega RQ1 ARNse-Free DNase Part No. M610A*)

Se emplearon 2 µg de ARN

27. + 1 µl RQ1 ARNse-Free DNase 10X Reaction Buffer
28. + 1 µl RQ1 ARNse-Free DNase
29. + hasta 10 µl H<sub>2</sub>O DEPC
30. 37°C x 3 h
31. + 1µl RQ1 DNase Stop Solution
32. Se incubó a 65°C x 10 min para inactivar la DNasa.

**Síntesis de ADNc** (*SuperScript III de síntesis de ADNc para RT-PCR Cat. No: 18080-051*)

Se partió de 1 µg de ARN tratado con RQ1 DNase.

33. + 1 µl 50 ng/µl *random hexamers*
34. + 1 µl 10 mM dNTPs
35. + hasta 10 µl H<sub>2</sub>O DEPC
36. 65°C x 5 min
37. Hielo x 1 min
38. + 2 µl 10X RT *buffer*
39. + 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
40. + 2 µl 0,1 M DTT
41. + 1 µl ARNseOUT (40 U/µl)
42. + 1 µl SuperScript III RT (200 U/µl)
43. 25°C x 10 min
44. 50°C x 50 min
45. 85°C x 5 min
46. Hielo.

### Degradación del ARN

47. + 1 µl de RNAsaH.
48. 37°C x 20 min
49. Se puede conservar a -20°C.

### Misma reacción sin SuperScript III RT: control de contaminación de ADN genómico

Para la amplificar a las secuencias de ADNc correspondientes a los ARNm de los genes analizados en la sección de Resultados, se utilizaron los oligonucleótidos listados en la **Tabla M-3** con las siglas RT en su nombre.

#### Reacción de PCR

1 µl	ADNc
1 µl	10 µM oligo Fwd
1 µl	10 µM oligo Rev
0,25 µl	10X Buffer
0,5 µl	50 mM MgCl <sub>2</sub>
0,5 µl	10 mM dNTPs
Hasta	25 µl con H <sub>2</sub> O

#### Tiempos y temperaturas de termociclador

##### Desnaturalización inicial:

94°C x 4 min

##### x 33 ciclos:

94°C x 30 seg

57°C x 30 seg

72°C x 20 seg

##### Extensión final:

72°C x 7 min

Visualización: 4 µl en gel de agarosa 1,5%

## Electroforesis en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN y ARN obtenidos por restricción, amplificación o extracción (ARN, ADN genómico o plasmídico) fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa, entre 0,8% y 2% (p/v) conteniendo 1-2 µg/ml de Bromuro de Etidio. Las imágenes de los geles fueron adquiridas mediante un sistema de transiluminación UV y adquisición digital Bio-Rad.

## Secuenciación de ADN y análisis de secuencia

En todos los casos, las muestras se secuenciaron con los *kits Big Dye Terminator Chemistry* (v1.0) de *Applied Biosystems*, en un secuenciador *ABI 377*. Para el análisis informático de los cromatogramas se empleó el programa *Chromas Lite*, versión 2.0 de *Technelysium Pty Ltd*.

## Electroforesis de proteínas

Las muestras fueron resuspendidas en buffer de siembra con  $\beta$ -mercaptoetanol o DTT y calentadas a 100°C x 5 min. Luego fueron sometidas a SDS-PAGE o electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida 15% con SDS (condiciones desnaturalizantes). Las proteínas fueron teñidas sometiendo a los genes a una solución con *coomassie brilliant blue* R-250 0,25% (p/v) en metanol: ácido acético: H<sub>2</sub>O (40:10:30). La decoloración se llevó a cabo mediante el lavado con metanol 50% (v/v) y ácido acético 12% (v/v).

## Western Blots

Los Western Blots se realizaron por transferencia electroforética en cuba (*Bio-Rad*) de geles SDS-PAGE a membranas de nitrocelulosa *Immobilon-NC Transfer Membranes* (*Millipore*). El bloqueo se realizó empleando PBS 3% leche (*Molico*) descremada, los anticuerpos fueron diluidos PBS 1% leche. Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: monoclonal anti-RibH2 (Bi24), monoclonal anti-MBP (*Abcam*) o un antisuero policlonal anti-RibH1 hecho en conejo. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron un anti-IgG de ratón (específico de Fc) o un anti-IgG de conejo (molécula completa) producidos en cabra y conjugado a peroxidada (*Sigma*). Para el revelado se utilizó el *kit* quimioluminiscente *ECL Plus Western Blotting Detection System* (*Amersham Biosciences*) y el sistema de imágenes y detección *Storm 860* (*Molecular Dynamics*).

## Construcción de plásmidos

**pribH1Km y pribH1:** Un fragmento de PCR de 1 kb conteniendo el gen *ribH1* se clonó primero en un vector pGem-T-Easy y luego se escindió y ligó en el sitio EcoRI del vector pBBR1 y pBBR4 para generar a *pribH1Km* y *pribH1* respectivamente, donde *ribH1* se encuentra en el mismo sentido y bajo el control del promotor *plac* residente de los plásmidos.

**pribH2:** Un fragmento de 0,9 kb digerido con EcoRI conteniendo el gen de *ribH2* y su región reguladora se escindió de pGem-T-*ribH2* y se ligó en el sitio EcoRI del pBBR4 para generar a *pribH2*.

**pLS\_sce y pBBR1\_LS\_sce:** El ORF YOL143C (RIB4) fue amplificado utilizando los oligonucleótidos LS\_sce\_Fwd y LS\_sce\_Rev a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae*. El producto de PCR resultante de 0,6 kb fue purificado y digerido con las enzimas de restricción

XhoI y XbaI, y luego ligado en pBBR4 y pBBR1 digerido con las mismas enzimas de restricción. Los plásmidos resultantes se denominaron pLS\_sce y pBBR1\_LS\_sce.

**pribH2\_W22A:** La mutación de *ribH2\_W22A* se generó empleando los oligonucleótidos ribH2\_W22A y ribH2\_Rev\_2 para amplificar un fragmento del gen *ribH2* con la mutación, después el producto de PCR se purificó y se usó como “megaprimer” para una segunda ronda de amplificación empleando el oligonucleótido ribH2\_Fwd\_2. El producto de PCR resultante se purificó y digirió con BamHI y se ligó con pBBR4 digerido con la misma enzima de restricción. El plásmido resultante se llamó *pribH2\_W22A*

**pribH2\_rle:** Se amplificó un fragmento de 0,9 kb conteniendo a *ribH2* y a su zona regulatorio de *R. leguminosarum* empleando los oligonucleótidos ribH2\_rle\_Fwd y ribH2\_rle\_Rev. Luego, el amplicón se digirió con las enzimas XbaI y HindIII, se ligó en el vector pBBR1 digerido con las mismas enzimas, dando origen a *pribH2\_rle*

**pVHH:** Se obtuvo la construcción HindIII-MBP-Sfil-VHH $\alpha$ RibH2-EcoRI en el plásmido pAB1 y luego se subclonó en el plásmido pBBR4 en los sitios HindIII y EcoRI obteniéndose pVHH. El fragmento MBP tiene en su extremo C-terminal el antígeno pmaIE reconocido por el anticuerpo anti-MBP. El VHH tiene en su extremo C-terminal el antígeno 6xHis-*tag* reconocido por el anticuerpo anti-his *tag*. Se realizaron Western Blots con estos anticuerpos para confirmar que la construcción se expresa correctamente en las cepas *B. abortus* 2308 y  $\mu$ *ribH1* transformadas con pVHH.

**pRRT:** El fragmento de RL1692 completo con su región reguladora se amplificó con los oligonucleótidos rrt\_Fwd y rrt\_Rev. El amplicón de 1,46 kb se clonó en pGem-T Easy, después se subclonó en pBBR1 en los sitios XbaI y BamHI para dar origen pRRT.

**pREP:** 275 pb de la región intergénica ubicada río arriba del gen *ribH2* fueron amplificados empleando los oligonucleótidos prom\_ribH2\_Fwd y prom\_ribH2\_Rev. El producto de PCR fue digerido con las enzimas BamHI y HindIII y clonado en vector pBluescript II KS, digerido con las mismas enzimas para dar lugar al vector pBlues

*ribH2*

. Luego un fragmento de 4,5 kb conteniendo al gen reportero *lacZ* producto de la digestión del plásmido pAB2001 con las enzimas KpnI y XhoI fue clonado en el vector pBlues

*ribH2*

 digerido con las mismas enzimas para dar lugar a pBlues

*ribH2*

\_lacZ. Finalmente, se escindió la fusión de 4,8 kb de pBlues

*ribH2*

\_lacZ digiriendo con las enzimas KpnI y XbaI.

## Conjugación biparental

La cepa donora *E. coli* S17-1 [173] fue transformada con los plásmidos de la serie pBBR1MCS: *pribH1*Km, *pribH1*, *pribH2*, *pribH2\_W22A*, pLS\_sce, pBBR4, pVHH, pREP y pRRT generando las cepas S17 + *pribH1*Km, S17 + *pribH1*, S17 + *pribH2*, S17 + *pribH2\_W22A*, S17 + pLS\_sce, S17 + pBBR4, S17 + pVHH, S17 + pREP y S17 + pRRT. Las diferentes cepas S17-1 y *B. abortus* se cultivaron separadamente, las células fueron cosechadas después de la fase de crecimiento exponencial, se centrifugó 1 ml de cultivo de cada cepa, se resuspendió en 1 ml de TSB, se centrifugó de nuevo y se resuspendió en el líquido residual. Los *pellets* bacterianos se mezclaron y plaquearon juntos en una misma gota en una placa de TSA sin antibióticos. Las placas fueron incubadas a 37°C ON, después la mezcla fue plaqueada en placas TSA-Nal, para seleccionar *Brucella*, y el antibiótico adecuado para seleccionar a las exconjugantes de acuerdo a la resistencia plasmídica.

## Construcción de las cepas mutantes en *B. abortus*

### Obtención de la cepa mutante $\mu$ *ribH1*

Se optó por hacer la mutante del gen *ribH1* (BAB1\_0791) delecionando el ORF ya que éste está ubicado en un operón y una deleción genera una mutación no polar dejando el resto del operón intacto.

Para la construcción de la mutante por deleción cromosomal del gen *ribH1*, dos fragmentos de PCR se generaron a partir de las regiones adyacentes a este ORF. Los oligonucleótidos *ribH1\_Fwd\_1* y *ribH1\_Rev\_1* se utilizaron para amplificar un fragmento de 0,3 kb incluyendo los codones 1-7 y los oligonucleótidos *ribH1\_Fwd\_2* y *ribH1\_Rev\_2* se utilizaron para amplificar un fragmento de 0,3 kb incluyendo los codones 150-157 de *ribH1*. Ambos fragmentos, los cuales contenían regiones complementarias, fueron ligados por medio de PCR de superposición utilizando los oligonucleótidos *ribH1\_Fwd\_1* y *ribH1\_Rev\_2*. El fragmento resultante que contiene el alelo delecionado de *ribH1* se clonó en el plásmido pBluescript II KS (*Stratagene*) donde el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* está clonado en el sitio PstI, para generar pBluescript II KS *sacB*Δ*ribH1*. El gen *sacB* codifica para la levansucrasa que induce letalidad frente a la exposición a 5-10% (p/v) sacarosa en el medio de cultivo. El plásmido se introdujo en *B. abortus* 2308 por medio de electroporación. El primer evento de recombinación (integración del vector suicida en el cromosoma) se seleccionó por resistencia a Cb en placas de TSA. Luego, clones individuales se cultivaron durante la noche en TSB en ausencia de antibióticos para promover la recombinación. El segundo evento de recombinación, la escisión del plásmido y la generación de la cepa mutante por intercambio alélico, se seleccionó por sensibilidad a Cb y

resistencia a 10% (w/v) sacarosa en placas de TSA. Las colonias obtenidas se exploraron por medio de *colony*-PCR utilizando los oligonucleótidos *ribH1\_Flank\_Fwd* y *ribH1\_Flank\_Rev* que amplifican un fragmento de 1,8 kb en la cepa mutante y un fragmento de 2,2 kb en la cepa salvaje y la mutación se confirmó secuenciando los productos de PCR (**Figura MM-1**). A su vez, se determinó la ausencia de gen *sacB* realizando *colony*-PCR, empleando los oligonucleótidos *sacB\_Fwd* y *sacB\_Rev*. Se determinó la ausencia de la expresión de RibH1 por medio de Western Blot (**Figura MM-2**). La cepa mutante con la delección limpia del gen *ribH1* se llamó  $\mu$ *ribH1*.

### **Obtención de la cepa mutante $\mu$ *ribH2***

La cepa mutante para el gen *ribH2* (BAB2\_0545) se generó por medio de una interrupción del ORF por medio de la inserción de un cassette de resistencia a gentamicina. Esto se decidió porque el uso de cassettes de resistencia a antibióticos facilita mucho la obtención de mutantes. Esta estrategia de interrupción génica porque este gen se encuentra aislado en el genoma y una inserción del cassette Gm<sup>r</sup> no afectaría a los genes aledaños.

El producto de PCR de 0,9 kb conteniendo el gen *ribH2* y su zona regulatoria se amplificó utilizando los oligonucleótidos *ribH2\_Fwd* y *ribH2\_Rev* y fue ligado en el vector pGem-T-Easy (*Promega*) para generar pGem-T*ribH2*. El plásmido se linealizó con HindIII y se generaron extremos romos utilizando la enzima *DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment (NEB)* según el protocolo. El pGem-T*ribH2* linealizado con extremos romos, se puso a ligar con un fragmento de 0,7 kb digerido con SmaI conteniendo el cassette *acc(3)-I* de resistencia a Gm, para generar pGem-T*ribH2::Gm<sup>r</sup>*. Este plásmido se electroporó en *B. abortus* 2308 donde es incapaz de replicación autónoma. Los eventos de recombinación homóloga se seleccionaron por resistencia a Gm y sensibilidad a Cb en placas de TSA. Las colonias obtenidas se exploraron por medio de *colony*-PCR utilizando los oligonucleótidos *ribH2\_Flank\_Fwd* y *ribH2\_Flank\_Rev* que amplifican un fragmento de 1,9 kb en la cepa mutante y un fragmento de 1,1 kb en la cepa salvaje y la mutación se confirmó secuenciando los productos de PCR (**Figura MM-1**). Se determinó la ausencia de la expresión de RibH2 por medio de Western Blot (**Figura MM-2**). La cepa mutante con la delección limpia del gen *ribH1* se denominó  $\mu$ *ribH1*.

### **Obtención de la cepa mutante cromosómica en los dos genes *ribH***

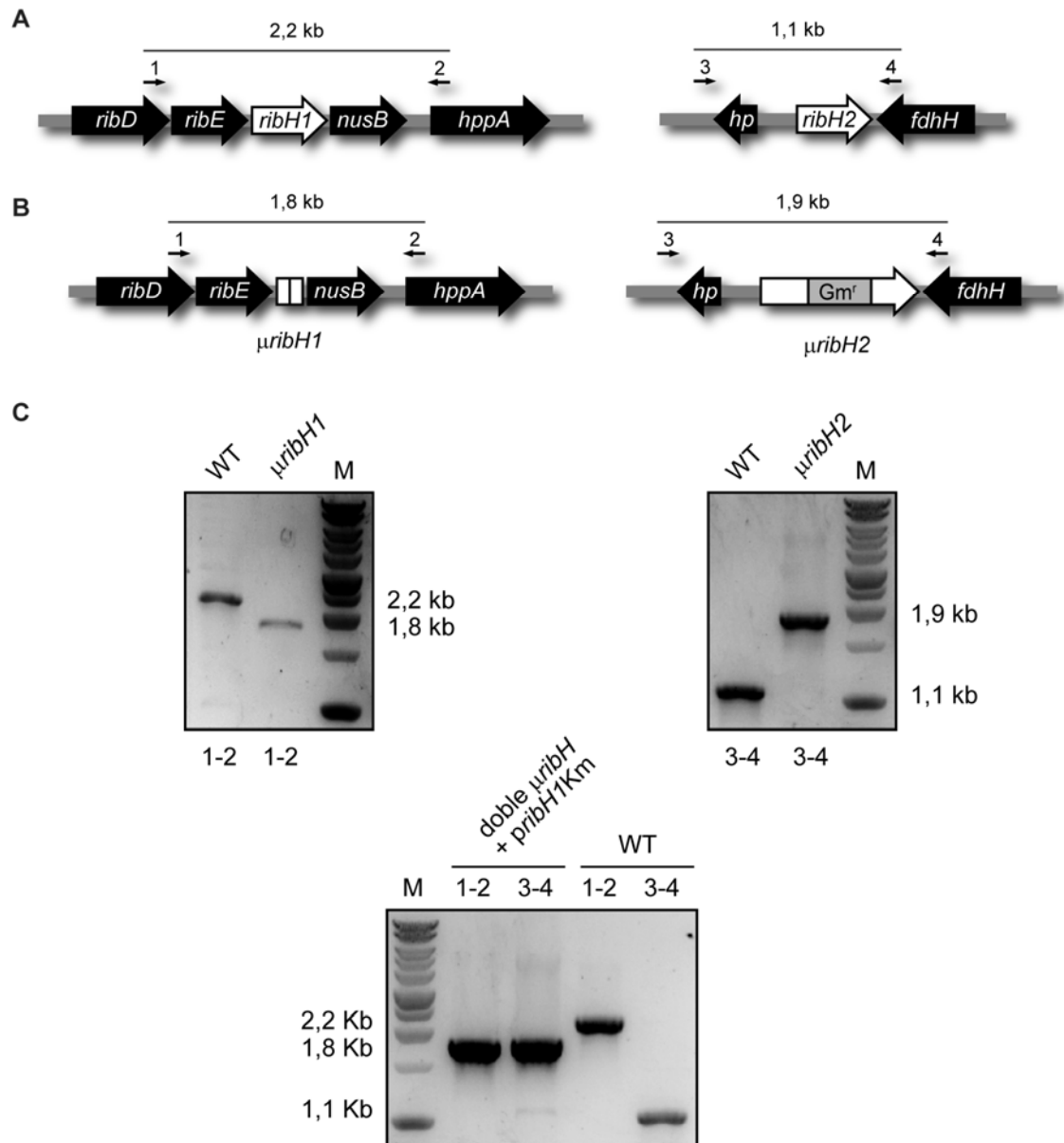
Obtener ambas mutantes simples *ribH* no presentó mayor dificultad. Al igual que la cepa WT, ninguna de las cepas mutantes presentó auxotrofia para riboflavina tanto para medio rico como para medio mínimo GW.

Se intentó generar una cepa doble mutante para los dos genes de *ribH* mutagenizando el gen *ribH2* en la cepa  $\mu$ *ribH1* y *vice versa*, mutagenizando el gen *ribH1* en la cepa  $\mu$ *ribH2*. Estos intentos se realizaron varias veces sin éxito. Como era razonable pensar que la doble mutación podría ser letal por la falta de síntesis de riboflavina, por no poseer el paso enzimático de LS en la ruta biosintética, se suplementó con riboflavina todos los medios sólidos y líquidos durante las mutagénesis. La vitamina sólida fue agregada a los medios para obtener 500  $\mu$ M concentración, similar a la reportada en algunos trabajos de la literatura [177,178,179]. Sin embargo, siendo la riboflavina muy poco soluble en medios acuosos no básicos aparecían cristales precipitados indicando la saturación de la solución y por ende la concentración real de riboflavina era considerablemente menor. A pesar del agregado de riboflavina no se pudo obtener la mutante doble  $\mu$ *ribH* de esta manera. Por ello se cambió de estrategia: asumiendo que la doble mutación era letal por lo anteriormente mencionado, se decidió mutagenizar a *ribH2* en la cepa  $\mu$ *ribH1* pero en presencia de copias extracromosomales del gen *ribH1* en un plásmido de expresión.

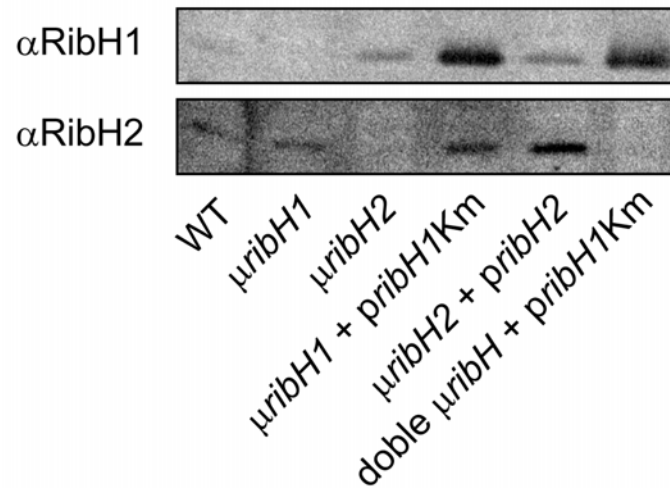
Para ello, se amplificó un por PCR un fragmento de 1 kb conteniendo al gen *ribH1*, se clonó en pGem-T-Easy, luego se escindió y ligó en el sitio EcoRI del vector pBBR2 [174] para generar *pribH1Km*. Este plásmido se introdujo por medio de conjugación biparental para generar la cepa  $\mu$ *ribH1* + *pribH1Km*. Luego el plásmido pGem-T*ribH2*::Gm fue utilizado para mutagenizar *ribH2* tal como fue descrito con anterioridad. La mutación en *ribH2* se confirmó por medio de *colony*-PCR usando oligonucleótidos *ribH2\_Flank\_Fwd* y *ribH2\_Flank\_Rev*, secuenciación del amplicón (**Figura MM-1**). Por medio de Western Blot se determinó la ausencia de la expresión de RibH2 (**Figura MM-2**). La cepa mutante obtenida se denominó doble  $\mu$ *ribH* + *pribH1Km*.

De esta forma fue obtenida una cepa mutante en ambos genes *ribH* cromosomales, pero a expensas de tener copias plasmídicas de *ribH1*. La obtención de una cepa doble  $\mu$ *ribH* sin *ribH1* plasmídica se obtuvo en el experimento de barajado de plásmidos.





**Figura MM-1. Obtención de las mutantes  $\mu$ *ribH1*,  $\mu$ *ribH2* y la doble mutante *ribH* cromosómica**  
**(A)** Esquema de los *loci* genómicos en *B. abortus* de los genes *ribH* con sus genes aledaños. En el cromosoma I se encuentra *ribH1* dentro del operón *rib* y en el cromosoma II se encuentra *ribH2* aislado. También se muestran los sitios de unión de los oligonucleótidos empleados para el *screening*: *ribH1*\_Flank\_Fwd (1), *ribH1*\_Flank\_Rev (2), *ribH2*\_Flank\_Fwd (3), *ribH2*\_Flank\_Rev (4). **(B)** Estrategias de mutación adoptados: delección de *ribH1* por su ubicación dentro de un operón e interrupción del gen *ribH2* por un cassette de resistencia a Gm. **(C)** Confirmación de las mutaciones en las cepas  $\mu$ *ribH1*,  $\mu$ *ribH2* y doble  $\mu$ *ribH*, por medio de *colony*-PCR utilizando los oligonucleótidos 1-2 y 3-4 que flanquean en el genoma a los genes *ribH1* y *ribH2*.



**Figura MM-2. Western Blots de las cepas mutantes y complementadas**

Western Blot revelado contra RibH1 y RibH2 de la cepa *B. abortus* 2308 (WT),  $\mu$ ribH1,  $\mu$ ribH2,  $\mu$ ribH1 +  $\mu$ ribH2 +  $\mu$ ribH1Km,  $\mu$ ribH2 +  $\mu$ ribH2 y doble  $\mu$ ribH +  $\mu$ ribH1Km.

## **Panning de la biblioteca de *display* en fagos**

El *panning* consiste en el enriquecimiento de una *library* de fagos presentadores de péptidos de *B. suis* con afinidad al ligando al que se lo enfrenta. En este caso el enriquecimiento se realizó enfrentando estos fagos RibH2. Para las eluciones se emplearon dos variantes: disminución drástica en el pH o competencia utilizando una solución del ligando diez veces más concentrada que la que se utilizó para inmovilizarlo.

### **Los pasos para realizar el *panning* fueron los siguientes:**

1. Se inmovilizó el ligando en los *wells* de una placa de 96 *wells* (*MaxiSorp*, *Nunc*) a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml en *buffer* carbonato de sodio 50 mM pH 9,7, se incubó por 1 h T°C amb.
2. Se enjuagaron los *wells* con PBS-T (*buffer* fosfato salino con 0,05% Tween 20), y se bloquearon con PBS-T BSA 0,1% durante 30 minutos.
3. Se lavaron con PBS-T y se agregaron 200  $\mu$ l de la biblioteca de fagos. Se permitió que el *panning* proceda durante cuatro horas a T°C am b. Como se utilizó BSA para bloquear, entonces esta misma proteína se agregó a la *library* antes de colocarla en los *wells*.
4. Se lavaron exhaustivamente los *wells* con PBS-T. (25-30 lavados).
5. Se eluyeron los fagos adheridos al ligando agregando 50 mM citrato de sodio con 150 mM cloruro de sodio pH 2 y dejando durante cinco minutos. Inmediatamente se retiró el líquido del *well* y se neutralizó el pH de esta solución adicionando 25  $\mu$ l de Tris pH 8, 2M. Alternativamente se realizaron eluciones por competencia, empleando una solución de RibH2 500  $\mu$ g/ml en PBS. En ambos casos se empleó el eluato obtenido para realizar las infecciones subsiguientes.

6. En las infecciones se emplearon 50  $\mu$ l de cultivo en fase exponencial de *E. coli* TG-1 en medio LB más 50  $\mu$ l del eluato obtenido en el paso anterior. Se incubó durante 20 minutos.
7. Se rastrilló la mezcla sobre placas LB-Amp. y se incubó a 37°C ON.
8. Se utilizaron dos infecciones de 1 y 10  $\mu$ l de eluato para determinar el título de los fagos recuperados.
9. Se contaron las colonias de la titulación y se empleó este valor para estimar el progreso de la selección por afinidad.
10. En las otras placas se resuspendieron las colonias adicionando 1 ml de medio LB líquido por placa.
11. Las bacterias resuspendidas fueron infectadas con 10-50  $\mu$ l de fago *helper* ( $1 \times 10^{12}$  UFC/ml) durante 30 min para iniciar el proceso de producción de nuevos fagos.
12. Se agregaron 5 ml de agar blando (0,5%) por cada ml de suspensión de bacterias+fagos y se volcó la mezcla sobre placas LB Amp. Se incubó toda la noche a 37°C.
13. Se transfirió todo el agar blando de cada placa a un tubo de centrifuga y se incubó bajo fuerte agitación durante cuatro horas para liberar a las partículas fágicas.
14. Se centrifugó a 35.000 g x 20 min para separar a los fagos. Se removieron las bacterias remanentes por filtración (0,22  $\mu$ m).

Luego de cada ronda de *panning* se obtiene una fracción enriquecida en fagos que presentan afinidad al ligando inmovilizado. Se espera que esta afinidad aumente en las sucesivas rondas. Se realizaron 4 rondas de *panning* luego de la ronda 3 y 4 se aislaron y secuenciaron diferentes clones para corroborar el buen funcionamiento del proceso.

**Colony-PCR de colonias provenientes del *panning*:** Los insertos clonados en el fagémido pG8SAET fueron amplificados y secuenciados con los oligonucleótidos phage\_Fwd y phage\_Rev. Estos oligonucleótidos son complementarios al vector y aparean en zonas lindantes al sitio de clonado múltiple, por lo que el tamaño del fragmento amplificado está determinado por el tamaño del inserto. Se empleó el mismo protocolo de *colony*-PCR antes descrito.

## **Obtención de fagos a partir de un único clon**

Se aislaron e identificaron clones de interés (TG-1 + fagémido que porta algún gen de interés, Amp<sup>r</sup>). Se inocularon 3 ml de LB y se incubó a 37 °C, con agitación hasta llegar a fase exponencial, aproximadamente 5 h. Los cultivos en fase exponencial fueron infectados con el fago *helper* R408 (*Promega*) y se incubó nuevamente a 37°C toda la noche. Se centrifugó el cultivo a 10.000 rpm x 5 min y se filtró el sobrenadante (filtro de 0,22  $\mu$ m). De esta forma se

obtuvo un *stock* de fagos libres de bacterias. Estos se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , en alícuotas de  $500\ \mu\text{l}$ .

## **Titulación de los fagos**

Tanto cuando se avanza con el enriquecimiento de la biblioteca como cuando se obtiene un *stock* de fagos proveniente de un único clon se debe conocer el título de fagos con el que se trabaja. Para ello se realizó el siguiente protocolo:

1. Se infectaron  $50\ \mu\text{l}$  de un cultivo de *E. coli* (TG-1) con  $1\ \mu\text{l}$  del fago a titular (se utilizaron diluciones seriadas del fago  $10^{-4}$ - $10^{-8}$ ).
2. Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, de modo que proceda la infección.
3. Se depositaron cuatro gotas de  $10\ \mu\text{l}$  cada una sobre una placa LB ampicilina previamente secada, de cada una de las infecciones y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  ON.
4. Se contaron la cantidad de colonias presentes en cada placa (provenientes de cada gota) y se realizaron los cálculos pertinentes teniendo en cuenta que cada colonia corresponde a una única bacteria que fue infectada por una única partícula de fago.
5. Se expresó el título de cada preparación de fagos como UFC/ml.

## **Evaluación de la especificidad de los péptidos seleccionados**

### ***Panning***

Una vez finalizadas las rondas de *panning* se obtuvieron candidatos que cumplían con todos los criterios de selección estipulados (ver Resultados). Con el fin de evaluar la especificidad de cada péptido expuesto en la superficie de los fagos de interés se emplearon diversos 2 métodos, luego de obtener un *stock* de cada uno de estos fagos de la forma antes descrita, i) se llevaron a cabo ELISAs y ii) *pannings* para comparar la especificidad del fago al ligando con el que fue seleccionado comparando con otro ligando no relacionado. Para empezar se estudió la especificidad por *panning* de un *stock* puro.

1. Se inmovilizaron el ligando de interés y un control negativo (BSA) en *wells* de una placa *MaxiSorp (Nunc)*.
2. Luego se adicionaron  $200\ \mu\text{l}$  de *stock* de fago a cada *well*, y se incubó durante 2 h a  $T^{\circ}\text{C}$  amb.
3. Se realizaron 25 lavados con PBS-T para eliminar a las partículas del fago que no se unieron al ligando, y para liberar a las que se unieron de modo inespecífico.

4. Se eluyeron los fagos adheridos específicamente, y con estos se infectó *E. coli* TG-1 del modo antes descrito. Estas bacterias se plaquearon en medio selectivo y se incubaron toda la noche.
5. Se contaron las colonias, y se calculó el título de los fagos recuperados en cada *well*.
6. Se comparó el título de los fagos obtenidos en los *pannings* con el ligando de interés y los obtenidos con BSA.

La idea es que cuanto mayor sea la especificidad del fago por el ligando, más fagos quedaran retenidos con lo cuál el título de fagos eluidos debiera ser mayor. Se espera entonces que si el péptido presenta una unión específica por el ligando seleccionado, entonces se han de recuperar más fagos al haberlos enfrentado a éste que a BSA.

## ELISA

1. Se inmovilizó el antígeno en la placa (*MaxiSorp, Nunc*). Se empleó 1 µg/well. Se realizó una dilución del stock en PBS y se incubó durante 2 h a T°C amb.
2. Se lavó 3 veces con PBS 1X -Tween (0,05%).
3. Se bloqueó con PBS BSA 3%, 150 µl por *well* durante 2 h a T°C amb.
4. Se lavó 3 o 4 veces con PBS 1X -Tween (0,05%).
5. Se agregó una dilución del *stock* de fago a ensayar\* (150 µl por *well*) y se incubó durante 2 h a T°C amb.
6. Se lavó 3 veces con PBS 1X -Tween (0,05%).
7. Se agregó el anticuerpo primario, (dilución 1:1000 en PBS 1X, *Molico* 1%) Este anticuerpo monoclonal reconoce al fago M13 y está conjugado a HRP.
8. Se lavó 3 veces con PBS 1X -Tween (0,05%).
9. Se reveló con solución de OPD: 2 mg/ml de OPD en buffer OPD, se agregó a último momento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,03% final). Se colocaron 50 µl por *well*, y luego de que apareció color, se frenó la reacción con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Se midió la absorbancia a 480 nm en un lector de placas *Beckman*.

Como control negativo se reemplaza el ligando inmovilizado por BSA.

### Buffer OPD:

Solución base:            0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            0,1 M    citrato de sodio

Solución ácida:            0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            0,1 M    ácido cítrico.

Llevar a pH 5 la solución base con la solución ácida.

## Actividad transcripcional de *ribH2*

La construcción reportera de la región promotora de *ribH2* fue hecha fusionando transcripcionalmente 275 pb de la región 5' no codificante del gen *ribH2* a *lacZ* en un plásmido replicativo pBRR4 (pREP). Se transformó en la cepa WT con la construcción pREP (WT + pREP) y la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de esta cepa fue evaluada como correlato de los niveles de transcripción de *ribH2*.

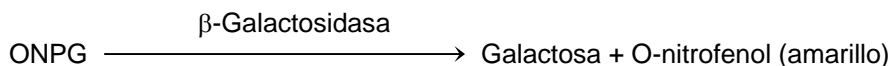
## Ensayo de actividad $\beta$ -Galactosidasa

1. Sobre un cultivo ON de bacterias a ensayar y se transfirió 1 ml a un tubo de 1,5 ml.
2. 5000 x 4 min para obtener el *Beckman*. Se descartó el sobrenadante.
3. Resuspensión en 0,5 ml de *buffer Z*.
4. 5000 x 4 min Se descartó el sobrenadante.
5. Resuspensión en 1 ml de *buffer Z*.
6. Medición de DO<sub>600</sub>.

### Lisis de las células:

1. + 20  $\mu$ l de cloroformo y 10  $\mu$ l de SDS 0,1% a cada tubo. Mezcla x 20 seg con vórtex.
2. Se transfirieron 0,5 ml de a tubos de 1,5 ml nuevos.
3. a 28°C por 5-10 min, para llevarlos a temperatura.
4. + 0,1 ml de ONPG. Este es el tiempo 0.
5. a 28°C hasta que se desarrolló un color amarillo/verde.
6. Se detuvo la reacción por agregado de 0,2 ml de 1,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
7. 10.000 rpm x 2 min para remover los restos celulares.
8. Medición DO a 420 nm.
9. Idealmente la aparición del color amarillo/verde debería tomar entre 5-10 min Si el color aparece muy pronto se debe volver a la muestra original, diluirla en *buffer Z* y repetir.

Se calcularon las unidades :



La cantidad de o-nitrofenol es proporcional a la cantidad de enzima presente y al tiempo tomado para que la enzima reaccione con el ONPG.

### **Transformación a unidades Miller:**

Unidades Miller = (DO 420nm x 1000)/(DO<sub>600</sub> x min x dilución x ml bacterias)

<b>buffer Z</b>	<b>en 250 ml</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,025 g (0,06 M)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,375 g (0,04 M)
KCl	0,188 g (0,01 M)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,062 g (0,001 M)
β-mercaptoetanol	0,675 g (0,05 M)
ajustar pH = 7,0	

<b>buffer fosfato*</b>	<b>en 250 ml</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,025 g (0,06 M)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,375 g (0,04 M)

\*para el ONPG

ONPG 4 mg/ml en *buffer fosfato* 0,1M, pH 7,0

Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 1,5 M

## Barajado de plásmidos

El experimento de barajado de plásmidos se basa en la inestabilidad de dos vectores pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad dentro de la misma población bacteriana. Para esto, un plásmido pBBR4 (Amp<sup>r</sup>) albergando diferentes insertos diferentes: *ribH1*, *ribH2*, *ribH2\_W22A*, LS\_sce o el plásmido vacío, fue introducido por conjugación biparental dentro de la cepa doble  $\mu$ *ribH* + *pribH1*Km. Se seleccionó la presencia de los dos vectores en placas TSA-Nal con Amp y Km. Tres clones Amp<sup>r</sup>/Km<sup>r</sup> independientes de cada conjugación fueron cultivados por al menos 10 generaciones en TSB-Amp, luego se plaquearon diluciones en placas TSA-Amp. Cien colonias de estas placas fueron replicadas en TSA-Amp o Km. Cuando fue necesario, se agregó 500  $\mu$ M riboflavina al TSB o al TSA. El porcentaje de clones Amp<sup>r</sup>/Km<sup>s</sup> se calculó para cada caso.

## Ensayos de infección bacteriana

### Células J774.A1

Monocapas de células J774.A1 fueron cultivadas en placas *multiwell* de 24 *wells* con 1 x 10<sup>5</sup> células por *well* con RPMI 1640 suplementado con 5-10% suero fetal bovino (SFB). Luego, las células fueron infectadas con 5 x 10<sup>5</sup> bacterias (MOI 5:1) resuspendidas en RPMI. Para asegurar el contacto entre las células y las bacterias, se centrifugaron las placas *multiwell* a 1000 rpm por 10 min Después de 30 min de incubación a 37°C en una atmósfera 5% CO<sub>2</sub> las

células fueron lavadas gentilmente con buffer fosfato sal (PBS, pH 7,4) y luego incubadas por 1 h en medio suplementado con 100 µg/ml Str y 50 µg/ml Gm para matar a las bacterias extracelulares remanentes. De aquí en adelante la concentración de antibióticos se bajó a 20 µg/ml Str y 10 µg/ml Gm. Luego, el número intracelular de bacterias viables se determinaron de la siguiente manera: las células fueron lavadas 3 veces con PBS y tratadas por 5 min con 0,5 ml de 0,1% Tritón X-100. Los lisados fueron diluidos en serie y plaqueados en placas TSA con los antibióticos correspondientes para determinar las CFU por ml. Cada determinación es el promedio de dos experimentos independientes. Se calculó la media ± la desviación estándar.

## **Células HeLa**

Monocapas de células HeLa fueron cultivadas en placas *multiwell* de 24 *wells* con  $1 \times 10^5$  células por *well* con medio mínimo esencial (MEM; *Gibco*) suplementado con 5% SFB y 2 mM glutamina. Luego, las células fueron infectadas con  $5 \times 10^7$  CFU bacterias (MOI 500:1) resuspendidas en RPMI. Las placas *multiwell* fueron centrifugadas a 1000 rpm por 10 min. Después de 1 h de incubación a 37°C en una atmósfera 5% CO<sub>2</sub> las células fueron lavadas gentilmente con PBS (pH 7,4) y luego incubadas por 1 h en un medio suplementado con 100 µg/ml Str y 50 µg/ml Gm para matar a las bacterias extracelulares remanentes. De aquí en adelante la concentración de antibióticos se bajó a 20 µg/ml Str y 10 µg/ml Gm. Luego, el número intracelular de bacterias viables se determinaron de la siguiente manera: las células fueron lavadas 3 veces con PBS y tratadas por 5 min con 0,5 ml de 0,1% Tritón X-100. Los lisados fueron diluidos en serie y plaqueados en placas TSA con los antibióticos correspondientes para determinar las CFU por ml. Cada determinación es el promedio de dos experimentos independientes. Se calculó la media ± la desviación estándar.

Para los ensayos de microscopía, el protocolo de infección es igual pero en presencia de un cubreobjetos de vidrio estéril por *well*. Se cultivan las células. Luego, los cubreobjetos con células fueron lavados 3 veces con PBS y fijados para inmunofluorescencia (la marcación está descrita en la sección de inmunofluorescencia).

## **Ratones BALB/C**

Ratones hembra BALB/c de 60 días aproximadamente fueron inoculados intraperitonealmente (IP) con 200 µl conteniendo  $1 \times 10^5$  hasta  $1 \times 10^7$  CFU de las cepas de *B. abortus*. Luego, los ratones fueron sacrificados, sus bazo disecados y homogeneizados en 2 ml de PBS. Los homogenatos fueron diluidos en serie y plaqueados en placas TSA con los antibióticos correspondientes para determinar las CFU por bazo. Se calculó la media ± la desviación estándar.



Todos los experimentos que involucraron animales fueron hechos bajo los lineamientos de la guía del NIH (*National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*) en el laboratorio BSL-3 de la UNSAM.

## **Microscopía de Inmunofluorescencia**

Los cubreobjetos con células HeLa infectadas, fueron lavadas 5 veces con PBS para remover las bacterias no adheridas y luego fijadas por 15 min en 3% paraformaldehído (pH 7,4) a 37°C y luego procesadas para el marcado de inmunofluorescencia. Brevemente, los cubreobjetos fueron lavados 3 veces con PBS, incubados por 10 min con PBS con 250 mM NH<sub>4</sub>Cl para *quenchear* los grupos aldehído. Luego, los cubreobjetos fueron incubados con los anticuerpos primarios en una solución PBS 10% suero de caballo 0,1% saponina por 20 min a temperatura ambiente, lavados con PBS 0,1% saponina y luego incubados con los anticuerpos secundarios en una solución PBS 10% suero de caballo 0,1% saponina. Los cubreobjetos fueron montados empleando *Mowiol (Aldrich)*. Las células fueron observadas en el microscopio empleando un objetivo de 100X de inmersión en aceite. Las proyecciones fueron almacenadas en el formato TIFF e importadas al *Adobe Photoshop CS3* donde las imágenes fueron unidas empleando el formato RGB. Para determinar el porcentaje de bacterias que co-localizaban con los marcadores intracelulares un mínimo de 100 bacterias intracelulares (reveladas por inmunofluorescencia indirecta) fueron contadas. Los ensayos se hicieron por duplicado.

## **Anticuerpos y Reactivos**

Para las inmunofluorescencias, los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-LAMP-1 H4A3-humana de ratón (*Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences, University of Iowa*) y anti-cathepsina D-humana de conejo (*Dako*). Los anticuerpos secundario fueron anti-ratón o anti-conejo generados en cabra, Alexa Fluor 568 (*Molecular Probes, Invitrogen Co.*). Para tinción de ADN se usó la tinción de Hoechst a 2 µg/ml concentración final.

## Determinación del contenido de flavinas intracelulares

### Extracción de flavinas

Las flavinas fueron extraídas de las células bacterianas de la siguiente manera: Se midió la  $DO_{600}$  de 1 ml de cultivo, luego se centrifugó 5000 rpm x 5 min y se descartó el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con 1 ml de PBS x 2 veces. El *pellet* fue resuspendido en EtOH 70% y calentadas en un baño a 90°C x 20 min Se centrifugó a 13.000 rpm x 10 min y se tomaron 500  $\mu$ l del sobrenadante que fueron liofilizados completamente.

### Cromatografía en capa delgada (TLC)

Se resuspendieron los diferentes liofilizados en EtOH 30% de manera proporcional a la  $DO_{600}$ . Luego, se realizó una TLC con n-butanol:ácido acético:H<sub>2</sub>O en la proporción 3:1:1 (vol/vol) como solvente. Se utilizó placas de matriz de sílica gel con soporte de vidrio (*Merck*). El resultado fue visualizado en un transiluminador UV. Los patrones utilizados fueron lumazina, riboflavina, FMN y FAD, disueltos en EtOH 30%.

## Bioinformática

### Predicción de riboswitches

Las predicciones de riboswitches fueron realizadas en el servidor RibEx: *Riboswitch Explorer*, de la Universidad Nacional de México (<http://132.248.32.45/cgi-bin/ribex.cgi>) [180].

### Construcción de árboles filogenéticos

Para construir de cada árbol filogenético se realizó el siguiente protocolo:

1. Alineamiento múltiple con el software *CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment*.
2. Calculo de la matriz de distancias con el programa *Protein distance algorithm version 3.67*.  
Se utilizó un *Bootstrap* de 1000 *datasets*.
3. El árbol filogenético consenso fue construido con el programa *Phylip 3.67:neighbor, neighbor-Joining/UPGMA method version 3.67*.
4. La visualización se realizo con el programa *Newicktops 1.0*.

Todos estos programas fueron ejecutados desde el servidor *Mobyle@Pasteur v1.0* (<http://mobyle.pasteur.fr/>).

## Modelos ocultos de Markov: generación del Logo

El Logo del modelo oculto de Markov (HMM) se construyó siguiendo el siguiente esquema:

1. Se generó un alineamiento múltiple de secuencias de proteínas con el programa *ClustalW* 2.0.12 *Multiple sequence alignment*.
2. El modelo oculto de Markov se calculó con el programar *hmmer 3.0: HMMBUILD*

Se utilizaron los parámetros por *default*. Ambos programas se ejecutaron desde el servidor *Mobyle@Pasteur v1.0* (<http://mobyle.pasteur.fr/>).

3. La visualización se realizó por el programa *LogoMat-M* desde el servidor del Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk>).

El *dataset* constó de 95 secuencias de proteínas RibH2 provenientes de genomas completamente secuenciados, a continuación se muestran sus números de acceso de la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>):

Q4ZQI2	C5CUS6	A5VV03	A6X5M0	A8LGD1	B3PT31	Q131Y8	B5K7X8	C3JHV6	Q53107	A9DZF0
Q885J3	A6UBE1	A9MBX8	A5ECR0	A3SR09	B9NV02	B5K4K0	Q0F8K6	C4IVE9	C0GBL7	Q219G6
A6SXN8	C3JXY3	A9WYZ1	C4WM37	B5ZUS9	A9F9V6	A6FUI7	B1FUZ5	Q986N2	C0RLK3	A3YGP9
Q48G23	Q92NI1	B2SAX4	A4Z0L0	C9D1B6	A1BB46	Q0FUX9	A4F0K2	B2AKF9	Q1W5D3	B3Q7Y1
Q0SG92	B9JH96	Q2YKV1	A9BYU1	B7QTH9	C6B3Z9	A3K9J9	C3MES4	A9G5F2	A3SUV5	
A4G6U4	B9K1P3	C5AHZ7	Q89DI7	Q1YEN3	A4F0K1	A6VV22	C7LIH2	B7RMK7	C1A293	
Q4K841	Q396H2	A0R6M2	Q1GM34	Q1MEI6	Q2ISE9	A4EG89	B4RDF9	A8U359	P61713	
C1AX71	P61711	Q2KVI7	Q16CM8	A0Y875	B9R3F8	P61727	A3X704	B7WYF2	C8SFH4	
Q3K889	P61712	Q5YZ81	A9HHT8	B6B542	C7DE13	B6AXL3	Q2K6S7	Q07RQ4	Q5LX59	
C1A293	P61713	C8SFH4	Q5LX59	A3S9Z2	A9DZF0	Q219G6	A3YGP9	B3Q7Y1	A3S9Z2	

## Predicción de dominios transmembrana

Para la predicción de hélices transmembrana, se utilizó el programa TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)

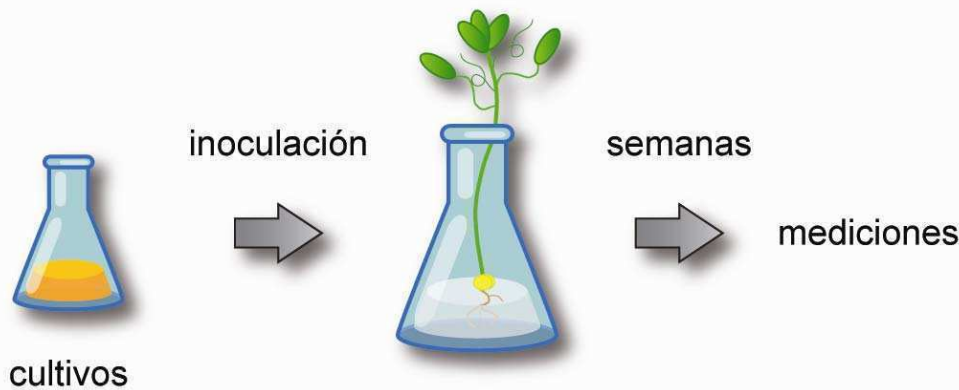
## Análisis de archivos PDB

El archivo 1T13 correspondiente a RibH2 de *B. abortus* de la base de datos *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org>) se visualizó y analizó usando el programa *PyMol* 1.3.

## Ensayos de infección *Rhizobium*-arveja

Brevemente, se germinaron semillas de arveja (*Pisum sativum* variedad *Wisconsin Perfection*), luego se colocó una plántula por *erlenmeyer* en un medio sin nitrógeno para favorecer la nodulación. Una vez transcurrida una semana (cuando la planta asoma por el extremo del *erlenmeyer*) las mismas fueron infectadas en esterilidad con las cepas de *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 3841 aplicando una suspensión con bacterias en la zona

de las raíces. Luego de semanas, se analizaron distintas variables como ser el número de nódulos por planta, la cantidad de bacterias en los nódulos, entre otras (**Figura MM-3**).



**Figura MM-3. Esquema del modelo experimental de simbiosis de *Rhizobium*-arveja.** Plantas de *P. sativum* son inoculadas en esterilidad en la zona radicular con cultivos de *R. leguminosarum* e incubadas a 16°C por un lapso de semanas. Luego, diferentes variables son medidas.

## Preparación de las plantas

### Esterilización de semillas:

1. En *erlenmeyer* estéril, sumergir las arvejas en EtOH 96% por 30 seg. Agitar manteniendo tapado el *erlenmeyer*.
2. Limpiar las semillas con H<sub>2</sub>O destilada estéril o milliQ.
3. Sumergir en lavandina 2% durante 10 min (lavandina comercial es aproximadamente 10%, entonces dilución 1:5). Nota: lavandina *Ayudín* 5,5% entonces es 1,1% final.

**Notas:** Otra variante es no usar el EtOH y usar directamente la lavandina.

4. En esterilidad, 5 lavados con H<sub>2</sub>O destilada estéril o milliQ.
5. Dejar hidratar las semillas en H<sub>2</sub>O destilada estéril o milliQ durante 4 h u ON a T°C amb (25°C aprox.).

### Germinación de las semillas:

1. En esterilidad, colocar 3-6 semillas por placa de petri agar 1% H<sub>2</sub>O, sellar con *parafilm* y proteger de la luz (bolsa negra, cajón o caja). Dejar a T°C amb. por 3-4 días, pero no más de 7 días.

**Nota:** a las 48hs comienzan a germinar. Verificar la humedad y crecimiento mientras se espera que germinen, a las 72hs se asoma el hipocotilo.

2. En esterilidad, utilizando pinzas flameadas, transferir las plántulas a medio de plantas FP-agar 0,5% (200 ml) en *erlenmeyer* de 300 ml (ver receta aparte).
3. Cultivar en oscuridad a T°C amb., 7 días aproximadamente, hasta que el tallo llegue al tapón.
4. En esterilidad, sacar el tallo afuera y poner en la incubadora a 16°C.

## Inoculación de las plantas

1. Cultivos de *Rhizobium* a 28°C en TY tardan un ON largo tal vez 2 días.
2. Centrifugar y resuspender en FP.
3. Medir DO<sub>600</sub> → Inocular con p1000 1 ml DO = 0,25.

Ej. Para 10 plantas de un cultivo DO = 1.

$$0,25 \times 11 \text{ ml} = 2,75 \text{ ml de cultivo} + 8,25 \text{ ml de FP}$$

1 ml

**Nota:** Observar los nódulos cada 2-3 días, comienzan a fijar N<sub>2</sub> cuando se tornan rosados. Cosechar 2-3 semanas después.

## Cosecha de los nódulos

1. Sacar la planta del *erlenmeyer* con la raíz entera.
2. Tomar con la mano los nódulos de a uno y ponerlos en un tubo *falcon* de 15 ml con el fondo perforado con un alambre caliente o aguja.
3. Sumergir en EtOH 70% x 2 min
4. Sumergir en Ayudín 1:5 x 2 min
5. Lavar varias 3 veces con H<sub>2</sub>O estéril.
6. Poner de a 1 nódulo en una placa de 96 de cultivo con 100 µl de Glicerol 20% en diferentes columnas.
7. Reventar cada nódulo con una pinza o barra de vidrio de borde romo.
8. Congelar a -80°C.

## Recuentos intranodulares

1. Hacer diluciones seriadas en las columnas de la placa 180 µl de Glicerol 20% + 20 µl con pipeta multicanal. Diluciones orden 1, 2, 3, 4. Siembra: 20 µl x gota, 3 gotas por orden en placas TY.

**Medio FP para plantas** (receta enviada por Aldous Dawn):

Soluciones Stock:		ml de Stock en 4 litros de H <sub>2</sub> O	ml Stock en 1 litro de H <sub>2</sub> O
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	40 g/l	10	2,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	40 g/l	12	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g/l	13,32	3,33
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	45 g/l	13,32	3,33
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	2,5 g/l	8	2

**Gibson Trace (Stock):**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g/l
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2,03 g/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	220 mg/l
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	80 mg/l
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (ácido molibdico)	80 mg/l

Se prepara aparte, agregar 4 ml de trazas de Gibson cada 4 L de medio:

Ajustar el pH a 6,3 – 6,7. Generalmente el pH del medio está naturalmente en este rango.

Para medio sólido agregar 0,7% de bactoagar ó 0,5% de agar Lab M No.1.

## **Análisis estadístico**

Todos los datos fueron calculados como la media  $\pm$  la desviación estándar. La significancia se evaluó utilizando la prueba *T*-test de *Student* no pareada de dos colas (*Prism*, *GraphPad Software*). Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente relevantes.

## Recetas

### LB (1 litro)

10 g triptona  
5 g extracto de levadura  
5 g NaCl

**LB Agar:** 1,5% (p/v) agar

### Tank Buffer (1litro)

30,3 g tris  
144 glicina  
10 g SDS (agregar al final)

### TY (1 litro)

5 g triptona  
3 g extracto de levadura  
0,87 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

**TY Agar:** 1,5% (p/v) agar

### TBE 5X (1 litro)

54 g tris base  
27,5 g ácido bórico  
20 ml EDTA 0,5 M pH 8

### 4X Running Buffer

(1,5M Tris-HCl pH 8,8)

36,3 g tris

150 ml H<sub>2</sub>O

Llevar a pH 8,8 con HCl

Llevar a 200 ml

Almacenar a 4°C en oscuridad hasta tres meses

### 4X Stacking Buffer

(0,5 Tris-HCl pH 6,8)

3 g tris

40 ml H<sub>2</sub>O

Llevar a pH 6,8 con HCl

Llevar a 50 ml

Almacenar a 4°C en oscuridad hasta tres meses

### Solución de monómero

(pesar en campana)

58,4 g acrilamida

1,6 g bisacrilamida

Llevar a 200 ml

Almacenar a 4°C en oscuridad hasta tres meses

## Medio Mínimo GH

### Stock de sales 10X: por litro

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 mg
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	7,5 g

- Preparar medio sales 1X a partir de cada stock en H<sub>2</sub>O milliQ.
- Fraccionar.
- Agregar agar (para medio sólido) 1,5%.
- Autoclavar.

8. En el momento de usar, se agregaron los siguientes suplementos que son esterilizados por separado:

<b>Suplemento</b>	<b>por litro</b>
Casaminoácidos 10% (p/v)	30 ml
Glucosa 100 g/L	10 ml
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 10 mg/ml	0,01 ml
Mix Vitaminas	1 ml

<b>Mix Vitaminas*</b> (en 50 mM Buffer fosfato pH 7)	<b>µg/ml</b>
Biotina	0,01
Tiamina	0,2
D/L ácido pantoténico	0,04
D/L ácido nicotínico	0,2

\*Esterilizadas por filtración con *Millipore* 0,22 µm



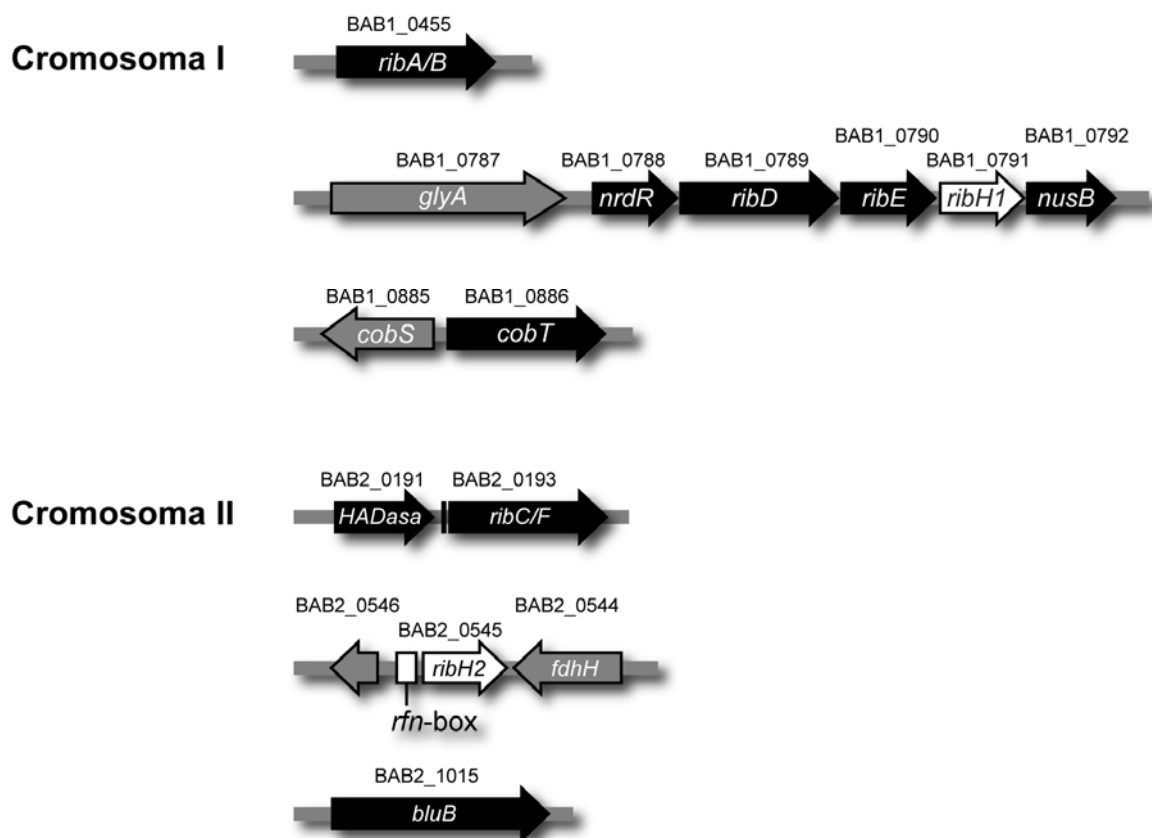
## Resultados

# CAPÍTULO 1

“Genes del metabolismo de flavinas en *B. abortus*”

## Genes del metabolismo de flavinas en *B. abortus*

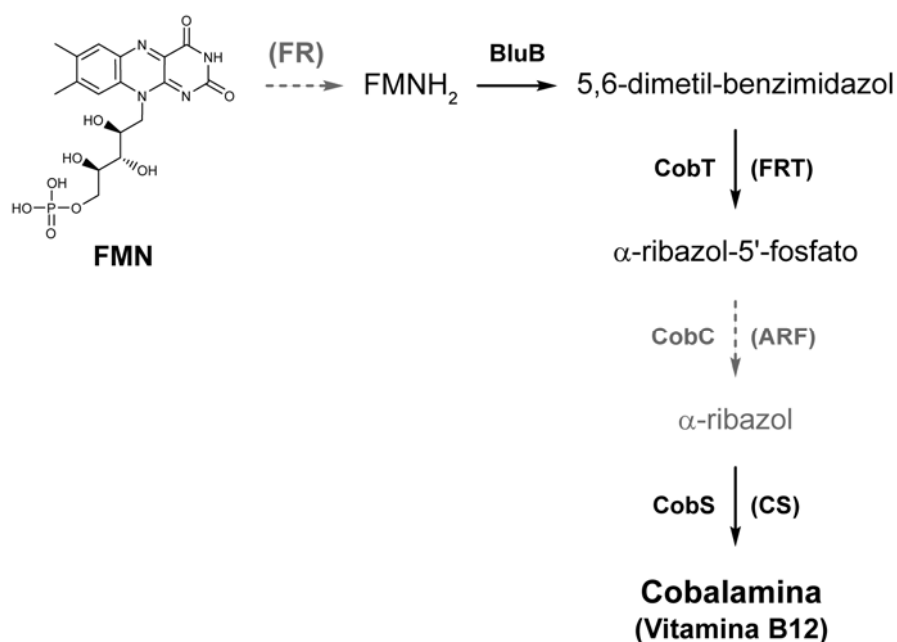
Como se describió en la Introducción, las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de las flavinas en *Brucella* están ubicadas en los dos cromosomas (**Figura 1**). Por un lado el gen *ribA/B* codifica una enzima bifuncional que contiene a RibA y RibB en una misma cadena polipeptídica y se encuentra como un ORF aislado en el cromosoma I. En el mismo cromosoma, río abajo, se encuentran el operón *rib* y el gen *cobT*. El operón *rib* está constituido por los genes *ribD*, *ribE* y *ribH1* flanqueados por los genes regulatorios *nrdR* y *nusB* en los extremos 5' y 3', respectivamente. En *E. coli*, NrdR está caracterizado como un represor transcripcional de los genes que codifican las ribonucleótido reductasas, mientras que *nusB* es un antiterminador de la transcripción [153]. El gen *cobT*, el cual está involucrado en la síntesis de un precursor de la vitamina B12 ( $\alpha$ -ribazol-5'-fosfato) a partir de un derivado del FMN (5,6-dimetilbenzimidazol), se encuentra adyacente al gen *cobS* aunque en orientación contraria. CobS es la enzima cobalamina sintasa responsable del último paso de biosíntesis de la vitamina B12.



**Figura 1. Organización de los genes del metabolismo del flavinas en *Brucella*.**

Un esquema de la distribución de los distintos ORFs que conforman al conjunto de enzimas involucradas en el metabolismo de las flavinas en *B. abortus* (negros y blancos) y algunos genes vecinos (en gris). Se resaltan los genes *ribH* (blanco) donde *ribH1* se encuentra dentro del operón *rib* y *ribH2* está aislada con la *rfn*-box en su zona reguladora.

El gen que codifica para la enzima BluB se encuentra aislado en el cromosoma II de *Brucella*. Esta enzima produce 5,6-dimetilbenzimidazol a partir de FMN reducido y, junto a CobT conectarían el metabolismo de flavinas con el de la vitamina B12 en *Brucella* (Figura 2) [181]. La enzima HADasa se encuentra codificada en el cromosoma II. También en este cromosoma se encuentra el gen *ribC/F* que codifica un polipéptido con actividad bifuncional: riboflavina kinasa y FAD sintetasa, en algunos organismos estas actividades se encuentran codificadas en genes independientes. Los genes *HADasa* y *ribC/F* se encuentran adyacentes y con la misma orientación, pudiendo estar formando un operón, aunque todavía no se ha demostrado experimentalmente. Ríto abajo, a unos 350 ORFs de distancia, se encuentra al gen *ribH2* ubicado entre otros dos genes de función no relacionada con el metabolismo de flavinas (Figura 1).



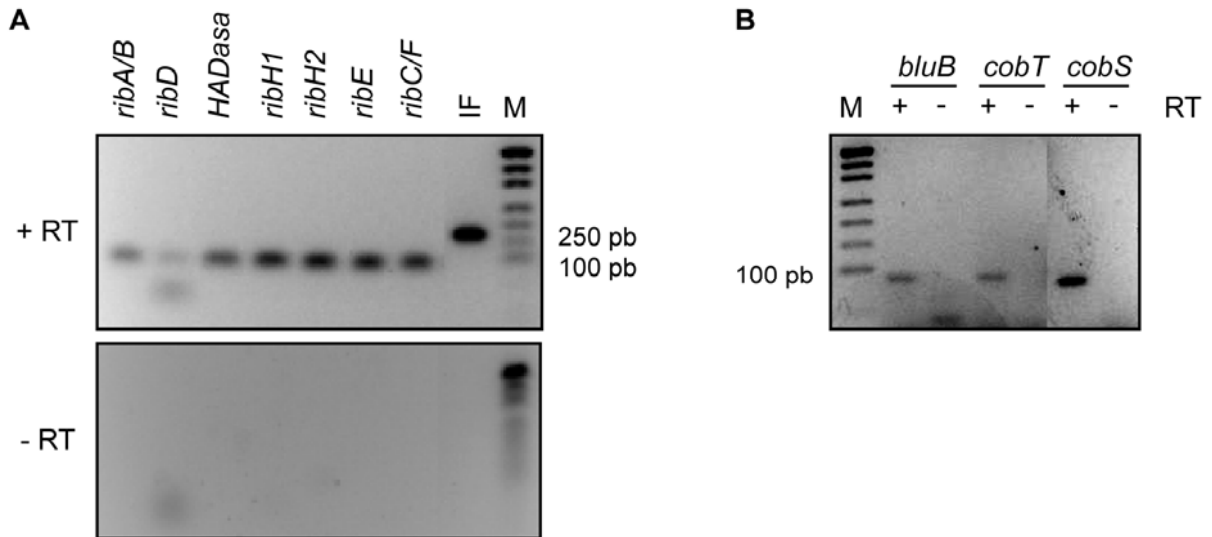
**Figura 2. Conexión entre el metabolismo de riboflavina y el metabolismo de la cobalamina.**

El FMN es reducido por acción de la FMN reductasa (FM), BluB genera 5,6-dimetilbenzimidazol a partir de FMN reducido que luego es tomado por CobT o fosforibosil transferasa (FRT) para dar  $\alpha$ -ribazol-5'-fosfato. La enzima CobC, una  $\alpha$ -ribazol fosfatasa que genera  $\alpha$ -ribazol el cual es sustrato en la síntesis de cobalamina por acción de la enzima CobS, la cobalamina sintasa (CS), toma  $\alpha$ -ribazol y lo utiliza como un sustrato más en la síntesis de cobalamina. Las enzimas que están en gris y los pasos enzimáticos en flecha punteadas no se encuentran codificados en los genomas de *Brucella*.

## Expresión de los genes del metabolismo de flavinas

Todos los genes de la ruta de las flavinas mencionados anteriormente fueron encontrados por métodos bioinformáticos y, a excepción de *ribH1* y *ribH2*, no se tenían evidencias experimentales ni bibliográficas de la expresión de dichos genes en *Brucella*. Para determinar si todos ellos se estaban expresando a nivel de ARN se realizó una RT-PCR para cada uno de los genes a partir de ARN total obtenido a partir de la cepa salvaje cultivada en medio rico TSB. Los productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa donde se

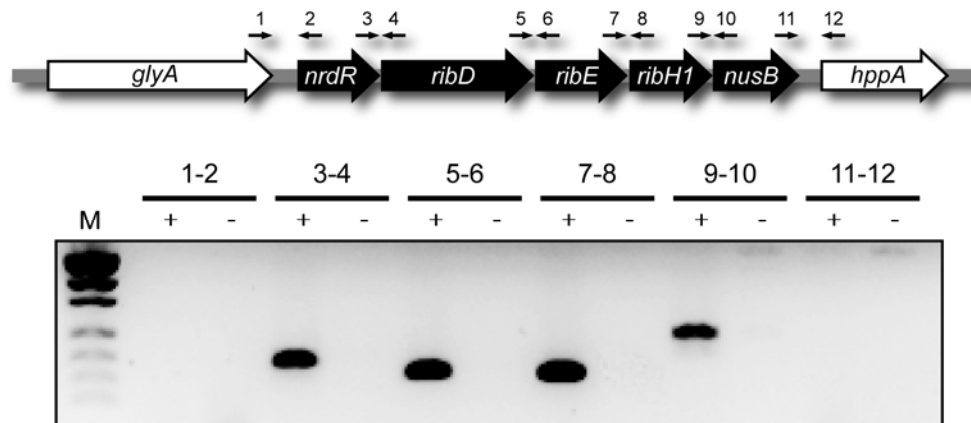
podieron confirmar que todos los genes de la ruta biosintética de la riboflavina se expresan en medio rico (**Figura 3.A**). Para descartar que se estuviera amplificando ADN genómico contaminante, se incluyeron templados a los cuales no se les realizó el paso de retrotranscripción como control. Se destaca el hecho de que también se demostró la presencia de ARNm de los genes *bluB*, *cobT* y *cobS* (**Figura 3.B**).



**Figura 3. Expresión de los genes de la ruta de las flavinas.**

Se amplificó por medio de RT-PCRs usando oligonucleótidos específicos para cada gen involucrado en el metabolismo de flavinas. Como molde se empleó ADNc (+RT) total de *B. abortus*. Se incluye el control sin el paso de retrotranscripción (-RT). Como control de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos IF. **(A)** Genes directamente involucrados en la síntesis de la riboflavina, FMN y FAD y **(B)** genes relacionados con el metabolismo de la vitamina B12.

Además, la Lic. Inés Serer, miembro del Laboratorio, demostró mediante RT-PCR de las regiones intergénicas de los genes que conforman el operón *rib* en *Brucella* que *nrdR*, *ribD*, *ribE*, *ribH1* y *nusB* se encuentran en la misma unidad transcripcional (**Figura 4**).



**Figura 4. Los genes que conforman el operón *rib* en *B. abortus*.**

Se realizaron 6 RT-PCRs con los juegos de oligonucleótidos que se muestran en la figura amplificando las regiones intergénicas. El templado control sin la RT se incluyó para descartar contaminaciones con ADN genómico.

## Interacción de RibH2 con otras proteínas de *Brucella*

En esta Tesis se buscaron compañeros de interacción de RibH2 en *Brucella*. Los compañeros encontrados podrían hipotéticamente aportar evidencias sobre la función que cumple RibH2 en *B. abortus*. Entre ellos, se podrían encontrar otros miembros de la ruta biosintética de la riboflavina como ocurre con las proteínas RibH de *E. coli*, *Campylobacter jejuni* o *Bacillus subtilis* [182,183,184,185]; pero también podrían hallarse otros actores que interactuasen con RibH2 con funciones no relacionadas con el metabolismo de flavinas. Dadas las diferencias que RibH2 presenta respecto a las LS Tipo-I, es relevante evaluar si RibH2 tiene funciones biológicas adicionales a la actividad de LS. La estrategia experimental utilizada fue la exploración de una biblioteca de expresión en fagos construida a partir de ADN genómico total de *Brucella suis*. Sabiendo que *B. suis* y *B. abortus* poseen una identidad de más del 99% en la mayoría de sus ORFs [11], los resultados obtenidos pueden ser extrapolados entre ambas especies.

La biblioteca fue construida por la Dra. Diana Posadas durante su tesis doctoral [186], en este trabajo se utilizó RibH2 como ligando para el *screening*. Los fagos con capacidad de unión a RibH2 fueron seleccionados en rondas de *panning*.

### **Display en fagos**

La técnica permite expresar péptidos, proteínas o dominios proteicos fusionados a proteínas virales, en la superficie de ciertos fagos [187]. Las fusiones se disponen de una forma accesible, permitiendo la interacción de los péptidos de fusión con ligandos de interés. En la técnica se emplean fagos filamentosos de *E. coli* (M13, f1, etc.) y vectores-fagémidos. El *display* en fagos es particularmente útil cuando se quieren identificar nuevos pares de interacción a un ligando conocido. Esta técnica posee dos grandes ventajas, la primera de ellas es que cuando una proteína de fusión capaz de unir algún ligando es expresada en la superficie del fago, el fago adquiere dicha capacidad. Los fagos que poseen esta nueva propiedad de unión pueden ser aislados de una mezcla compleja de fagos mediante un proceso de selección por afinidad a dicho ligando denominado *panning*. La selección por afinidad permite analizar una gran cantidad interacciones proteína-ligando en poco tiempo. La segunda ventaja es que la proteína de fusión que participa en la interacción está unida físicamente a la secuencia de ADN que la codifica, en la partícula viral. Esta unión permite el aislamiento selectivo y la amplificación de un fago particular que porta el gen de interés de un *pool* de millones de fagos.

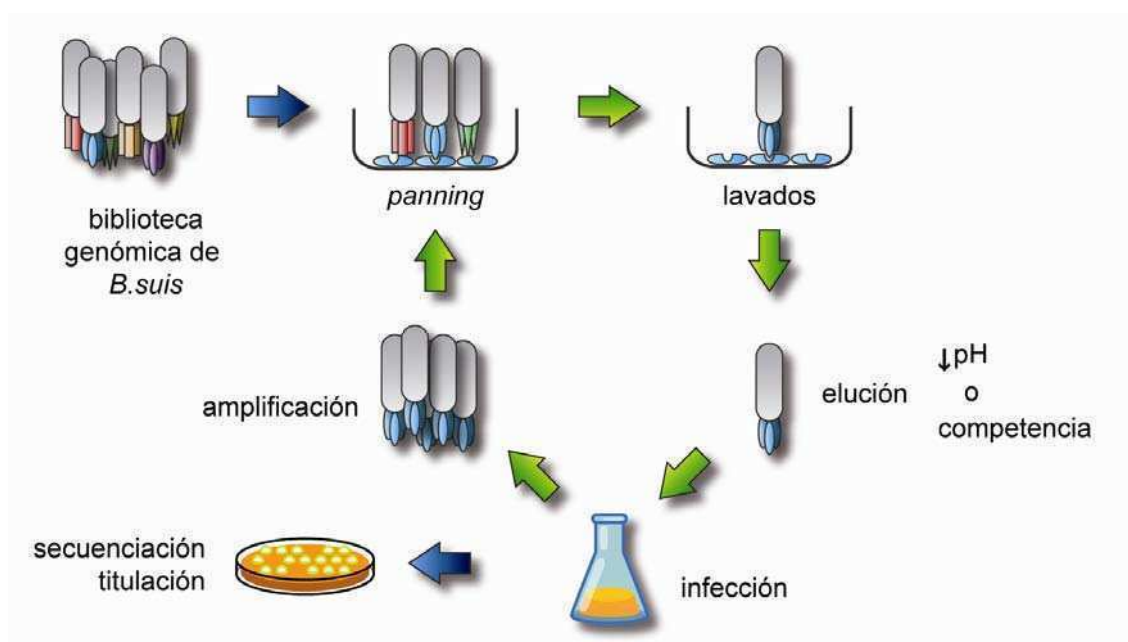
La Dra. Posadas utilizó el sistema descrito por Jacobsson *et al.* [175] que emplea la proteína pVIII del fago M13 como proteína de fusión o *carrier*. Para la construcción de la

biblioteca se purificó ADN genómico de *B. suis* y se preparó ADN del vector pG8SAET. El ADN genómico se fragmentó por sonicación en fragmentos de 0,4 a 8 Kb y se los ligó en el vector. Finalmente se obtuvo una biblioteca con un título de  $5,2 \times 10^{11}$  UFC/ml, con un tamaño de  $8 \times 10^6$  clones y con más de 90% de clones con inserto. La calidad y representatividad de la biblioteca fueron corroborados por diversos procedimientos [186]. Estos pasos son importantes, ya que la calidad de los resultados obtenidos en el *panning* depende directamente de la calidad de la biblioteca. Según los cálculos realizados, la biblioteca contaba con una representatividad muy elevada, donde cada ORF estaría representado al menos 50 veces [186].

## Rondas de *panning*

Para realizar el *panning* se inmovilizó a RibH2 en una placa *multiwell* y luego se la incubó con la biblioteca de fagos por 4 horas. Los fagos unidos inespecíficamente se removieron mediante lavados exhaustivos. Por último, los fagos unidos específicamente al ligando fueron liberados por competencia con RibH2 libre o mediante el cambio abrupto de pH. En la elución por competencia se eluyeron los fagos utilizando una solución del ligando diez veces más concentrada que la que se utilizó para inmovilizarlo; con este método se espera una elución de fagos muy específica, ya que sólo se liberarían aquéllos que interaccionaron con el ligando libre. En la elución por cambio de pH se someten los *well* a una disminución drástica del pH. Con este método se espera liberar a todos los fagos presentes en el *well* (**Figura 5**). Con ambos métodos de elución se han obtenido buenos resultados si bien se basan en principios distintos [175].

Se infectaron células *E. coli* TG-1 con los fagos obtenidos después de las eluciones. Esta cepa mantiene a los fagémidos como episomas, de modo tal que la secuencia clonada puede entonces determinarse fácilmente por PCR o purificación del fagémido mediante *mini-prep* y posterior secuenciación. Las partículas virales pueden ser amplificadas y los nuevos fagos generados a partir de las mismas pueden emplearse nuevamente en otra ronda de *panning*, en la que se los enfrenta otra vez contra RibH2 inmovilizada. Se realizaron cuatro rondas sucesivas de enriquecimiento para cada método de elución (pH y competencia).



**Figura 5. Esquema simplificado de la estrategia utilizada en la selección de *display* en fagos.**

RibH2 fue inmovilizada en los *wells* de una placa de ELISA y enfrentada a la biblioteca de *display* en fagos. Luego de exhaustivos lavados, se eluyeron los fagos capaces de interactuar específicamente con el ligando de dos formas diferentes e independientes: por un cambio brusco del pH o por competencia con RibH2 soluble a una concentración 10 veces superior a la utilizada en la inmovilización en los *wells*. Luego, los fagos eluidos fueron usados para infectar la cepa TG-1 de *E. coli* (empleada para amplificar a los fagos y titular la cantidad de los mismos). Este proceso se repitió cuatro veces. Los insertos de los fagos provenientes de la 3ra y 4ta ronda de *panning* fueron amplificados por PCR y secuenciados.

Las secuencias clonadas en los fagémidos fueron amplificadas usando oligonucleótidos específicos que flanquean al inserto [175]. Se emplearon fagémidos provenientes de la tercera y cuarta ronda de *panning* de cada uno de los métodos de elución utilizados. Se obtuvieron las secuencias de 130 amplicones provenientes de 80 clones obtenidos a partir de la tercera ronda de *panning* y 50 clones a partir de la cuarta. Luego se analizó cada una de las secuencias obtenidas, determinando si pertenecía a un ORF, cuál es la función que cumple y si aparecían clones coincidentes para un mismo ORF. En cada caso se estudió si las secuencias obtenidas eran repeticiones del mismo clon o si eran clones distintos que contenían insertos solapados o no.

Se depuró la lista de ORFs relevantes, otorgando una mayor preferencia a los clones que cumplían con cierto criterio de selección: i) candidatos que hayan aparecido en ambos métodos de elución, ii) que el ORF esté representado por clones con insertos superpuestos, iii) que los clones aparezcan repetidos, iv) que ocurran repeticiones en la ronda tres y cuatro y, v) que tengan alguna relación funcional o genética con RibH2 (**Tabla 1**). De los 23 ORFs seleccionados se destacan dos: BAB1\_0789 que codifica la proteína RibD y se aisló por ambos métodos de elución, y BAB2\_0553 que también fue aislado por ambos métodos de elución y esta representado por dos clones idénticos. Además el ORF BAB2\_0553 se encuentra a cinco genes de distancia de *ribH2*.

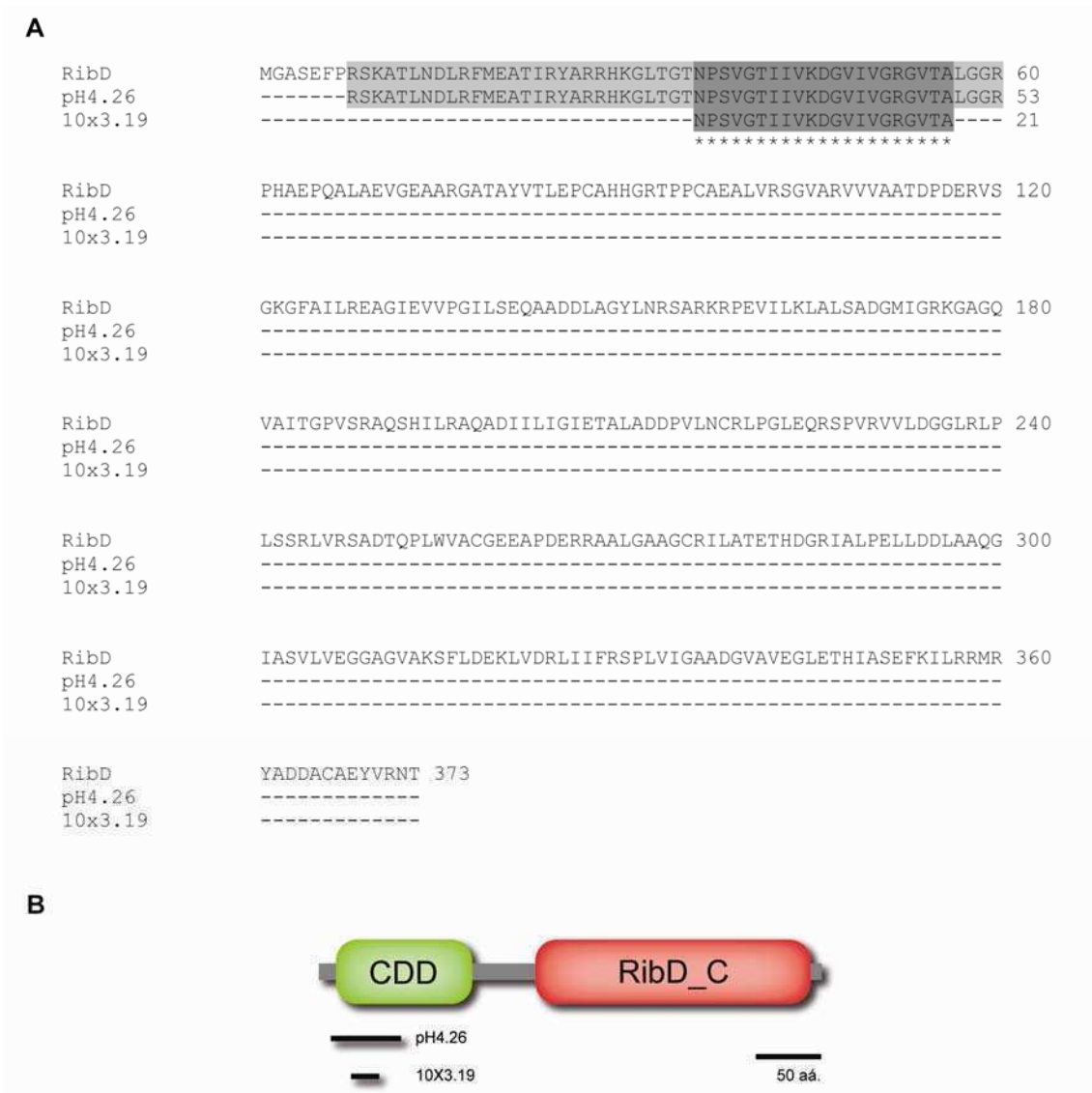


**Tabla 1. Lista de ORFs más relevantes encontrados en el screening de la biblioteca de *display* en fagos.**

NA	Método	Descripción
BAB1_0084	pH	<i>membrane protein, putative</i>
BAB1_0563	pH	<i>glycosyl transferase, group 1 family protein</i>
BAB1_0708	pH	<i>permease YjgP/YjgQ family protein</i>
BAB1_0789	pH-comp	<i>riboflavin biosynthesis protein RibD</i>
BAB1_1000	pH	<i>glycosyl transferase, group 1 family protein</i>
BAB1_1124	pH	<i>transcriptional regulator, GntR family</i>
BAB1_1191	pH-comp	<i>ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpA</i>
BAB1_1337	pH	<i>HTH-type transcriptional regulator pecT</i>
BAB1_1346	pH	<i>membrane protein, putative</i>
BAB1_1400	pH	<i>transcriptional regulator, TetR family</i>
BAB1_1434	pH	<i>antibiotic acetyltransferase</i>
BAB1_1436	pH	<i>ribosomal protein L11 methyltransferase, putative</i>
BAB1_1575	pH-comp	<i>ARN-binding region RNP-1 (ARN recognition motif):Blue (type 1) copper domain</i>
BAB1_1718	pH	<i>opgC protein, putative</i>
BAB1_1827	pH-comp	<i>CHP</i>
BAB1_1909	pH	<i>HP</i>
BAB1_1960	pH	<i>Amino acid ABC transporter, ATP-binding protein</i>
BAB1_2015	pH	<i>membrane protein, putative</i>
BAB2_0286	comp	<i>Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein</i>
BAB2_0448	pH-comp	<i>CHP</i>
BAB2_0553	pH-comp	<i>drug resistance transporter, Bcr/CflA family</i>
BAB2_1047	comp	<i>acyl-CoA dehydrogenase</i>
BAB2_1149	pH-comp	<i>ROK family protein</i>

En gris se resaltan los clones elegidos para continuar con la caracterización de los fagos correspondientes a RibD y el ORF BAB2\_0553 que codifica una proteína putativa de membrana. NA: Número de acceso del ORF en la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>).

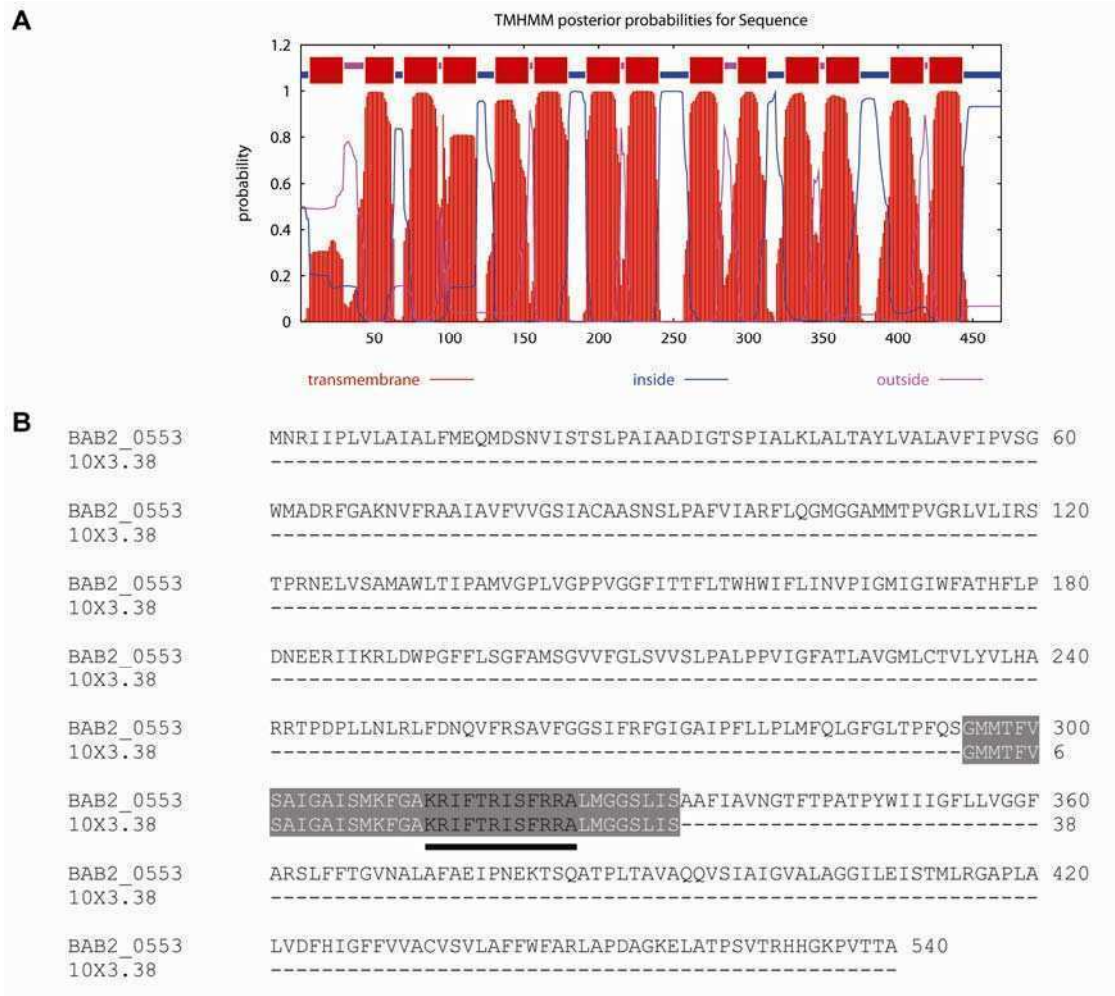
Se obtuvieron dos clones de secuencias independientes que mapean sobre una misma región de RibD. Los clones fueron denominados pH4.26 y 10X3.19, respectivamente. El clon pH4.26 cuenta con una secuencia más larga, que contiene a la secuencia del clon 10X3.19 (**Figura 6.A**). RibD de *B. abortus* posee dos dominios funcionales, denominados Citidina y Desoxicitidilato Deaminasa (CDD) en el extremo N-terminal y el dominio RibD\_C en el extremo C-terminal (RibD\_C) (**Figura 6.B**). Las secuencias de los clones pH4.26 y 10X3.19 corresponden al dominio CDD (**Figura 6.B**).



**Figura 6. Los clones obtenidos por *display* en fagos corresponden a un dominio de RibD.**

(A) Se alinearon las secuencias traducidas de los insertos de los fagos obtenidos a partir del *screening* de la biblioteca de *display* en fagos con la secuencia de RibD de *B. abortus*. El clon pH4.26 se superpone con RibD (gris claro). El clon 10X3.19 se muestra superpuesto a RibD y a pH4.26 (gris oscuro). (B) RibD cuenta con dos dominios: un dominio N-terminal denominado Citidina y Desoxicitidilato Deaminasa (CDD) y un dominio RibD\_C terminal (RibD\_C). Las regiones correspondientes a las secuencias de pH4.26 y 10X3.19 se muestran indicadas en la figura. La figura está en escala.

El otro ORF, anotado como BAB2\_0553, codifica un transportador de membrana de función desconocida. Este marco de lectura abierto está ubicado a sólo cinco genes de distancia de *ribH2*, la proteína que codifica posee 469 aminoácidos de longitud y tiene una predicción de 14 regiones transmembrana, 8 dominios citoplasmáticos y 6 dominios extracelulares. La secuencia aislada corresponde al sexto *loop* o dominio intracelular desde el extremo N-terminal (Figura 7).

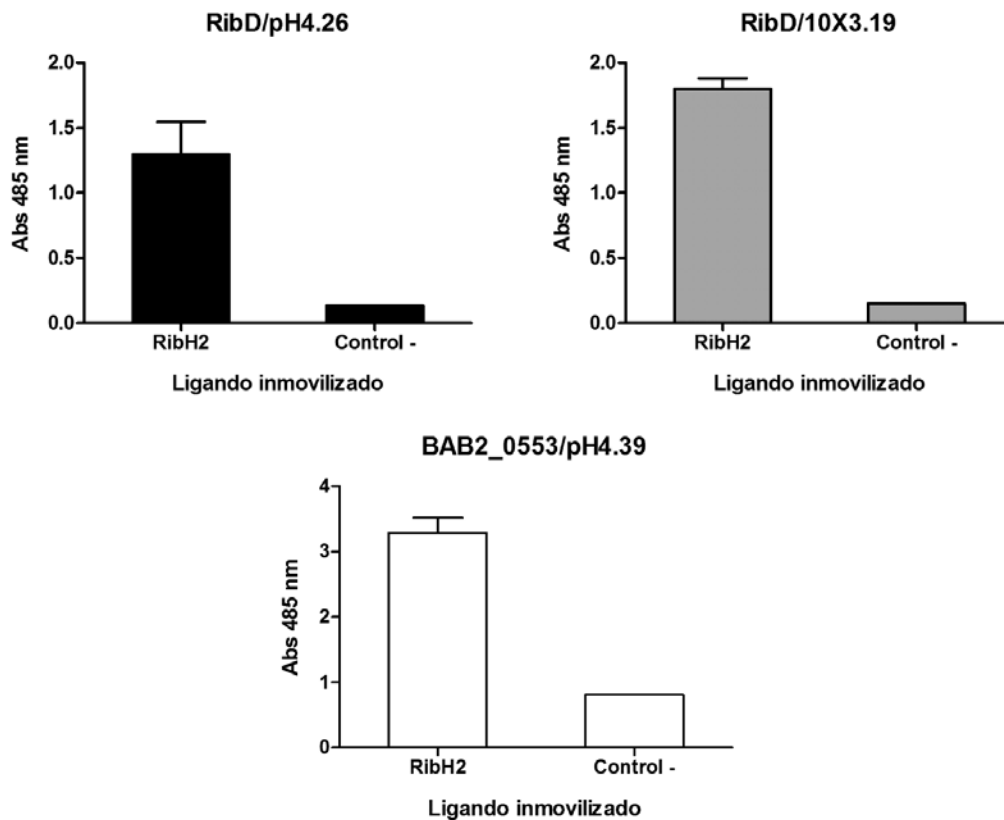


**Figura 7. Alineamiento del clon 10X3.38 y BAB2\_0553.**

(A) Predicción de la estructura de dominios del producto del ORF BAB2\_0553 realizada en *TMHMM Server v. 2.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) (B) La secuencia del péptido expresado en el clon 10x3.38 se muestra sombreada (gris) y la predicción del sexto dominio citoplasmático del producto de BAB2\_0553 se muestra en letras negras y subrayadas.

## Caracterización del *binding* por ELISA

Para confirmar que los clones de los fagos obtenidos son específicos para la interacción con RibH2 se emplearon el ELISA de fagos y el *panning* de fago único. Se utilizó como ligando control la proteína BSA, esperando que los fagos no presentasen afinidad por la misma. En todos los casos se observó que la señal para RibH2 siempre fue mucho mayor a la del control negativo sugiriendo que la unión entre RibH2 y el fago es específica (**Figura 8**).

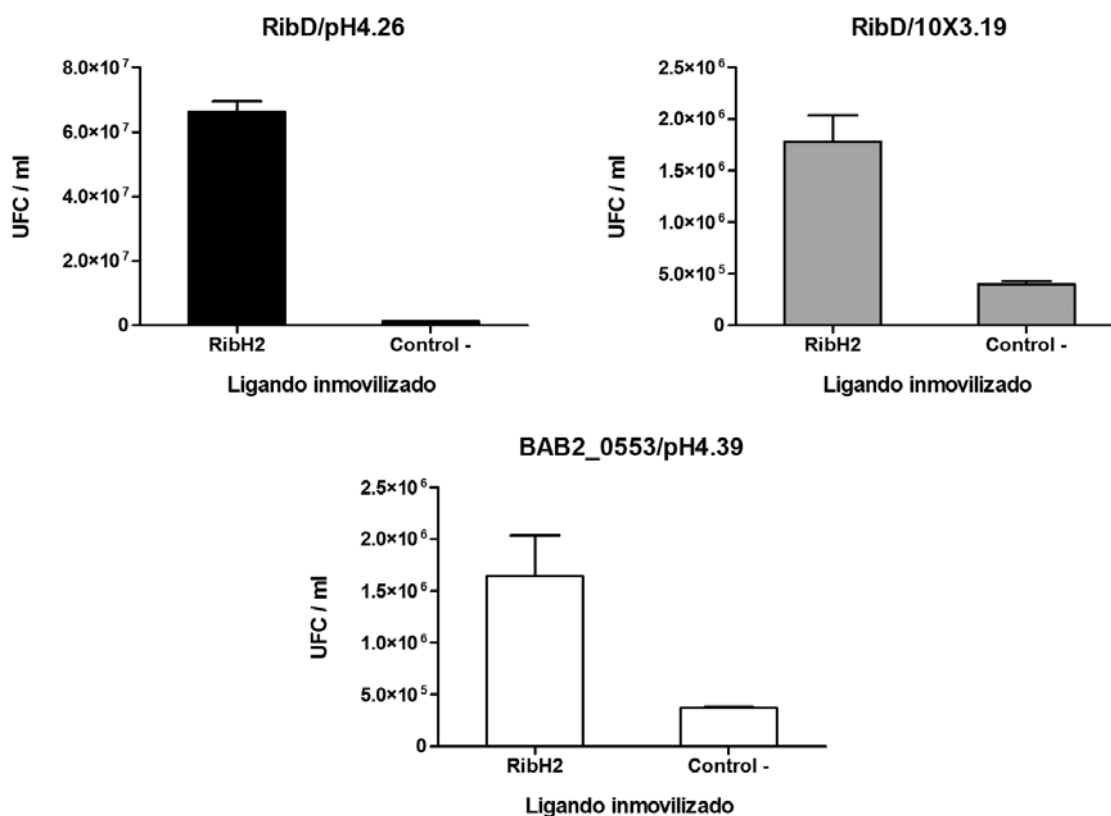


**Figura 8. ELISA con fagos puros.**

Se inmovilizaron 0,1  $\mu\text{g}$  de RibH2 y como control negativo 0,1  $\mu\text{g}$  de BSA (Control -). Se emplearon *stocks* de fagos puros de  $1 \times 10^8$  UFC/ml y los fagos unidos se revelaron con un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -M13 conjugado a HRP. Se utilizó OPD como sustrato en la reacción colorimétrica y se midió la absorbancia a 485 nm. Se grafica la media + la desviación estándar (N = 4).

### Caracterización del *binding* por *panning*

Por *panning* también se determinó que la interacción es específica. Se comparó la capacidad de unión a diferentes ligandos mediante *pannings* en los que se emplearon fagos únicos purificados. En los *wells* del ensayo se inmovilizó el RibH2 y en los *wells* control se inmovilizó BSA, luego se realizó una ronda de *panning* idéntica a las anteriormente descritas, y finalmente se realizó un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) como método para estimar la capacidad de *binding*. Se obtuvieron recuentos entre 5 y 50 veces mayores en los *wells* en donde se inmovilizó el ligando de interés respecto a los *wells* del control negativo (Figura 9). En conjunto, los resultados del ELISA de fagos y del *panning* sugieren que las interacciones entre RibH2 y RibD, y RibH2 y BAB2\_0553 son específicas. Sin embargo, se requiere de estudios biofísicos y bioquímicos más detallados para determinar la especificidad de las interacciones observadas.



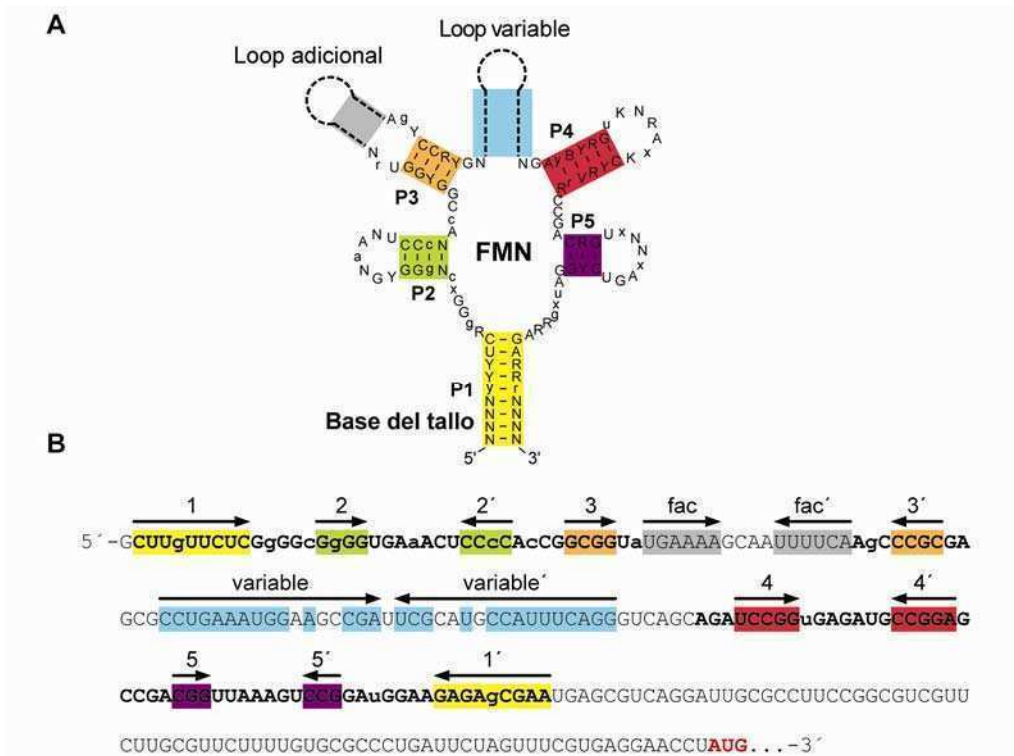
**Figura 9. Panning con fagos puros.**

Se inmovilizaron 0,1  $\mu\text{g}$  de RibH2 y como control negativo 0,1  $\mu\text{g}$  de BSA (Control -). Se emplearon stocks de fagos puros de  $1 \times 10^6$  UFC/ml y los fagos unidos se eluyeron por cambio en el pH y se titularon las UFC. Los recuentos se expresan como UFC/ ml. Se grafica la media + la desviación estándar (N = 4).

## Expresión y regulación de *ribH2*

### La expresión de RibH2 de *B. abortus* está regulada por el riboswitch FMN

Como se mencionó en la Introducción, río arriba del gen *ribH2* existe una predicción bioinformática para una secuencia *rfa*-box que codifica un riboswitch FMN, mientras que reguladores de este tipo se hallan ausentes en la región intergénica del operón *rib*. El servidor RibEx (<http://132.248.32.45/cgi-bin/ribex.cgi>) predice este elemento regulatorio a 215 pb del ATG de inicio de *ribH2* (*e-value*:  $2,20 \cdot e^{-21}$ ) [180]. Todas las regiones y secuencias del elemento regulatorio están conservadas y coinciden con lo descrito en la literatura (**Figura 10**) [188].

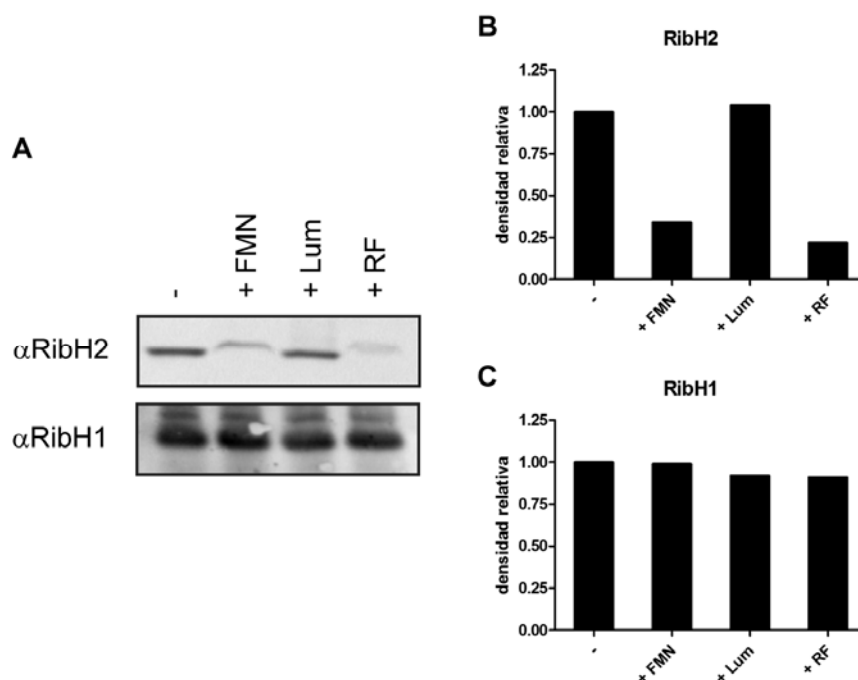


**Figura 10. Regiones conservadas del ARNm de *ribH2* de *Brucella*.**

(A) El riboswitch FMN se caracteriza por poseer una estructura conservada que contiene regiones donde las bases se encuentran apareadas. Además la secuencia de este riboswitch posee bases con posiciones que son invariables (en mayúscula) y altamente conservadas (en minúscula). Las hélices conservadas se numeran de P1 a P5 siendo P1 la base del tallo. Además el riboswitch FMN contiene un *loop* variable de secuencia no conservada y, en algunos casos, puede contener un *loop* adicional. Adaptado de [188] (B) La secuencia correspondiente a 215 pb del 5' UTR del ARNm de *ribH2* de *B. abortus* conserva las hélices de P1 a P5 y muestra los *loops* adicional y variable. En negrita se muestra la secuencia del riboswitch, en mayúscula las posiciones invariables y en minúscula las conservadas.

Barrick *et al.* (2007), abordó el estudio de los riboswitches de forma computacional donde muestra que los riboswitches FMN de *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* estarían actuando por medio de la atenuación traduccional [146]. Para distinguir entre los modelos de regulación a nivel de la traducción o transcripción se decidió medir los niveles de expresión de proteína y expresión transcripcional de *ribH2* en bacterias cultivadas en presencia de FMN y otras flavinas. Para ello se realizaron Western Blots revelando RibH2 y también se creó una construcción reportera correspondiente al promotor de *ribH2* fusionado transcripcionalmente al gen *lacZ*.

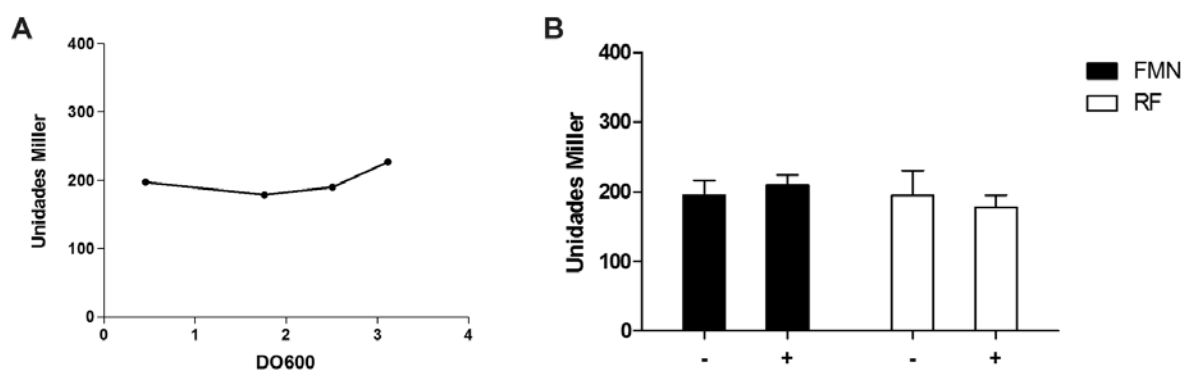
La cepa *B. abortus* 2308 se cultivó en presencia de diferentes flavinas y se realizó un Western Blot revelando RibH2 y, como control, se reveló también RibH1. Se observó una clara dependencia de los niveles de RibH2 con respecto a la presencia de FMN y riboflavina (Figura 11.A). Esta dependencia no se observa para la proteína RibH1 (Figura 11.C). En presencia de FMN o riboflavina los niveles de RibH2 disminuyeron entre 4 y 5 veces mientras que con lumazina no se observó ningún cambio respecto al control (Figura 11.B).



**Figura 11. Inhibición de la expresión de RibH2 en *B. abortus*.**

(A) Western Blot revelado para RibH2 y RibH1 de extractos de cultivos de la cepa silvestre (WT) cultivados en presencia de 500  $\mu$ M FMN, lumazina (Lum) o riboflavina (RF). En los wells se sembraron la misma cantidad de extracto de bacterias medida por DO<sub>600</sub>. (B) Se grafica la densidad de los pixeles correspondiente al área de las bandas medidas con el programa *ImageJ 1.43* y relativizadas a los niveles WT para RibH2 y (C) RibH1.

Los niveles transcripcionales correspondientes al promotor de *ribH2* se midieron mediante la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen reportero. A lo largo de la curva de crecimiento en TSB no se observan cambios en la actividad transcripcional (Figura 12.A). La adición de FMN ó riboflavina al medio no cambia la actividad transcripcional del promotor *ribH2* (Figura 12.B). Contrariamente a lo observado en cuanto a la expresión de proteína, los niveles de transcripción no se ven afectados por la presencia de los metabolitos FMN o riboflavina (Figura 12).

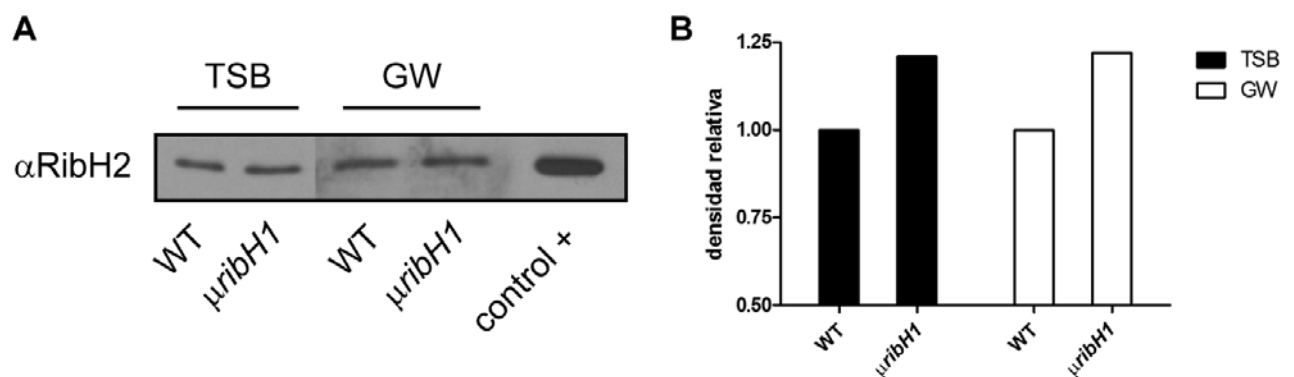


**Figura 12. Niveles transcripcionales de *ribH2* de *B. abortus*.**

(A) *B. abortus* 2308 fue cultivada en medio TSB. A distintos tiempos se cosecharon las células, se permeabilizaron y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa utilizando ONPG como sustrato. (B) *B. abortus* 2308 fue cultivada a saturación en TSB en presencia de FMN o riboflavina (500  $\mu$ M) y se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los valores son expresados como la media + la desviación estándar (N = 2).

Como los niveles de FMN dependen de los niveles de riboflavina y, por ende, de lumazina, en ausencia de las RibH1, los niveles de FMN podrían bajar. El riboswitch, en estas condiciones de menor concentración de FMN, tendería a desreprimir la traducción de RibH2 aumentando los niveles de proteína RibH2. Por ello se postuló que la ausencia de RibH1 podría traer aparejado un aumento en los niveles de RibH2. Para confirmar esta idea, se midieron por Western Blot los niveles de RibH2 en la cepa WT y en una cepa mutante para el gen *ribH1* ( $\mu$ *ribH1*) en medio rico y medio mínimo (TSB y GW respectivamente) (**Figura 13.A**). Midiendo la densidad relativa de las bandas en los Western Blots, los resultados obtenidos indicaron que en ambos medios de cultivo la cepa  $\mu$ *ribH1* presenta niveles de proteína RibH2 superiores en un 20% a los de cepa control WT (**Figura 13.B**).

En resumen, el gen *ribH2* tiene un riboswitch en la región 5' no codificante y este elemento regulador estaría atenuando traduccionalmente y no transcripcionalmente los niveles de RibH2, en presencia de FMN y riboflavina *in vivo*.



**Figura 13. Western Blots de RibH2 en la cepa  $\mu$ ribH1.**

(A) Western Blot revelado contra RibH2 de extractos de cultivos WT y  $\mu$ ribH1 cultivados en medio rico (TSB) y medio mínimo (GW), se incluyó un control positivo de proteína RibH2 pura. En los wells se sembraron la misma cantidad de bacterias medida por  $DO_{600}$ . (B) Se grafica la densidad de los pixeles correspondiente al área de las bandas medidas con el programa *ImageJ 1.43* y relativizadas a los niveles de WT para cada medio de cultivo.

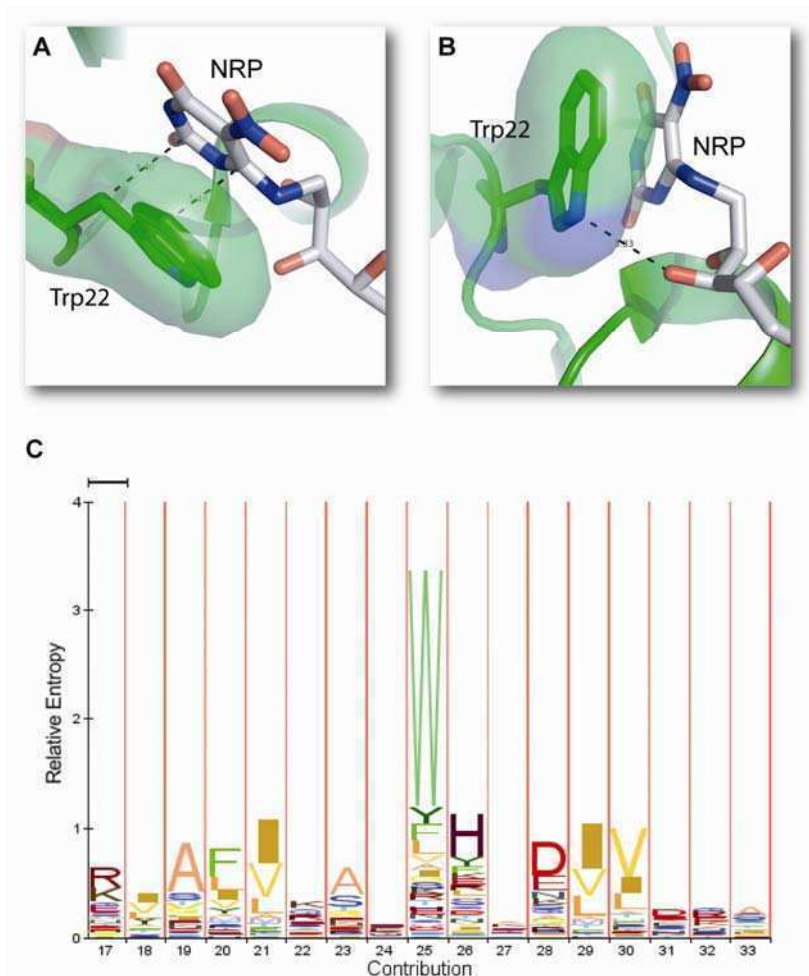
## Generación de la mutante RibH2\_W22A

Dentro de las diferencias existentes y mencionadas en la Introducción, RibH2, a diferencia de RibH1, es capaz de unir riboflavina con una constante de disociación ( $K_d$ ) de 7  $\mu$ M [139]. Con el fin de estudiar el rol de unión de riboflavina a RibH2 en la actividad LS se realizó una mutante de dicha proteína deficiente en la unión de riboflavina.

Con el objetivo de obtener una mutante de RibH2 carente de la capacidad de unir riboflavina se analizó la estructura tridimensional de RibH2. El análogo de sustrato 5-nitro-6-(D-



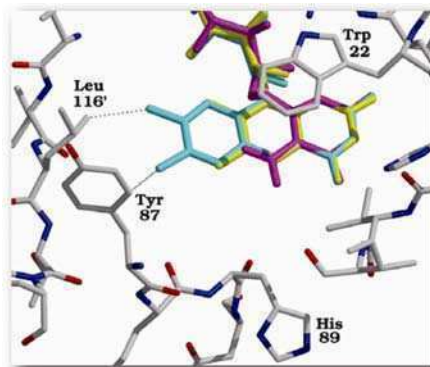
ribitilamino)-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona (NRP) realiza contactos de unión con el triptofano de la posición 22 (W22). Las interacciones son principalmente entre el anillo indólico del residuo del W22 y el anillo del análogo de sustrato formando una interacción tipo *stacking- $\pi$*  (**Figura 14.A**). Existe también un puente de hidrógeno entre el N indólico del W22 y un OH del ribitilo del NRP (**Figura 14.B**). Cuando se analiza el alineamiento de las secuencias RibH2 de diferentes organismos se evidencia la alta conservación del triptofano de la posición 22 de la RibH2 de *Brucella* (**Figura 14.C**)



**Figura 14. Análisis del sitio activo de RibH2.**

(A) Interacciones que tiene W22 con el NRP de RibH2 de *B. abortus*: las interacciones son de tipo *stacking- $\pi$*  entre el anillo indólico del triptofano y el heterociclo del NRP (distancias resaltadas en línea punteada < 3,5 Å) y (B) un puente de H entre el N indólico del W22 y un OH del ribitilo del NRP (distancia promedio 3,4 Å). Análisis a partir del PBD 1T13 usando *PyMol 1.3*. (C) El logo del un modelo de matrices ocultas de Markov (HMM) de la familia de las proteínas RibH2 revela la alta conservación del triptofano correspondiente a la posición 22 de RibH2 de *Brucella*. Sólo se muestran las primeras posiciones de la secuencia. La altura del aminoácido corresponde con la probabilidad de ocurrencia del mismo. Para la construcción del logo se utilizaron los programas *ClustalW 2.0.12 Multiple sequence alignment*, *hmmer 3.0: HMMBUILD*, desde el servidor *Mobyle@Pasteur v1.0* (<http://mobyle.pasteur.fr/>) y fue visualizado en *LogoMat-M* desde el servidor del *Sanger Institute* (<http://www.sanger.ac.uk>). El set de datos constó de 95 secuencias de proteínas RibH2 provenientes de genomas completamente secuenciados.

Esta observación sugiere que el residuo W22 sería también responsable de estabilizar la unión tanto del precursor de la lumazina (5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*, 3)-pirimidinadiona) como de la riboflavina (**Figura 15**) [138]. La mutante RibH2\_W22A fue generada y purificada. La unión de riboflavina a la proteína se determinó mediante el *quenching* de la fluorescencia intrínseca de la riboflavina.

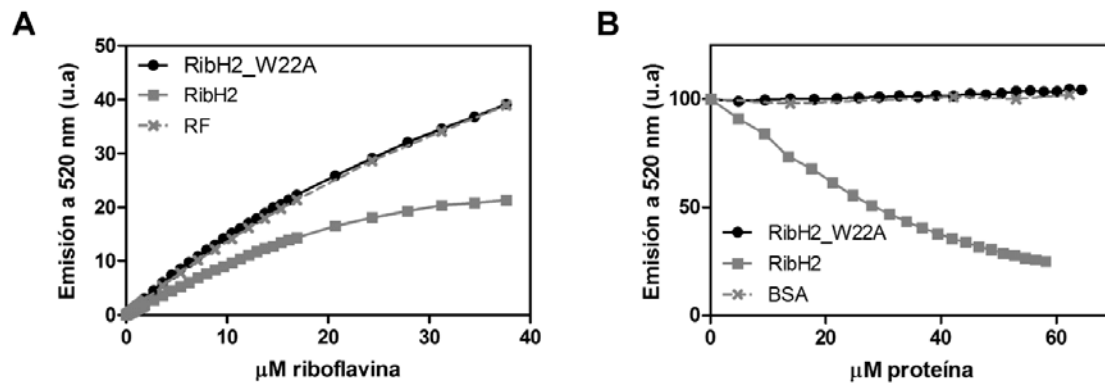


adaptado de [138]

**Figura 15. Modelado del sitio de unión de RibH2 de *B. abortus*.**

El análisis de la estructura de la RibH2 de *B. abortus* permite ubicar tanto a la riboflavina (celeste) como a la lumazina (amarillo) y superponiéndolos con el análogo de sustrato NRP (magenta) en la cavidad del sitio de unión.

Se realizaron curvas de titulación a una cantidad de proteína constante con concentraciones crecientes de riboflavina o viceversa (**Figura 16**). La curva control de riboflavina sin proteína muestra el aumento esperado de la fluorescencia correspondiente con el aumento de la concentración de fluoróforo libre. La curva en presencia de 30  $\mu$ M RibH2 muestra una disminución del crecimiento de la fluorescencia respecto a la curva sin proteína debido al *quenching* que surge por la unión de la riboflavina a RibH2. Analizando la curva de la proteína mutante se puede observar que se superpone con la curva control sin proteína (**Figura 16.A**). Cuando se titularon 30  $\mu$ M riboflavina con RibH2, la fluorescencia intrínseca de la riboflavina disminuye a medida que la concentración de RibH2 aumenta debido al *quenching* de la fluorescencia de flavina. Sin embargo, cuando se titulan 30  $\mu$ M riboflavina con RibH2\_W22A, BSA ó buffer (controles negativos), la fluorescencia se mantiene sin modificarse (**Figura 16.B**). La proteína mutante fue caracterizada estructuralmente en más detalle por integrantes del Laboratorio, y se demostró que su estructura y estabilidad permanecen intactas (datos no mostrados).



**Figura 16. Unión de riboflavina a RibH2 de *B. abortus*.**

Curvas de titulación de (A) 30  $\mu$ M proteína titulada con concentraciones crecientes de riboflavina y (B) 30  $\mu$ M riboflavina fija titulada con concentraciones crecientes de proteína. Excitación a 450 nm y medición de la emisión a 520 nm. Para (B) se tomó el 100% de emisión en la solución con 30  $\mu$ M riboflavina en ausencia de proteína.

## RibH1 y RibH2 poseen función enzimática LS *in vivo*

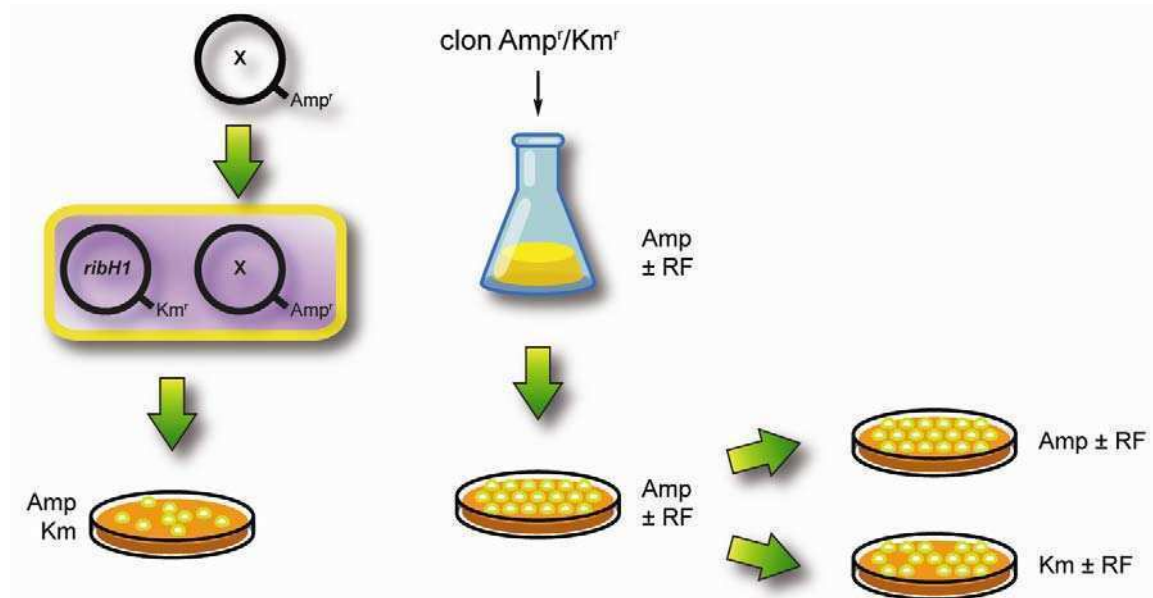
Dado que RibH1 y RibH2 exhiben una actividad enzimática *in vitro* bastante baja comparada con la actividad de otras LSs ya caracterizadas [128,136], se decidió evaluar la actividad LS de las RibH *in vivo*. Para ello, se generó una mutante en el gen *ribH2* en *B. abortus* 2308 ( $\mu$ *ribH2*) la cual no presenta auxotrofia para riboflavina, al igual que la cepa  $\mu$ *ribH1*. Se intentó generar la cepa doble mutante para los genes *ribH*, utilizando las cepas  $\mu$ *ribH1* o  $\mu$ *ribH2* como parentales. Los intentos de mutagénesis se realizaron con y sin el agregado de riboflavina a los medios de cultivo, aunque ésta se encontraba en baja concentración debido a la baja solubilidad de la misma en medios acuosos no básicos. Todos los intentos de obtención de la mutante doble fracasaron. Esto sugiere que la ausencia de RibH1 y RibH2 es letal en *Brucella*.

Luego, se clonó al gen *ribH1* en un plásmido de expresión en *Brucella* bajo un promotor constitutivo (*pribH1Km*). Este plásmido fue transformado en la cepa  $\mu$ *ribH*, generando la cepa  $\mu$ *ribH* + *pribH1Km* que luego fue utilizada como parental para la mutagénesis del gen *ribH2*. De esta manera se obtuvo la cepa mutante cromosómica en ambos genes *ribH* denominada doble  $\mu$ *ribH* + *pribH1Km*, la cual expresa RibH1 desde el plásmido. Esta cepa fue utilizada en los experimentos que se describen a continuación.

## Experimentos de barajado de plásmidos

Se diseñó un experimento genético de barajado de plásmidos para evaluar si las proteínas RibH y RibH2\_W22A tienen función LS *in vivo*. Para ello se toma como premisa que

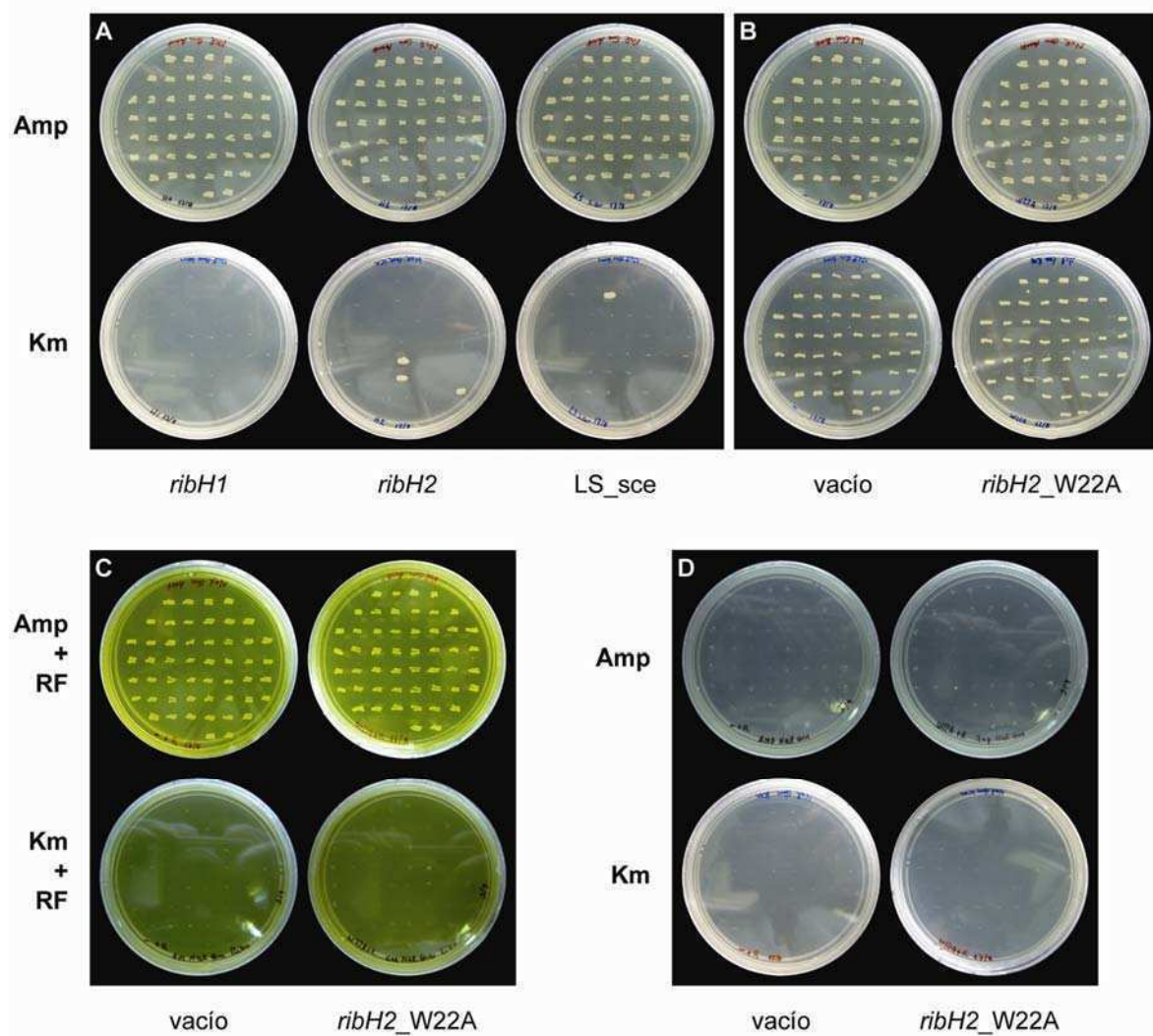
el plásmido *pribH1Km* es esencial para la sobrevivencia de la bacteria mutante en ambos genes *ribH*, en medio TSB (sólo contiene trazas de riboflavina). Por lo tanto, se ensayó si el plásmido *pribH1Km* ( $Km^r$ ) podía ser curado en presencia de otro plásmido del mismo grupo de incompatibilidad pero con resistencia a ampicilina (*pBBR4*) albergando distintos insertos. En teoría y suponiendo que *pribH1Km* le está aportando la función LS codificada en *ribH1*, sólo plásmidos con insertos que codifican enzimas LS serían capaces de reemplazar el plásmido *pribH1Km* original después de varias generaciones bacterianas. En caso de que el plásmido  $Amp^r$  no codificara para la función LS, la bacteria se vería obligada a retener el plásmido  $Km^r$  porque éste le estaría aportando esa función enzimática vital. Esto sería debido a que existe una presión de selección metabólica para mantener la función de LS cuando las bacterias son cultivadas en ausencia de riboflavina. En caso de que haya riboflavina presente en el medio durante la selección con  $Amp$ , no existiría presión metabólica alguna y la bacteria podría perder el plásmido  $Km^r$  que codifica la LS. Como control positivo de función enzimática de LS se eligió a RIB4 *Saccharomyces cerevisiae* (ORF YOL143C), que se nombra en esta Tesis como LS\_sce. Elegimos LS\_sce porque es una LS ampliamente caracterizada en la literatura y con una alta actividad enzimática [126,189,190]. Además, tiene baja identidad con ambas RibH: 31% respecto a RibH1 y 23% respecto a RibH2. Los insertos *ribH1*, *ribH2*, *ribH2\_W22A* y LS\_sce fueron clonados en los en el vector *pBBR4* separadamente para generar los plásmidos *pribH1*, *pribH2*, *pribH2\_W22A* y *pLS\_sce* respectivamente. Estos plásmidos y el vector vacío fueron utilizados para desplazar al vector residente de la cepa doble  $\mu ribH + pribH1Km$  (Figura 17)



**Figura 17. Esquema simplificado del experimento de barajado de plásmidos.**

Diferentes construcciones del plásmido *pBBR4* ( $Amp^r$ ) fueron introducidas por conjugación dentro de la cepa doble  $\mu ribH + pribH1Km$  (X: *ribH1*, *ribH2*, LS\_sce, *ribH2\_W22A* o el plásmido vacío). Las transconjugantes fueron seleccionadas por resistencia a  $Amp$  y  $Km$ . Luego, tres clones independientes de cada conjugación fueron cultivados separadamente en presencia de  $Amp$  por más de 10-15 generaciones. Cien clones  $Amp^r$  fueron replicados en placas  $Amp$  y  $Km$  y se determinaron los porcentajes  $Amp^r/Km^s$ . Cuando se utilizaron *pBBR4* vacío o *pribH2\_W22A*, se agregó o no riboflavina (RF) a los medios de cultivo para demostrar que la presencia del metabolito final de la ruta puede llevar a la pérdida completa de la actividad LS en la célula.

Los plásmidos *ribH2* y *pLS\_sce* pueden reemplazar a *ribH1Km* en la cepa doble  $\mu$ *ribH*, demostrando de esta manera que tanto RibH1 como RibH2 cumplen con la función de LSs *in vivo* (**Figura 18.A**). A su vez, el plásmido *ribH1Km* no puede ser reemplazado por un plásmido vacío pBBR4 o por *ribH2\_W22A*, pero sí por el plásmido control *ribH1* ( $Amp^r$ ) (**Figura 18.A y B**). En esta serie de experimentos se añadió riboflavina a los medios de cultivo calentando a ebullición los medios, lo cual permitió solubilizarla hasta concentraciones de 500  $\mu$ M. Utilizando estas concentraciones de riboflavina, *ribH2\_W22A* o el plásmido vacío son capaces de reemplazar al plásmido *ribH1Km* en la cepa doble  $\mu$ *ribH* (**Figura 18.C**). Los clones  $Amp^r/Km^s$  obtenidos a partir de estos últimos mencionados pierden la capacidad de crecer en ausencia de riboflavina (**Figura 18.D**).



Inserto	% $Amp^r/Km^s$	
	- RF	+ RF
<i>ribH1</i>	100	-
<i>ribH2</i>	95	-
<i>LS_sce</i>	98	-
<i>ribH2_W22A</i>	4	100
vacío	2	100

Figura 18. Resultados de los plaqueos de los experimentos de barajado de plásmidos.

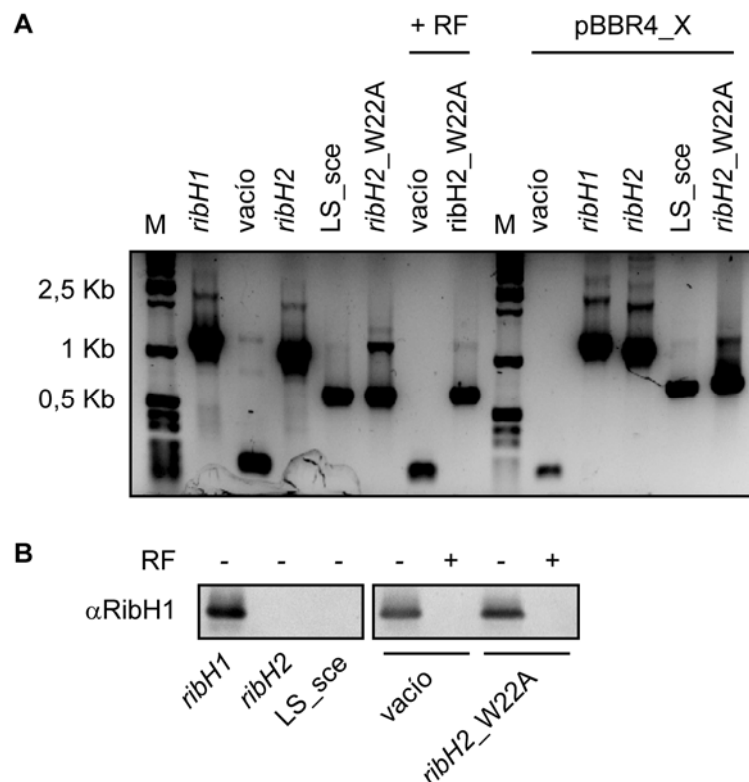
...continúa en la página siguiente

Réplicas en placas de petri TSA-Km de clones  $Amp^r$  de la cepa doble  $\mu ribH + pribH1Km$  realizadas luego de crecer las bacterias por 10-15 generaciones después de haber sido transformada con el plásmido pBBR4 con los insertos (A) *ribH1*, *ribH2*, LS\_sce, (B) *ribH2\_W22A*, el plásmido vacío, o (C) *ribH2\_W22* ó el plásmido vacío en presencia de 500  $\mu M$  riboflavina (RF). (D) Los clones doble  $\mu ribH Amp^r/Km^s$  que contienen los vectores pBBR4 vacío o *ribH2\_W22A* fueron replicados en placas  $Amp$  sin el agregado de RF y Km con el agregado de RF como controles.

**Tabla: Cuantificación de los desplazamientos**

Porcentajes calculados de clones doble  $\mu ribH Amp^r/Km^s$  obtenidos en el experimento de barajado de plásmidos para cada uno de los insertos clonados en pBBR4.

Para demostrar que efectivamente se desplazó o no a *ribH1* en los experimentos de barajado de plásmidos se realizaron *colony-PCR* sobre clones  $Amp^r$ . Se usaron los *primers* universales que flanquean a todos los insertos clonados en los vectores pBBR4 y a *ribH2* en *pribH1Km*. Como templado se utilizaron clones  $Amp^r$  correspondiente a cada una de las placas de los paneles A, B y C de la **Figura 18**. Es posible distinguir por el tamaño del amplicón a qué inserto corresponde (**Figura 19.A**). Para evaluar la presencia de la proteína RibH1 se realizaron Western Blots de cultivos de esos mismos clones revelando RibH1 (**Figura 19.B**). Todos los clones evaluados  $Amp^r/Km^r$  mostraron un amplicón correspondiente a *ribH1* así como también una banda en el Western Blot positiva para RibH1 (**Figura 19**).



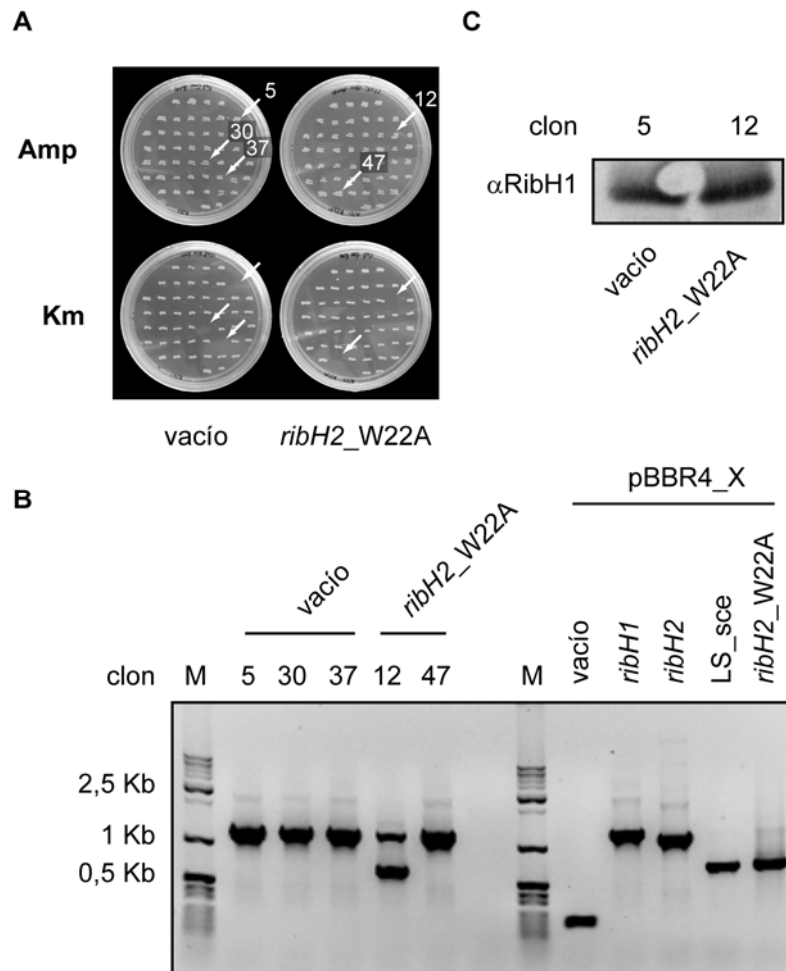
**Figura 19. Controles por *colony-PCR* y Western Blot del experimento de barajado de plásmidos.**

(A) *Colony-PCR* utilizando los *primers* universales T7 y T3 que flanquean el sitio de clonado múltiple del pBBR4 ( $Amp^r$ ) y del *pribH1Km*. Las primeras siete calles después del marcador de PM (M) muestran las bandas de amplificación provenientes de la *colony-PCR* del primer clon  $Amp^r/Km^s$  de las placas  $Amp$  correspondientes a la **Figura 18**. Cada calle es nombrada con el inserto que llevaba el pBBR4 conjugado en el experimento de barajado de plásmidos. A los clones cultivados en presencia de riboflavina se los designó + RF. Como control de amplificación y tamaño de amplicones se utilizaron plásmidos puros como templado de la PCR (calles pBBR4\_X) donde el nombre de la calle corresponde al inserto del plásmido. (B) Western Blot de los mismos clones usados para las *colony-PCR* revelando RibH1.

## Anomalías en el ensayo de barajado de plásmidos

Se observaron clones que presentaron un fenotipo Amp<sup>r</sup>/Km<sup>s</sup> en ausencia de riboflavina cuando se evaluó el barajado de plásmidos en la cepa doble  $\mu$ ribH + pribH1Km con los plásmidos pBBR4 vacío o con pribH2\_W22A, (**Figura 18.B y 20.A**). Estos clones son muy llamativos, ya que la sensibilidad a kanamicina (Km<sup>s</sup>) implica que han perdido al plásmido pribH1Km y la resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>) implica que poseen un plásmido sin ninguna LS activa codificada pero igual son capaces de crecer en ausencia de riboflavina. Sin embargo, todos estos clones tienen presente el gen de *ribH1* (**Figura 20.B**) y expresan la proteína RibH1 (**Figura 20.C**). Una posible explicación para la aparición de estos clones anómalos es que se hayan seleccionado eventos de recombinación entre los plásmidos homólogos pBBR2 y pBBR4 donde *ribH1* terminó integrado al episoma Amp<sup>r</sup>. La alta tasa de recombinación homóloga de *Brucella* sugiere que esta explicación es plausible. En este escenario, *ribH1* proveniente de *pribH1Km* se integró por recombinación homóloga al pBBR4 vacío o con *ribH2\_W22A* y, esta doble recombinación, permite que se pierda el plásmido original *pribH1Km*.

En resumen, RibH1 y RibH2 tienen función de LS *in vivo* mientras que la mutante RibH2\_W22A no la tiene. Por medio del experimento de barajado de plásmidos, fue posible reemplazar al plásmido *pribH1Km* de la cepa doble  $\mu$ ribH + *pribH1Km* con el plásmido pBBR4 vacío, generando una cepa sin ninguna LS codificada en ella. Se denominó a esta cepa doble  $\mu$ ribH y la misma será objeto de estudio en secciones futuras.



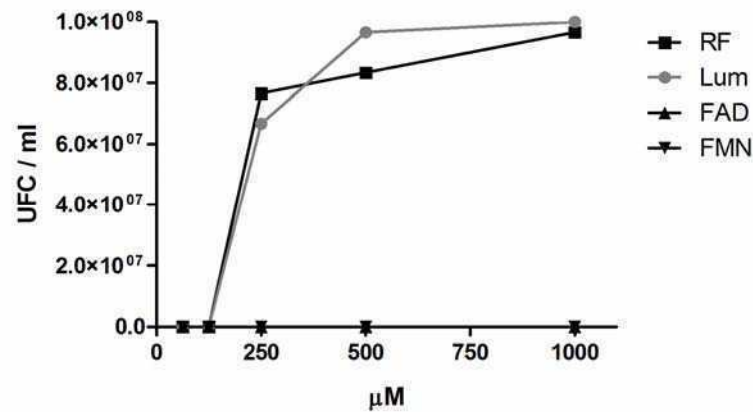
**Figura 20. Colony-PCR y Western Blot de los clones anómalos provenientes de barajado de plásmidos.**

(A) Las flechas indican los clones 5, 30, 37, 12 y 47,  $Amp^r/Km^s$  correspondientes a la **Figura 18.B** que fueron seleccionados para el análisis por colony PCR. (B) Productos de amplificación provenientes de la colony-PCR de los clones 5, 30, 37, 12 y 47, usando los *primers* universales T7 y T3 que flanquean el sitio de clonado múltiple del pBBR4 ( $Amp^r$ ) y del *ribH1*Km. Como control de amplificación y del tamaño de los amplicones se muestran las PCR usando los plásmidos puros como templado (calles pBBR4\_X) donde el nombre de la calle es el inserto del plásmido. (C) Western Blot de cultivos provenientes de los clones 5 (pBBR4 vacío) y 12 (*ribH2\_W22A*) contra RibH1.

## Auxotrofia y Transporte de Flavinas

Los experimentos de barajado de plásmidos evidenciaron que la cepa doble  $\mu ribH$  es incapaz de crecer en medio rico TSB sin el agregado de riboflavina. Por ello, se decidió evaluar la auxotrofia de esta cepa haciéndola crecer en placas suplementadas con diferentes concentraciones de las flavinas riboflavina, lumazina, FAD y FMN. Se determinó que no es posible restituir el crecimiento con el agregado de hasta 1 mM de FAD o FMN mientras que el agregado de riboflavina y lumazina logra restituir el crecimiento a partir de 250  $\mu M$  (**Figura 21**).



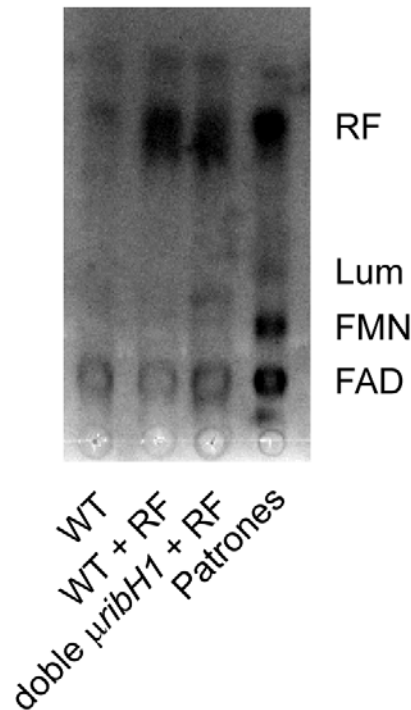


**Figura 21. Crecimiento de *B. abortus* doble  $\mu ribH$  en presencia de diferentes flavinas.**

La cepa doble  $\mu ribH$  se cultivó en placas de petri de TSA conteniendo diferentes concentraciones de riboflavina (RF), lumazina (Lum), FAD y FMN. Se plaquearon diluciones seriadas de un cultivo  $DO_{600} = 0,1$  para determinar las UFC por ml.

## Transporte de flavinas

Como fue mencionado en la Introducción, existen descriptos varios sistemas de transporte de flavinas en bacterias: RibU, RibM, ImpX y RfnT. Ningún genoma del género *Brucella* posee ORFs homólogos a alguno de los transportadores conocidos de flavinas. Este hecho sumado a que son necesarias concentraciones muy altas de riboflavina o lumazina (del orden  $\mu M$  a mM) para restituir el crecimiento de la cepa doble  $\mu ribH$ , lleva a postular que *Brucella* efectivamente no posee actividad de transporte de flavinas codificada en su genoma. La forma de entrada de las flavinas al citoplasma de la cepa doble  $\mu ribH$  sería por medio de difusión simple a través de la membrana celular. Debido a la poca difusibilidad de las flavinas a través de las mismas, son necesarias altas concentraciones extracelulares para que una fracción apreciable penetre en la célula. Para evaluar el contenido de flavinas celulares de *B. abortus* luego de haber sido cultivada en presencia de 500  $\mu M$  riboflavina, se realizó una extracción de flavinas intracelulares de las cepas WT y doble  $\mu ribH$ . Luego, los extractos fueron resueltos por medio de una cromatografía en capa delgada (TLC) analítica. Ambas cepas presentan una mayor cantidad de riboflavina intracelular en comparación a la cepa control cultivada sin el agregado de riboflavina (**Figura 22**).



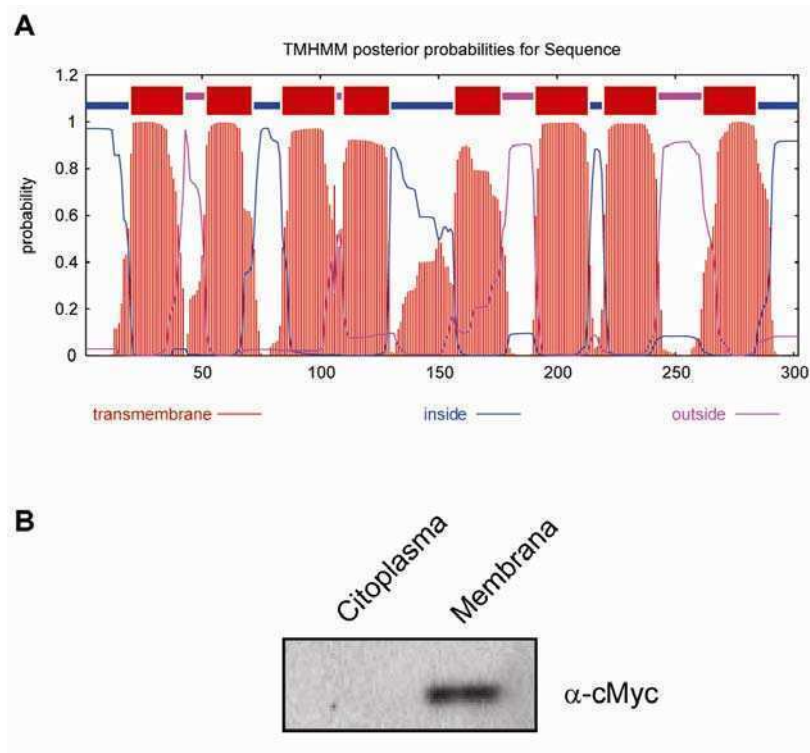
**Figura 22. TLC de flavinas intracelulares de *B. abortus*.**

Se sembraron extractos de flavinas de las cepas *B. abortus* 2308 (WT) y doble  $\mu$ ribH cultivadas en presencia de 500  $\mu$ M riboflavina (RF) conjuntamente con extractos de la cepa WT sin el agregado de riboflavina. Paralelamente se analizó una mezcla con los patrones de la riboflavina (RF), lumazina (Lum), FMN y FAD.

## Transportador RRT

Dos ORFs fueron identificados en el genoma de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 que presentan secuencias *rfn*-box en sus regiones regulatorias FMN (utilizando el servidor RibEx). Los ORFs encontrados son RL3153 y RL1692 los cuales presentan secuencias regulatorias que codifican un riboswitch FMN a 216 pb y 235 pb río arriba de sus respectivos codones de iniciación de la traducción (*e-values*:  $2,5 \cdot 10^{-18}$  y  $9,5 \cdot 10^{-22}$ ). Como se mencionó en la Introducción, las secuencias *rfn*-box hasta ahora sólo fueron halladas regulando genes del metabolismo y transporte de riboflavina [147]. RL3153 es el ORF que codifica al homólogo de RibH2 en *R. leguminosarum* y, tal como ocurre en *Brucella*, está gobernado por un riboswitch FMN. El ORF RL1692 puede ser identificado como miembro dentro de una gran familia de proteínas denominada *EamA-like transporter family* (Pfam, <http://pfam.sanger.ac.uk>). Los miembros de esta familia, se caracterizan por ser proteínas de membrana y transportar una gran variedad de sustratos a través de ella. El análisis bioinformático de la proteína codificada por el ORF RL1692 arroja una predicción de 8 dominios transmembrana para dicha proteína (**Figura 23.A**). El Dr. Víctor García Angulo, miembro del Laboratorio, fusionó el ORF RL1692 al epítipo c-Myc y sobreexpresó la proteína obtenida en *R. leguminosarum*. El análisis por Western Blot de las fracciones citoplasmática y membranosa

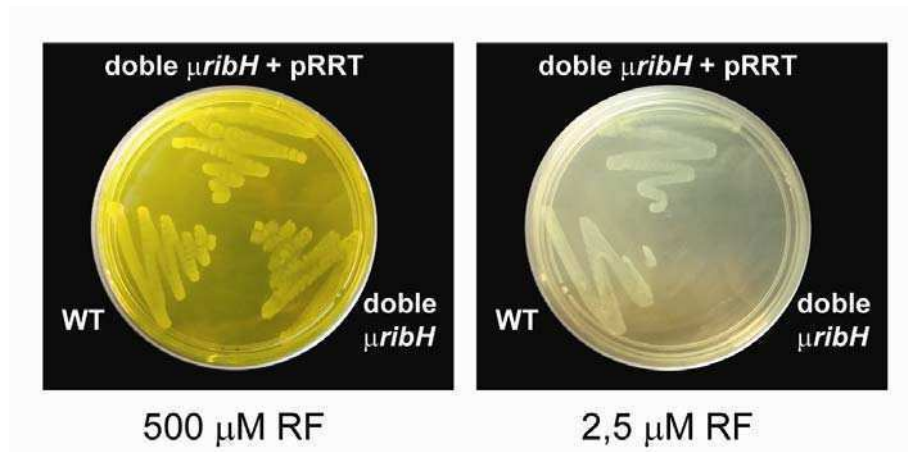
de dicha cepa de *R. leguminosarum* demostró que efectivamente el producto del ORF RL1692 se localiza en la membrana plasmática (**Figura 23.B**).



**Figura 23. El ORF RL1692 de *R. leguminosarum* codifica una proteína de membrana**

**(A)** Predicción de dominios transmembrana del producto del ORF RL1692 de *R. leguminosarum* por TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). **(B)** Western Blot de un fraccionamiento celular de *R. leguminosarum* expresando el ORF RL1692 fusionado a c-Myc y revelado con anticuerpos anti-c-Myc.

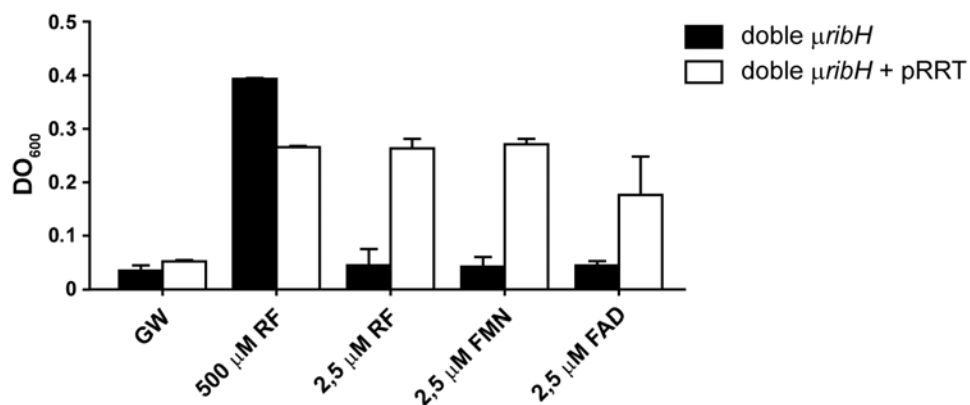
Se denominó RRT (por *Rhizobium Riboflavin Transporter*) a la proteína codificada en el ORF RL1692. RRT fue clonada en el plásmido de amplio rango pBBR1MCS (pRRT) con su propia región promotora e introducida en *B. abortus* doble  $\mu$ ribH generando la cepa doble  $\mu$ ribH + pRRT. La cepa doble  $\mu$ ribH sin RRT crece solamente en presencia de altas concentraciones de riboflavina en el medio de cultivo. Sin embargo, cuando dicha cepa es transformada con el pRRT es capaz de crecer aún en bajas concentraciones de riboflavina (**Figura 24**).



**Figura 24.** Expresión heteróloga del transportador RRT de *R. leguminosarum* en *B. abortus* doble  $\mu\text{ribH}$ .

Estrias de *B. abortus* 2308 (WT), doble  $\mu\text{ribH}$  y doble  $\mu\text{ribH}$  + pRRT fueron cultivadas en placas con medio GW suplementadas con 500  $\mu\text{M}$  ó 2,5  $\mu\text{M}$  riboflavina (RF).

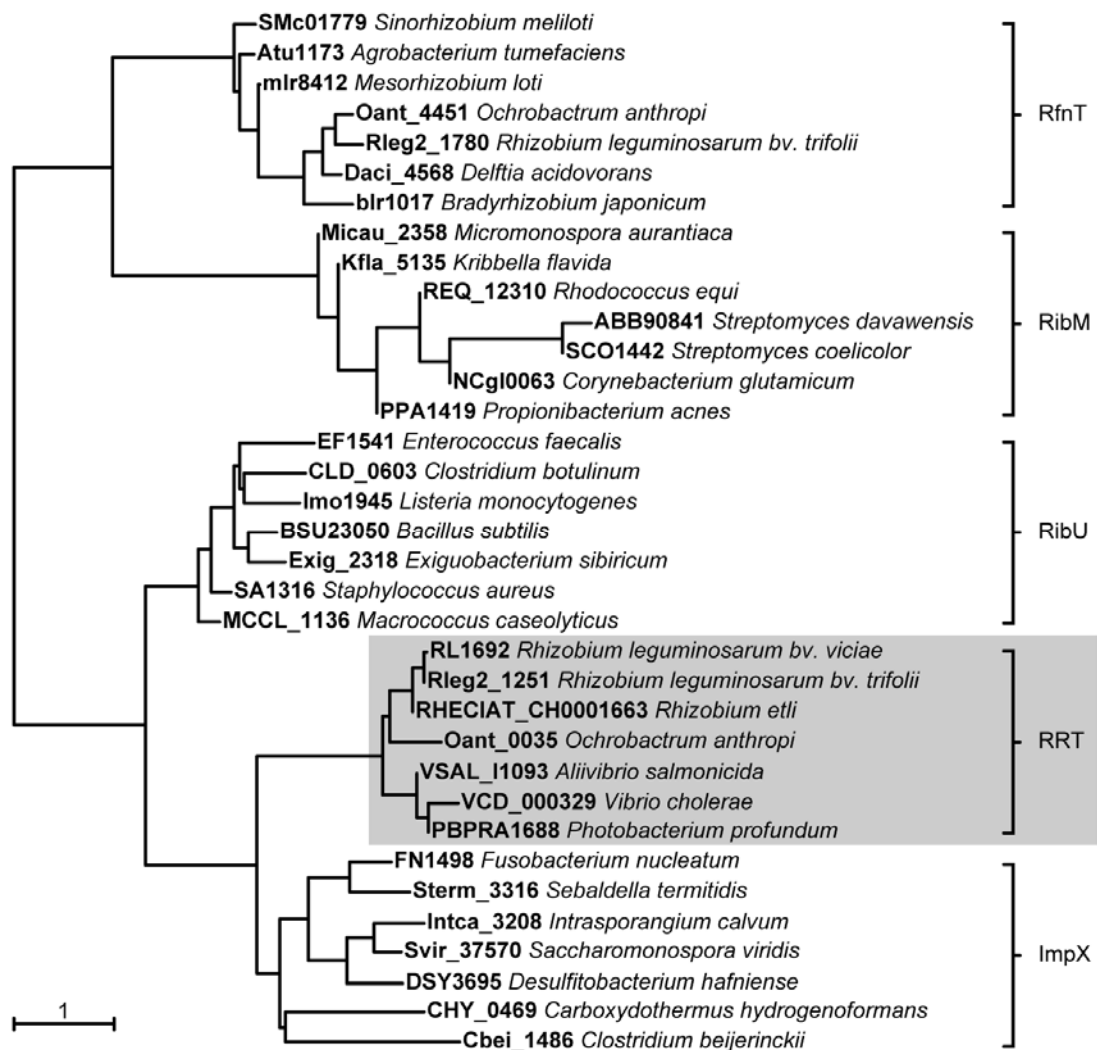
La cepa doble  $\mu\text{ribH}$  + pRRT también crece en medio mínimo líquido con el agregado de 2,5  $\mu\text{M}$  riboflavina, FAD ó FMN (**Figura 25**). Este ensayo funcional heterólogo en *Brucella* demuestra la funcionalidad del RRT de *Rhizobium* como transportador de flavinas. La presencia de RRT le permite a la cepa doble  $\mu\text{ribH}$  crecer en medios con concentraciones 100 veces menores de riboflavina o lumazina. Este hecho, sumado a que la cepa doble  $\mu\text{ribH}$  + pRRT auxótrofa puede crecer en presencia de 2,5  $\mu\text{M}$  FAD o FMN mientras que la cepa isogénica que no expresa RRT es incapaz de crecer en medios suplementados con FAD o FMN hasta concentraciones de 1 mM, refuerza la hipótesis de que *Brucella* carece de actividades de transporte de flavinas.



**Figura 25.** Ensayo heterólogo de transporte de flavinas por RRT en *B. abortus* doble  $\mu\text{ribH}$ .

Las cepas doble  $\mu\text{ribH}$  y doble  $\mu\text{ribH}$  + RRT fueron cultivadas por 72 h en medio GW con el agregado de riboflavina (RF), FMN o FAD. La DO<sub>600</sub> inicial fue de 0,05. Los valores son expresados como la media + la desviación estándar (N = 2).

Los transportadores de flavinas descritos hasta el presente comprenden 4 familias: RibM, RibU, RfnT e ImpX. Miembros pertenecientes a las dos primeras familias ya fueron caracterizados experimentalmente [149,151,152,191,192] mientras que RfnT e ImpX sólo fueron analizados por métodos bioinformáticos [147]. Por otro lado, la búsqueda de genes ortólogos a RRT en la base de datos KEGG determinó la presencia de genes homólogos a este transportador en otras especies bacterianas. El análisis filogenético de las secuencias de proteínas de los transportadores de flavinas conocidos y de los homólogos a RRT determinó que estos constituyen una nueva familia de transportadores, ya que el análisis no agrupó a dichas secuencias con ninguna de las familias de transportadores ya descritas (**Figura 26**).



**Figura 26.** Árbol filogenético sin raíz de las diferentes familias de transportadores de flavinas conocidas en bacterias.

Se generó un árbol filogenético creado a partir del alineamiento de 35 transportadores bacterianos de flavinas. Los miembros se agrupan en 5 clusters bien definidos. El alineamiento se realizó con el software CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment. Las distancias fueron obtenidas con el programa Protein distance algorithm version 3.67 y el árbol filogenético fue construido con PhyIip 3.67-Neighbor-Joining/UPGMA method version 3.67 y visualizado con el programa Newicktops 1.0. Todos los programas fueron ejecutados desde el servidor Mobylye@Pasteur v1.0 (<http://mobylye.pasteur.fr/>).

## CAPÍTULO 2

“Rol de la biosíntesis de riboflavina en la virulencia de *B. abortus*”

## RibH2 está involucrada en la virulencia de *B. abortus*

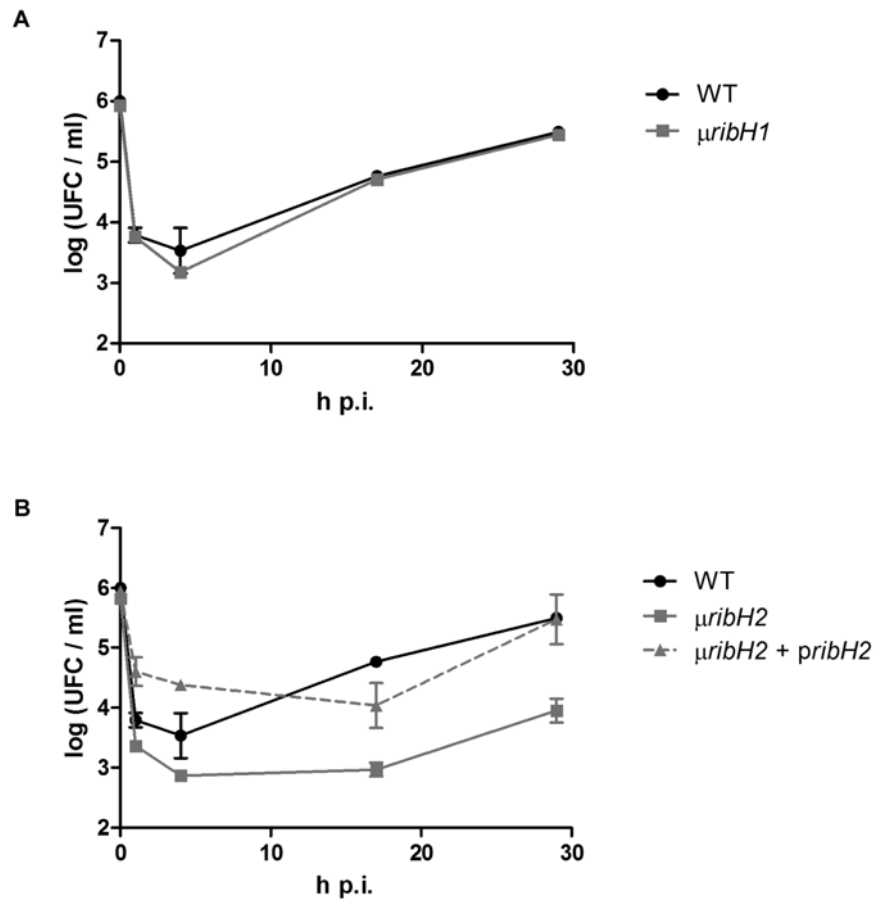
### Ensayos de infección en células con las cepas $\mu$ ribH1 y $\mu$ ribH2

Tal como se mencionó en la Introducción, *Brucella* infecta principalmente células fagocíticas profesionales y no profesionales como son los macrófagos y células epiteliales. En el laboratorio puede estudiarse la supervivencia, virulencia e infectividad de *Brucella* en diferentes modelos. Existen modelos de infección de *Brucella* en diversos tipos celulares, cultivos primarios o líneas celulares [88,193,194,195]. En esta Tesis, se usó como modelo de infección la línea macrofágica murina J774.A1 [196], con las que se realizó la mayoría de los experimentos, y la línea celular epitelial humana HeLa [197].

Brevemente, se infectaron las células animales con las cepas de *B. abortus* en placas de cultivo de 24 wells, luego de un tiempo se aplicaron antibióticos para matar las bacterias extracelulares manteniéndolos durante todo el ensayo y al cabo de distintos tiempos (horas) se lisaron las células y se plaqueó el lisado en medio sólido TSB para *Brucella*. De esta manera se pudieron cuantificar las bacterias intracelulares presentes por well a medida que progresaba la infección.

La curva de infección WT típica comienza en el tiempo 0, momento en que se ponen en contacto las bacterias con las células en cultivo, luego a 1 h post-infección (p.i.) se observa la caída en las UFC debido a que sólo una fracción de las bacterias entra a la célula. A las 4 h p.i. la caída se acentúa por los mecanismos activos bactericidas del macrófago. Una vez que las bacterias sobrevivientes logran llegar al nicho replicativo comienza la división activa de las bacterias. Este evento ocurre al cabo de las 10-12 h p.i.; recién después a las 16 h p.i. se observa un incremento de las UFC intracelulares (**Figura 27**).

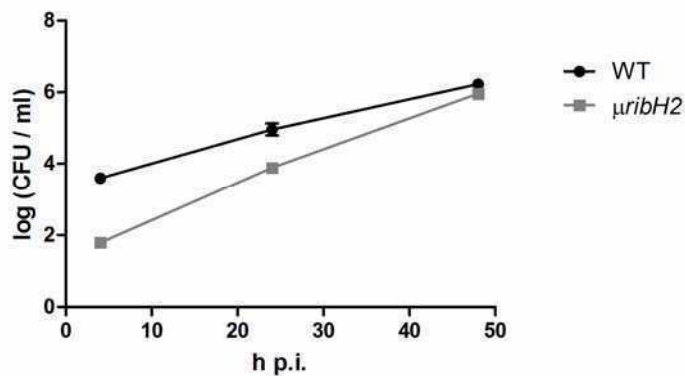
Ambas mutantes simples *ribH* fueron evaluadas en un ensayo de infección en la línea celular J774. La curva de infección obtenida para la cepa  $\mu$ ribH1 no muestra diferencias con respecto a la curva de *B. abortus* WT (**Figura 27.A**). Los resultados de supervivencia intracelular de la mutante  $\mu$ ribH2 fueron diferentes. Comparada con la cepa WT,  $\mu$ ribH2 se ve drásticamente disminuida desde 1 h p.i. hasta el final de la curva (**Figura 27.B**). A tiempos tardíos, la cepa  $\mu$ ribH2 logra replicar aunque más lentamente que la cepa WT. La cepa complementada de  $\mu$ ribH2 ( $\mu$ ribH2 + *pribH2*), que contiene a *ribH2* clonada con su zona promotora en un plásmido pBBR4, muestra una restitución del fenotipo virulento e incluso alcanza recuentos intracelulares mayores que la cepa WT a tiempos cortos de infección. La complementación produce la sobreexpresión de RibH2 (**Figura MM-2** de Materiales y Métodos) debido a que el plásmido pBBR4, en *B. abortus*, se encuentra en un número de 10 copias por célula aproximadamente [198].



**Figura 27. Replicación y supervivencia de  $\mu$ ribH1 y  $\mu$ ribH2 en células J774.A1.**

Las cepas *B. abortus* 2308 (WT), (A)  $\mu$ ribH1 o (B)  $\mu$ ribH2 y  $\mu$ ribH2 + *pribH2* fueron utilizadas en la infección de  $5 \times 10^5$  células J774.A1 (MOI 5:1). Las células fueron lisadas a diferentes tiempos y las UFC por ml se determinaron plaqueando diluciones seriadas de los lisados en placas TSA. Se grafica la media  $\pm$  la desviación estándar (N = 2).

Se realizaron ensayos de supervivencia intracelular con las cepas *B. abortus* WT y  $\mu$ ribH2 en la línea celular HeLa. En este tipo celular, al igual que en la línea J774.A1, la mutante  $\mu$ ribH2 muestra una clara atenuación en la supervivencia intracelular (Figura 28).



**Figura 28. Replicación y supervivencia de  $\mu$ ribH2 en células HeLa.**

Las cepas *B. abortus* 2308 (WT) o  $\mu$ ribH2 fueron utilizadas en la infección de  $5 \times 10^5$  células HeLa (MOI 500:1). Las células fueron lisadas a diferentes tiempos y las UFC por ml se determinaron plaqueando diluciones seriadas de los lisados en placas TSA. Se grafica la media  $\pm$  la desviación estándar (N = 2).



## El tráfico intracelular de la cepa $\mu ribH2$

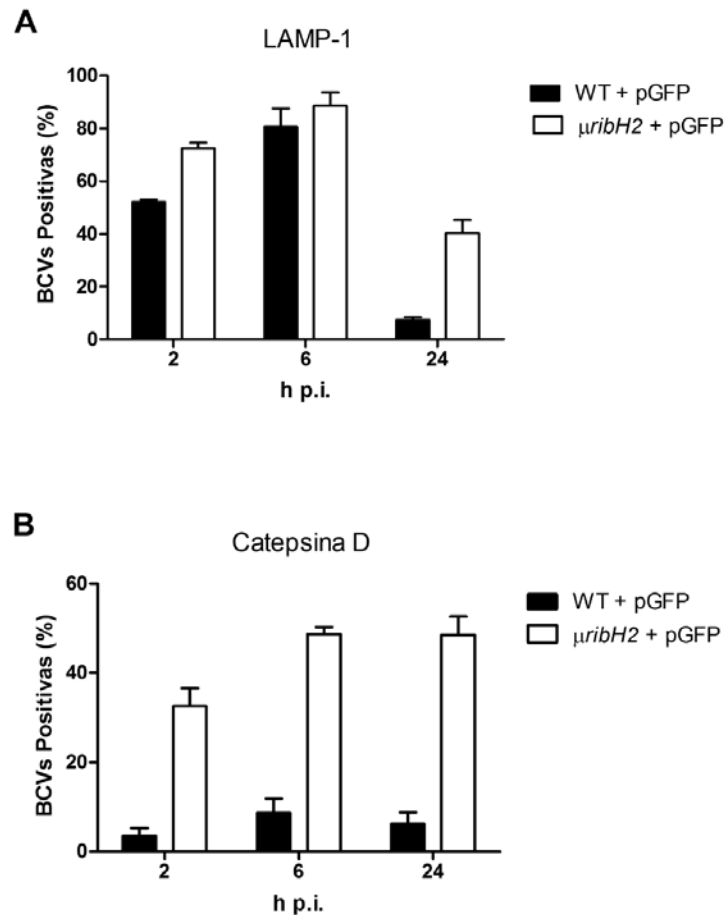
Para seguir caracterizando los mecanismos por los cuales RibH2 actúa en la supervivencia intracelular, se analizó la biogénesis de las vacuolas que contienen *Brucella* (BCVs). Para ello se infectaron células HeLa con la cepa  $\mu ribH2$  y la cepa control WT, ambas expresando GFP y por inmunofluorescencia se localizaron diferentes marcadores de tráfico intracelular. Luego se analizó la co-localización de las señales de GFP y la inmunofluorescencia proveniente de los marcadores.

En el esquema de la **Figura I-4** de la Introducción se muestra cómo *Brucella* trafica por la vía endosómica. Durante su travesía intracelular, *Brucella* interactúa con los endosomas y lisosomas, evadiendo la vía lisogénica hasta establecerse en un compartimento derivado del retículo endoplásmico (RE). A los pocos minutos de entrar en la célula, la vesícula que contiene a la bacterias adquiere el marcador LAMP-1, el cual es un marcador endosómico-lisosomal, que luego se pierde al establecerse en el compartimento replicativo [80,199]. La hidrolasa luminal de lisosoma catepsina D sirve como marcador de lisosomas o fagolisosomas. Este marcador nunca es adquirido por las vesículas que contienen a *Brucella* durante su tráfico [84,199].

Se estudió en la mutante  $\mu ribH2$  la cinética de reclutamiento de LAMP-1 y catepsina D como marcadores del tráfico intracelular en HeLa a las 2, 6 y 24 h p.i. El tráfico de *Brucella* WT muestra una co-localización con LAMP-1 a las 2 y 4 h p.i. (BCVs tempranas) que luego es excluida a las 24 h p.i. (**Figura 29.A y 30**). En concordancia con este resultado, a las 24 h p.i. las BCVs salvajes son capaces de promover la maduración de organelas replicativas y de proliferar en compartimentos LAMP-1 negativos (**Figura 30**). Las BCVs de la cepa  $\mu ribH2$  adquieren el marcador LAMP-1 con una cinética similar a las BCVs salvajes pero en vez de perderlo, lo retienen. A las 24 h p.i., 40,3% de las BCVs mutantes son LAMP-1 positivas mientras que sólo 7,4% de las BCVs salvajes resultan LAMP-1 positivas (**Figura 29.A**). Estos resultados sugieren que la mutante  $\mu ribH2$  falla en controlar la maduración de las BCVs en células HeLa.

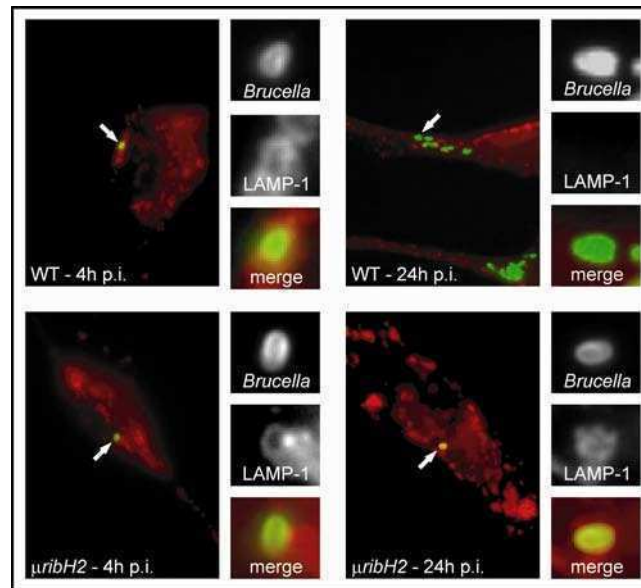
El otro marcador evaluado fue catepsina D, el cual no co-localiza con BCVs salvajes en ningún momento del tráfico de la bacteria salvaje (**Figura 29.B**). Analizando la cepa mutante  $\mu ribH2$ , se puede notar un importante incremento en el porcentaje de BCVs positivas para catepsina D en los tiempos 2 y 6 h p.i. con valores de 32,6% y 48,7% respectivamente ya que los valores para las BCVs salvajes para esos mismos tiempos son de 3,5% a 8,7% respectivamente (**Figura 29.B**). Esto es indicativo de que las BCVs de la cepa mutante están interactuando con lisosomas tempranamente. Además, a las 24 h p.i. casi 48,5% de los fagosomas son positivos para catepsina D, mientras que la mayoría de los BCVs salvajes excluyen esta molécula en todos los tiempos analizados (**Figura 29.B**). Estos resultados son

consistentes con las supervivencias observadas a las 4 y 24 h p.i. en células HeLa donde la mutante  $\mu ribH2$  muestra recuentos intracelulares bastante menores comparados con *B. abortus* salvaje (**Figura 28**). Sin embargo, el número de UFC de  $\mu ribH2$  recuperadas a las 48 h p.i. es similar a los recuentos de la cepa salvaje (**Figura 28**). Esto indica que aunque la cepa mutante es menos eficiente para promover la maduración de las BCVs en comparación con la cepa salvaje, es capaz de sobrevivir y replicar en células HeLa.



**Figura 29. Co-localización de  $\mu ribH2$  con marcadores del tráfico intracelular durante la infección en células HeLa.**

Se infectaron  $5 \times 10^5$  células HeLa cultivadas en cubreobjetos con las cepas *B. abortus* 2308 WT + pGFP o  $\mu ribH2$  + pGFP (MOI 500:1). Las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con anticuerpos (**A**) anti-LAMP-1 o (**B**) anti-Catepsina D, a 2, 6 y 24 h p.i. Luego los preparados fueron observados al microscopio de fluorescencia y se determinó el porcentaje de BCVs (GFP) que co-localizan con la marca de LAMP-1 o catepsina D. Los valores son expresados como la media + la desviación estándar (N = 2).



**Figura 30. Co-localización de  $\mu$ ribH2 con LAMP-1 durante la infección en HeLa.**

Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de una infección de células HeLa a las 4 y 24 h p.i. con *B. abortus* 2308 (WT) y  $\mu$ ribH2 expresando GFP, marcadas con anticuerpos anti-LAMP-1. Las flechas blancas muestran BCVs.

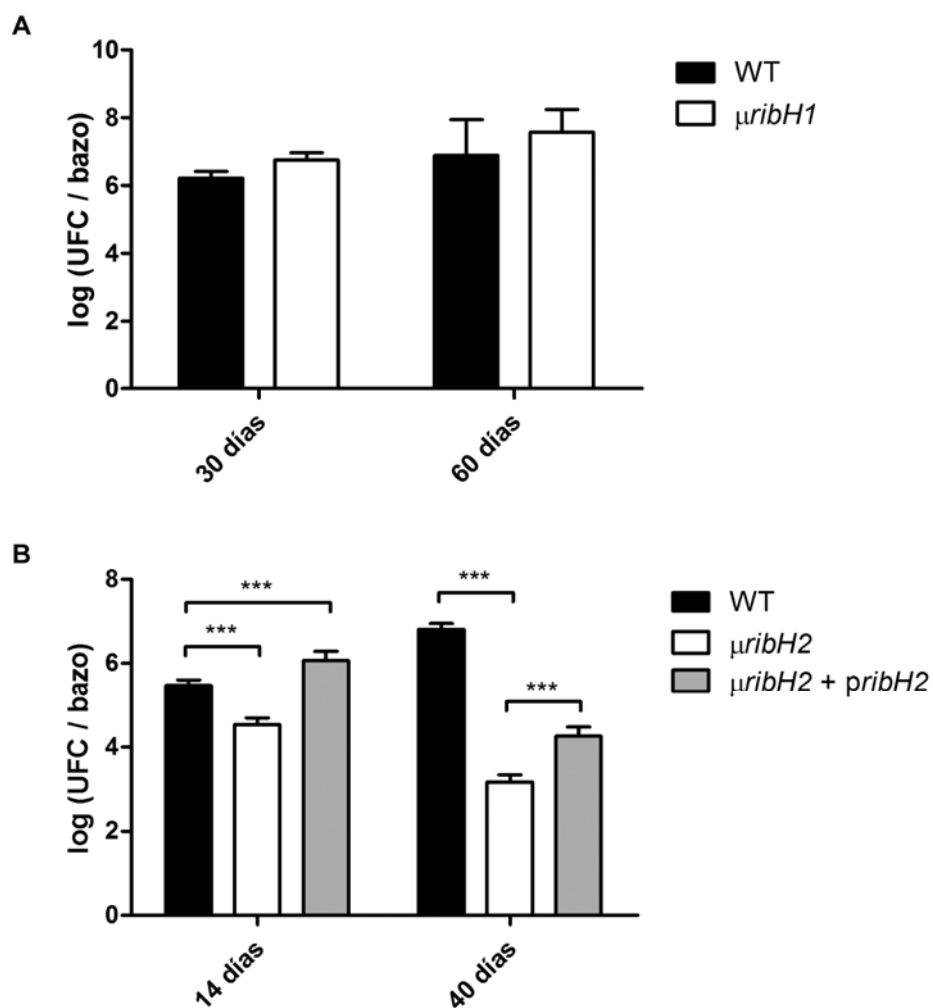
## Ensayos de infección en ratón con las cepas $\mu$ ribH1 y $\mu$ ribH2

Como modelo de infección animal se utilizó la infección por vía intraperitoneal (IP) en ratones hembras BALB/c. Si bien la infección con *B. abortus* en murinos no reproduce fielmente los síntomas de la brucelosis por no tratarse de su hospedador natural, la bacteria es capaz de infectar, colonizar varios de sus órganos y reproducirse sin causarle enfermedad. Además, el hospedador murino puede resistir una infección de cepas atenuadas de *B. abortus* y eliminarlas de su organismo. Los resultados obtenidos en ratón no siempre coinciden con los obtenidos en células en cultivo. Como regla general, una cepa atenuada en ratón suele ser atenuada en cultivos celulares pero no viceversa.

Se infectaron ratones con la cepa mutante  $\mu$ ribH1 por vía IP. Luego de 30 y 60 días p.i. los bazo fueron disecados, homogeneizados y se determinaron las UFC por bazo. En concordancia con los datos obtenidos de las infecciones en células con la mutante *ribH1*, las UFC obtenidas de bazo de ratones infectados con la cepa  $\mu$ ribH1 no presentan diferencias significativas respecto a las de bazo de infectados con la cepa WT en ninguno de los tiempos evaluados (**Figura 31.A**).

La virulencia de la cepa mutante  $\mu$ ribH2 fue ensayada en ratones mostrando diferencias significativas respecto a la cepa WT tanto a los 14 días ( $p < 0,001$ ) como a los 40 días p.i. ( $p < 0,001$ ) (**Figura 31.B**). A los 14 días p.i. las UFC de  $\mu$ ribH2 disminuyen casi 10

veces respecto a la cepa WT y a los 40 días p.i. la disminución es mayor a 36 veces. La cepa complementada  $\mu ribH2 + pribH2$  muestra una clara restitución del fenotipo de virulencia a los 14 días p.i. y una restitución parcial a los 40 días p.i. (Figura 31.B). Los recuentos de las UFC de  $\mu ribH2 + pribH2$  de los bazos disecados a los 14 días p.i. son 6 veces mayores a los recuentos de la cepa WT ( $p < 0,001$ ) y 15 veces mayores que los obtenidos en la cepa mutante  $\mu ribH2$  ( $p < 0,0001$ ). A los 40 días p.i., los recuentos de UFC por bazo correspondientes de la cepa complementada son inferiores a los recuentos de la cepa WT. Sin embargo, si se los compara con los obtenidos para la cepa mutante  $\mu ribH2$  éstos resultan ser 6 veces mayores ( $p < 0,001$ ), resaltando nuevamente la relevancia de RibH2 sobre la virulencia de *Brucella* (Figura 31.B).



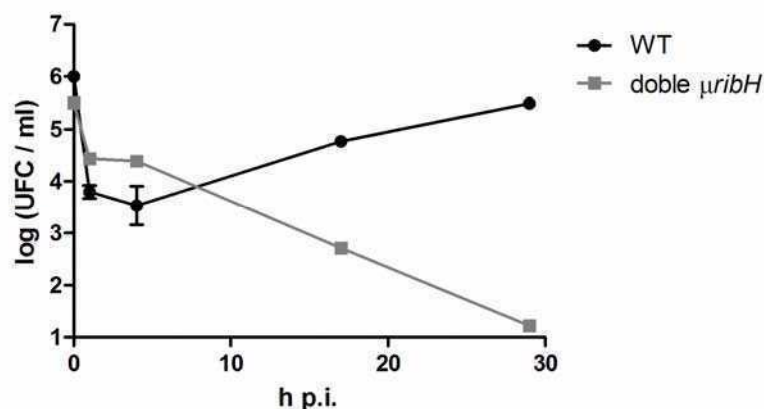
**Figura 31. Persistencia en ratón de  $\mu ribH1$  y  $\mu ribH2$ .**

Ratones hembra BALB/c (N = 5) fueron inoculados por vía IP con  $1 \times 10^5$  UFC de la cepa *B. abortus* 2308 (WT),  $\mu ribH1$ ,  $\mu ribH2$  o  $\mu ribH2 + pribH2$ . Los bazos fueron disecados y homogeneizados a los 14, 30, 40 ó 60 días. Las UFC por bazo se determinaron plaqueando diluciones seriadas de los homogenatos en placas TSA. Se grafica la media + la desviación estándar. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t-Student* no pareada de dos colas (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ).

## La síntesis de riboflavina es necesaria para la replicación intracelular de *B. abortus*

### Ensayos de infección en células con la cepa doble $\mu ribH$

Los ensayos de supervivencia y replicación intracelular de la cepa doble  $\mu ribH$  en células J774.A1 revelaron que esta cepa es completamente atenuada. Si bien a tiempos tempranos, 1 y 4 h p.i., la cepa doble  $\mu ribH$  presenta más UFC intracelulares que la cepa WT, los recuentos intracelulares comienzan a decaer a las 24 h p.i. hasta quedar erradicada de la célula después de las 30 h p.i. (**Figura 32**). Esto es indicativo de que la síntesis de flavinas es esencial para la supervivencia en el nicho replicativo. La doble mutación de los genes *ribH* conlleva a un fenotipo completamente atenuado en células.

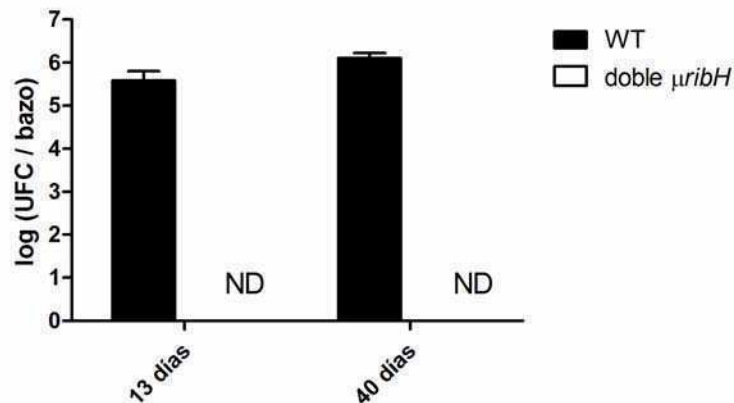


**Figura 32. Replicación y supervivencia de doble  $\mu ribH$  en células J774.A1.**

Las cepas *B. abortus* 2308 (WT) y doble  $\mu ribH$  fueron utilizadas en la infección de  $5 \times 10^5$  células J774.A1 (MOI 5:1). Las células fueron lisadas a diferentes tiempos. Las UFC por ml se determinaron plaqueando diluciones seriadas de los lisados en placas TSA. Se grafica la media  $\pm$  la desviación estándar (N = 2).

### Ensayos de infección en ratón con la cepa doble $\mu ribH$

Para determinar la virulencia en ratón de la cepa doble  $\mu ribH$ , se infectaron ratones con dicha cepa y se determinaron las UFC por bazo a los 13 y 40 días p.i. En ninguno de los tiempos evaluados fue posible detectar la presencia de la cepa mutante en los bazos de los ratones infectados (**Figura 33**). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la síntesis de riboflavina es esencial para la replicación de la *B. abortus* durante el proceso de infección.



**Figura 33. Persistencia en ratón de la cepa doble  $\mu$ ribH.**

Ratones hembra BALB/c (N = 5) fueron inoculados por vía IP con  $1 \times 10^5$  UFC de *B. abortus* 2308 (WT) o doble  $\mu$ ribH. Los bazo fueron disecados y homogeneizados a los 13 y 40 días p.i. Las UFC por bazo se determinaron plaqueando diluciones seriadas de los homogenatos en placas TSA. Se grafica la media + la desviación estándar. ND: no detectable.

## La actividad enzimática LS de RibH2 es necesaria para la replicación intracelular de *B. abortus*

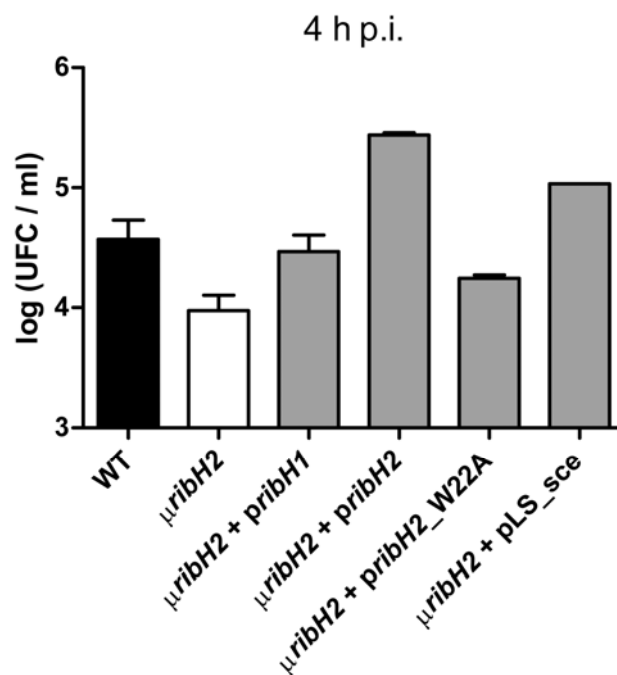
A partir de los resultados de atenuación de la virulencia de la cepa  $\mu$ ribH2 y el aumento de la virulencia en ratones debido a la sobreexpresión de RibH2 (**Figuras 27.B y 31.B**), y habiendo establecido que RibH2 es una LS activa *in vivo*, se decidió evaluar si esta actividad enzimática juega un papel en la virulencia de *B. abortus*. Para ello se realizaron infecciones en células y en ratón con la cepa doble  $\mu$ ribH y  $\mu$ ribH2 complementadas con diferentes construcciones.

### Ensayos de infección en células con complementaciones de la cepa $\mu$ ribH2

Observando las curvas de infección en células J774.A1 con las cepas *B. abortus* WT,  $\mu$ ribH2 y  $\mu$ ribH2 + *pribH2*, es posible diferenciar sus fenotipos de supervivencia a 4 h p.i. a partir de sus recuentos bacterianos intracelulares (**Figura 27.B**). Se decidió realizar ensayos de supervivencia a 4 h p.i. con la cepa  $\mu$ ribH2 complementada con diferentes LS. Por ello, se construyeron cepas transformando a  $\mu$ ribH2 con los plásmidos *pribH1*, *pribH2\_W22A* y *pLS\_sce* para evaluar si la sobreexpresión de las diferentes LSs logra restaurar el fenotipo de supervivencia intracelular en el tiempo mencionado.

La sobreexpresión *LS\_sce* es capaz de restituir el fenotipo de supervivencia a las 4 h p.i. a la mutante  $\mu$ ribH2. Incluso,  $\mu$ ribH2 + *pLS\_sce* muestra recuentos 5 veces mayores que los

recuentos de la cepa salvaje (**Figura 34**). Sin embargo, *pribH2\_W22A* no recuperó la capacidad de supervivencia evidenciado por los bajos recuentos intracelulares. Mientras que sobreexpresar RibH1 le permite a la mutante recuperar los niveles WT en los recuentos y el control de sobreexpresión de RibH2 genera recuentos 10 veces mayores a los recuentos salvajes (**Figura 34**). En conjunto, la sobreexpresión de una LS activa en la mutante  $\mu$ *ribH2* (RibH1, RibH2 o LS\_sce) permite restaurar el fenotipo de supervivencia a las 4 h p.i, aunque no todas las proteínas lo hacen en la misma magnitud. Por el contrario, la complementación de la mutante  $\mu$ *ribH2* con la proteína RibH2\_W22A, que tiene anulada la capacidad de unión a la riboflavina y la actividad de LS, no recupera los recuentos al nivel de *B. abortus* WT.



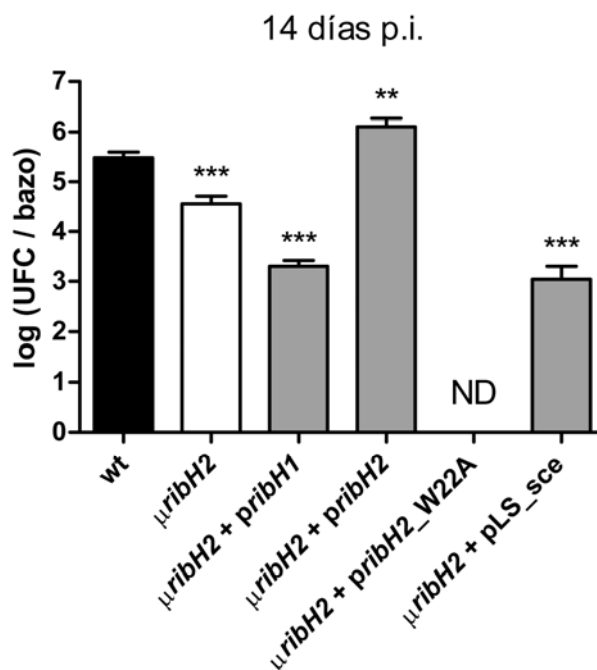
**Figura 34. Supervivencia de las cepas complementadas de  $\mu$ *ribH2* en células J774.A1**

Las cepas *B. abortus* 2308 (WT),  $\mu$ *ribH2* o  $\mu$ *ribH2* con: *pribH1*, *pribH2*, *pribH2\_W22A* o pLS\_sce fueron utilizadas en la infección de  $5 \times 10^5$  células J774.A1 (MOI 5:1). Las células fueron lisadas a las 4 h p.i. Las UFC por ml se determinaron plaqueando diluciones seriadas de los lisados en placas TSA. Se grafica la media + la desviación estándar (N = 2).

### Ensayos de infección en ratón con complementaciones de la cepa $\mu$ *ribH2*

Se decidió a evaluar si los resultados de supervivencia obtenidos en células correlacionan con la capacidad de persistir durante la infección en ratón. Para ello, se realizaron las infecciones en ratón con las cepas  $\mu$ *ribH2* complementadas (con: *pribH1*, *pribH2*, *pribH2\_W22A* o pLS\_sce) y se realizaron recuentos de UFC de los bazos a los 14 días p.i. Los resultados obtenidos fueron dispares a los obtenidos en células. La única complementación con fenotipo virulento en este ensayo fue el control  $\mu$ *ribH2* + *pribH2*. Los recuentos obtenidos de bazos de ratones infectados con el resto de las cepas ensayadas son incluso más bajos que los de la mutante  $\mu$ *ribH2* (**Figura 35**). Los recuentos correspondientes a las complementaciones con RibH1 o LS\_sce son iguales entre si y son 10 veces menores respecto

a los obtenidos para  $\mu ribH2$  sin complementar. La cepa  $\mu ribH2$  con el plásmido  $pribH2\_W22A$  es indetectable en los bazos de ratones infectados con ella (**Figura 35**).



**Figura 35. Persistencia en ratón de las cepas complementadas de  $\mu ribH2$ .**

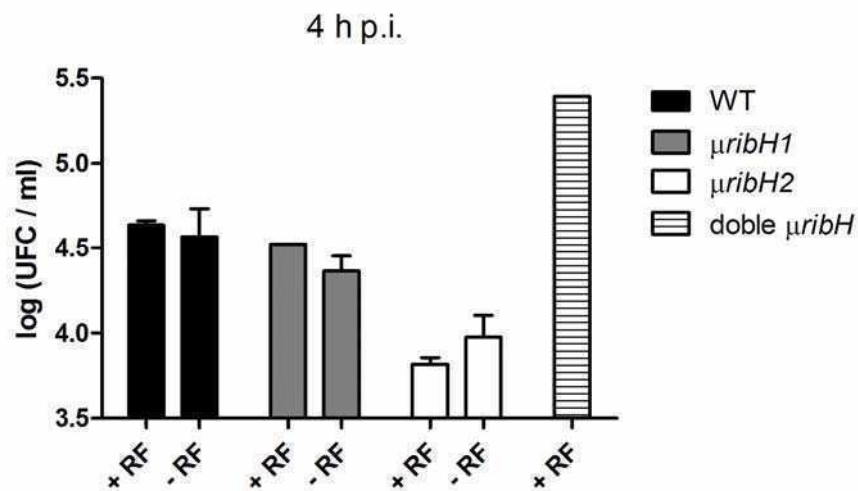
Ratones hembra BALB/c (N = 5) fueron inoculados por vía IP con  $1 \times 10^5$  UFC de *B. abortus* 2308 (WT),  $\mu ribH2$  o  $\mu ribH2$  con:  $pribH1$ ,  $pribH2$ ,  $pribH2\_W22A$  o  $pLS\_sce$ . Los bazos fueron disecados y homogeneizados a los 14 días p.i. Las UFC por bazo se determinaron plaqueando diluciones seriadas de los homogenatos en placas TSA. Se grafica la media + la desviación estándar. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t-Student* no pareada de dos colas comparando siempre contra WT (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). ND: no detectable.

El hecho de que la cepa doble  $\mu ribH$  posea mayores recuentos intracelulares que la cepa WT durante las infecciones celulares a tiempos tempranos, 1 y 4 h p.i. (**Figura 32**) llevó a postular que la riboflavina adicionada al medio de cultivo de esta cepa era la causante de la mayor capacidad de supervivencia. Ya se demostró por TLC que la cantidad de riboflavina intracelular se encuentra aumentada en las cepas WT y doble  $\mu ribH$  cultivadas en presencia de 500  $\mu M$  riboflavina (**Figura 22**). De esta manera el *pool* intracelular de riboflavina aumentado al momento del desafío con las células podría restituir los niveles de supervivencia en la mutante  $\mu ribH2$  o aumentarle la aptitud a la cepa WT para sobrevivir durante la infección celular. Para evaluar esta hipótesis, se realizaron ensayos de supervivencia en células y ensayos de persistencia en ratones con cepas de *B. abortus* crecidas en presencia o no de 500  $\mu M$  riboflavina.

Se realizaron infecciones de células J774.A1 con las cepas  $\mu ribH1$ ,  $\mu ribH2$  y *B. abortus* WT, cultivadas con o sin 500  $\mu M$  riboflavina y las UFC intracelulares fueron determinadas a las 4 h p.i. El agregado de riboflavina no cambia significativamente los recuentos intracelulares de



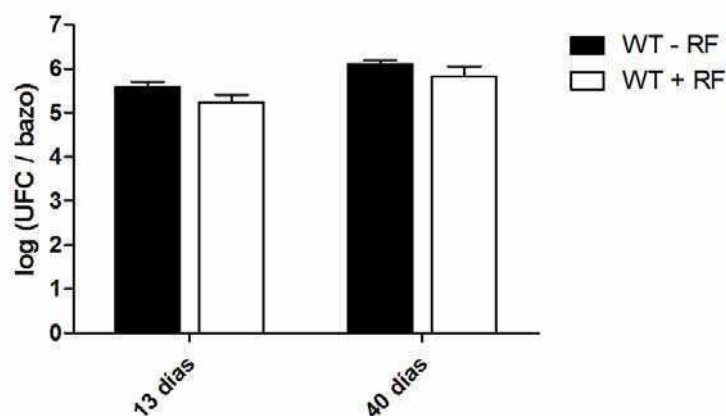
ninguna de las cepas evaluadas. La presencia del metabolito no puede complementar el fenotipo atenuado de la cepa  $\mu ribH2$  (Figura 36).



**Figura 36. Efectos de la riboflavina en la supervivencia en células.**

Las cepas *B. abortus* 2308 (WT),  $\mu ribH1$  o  $\mu ribH2$ , cultivadas con 500  $\mu M$  riboflavina (+ RF) o no (- RF), fueron utilizadas en la infección de  $5 \times 10^5$  células J774.A1 (MOI 5:1). Las células fueron lisadas y las UFC por ml se determinaron a las 4 h p.i. plaqueando diluciones seriadas de los lisados en placas TSA. Se grafica la media + la desviación estándar (N = 2).

También, con el objetivo de ensayar si el aumento de riboflavina intracelular le confiere a *B. abortus* una mayor capacidad de persistir en ratón, se infectaron ratones con la cepa WT cultivada con o sin 500  $\mu M$  riboflavina (Figura 37). A los 13 y 40 días p.i. se determinó la cantidad de bacterias por bazo de los ratones infectados. En este ensayo tampoco se detectaron diferencias entre los cultivos de *B. abortus* usados en el momento de la infección. La riboflavina no aumenta los niveles de virulencia en ratón en la cepa WT.



**Figura 37. Persistencia en ratón de *B. abortus* crecida con riboflavina.**

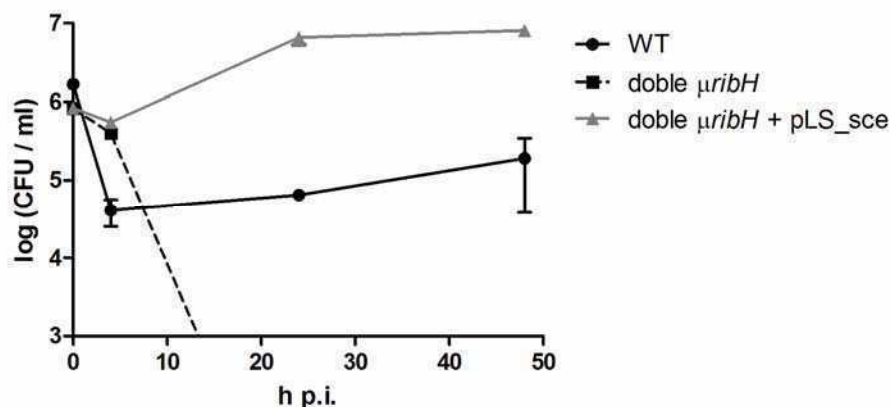
Ratones hembra BALB/c (N = 5) fueron inoculados por vía IP con  $1 \times 10^5$  UFC de *B. abortus* 2308 (WT) con o sin 500  $\mu M$  riboflavina (RF) previo a la infección. Los bazos fueron disecados y homogeneizados a los 7, 14 y 21 días p.i. Las UFC por bazo se determinaron plaqueando diluciones seriadas de los homogenatos en placas TSA. Se grafica la media + la desviación estándar.

## Flavinas en las *Brucella* Containing Vacuoles

Como ya se mencionó en la Introducción, se sabe poco acerca de la composición de nutrientes en las BCVs replicativas. En general, la necesidad de los metabolitos se infiere a partir del análisis de la expresión de genes de transporte o síntesis en esa etapa.

Ya se demostró que la cepa doble mutante *ribH* es auxótrofa para flavinas, que requiere más de 250  $\mu\text{M}$  de riboflavina en el medio de cultivo para su crecimiento y que tampoco es capaz de replicar durante la infección en células en cultivo. Entonces, se decidió evaluar si la actividad LS proveniente de la LS heteróloga de *S. cerevisiae*, sin el aporte de ninguna de las RibH endógenas, permite el establecimiento de *Brucella* en el nicho replicativo para luego comenzar a duplicarse.

Se infectaron células J774.A1 con la cepa doble  $\mu\text{ribH}$  + pLS\_sce y se determinó la cantidad de bacterias intracelulares hasta las 48 h p.i. Los recuentos obtenidos para la cepa ensayada fueron muy superiores a los obtenidos para la cepa *B. abortus* 2308 WT. La cepa expresando LS\_sce no sólo replica intracelularmente, sino que muestra recuentos de UFC intracelulares entre 10 y 100 veces mayores que la cepa WT en todos los puntos de la curva (Figura 38). Se concluye que la presencia de la actividad enzimática LS es suficiente para el establecimiento y replicación de *B. abortus* en células J774.A1 sin ser necesaria la presencia de ninguna de las proteínas RibH.



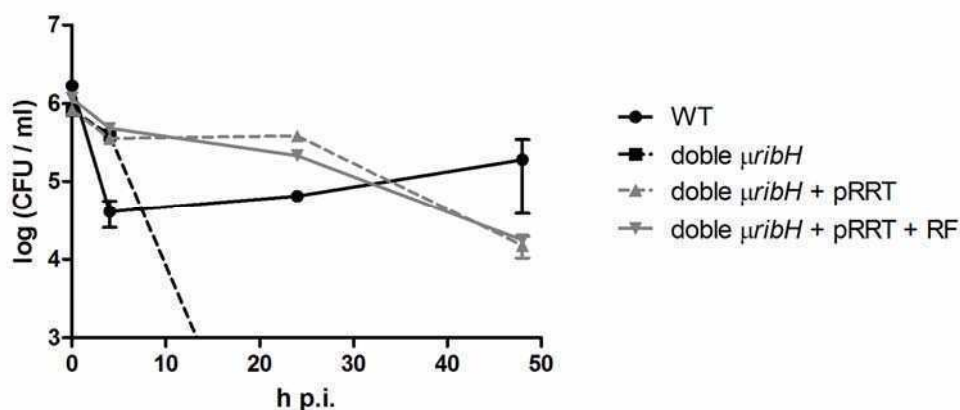
**Figura 38. Replicación y supervivencia de doble  $\mu\text{ribH}$  + pRRT en células J774.A1.**

Las cepas *B. abortus* 2308 (WT), doble  $\mu\text{ribH}$  o doble  $\mu\text{ribH}$  + pLS\_sce y los controles doble  $\mu\text{ribH}$  fueron utilizadas en la infección de  $5 \times 10^5$  células J774.A1 (MOI 5:1). Las células fueron lisadas y las UFC por ml se determinaron a distintos tiempos, plaqueando diluciones seriadas de los lisados en placas TSA. Se grafica la media  $\pm$  la desviación estándar (N = 2).

Con el objetivo de determinar si en las BCVs existen cantidades apreciables de flavinas se infectaron cultivos celulares con la cepa doble  $\mu\text{ribH}$  expresando el transportador RRT, que

es capaz de que restituir el crecimiento *in vitro* en presencia de concentraciones nanomolares de flavinas.

La cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT se cultivó en presencia de 0,5  $\mu M$  o 500  $\mu M$  de riboflavina para luego infectar células J774.A1 y determinar las UFC intracelulares en función del tiempo. Cuando la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT se cultivó en baja o alta concentración de riboflavina no presenta ninguna diferencia entre si. Los recuentos intracelulares correspondientes a las 4 h p.i. de esta cepa, al igual que los obtenidos para la cepa mutante doble  $\mu ribH$  sin ninguna complementación, son 10 veces mayores que los recuentos correspondientes a las células infectadas con la cepa control WT a 4 h p.i. (**Figura 39**). Esta diferencia de cantidad de bacterias intracelulares entre la cepa mutante doble  $\mu ribH$  + pRRT y la cepa WT se mantiene hasta las 24 h p.i. Luego, a las 48 h p.i., los recuentos de la mutante con el transportador disminuyen 10 veces por debajo de los niveles WT (**Figura 39**). Las curvas de infección de la cepa  $\mu ribH$  + pRRT no muestran en ningún momento un fenotipo replicativo ya que no se observan aumentos de las UFC durante la infección en ninguno de los tiempos evaluados.



**Figura 39. Replicación y supervivencia de doble  $\mu ribH$  + pRRT en células J774.A1.**

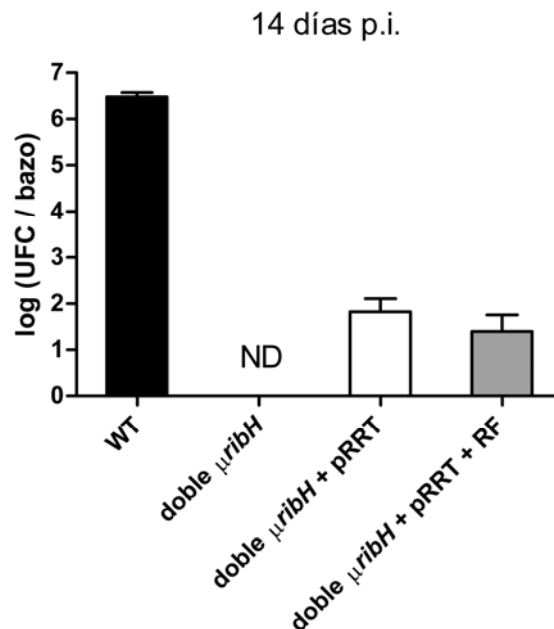
Las cepas *B. abortus* 2308 (WT), doble  $\mu ribH$ , doble  $\mu ribH$  + pRRT cultivada en 0,5  $\mu M$  riboflavina o doble  $\mu ribH$  + pRRT cultivada en 500  $\mu M$  riboflavina (+ RF) fueron utilizadas en la infección de  $5 \times 10^5$  células J774.A1 (MOI 5:1). Las células fueron lisadas y las UFC por ml se determinaron a distintos tiempos, plaqueando diluciones seriadas de los lisados en placas TSA. Se grafica la media  $\pm$  la desviación estándar (N = 2).

## Ensayos preliminares de protección

Una de las características deseables en una vacuna contra la Brucelosis es que sea atenuada para no causar enfermedad en el hombre y que al mismo tiempo genere una respuesta inmune suficiente para generar protección. Por ello, el desarrollo de vacunas vivas atenuadas en *Brucella* que sean seguras para el hombre ha girado en torno a la eliminación de genes importantes para la supervivencia de la bacteria. Sin embargo, las cepas con genes

eliminados que las convierten en bacterias seguras para la manipulación, suelen ser tan atenuadas que su eficacia como vacunas es reducida [48]. Las mutantes que no son rápidamente eliminadas en ratón suelen generar una respuesta inmune más protectora [200].

La cepa doble  $\mu ribH$  presenta una muy baja persistencia en ratones siendo completamente eliminada antes de los 14 días post-infección. Esto representaría una desventaja en caso de utilizarla como cepa vacunal. La cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT tiene mayor sobrevivencia que la cepa isogénica sin el RRT en células (**Figura 39**). Con el objetivo de evaluar si dicho incremento también ocurre *in vivo*, se infectaron ratones con la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT. Además evaluamos la co-inyección de la cepa con riboflavina debido a que la concentración de riboflavina libre en los tejidos animales es extremadamente baja [179]. Luego de 14 días p.i. la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT persiste en el bazo de ratones infectados, mientras que la bacteria que carece el transportador RRT es completamente eliminada (**Figura 40**). No se encontraron diferencias significativas cuando se co-inyectó la cepa con riboflavina respecto a la cepa sin el agregado de riboflavina (**Figura 40**). Sin embargo, la cepa doble  $\mu ribH$  expresando RRT, cultivada en presencia o no de riboflavina, presenta menores recuentos que la cepa WT. Además, los ratones infectados con la cepa doble  $\mu ribH$  expresando el transportador RRT no son esplenomegálicos como ocurre cuando se infectan ratones con la cepa de *Brucella* salvaje.

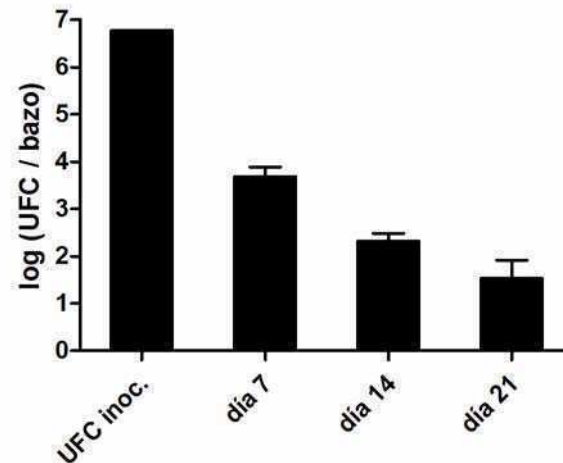


**Figura 40. Persistencia de la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT en ratón.**

Ratones hembra BALB/c (N = 5) fueron inoculados por vía IP con  $1 \times 10^5$  UFC de la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT con o sin el agregado de 500  $\mu M$  riboflavina (RF), o la cepa *B. abortus* 2308 (WT). Los bazos fueron disecados y homogeneizados a los 14 días p.i. Las UFC por bazo se determinaron plaqueando diluciones seriadas de los homogenatos en placas TSA. Se grafica la media + la desviación estándar.

Debido a que los ensayos de persistencia demostraron que la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT es más persistente que la cepa doble  $\mu ribH$  sin el transportador, se decidió estudiar la

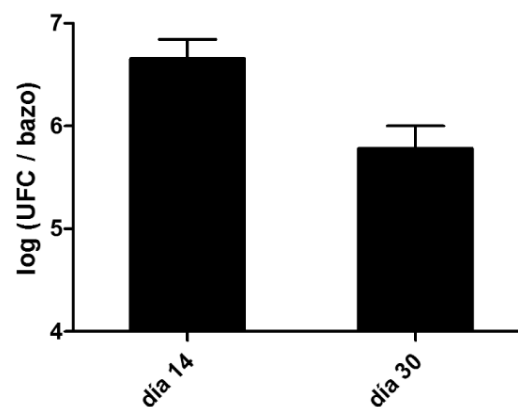
curva de eliminación de la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT en ratones con el fin último de realizar desafíos vacunales. Para ello se inoculó  $1 \times 10^7$  UFC de la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT en ratones y se determinaron las UFC por bazo los días 7, 14 y 21 p.i. (**Figura 41**).



**Figura 41. Curva de eliminación de la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT en ratones.**

Ratones hembra BALB/c (N = 6) fueron inoculados con  $1 \times 10^7$  UFC por vía IP con la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT. Los bazos fueron disecados y homogeneizados a los 7, 14 y 21 días. Las UFC por bazo se determinaron por plaqueo de diluciones seriadas. Se grafica la media + la desviación estándar.

La cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT muestra una persistencia menor a la cepa WT (comparar **Figura 41** con el control WT de la **Figura 31.B** al día 14) aunque no fue completamente eliminada al cabo de los 21 días p.i. Sin embargo, se determinó un promedio de 30 UFC por bazo al día 21 sugiriendo que al cabo de los 28 días p.i. la eliminación de las bacterias sería completa. Al observar los resultados y la tendencia de la curva de eliminación se decidió utilizar los últimos 12 ratones infectados en una prueba preeliminar de protección. Para ello se inocularon dichos ratones con  $1 \times 10^5$  UFC de la cepa *B. abortus* 2308 al día 40 después de haber sido inoculados con la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT. Al cabo de los 14 y a los 30 días p.i. con la cepa *Brucella* WT, se determinaron la UFC en los bazos. Los ratones desafiados con la cepa salvaje muestran una disminución de 10 veces en los recuentos al día 30 p.i. respecto al día 14 p.i. (**Figura 42**). La infección en ratones con la cepa *B. abortus* 2308 muestra un incremento en el número de bacterias por bazo del día 14 al día 40 p.i. (**Figuras 31, 33 y 37**). El resultado preeliminar del desafío vacunal con la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT fue obtenido mientras esta Tesis era escrita y, sugiere que vale la pena realizar un experimento con los debidos controles incluidos: cepa vacunal (por ejemplo *B. abortus* S19) y control sin bacterias.



**Figura 42. Protección contra la infección de la cepa WT.**

Ratones hembra BALB/c (N = 6) fueron re infectados con  $1 \times 10^5$  UFC de WT por vía IP, luego 40 días de haber sido inoculadas con la cepa doble  $\mu ribH$  + pRRT. A partir de esa fecha, a los 14 y 30 días los bazos fueron disecados y homogenizados. Las UFC por bazo se determinaron por plaqueo de diluciones seriadas. Se grafica la media + la desviación estándar.

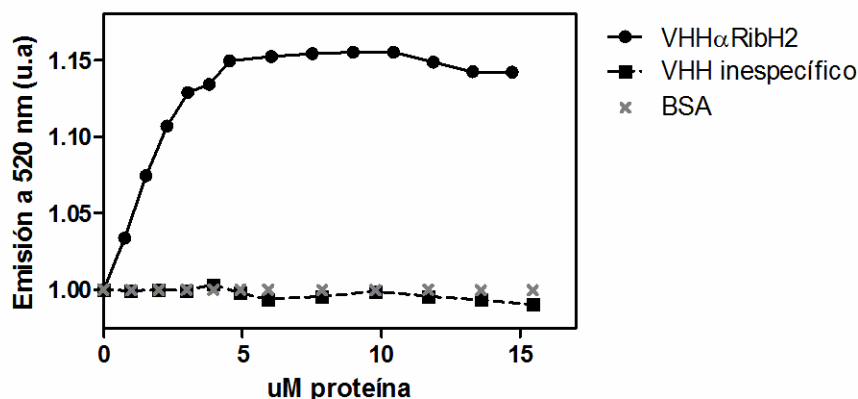
## Estrategia de Inhibición de RibH2

Hasta ahora, los resultados obtenidos en esta Tesis muestran a RibH2 como un atractivo blanco de quimioterapia. La inhibición de su actividad podría traer aparejado un fenotipo de virulencia atenuada. Por ello, se decidió intentar inhibir la actividad enzimática de RibH2 *in vivo*. Sin embargo, este objetivo no pudo ser logrado. A continuación se explica una de las estrategias utilizadas de inhibición enzimática expresando intracelularmente un anticuerpo anti-sitio activo de RibH2 de *B. abortus*.

## Estrategia de inhibición por *intrabody* VHH

En el Laboratorio se cuenta con un anticuerpo capaz de unirse a RibH2, derivado de anticuerpos de dominio de llama (datos aún no publicados). Este anticuerpo pertenece a una clase de anticuerpos monovalentes denominados VHH. Los VHHs son fragmentos pequeños que corresponden a los mencionados anticuerpos de llama y que tienen la capacidad de ser muy buenos inhibidores enzimáticos por poseer un CDR3 con un tamaño capaz de introducirse dentro hendiduras proteicas, donde se encuentran generalmente los sitios activos de las enzimas, con mucho más facilidad que los anticuerpos convencionales [201]. Existen varios trabajos en la literatura que validan el uso de estos anticuerpos como inhibidores enzimáticos y como potenciales herramientas terapéuticas [201,202]. El mencionado fragmento VHH que es capaz de unirse RibH2, se denomina VHH $\alpha$ RibH2 y puede desplazar a la riboflavina de su sitio

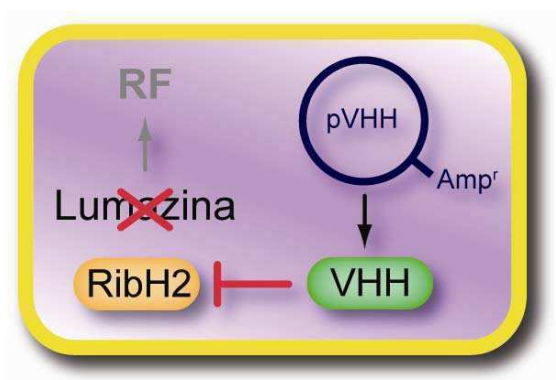
de unión (**Figura 43**). Como ya se mencionó en una sección anterior, la riboflavina se une al sitio activo de la enzima.



**Figura 43. Curva de desplazamiento de la riboflavina por VHH**

5  $\mu$ M de RibH2 unida a riboflavina fueron incubados con concentraciones crecientes de VHH $\alpha$ RibH2, con un VHH inespecífico o con BSA. Se determinó la fluorescencia de riboflavina mediante excitación a 450 nm y la emisión se midió a 520 nm.

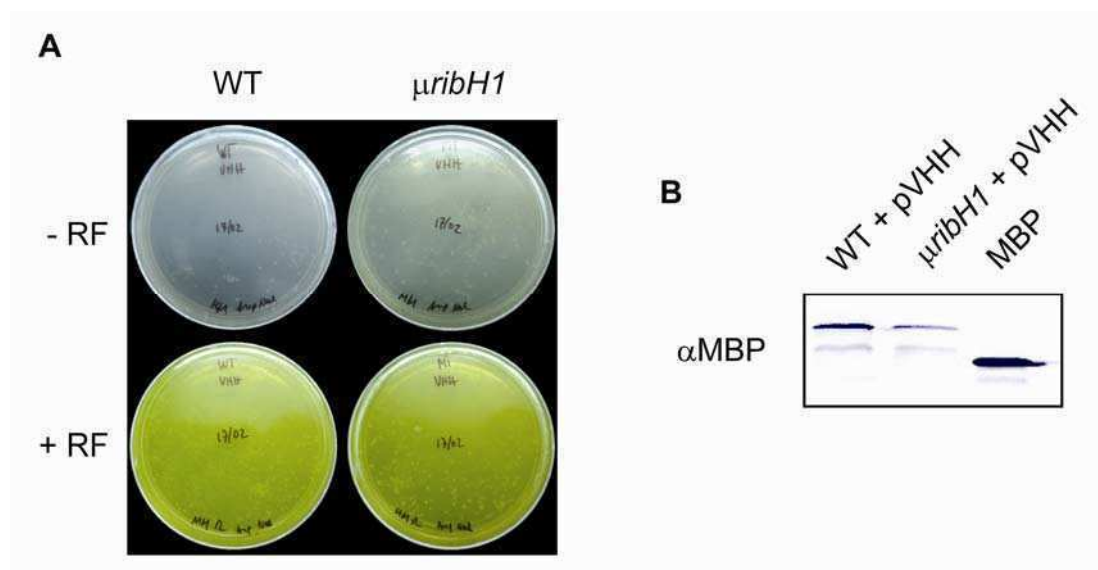
Como prueba conceptual y para validar a RibH2 como blanco para quimioterapia se deseaba inhibir la actividad enzimática de RibH2 usando el VHH $\alpha$ RibH2. Para ello se subclonó a VHH $\alpha$ RibH2 fusionado a la MBP (*Maltose Binding Protein*). La estrategia de fusión de una proteína a la MBP es utilizada para otorgar mayor estabilidad intracelular a la proteína de fusión, favoreciendo el plegamiento correcto, y permitiendo el monitoreo de la expresión por Western Blot con anticuerpos anti-MBP [202,203]. El plásmido de expresión de *Brucella* obtenido se denominó pVHH. Luego se transformó la cepa mutante  $\mu$ ribH1 con pVHH ( $\mu$ ribH1 + pVHH) que expresa, de forma intracelular, VHH $\alpha$ RibH2. Debido a que en la cepa  $\mu$ ribH1 la única LS es RibH2, la presencia del VHH $\alpha$ RibH2 inhibiría la actividad LS y la bacteria no sería capaz de crecer en ausencia de riboflavina (**Figura 44**).



**Figura 44. Estrategia diseñada de inhibición de la actividad LS *in vivo* de RibH2 de *B. abortus*.**

La expresión del *intrabody* VHH $\alpha$ RibH2 en la cepa mutante  $\mu$ ribH1 de *B. abortus* inhibiría la síntesis de lumazina por parte de RibH2, la única LS presente.

La cepa  $\mu ribH1$  + pVHH se cultivó en placas de medio mínimo con o sin 500  $\mu$ M riboflavina. Al igual que la *Brucella* WT, la cepa  $\mu ribH1$  + pVHH es capaz de crecer tanto con como sin el agregado de riboflavina (**Figura 45.A**). También,  $\mu ribH1$  + pVHH puede crecer en medio líquido sin diferencia respecto a las cepas que no expresan VHH $\alpha$ RibH2 (resultados no mostrados). La expresión intracelular del VHH $\alpha$ RibH2 fue confirmada por Western Blot (**Figura 45.B**). Una explicación posible es que VHH $\alpha$ RibH2 no está inhibiendo completamente a RibH2, y que la inhibición parcial de la actividad LS permita el crecimiento de la cepa  $\mu ribH1$  + pVHH en ausencia de riboflavina exógena.

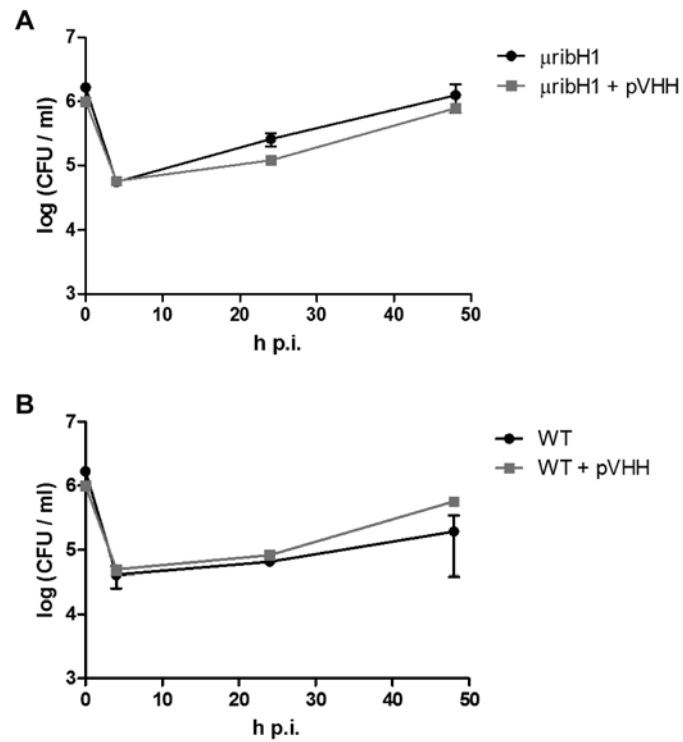


**Figura 45. Crecimiento de cepas expresando VHH- $\alpha$ RibH2.**

(A) Las cepas  $\mu ribH1$  y *B. abortus* 2308 (WT) que contiene el plásmido pVHH se inocularon en placas con y sin el agregado de 500  $\mu$ M riboflavina (RF). (B) Western Blot control donde se detecta la expresión del VHH $\alpha$ RibH2 en las cepas  $\mu ribH1$  y *B. abortus* 2308 revelando MBP (proteína de fusión). Se incluyó un control con MBP pura. El incremento del PM de MBP se debe a la fusión a VHH $\alpha$ RibH2.

Durante una infección en células o en ratones las condiciones de supervivencia son más estrictas y, como se ha demostrado en esta Tesis, la capacidad de sobrevivir dentro de la célula infectada depende de la actividad enzimática LS de RibH2. Además, la cepa doble  $\mu ribH$  (sin actividad LS) no replica en células y es completamente eliminada a las 24 a 30 h p.i. (**Figura 32**). Por ello se diseñó un experimento donde se evaluó el fenotipo de supervivencia de la cepa  $\mu ribH1$  + pVHH en células J774.A1. Se midieron las UFC intracelulares de las células infectadas a las 4, 24 y 48 h p.i. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de VHH $\alpha$ RibH2 no disminuye la virulencia de  $\mu ribH1$  (**Figura 46**). Los recuentos intracelulares de la cepa  $\mu ribH1$  con pVHH y sin el plásmido no muestran diferencias entre sí en ninguno de los tiempos evaluados, lo mismo ocurre con la cepa WT (**Figura 46**).





**Figura 46. Expresión de VHH $\alpha$ RibH2 durante la infección de *B. abortus* en células J774.A1.**

Las cepas **(A)**  $\mu\text{ribH1}$  o **(B)** *B. abortus* 2308 (WT), transformadas o no con pVHH fueron utilizadas en la infección de  $5 \times 10^5$  células J774.A1 (MOI 5:1). Las células fueron lisadas y las UFC por ml se determinaron a distintos tiempos, plaqueando diluciones seriadas de los lisados en placas TSA. Se grafica la media  $\pm$  la desviación estándar (N = 2).

## CAPÍTULO 3

“Rol de las flavinas en la simbiosis de *R. leguminosarum*”

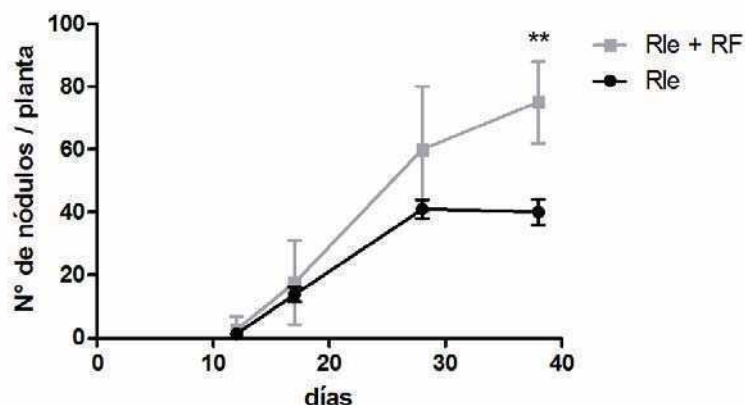
## Simbiosis de *R. leguminosarum*

Como fue mencionado en la Introducción, *Brucella* y *Rhizobium* tienen una gran cercanía filogenética, y comparten varios factores de virulencia y simbiosis, así como también, comparten la propiedad de tener dos genes *ribH* en sus genomas. La evidencia obtenida en el presente trabajo demuestra que el metabolismo de flavinas participa en la virulencia de *Brucella*. Además trabajos publicados que relacionan flavinas y simbiosis en la familia *Rhizobiaceae* [181,204,205,206], llevó a plantear la hipótesis que el metabolismo de flavinas de *Rhizobium leguminosarum* también está involucrado en la simbiosis con la planta.

Para los experimentos de nodulación se utilizó a la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (Rle) cuyo genoma está completamente secuenciando. Brevemente, se plantaron de arveja (*Pisum sativum*), fueron infectadas con cepas de *R. leguminosarum* aplicando una suspensión con bacterias en la zona de las raíces. Luego de semanas, se analizaron distintas variables como ser el número de nódulos por planta, la cantidad de bacterias en los nódulos, entre otras.

### La riboflavina aumenta la capacidad infectiva de *R. leguminosarum*

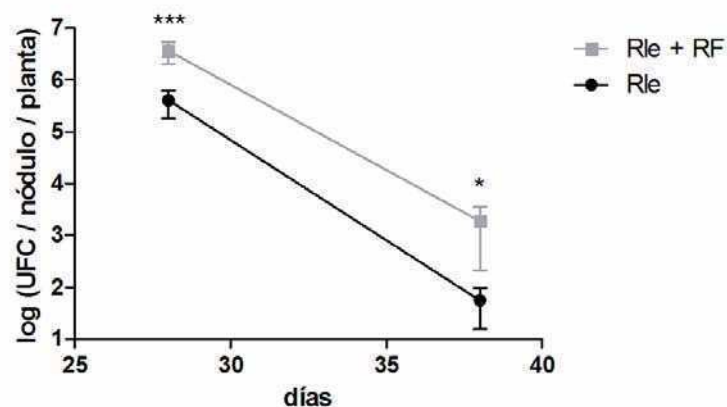
Con el fin de evaluar si el cultivo con riboflavina le otorga a *Rhizobium* una ventaja en la infección, se cultivó a *R. leguminosarum* en un medio suplementado o no con 500  $\mu$ M riboflavina, se cosecharon las células y se realizaron lavados, y luego se infectaron las plantas. Al cabo de 12, 17, 28 y 38 días después de la infección se determinó la cantidad de nódulos visibles por planta. Las plantas que fueron infectadas con bacterias cultivadas en presencia de 500  $\mu$ M riboflavina presentaron en promedio un mayor número de nódulos por planta que las plantas inoculadas con *Rhizobium* cultivada en un medio sin el suplemento de la vitamina. A los 38 días las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) (**Figura 47**).



**Figura 47. Número de nódulos en plantas infectadas con *R. leguminosarum*.**

1 ml de cultivo  $DO_{600} = 0,1$  de *R. leguminosarum* 3841 cultivada con 500  $\mu\text{M}$  (Rle + RF) o sin (Rle) se utilizó para inocular plantas de *Pisum sativum* ( $N = 5$ ). El número de nódulos por planta se determinó a los 12, 17, 28 y 38 días p.i. Se grafica la media  $\pm$  la desviación estándar. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t-Student* no pareada de dos colas (\*\* $p < 0,01$ ).

La cantidad de bacterias en los nódulos de las plantas inoculadas con *Rhizobium* crecidas en presencia o ausencia de 500  $\mu\text{M}$  riboflavina se determinaron a los día 27 y 38 p.i. Las plantas infectadas con *Rhizobium* cultivadas en presencia de riboflavina, presentan 10 veces más bacterias en los nódulos a los 27 días p.i. ( $p < 0,001$ ) y 33 veces más al día 38 que las bacterias que fueron cultivadas sin riboflavina (Figura 48). Cabe destacar que a los 38 días p.i. los nódulos se encuentran en senescencia.

**Figura 48. Ocupación bacteriana de los nódulos de plantas infectadas con cepas *R. leguminosarum*.**

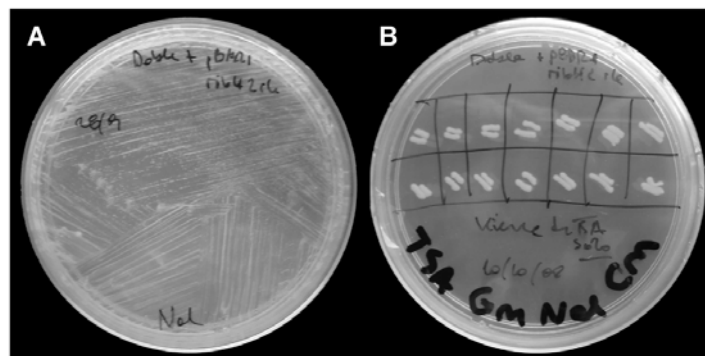
1 ml de cultivo  $DO_{600} = 0,1$  de *R. leguminosarum* 3841 cultivada con 500  $\mu\text{M}$  (Rle + RF) o sin riboflavina (Rle) fue utilizado para infectar plantas de *Pisum sativum* ( $N = 5$ ). Se determinó la cantidad de UFC por nódulo por planta, liberando el contenido de los nódulos individualmente ( $N = 12$ ) en una solución 10% glicerol estéril y plaqueando diluciones seriadas del homogenato en placas TY, a los días 27 y 38 p.i. Se grafica la media  $\pm$  la desviación estándar. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t-Student* no pareada de dos colas (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Es posible concluir que el cultivo de *R. leguminosarum* en altas concentraciones de riboflavina resulta en un incremento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

En *Brucella*, la sobreexpresión de la RibH2 endógena incrementa la infección tanto de células como de ratones. Por tanto se sobreexpresó la RibH2 endógena de *R. leguminosarum* (RibH2\_rle) con el fin de comprobar el rol de la misma en la simbiosis.

**RibH2 de *R. leguminosarum* es un LS activa**

Antes de realizar los ensayos de nodulación, se confirmó que RibH2\_rle también posee actividad de LS *in vivo*, clonando *ribH2\_rle* junto con su zona promotora en el vector de amplio rango pBBR1. La construcción fue denominada *pribH2\_rle*. Se realizó un ensayo de complementación heteróloga transformando a la cepa doble  $\mu$ *ribH* de *Brucella* con el plásmido *pribH2\_rle* y cultivando a las bacterias transformadas en una placa sin riboflavina y sin el antibiótico que selecciona el plásmido *pribH2\_rle*. La cepa doble  $\mu$ *ribH* transformada con el plásmido *pribH2\_rle* es capaz de crecer en ausencia de riboflavina (**Figura 49.A**). Como control, varios clones fueron repicados en una placa con cloranfenicol (Cm) para confirmar la presencia del plásmido *pribH2\_rle* (Cm<sup>r</sup>) (**Figura 49.B**).



**Figura 49. RibH2 de *R. leguminosarum* tiene función de LS *in vivo*.**

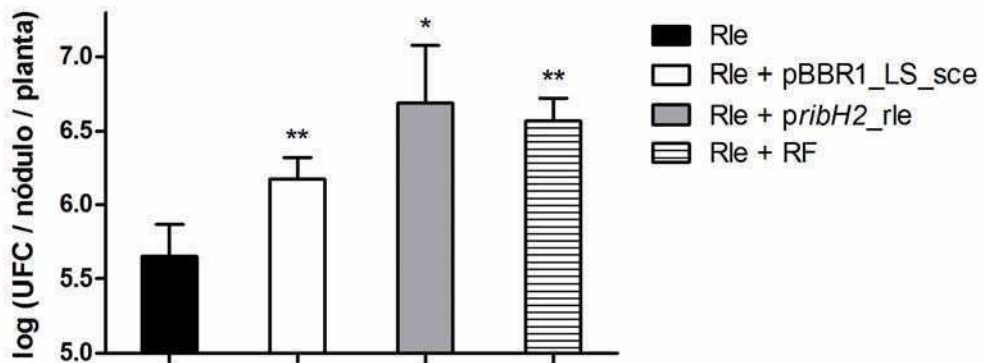
(A) Las bacterias transformadas de *B. abortus* doble  $\mu$ *ribH* + *pribH2\_rle* fueron plaqueadas en placas TSA sin el agregado de riboflavina. (B) 14 clones individuales provenientes de la placa (A) fueron repicados en una placa con Cm para verificar la presencia de *pribH2\_rle*.

### RibH2\_rle está involucrada en la simbiosis de *R. leguminosarum*

Una vez confirmado que *ribH2\_rle* codifica una LS activa, se transformó la cepa salvaje de *R. leguminosarum* 3841 con el plásmido *pribH2\_rle* con el fin de sobreexpresar la proteína endógena por aumento del número de copias del gen, generando la cepa Rle + *pribH2\_rle*. Dado que también se quería evaluar si la función LS era suficiente para aumentar la capacidad infectiva de *Rhizobium* se decidió generar una cepa de *R. leguminosarum* que sobreexpresara la proteína LS\_sce. Para ello, el gen LS\_sce fue subclonado en el vector pBBR1, denominado pBBR1\_LS\_sce y se transformó a *R. leguminosarum* 3841 con este plásmido, generando la cepa Rle + pLS\_sce.

Luego, se utilizaron las cepas Rle + *pribH2\_rle* y Rle + pBBR1\_LS\_sce para infectar plantas y a los 28 días p.i. se hicieron los recuentos de UFC intranodulares de las plantas infectadas con las diferentes cepas. Se detectaron diferencias significativas en los recuentos bacterianos de los nódulos de plantas inoculadas tanto con la cepa Rle + *pribH2\_rle*, Rle + pBBR1\_LS\_sce como con *Rhizobium* cultivada con 500  $\mu$ M riboflavina, comparando con las

UFC intranodulares de plantas infectadas con *R. leguminosarum* salvaje cultivada sin la adición de riboflavina en el medio de cultivo (**Figura 50**).



**Figura 50. Ocupación bacteriana de los nódulos de plantas infectadas con cepas *R. leguminosarum*.**

1 ml de cultivo  $DO_{600} = 0,1$  de las cepas *R. leguminosarum* 3841 cultivadas en 500  $\mu$ M riboflavina (Rle + RF) o no (Rle), Rle + pBBR1\_LS\_sce o Rle + *pribH2\_rle* se utilizó para infectar plantas de *Pisum sativum* (N = 5). La cantidad de UFC por nódulo por planta se determinó liberando el contenido de los nódulos individualmente (N = 12) en una solución 10% glicerol estéril y plaqueando diluciones seriadas del homogenato en placas TY, al día 28 p.i. Se grafica la media + la desviación estándar. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t-Student* no pareada de dos colas comparando siempre con el tratamiento Rle (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

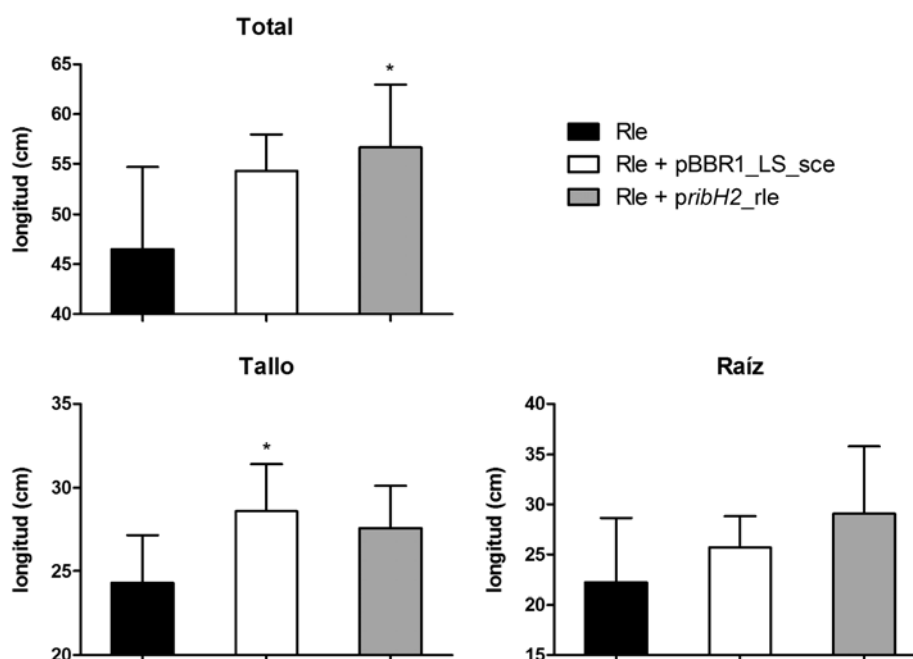
Las plantas infectadas con las cepas que sobreexpresan RibH2\_rle o LS\_sce presentan una mayor longitud del largo total de las plantas y un mayor desarrollo del árbol radicular (**Figura 51**).



**Figura 51. Morfología de plantas infectadas con cepas de *R. leguminosarum*.**

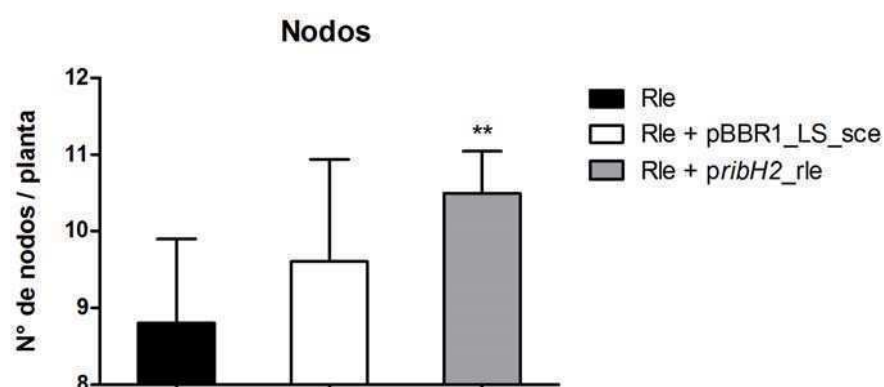
1 ml de cultivo  $DO_{600} = 0,1$  de la cepa *R. leguminosarum* 3841 (Rle), Rle + pBBR1\_LS\_sce o Rle + *pribH2\_rle* fue utilizado para infectar plantas de *Pisum sativum* (N = 5). Se muestra una planta representativa de cada grupo de infección.

Se midieron las longitudes total, del tallo y la raíz de las plantas infectadas con las diferentes cepas de *Rhizobium*. La longitud total de las plantas inoculadas con las cepas Rle + *pribH2\_rle* o Rle + pBBR1\_LS\_sce fue mayor que la correspondiente a las plantas control, inoculadas con Rle, aunque sólo se detectan diferencias significativas en largo total de plantas del grupo Rle + *pribH2\_rle* y los tallos de las plantas infectadas con Rle + pBBR1\_LS\_sce, respecto al grupo control (**Figura 52**).



**Figura 52. Longitud total y de diferentes partes de plantas infectadas con cepas *R. leguminosarum*.** 1 ml de cultivo  $DO_{600} = 0,1$  de la cepa *R. leguminosarum* 3841 (Rle), Rle + pBBR1\_LS\_sce o Rle + *pribH2\_rle* fue utilizado para infectar plántas de *Pisum sativum* (N = 5). Se determinó peso total, del tallo o la raíz de la planta, al día 28 p.i. Se grafica la media + la desviación estándar. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t-Student* no pareada de dos colas comparando siempre con el tratamiento Rle (\* $p < 0,05$ ).

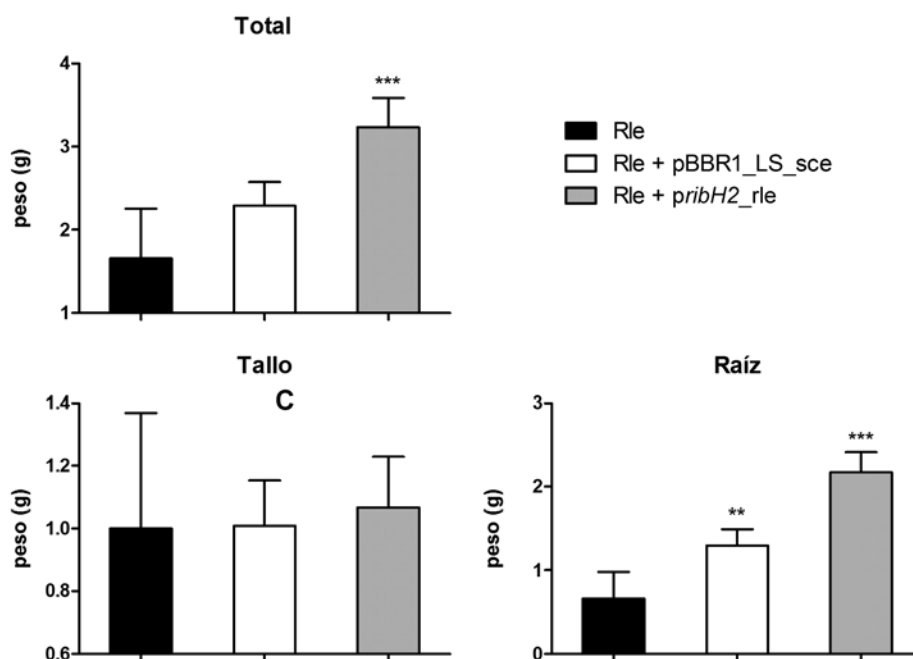
En parte, la diferencia entre las longitudes de las plantas infectadas puede ser explicada por el aumento de la cantidad de ramas o nodos que presentan en la parte aérea. El número de nodos correspondientes a las plantas infectadas con las cepas que sobreexpresan *RibH2\_rle* y *LS\_sce* es mayor que el número de nodos de las plantas control. Sin embargo, solamente Rle + *pribH2\_rle* muestra un diferencia significativamente mayor al control Rle (Figura 53).



**Figura 53. Número de nodos de plantas infectadas con cepas *R. leguminosarum*.** 1 ml de cultivo  $DO_{600} = 0,1$  de la cepa *R. leguminosarum* 3841 (Rle), Rle + pBBR1\_LS\_sce o Rle + *pribH2\_rle* fue utilizado para infectar plántas de *Pisum sativum* (N = 5). Se determinó la cantidad de nodos por tallo por planta, al día 28 p.i. Se grafica la media + la desviación estándar. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t-Student* no pareada de dos colas comparando siempre con el tratamiento Rle (\*\* $p < 0,01$ ).



Por último, se determinaron los pesos húmedos total, del tallo y la raíz de las plantas inoculadas. También se observaron incrementos en del peso húmedo en las plantas inoculadas con las cepas que sobreexpresan RibH\_Rle y LS\_sce, aunque sólo hay diferencias estadísticas en el grupo de plantas tratadas con Rle + *pribH2\_rle* respecto al grupo control (**Figura 54**). Estas diferencias residen en el peso húmedo de las raíces más que en el peso de los tallos, ya que el peso húmedo de los tallos no difiere entre las plantas inoculadas con las diferentes cepas de bacterias. Mientras que las raíces muestran grandes diferencias de peso húmedo. (**Figura 54**).



**Figura 54. Peso húmedo total o de diferentes partes de plantas infectadas con cepas *R. leguminosarum*.**

1 ml de cultivo  $DO_{600} = 0,1$  de la cepa *R. leguminosarum* 3841 (Rle), Rle + pBBR1\_LS\_sce o Rle + *pribH2\_rle* se utilizó para infectar plántas de *Pisum sativum* (N = 5). Se determinaron los pesos húmedos de la planta entera o, del tallo o la raíz, al día 28 p.i. Se grafica la media + la desviación estándar. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t-Student* no pareada de dos colas comparando siempre con el tratamiento Rle (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Tomando en cuenta los últimos resultados en su conjunto, la sobreexpresión de RibH2 endógena de *Rhizobium* o LS de *S. cerevisiae* en *R. leguminosarum* le confiere una mayor capacidad, respecto a la cepa salvaje, de colonizar los nódulos de las plantas infectadas. También, las plantas infectadas con ambas cepas sobreexpresantes muestran diferencias en el peso húmedo y la longitud del tallo y la raíz, respecto a las plantas infectadas con la cepa control sin transformar. Es posible inferir entonces que la actividad LS de RibH2\_rle, al igual que ocurre en *Brucella*, está involucrada en la función que desempeña durante la infección del hospedador por parte de *Rhizobium*.

## Conclusiones & Discusión

La brucelosis es la enfermedad zoonótica con más incidencia en el mundo y es causada por *Brucella* spp. [4]. *Brucella* es un patógeno exitoso que infecta animales probablemente desde hace millones de años y se encuentra sumamente adaptado a las condiciones de vida intracelular [5,6]. La virulencia de este patógeno reside en su capacidad de invadir al hospedador, resistir los mecanismos de defensa del mismo y establecerse y replicar en el inhóspito nicho replicativo. Este último se caracteriza por ser escaso en nutrientes, poseer baja presión de O<sub>2</sub> y en el mismo *Brucella* es sometida al daño oxidativo [88]. A pesar de que *Brucella* no posee factores de virulencia “clásicos”, posee una batería de mecanismos fisiológicos y adaptaciones metabólicas que, en definitiva, son los que le permiten sortear las defensas del hospedador y adaptarse a la vida intracelular.

En este trabajo de tesis se ha estudiado y caracterizado una parte importante de la fisiología básica de *Brucella*, como lo es el metabolismo de las flavinas, y su rol en el establecimiento y replicación del patógeno. Se ha hecho foco en los genes *rib*, en particular el factor de virulencia RibH2, estableciendo una relación directa entre virulencia y la biosíntesis de riboflavina en *Brucella*. Además se ha estudiado el rol de las flavinas y de RibH2 en *R. leguminosarum*, observándose que las mismas también participan en la simbiosis. Esto último demuestra que la función de RibH2 en la interacción con el hospedador eucariota no está restringida sólo a *Brucella*, sino que es compartido por otros *Rhizobiales*.

## Genes del metabolismo de flavinas

En el primer capítulo de esta Tesis, se ha demostrado la expresión simultánea a nivel ARNm de todas las enzimas involucradas en el metabolismo de flavinas (**Figura 3**). Además, sumado a los resultados provistos por otros integrantes del Laboratorio, se determinó que el operón *rib* está constituido por los genes *nrdR*, *ribD*, *ribE*, *ribH* y *nusB* que se expresan en una misma unidad transcripcional (**Figura 4**). No fue posible hallar trabajos en la literatura que muestren que los genes reguladores *nrdR* y *nusB*, los cuales aparecen con frecuencia en el operón *rib*, tengan alguna relación funcional con el mismo. Sin embargo, resultados preliminares de nuestro Laboratorio muestran que la sobreexpresión de *nusB* en *B. abortus* provoca un aumento en la cantidad de RibH1, pero no de RibH2. Esto sugiere que NusB estaría actuando sobre la regulación del operón *rib*. Existen trabajos que describen a NusB como un factor de antiterminación de la transcripción, por ejemplo, en *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Bacillus subtilis*; éste también podría ser el mecanismo por el cual actúa en *Brucella* [207]. A su vez, NrdR, podría jugar el rol de represor transcripcional del operón *rib*, aunque todavía no hay evidencias experimentales que sustenten esta hipótesis. Actualmente se está trabajando en la obtención de mutantes para los genes *nrdR* y *nusB*, así como también en el desarrollo de una cepa sobreexpresante de NrdR en *Brucella*. Dichas construcciones permitirían estudiar su relación con la regulación del operón *rib*. Por otro lado, el

estudio de la regulación de RibH2 *in vivo* determinó que el riboswitch FMN en *Brucella* es capaz de regular los niveles de RibH2 a través de mecanismos de atenuación traduccional, disminuyendo los niveles de la proteína en presencia de FMN y riboflavina. De esta forma se logró establecer una clara diferencia de regulación entre los genes que codifican RibH1 y RibH2. La conservación de la secuencia correspondiente al riboswitch río arriba de todos los genes *ribH2* encontrados hasta ahora en genomas completamente secuenciados, destaca la importancia de la regulación de *ribH2* por este elemento regulatorio.

La expresión de los genes *bluB* y *cobT*, también demostrada en esta Tesis (**Figura 3**), sugiere que los metabolismos de riboflavina y cobalamina se encuentran conectados en *Brucella* (**Figura 2**). Taga *et al.* (2007) demostraron que BluB de *S. meliloti* cataliza la conversión de FMN reducido a 5,6-dimetilbenzimidazol, derivando luego en un sustrato de CobS para la síntesis de cobalamina [181]. La disminución de los niveles de FMN por acción de la enzima BluB podría ser un modulador de la actividad del riboswitch FMN sobre RibH2. Taga *et al.* (2007) también generaron una cepa mutante en el gen *bluB* de *S. meliloti*, la cual resulta ser atenuada en la simbiosis con su planta hospedadora [181]. Este hallazgo plantea la importancia que podrían tener las enzimas BluB y CobT en el metabolismo y la virulencia de *Brucella*.

La regulación por atenuación traduccional ejercida por el riboswitch FMN es una manera rápida de obtener proteína, una vez que la represión sobre la traducción cesa cuando los niveles de FMN descienden. Esto sucede porque existe un *pool* de ARNm listo para ser traducido y, a diferencia de la activación transcripcional, no requiere del paso de la transcripción. El operón *rib* puede estar aportando niveles basales de biosíntesis de riboflavina durante la fase extracelular, y el mecanismo regulatorio que opera sobre *ribH2* puede ser necesario para regular finamente la biosíntesis de riboflavina durante la infección y la adaptación intracelular de *Brucella*, reponiendo flavinas en el momento preciso en el que son requeridas. Sería interesante realizar mediciones sobre los niveles de expresión intracelulares correspondientes a RibH2 durante el transcurso de la infección de *Brucella*. Asimismo, se podrían generar cepas mutantes cuyos riboswitch tengan anulada la capacidad de unión de FMN, o de formar la estructura anti-terminadora, para luego determinar los niveles de virulencia de las mismas. De esta forma se podría establecer una relación directa entre el sensado de FMN y la regulación de RibH2 por el riboswitch, y la virulencia de *Brucella*.

También, en este capítulo se han estudiado las interacciones de la proteína RibH2 con otras proteínas de *Brucella*, explorando una biblioteca de *display* en fagos construida a partir de ADN genómico de *B. suis*. Tal como se describió anteriormente, se encontró una posible interacción de RibH2 con RibD (**resultados de *display* en fagos**). Si bien la interacción RibH2-RibD necesita corroborarse por otros métodos biofísicos y/o bioquímicos, haber encontrado dos fagos diferentes por métodos de elución independientes durante el *panning* (con secuencias

que se superponen en una misma región pero que no son idénticas) sugiere que la interacción es genuina. En la literatura existen trabajos que reportan interacciones de proteínas RibH con diferentes proteínas de diversos organismos. Las interacciones reportadas son: RibH-RibD en *E. coli* [182], y RibH-RibE en *Campylobacter jejuni* [183] y *Bacillus subtilis* [184,185]. En todos estos trabajos se estableció una interacción binaria con una RibH LS-Tipo I. Sin embargo, en ningún trabajo encontrado se exploran las interacciones proteicas de una LS Tipo-II. Los hallazgos de esta Tesis son la primera evidencia de interacción entre una proteína de la vía de biosíntesis de riboflavina y una LS de Tipo-II. Ha sido propuesto que RibH-RibE forman un complejo multiproteico, y que mejoran la eficiencia catalítica en concentraciones bajas de sustratos por medio de un mecanismo de *channeling* [208]. Es posible que también en *Brucella*, RibH2 u otras proteínas Rib estén formando complejos entre ellas, además de la interacción RibH2-RibD, formando un verdadero complejo macromolecular. Nos resulta de sumo interés la exploración de toda la red de interacciones de las proteínas Rib de *B. abortus*, para poder determinar si existe la formación de complejos multiproteicos entre ellas.

### Rol de las flavinas en la virulencia de *B. abortus*

En el segundo capítulo de esta Tesis se ha demostrado que la cepa  $\mu$ ribH2 resulta atenuada durante las infecciones celulares (**Figuras 27.B, 28 y 31.B**). Además, los ensayos de infección de células HeLa con la mutante  $\mu$ ribH2 muestran un tráfico alterado, produciéndose una mayor derivación de las BCVs en fagolisosomas (**Figura 29 y 30**). Esta podría ser una de las causas por las cuales se produce una disminución en los recuentos en las infecciones celulares realizadas, tanto en células HeLa como en J774.A1. Por otro lado, los ensayos de infección de ratones muestran que la cepa mutante  $\mu$ ribH2 presenta menos persistencia que la cepa salvaje (**Figura 31.B**). Asimismo, la sobreexpresión de RibH2 genera en *Brucella* mayores recuentos intracelulares (**Figura 27.B**), y en la infección en ratón esta cepa es más persistente que la *B. abortus* 2308 salvaje a los 14 días p.i. (**Figura 31.B**). Los experimentos de complementación y restitución del fenotipo virulento durante la infección celular realizados sobre la cepa mutante  $\mu$ ribH2 con la versión mutante ribH2\_W22A y con LS\_sce, demostraron que la virulencia de RibH2 reside en su actividad LS (**Figura 35**).

Luego, fue demostrado que la cepa doble  $\mu$ ribH no es capaz de sobrevivir intracelularmente durante largos períodos, siendo completamente eliminada de las células a las 24 h p.i. aproximadamente (**Figura 32**). Esto es indicativo de que la síntesis endógena de flavinas es esencial para la supervivencia en el nicho replicativo. Cuando esta cepa es complementada mediante la expresión heteróloga de LS\_sce, los recuentos intracelulares superan a los recuentos de la cepa salvaje durante todas las etapas de la infección (**Figura 38**), demostrando que la función LS, independientemente de que sea suministrada por las proteínas RibH, es suficiente para la replicación intracelular de *Brucella*. Aún queda por

demostrar si la cepa doble  $\mu ribH$  realiza un tráfico normal, llegando al brucelosoma donde muere por inanición de riboflavina o si su tráfico está alterado y muere en fagolisosomas.

La cepa doble  $\mu ribH$  no presenta recuentos de UFC intracelulares a 24 y 48 h p.i. Por medio de la expresión heteróloga del transportador de flavinas RRT en la cepa doble  $\mu ribH$ , se determinó la existencia de niveles de flavinas apreciables en las BCVs, y se observó que de esta manera esta cepa alcanza niveles considerables de UFC intracelulares a 24 y 48 h p.i. Sin embargo, la cantidad de flavinas no sería suficiente para sostener el crecimiento ya que durante la curva de infección nunca observa un aumento de las UFC (**Figura 39**).

En las infecciones de ratón con las cepas complementadas de la mutante  $\mu ribH2$ , sobreexpresando RibH1, RibH2\_W22A o LS\_sce, se encuentra acentuada la atenuación de  $\mu ribH2$  (**Figura 35**) lo cual no se condice con los resultados obtenidos en las infecciones de células con las mismas cepas (**Figura 34**). Estas diferencias podrían deberse a que en el modelo de infección de ratón es necesario que la regulación de la biosíntesis de la riboflavina esté finamente modulada para el establecimiento del patógeno. La sobreexpresión de RibH1 y LS\_sce podría estar desbalanceando aún más los niveles de flavinas de la cepa  $\mu ribH2$ , causando que las primeras sean eliminadas más rápidamente del ratón. A su vez, la cepa complementada con RibH2\_W22A sobreexpresa una proteína que no es capaz de sintetizar lumazina, pero que retiene todas sus características estructurales, permitiéndole actuar como una mutante dominante negativa, interactuando con otras proteínas, (por ejemplo RibD, interfiriendo con su actividad enzimática). Es posible que la formación de complejos macromoleculares RibH2-RibD junto a otros integrantes de vía biosintética de riboflavina, sea importante en la regulación de la misma y necesaria para la infección de *B. abortus* en ratón.

En la literatura se pueden encontrar diversos abordajes de tipo genómico o proteómico para detectar genes trascendentes en la virulencia y patogénesis de *Brucella*. Algunos de estos estudios identificaron diferencialmente expresado al gen *ribH2*. Dahouk *et al.* (2008) han detectado que RibH2, conjuntamente con otras proteínas, está presente en concentraciones superiores dentro de *Brucella* intramacrofágica que en cultivo [209]. También, Lamontagne *et al.* (2009), hicieron un análisis comparativo de la expresión de genes entre la cepa atenuada *B. abortus* S19 y la cepa infecciosa *B. abortus* 2308, en el cual RibH2 fue hallada en mayor abundancia en la cepa virulenta [210]. De hecho, RibH2 fue originalmente caracterizada por ser un marcador serológico de infección activa para brucelosis humana y bovina, quedando implícito que esa proteína se expresa en altos niveles durante la infección [130].

En conjunto, los resultados presentados en esta Tesis y los reportados en la literatura, indican que RibH2 juega un papel importante en la virulencia y adaptación intracelular de *Brucella*.

## Diferencias en entre RibH1 y RibH2 en la virulencia de *B. abortus*

Las constantes catalíticas ( $k_{cat}$ ) obtenidas *in vitro* correspondientes a RibH1 y RibH2 de *Brucella* no muestran diferencias significativas entre si y son bajas en comparación con las  $k_{cat}$  de otras LS (**Tabla I-4**). Una posibilidad es que RibH1 y RibH2 muestren diferencias en sus actividades enzimáticas *in vitro* al ser medidas en condiciones diferentes a las empleadas en el ensayo estandarizado empleado para ello. Por ejemplo, RibH2 podría tener una mayor actividad enzimática en condiciones especiales, como en el interior de las BCVs tempranas (donde el pH es 4-4,5) o dentro un ambiente con estrés oxidativo o con baja tensión de O<sub>2</sub> como lo es el nicho replicativo.

Como ya fue mencionado en la Introducción, se considera que el cromosoma I de *Brucella* codifica principalmente para funciones de mantenimiento celular mientras que el cromosoma II alberga funciones relacionadas con la virulencia [77]. Este hecho refuerza la hipótesis de que ambos genes *ribH* son expresados diferencialmente durante la adaptación al nicho replicativo dentro de las células.

En conclusión, las diferencias entre las enzimas RibH1 y RibH2 podrían existir a nivel regulatorio, de formación de complejos multiproteicos o porque presentan actividades enzimáticas diferentes durante las fases intra o extracelulares. Todas estas diferencias podrían derivar en que RibH2 actúe como factor de virulencia, mientras que RibH1 no.

## Transporte de flavinas

En esta Tesis también se identificó un novedoso transportador de flavinas de *Rhizobium leguminosarum* denominado *Rhizobium Riboflavin Transporter*, que no pertenece a ninguna de las familias de transportadores descritas hasta el momento (**Figura 26**). En los ensayos de expresión heteróloga realizados en la cepa auxótrofa para riboflavina de *Brucella* doble  $\mu ribH$  se demostró que RRT transporta, al menos, riboflavina, FMN y FAD (**Figura 25**). También, se determinó que la riboflavina y la lumazina son capaces de atravesar la membrana celular de *Brucella* de forma pasiva (**Figuras 22**), pero FAD y FMN no pueden hacerlo de manera apreciable, incluso en concentraciones iguales a 1 mM (**Figuras 21**). Debido a que tanto riboflavina, como FMN y FAD a una concentración de 2,5  $\mu$ M, pueden restituir el crecimiento de la cepa doble  $\mu ribH+$  pRRT, sumado a las evidencias bioinformáticas en donde no es posible encontrar genes que codifiquen para transportadores de flavinas en el genoma de *Brucella*, se puede concluir que *Brucella* no posee proteínas con actividad de transporte de flavinas. El rol fisiológico de RRT en *R. leguminosarum* aún queda por determinarse. Recientemente se obtuvo en el Laboratorio una mutante de *R. leguminosarum* en el gen *rrt*. Los ensayos de infección y simbiosis con la cepa mutante muestran deficiencias en el

establecimiento con la planta hospedadora. Queda por determinar, por ejemplo, la especificidad del transportador por las flavinas, midiendo las  $K_m$  para cada una de ellas. Esto último es importante ya que el valor de  $K_m$  de cada flavina puede indicar si la selección natural operó sobre el transporte de alguna de ellas, resaltando su relevancia en la fisiología de la simbiosis de *Rhizobium*. Además, podría determinarse cuándo es expresado el transportador, por ejemplo, si *Rhizobium* lo expresa en la fase de vida libre o si es expresado en los bacteroides dentro de los nódulos de la planta.

Luego de haber mencionado todos los mecanismos y factores de virulencia e infección que tienen en común *Rhizobium* y *Brucella*, surge la pregunta de por qué *Rhizobium* tiene un transportador de flavinas y *Brucella* no. Para responder esta pregunta es posible imaginar el brucelosoma y el simbiosoma de *Rhizobium* como dos ambientes diferentes. Aun cuando se expresa el transportador RRT en la cepa de *Brucella* auxótrofa doble  $\mu ribH$ , la bacteria no es capaz de replicar intracelularmente (**Figura 39**). Debido a que las células eucariotas no sintetizan riboflavina, es posible que no haya un exceso de la misma en su interior, debiendo importarla por medio de transportadores específicos [211]. Sin embargo, como las plantas sí lo hacen, es factible que *Rhizobium* utilice la riboflavina sintetizada en las células vegetales y la transporte a través de RRT. Por ende, para *Brucella* no es una ventaja adaptativa poseer un transportador (por el entorno en el que replica), mientras que para *Rhizobium* sí.

## Potenciales vacunas contra la brucelosis

Una de las características principales que debe presentar una vacuna contra la brucelosis es que la cepa utilizada sea lo suficientemente atenuada como para no causar enfermedad en animales ni en el hombre, pero que logre impactar en el sistema inmune y generar protección. Por lo tanto, el desarrollo de vacunas vivas atenuadas en *Brucella* gira en torno a la eliminación de genes importantes para la supervivencia bacteriana. Sin embargo, las cepas mutantes con genes eliminados que hacen que la bacteria sea segura para la manipulación, suelen ser tan atenuadas que tienen reducida su eficacia como vacunas [48]. Las mutantes que no son rápidamente eliminadas en ratón suelen generar una respuesta inmune más protectora [200].

Un ejemplo de vacuna viva atenuada es la cepa *B. abortus* S19. Esta cepa es actualmente la más utilizada en vacunación contra la brucelosis bovina por su gran capacidad protectora, pero tiene la desventaja de causar abortos cuando es administrada a animales preñados y es patógena para el hombre [37,212]. Además, por ser una cepa lisa, con antígeno-O del LPS, no es posible diferenciar por serología a animales vacunados de infectados. Se están realizando ensayos para mejorar esta vacuna eliminando genes de virulencia, disminuyendo así su patogenicidad pero manteniendo su capacidad protectora [213].



La cepa mutante doble  $\mu ribH$  cumple con algunas de las características mencionadas para una cepa vacunal. Por ejemplo, presenta atenuación en las infecciones de células y ratón (**Figuras 32 y 33**), y es potencialmente no patogénica para animales o para humanos por carecer de un metabolismo central, como lo es el de la vitamina B2. Además, no expresa la proteína RibH2, antígeno que serviría para diferenciar a los animales vacunados de los infectados [130,137,214].

En la literatura están reportados algunos casos de vacunas basadas en cepas de bacterias patógenas de mamíferos con mutaciones en la vía de síntesis de riboflavina, que sirven como cepas vacunales vivas atenuadas. Fuller *et al.* (1996), generaron una cepa auxótrofa para riboflavina de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, el agente etiológico de la pleuroneumonía porcina, delecionando el gen *ribA* completo y porciones de los genes *ribB* y *ribH* del operón *ribGBAH*. Luego, usaron esa cepa auxótrofa como cepa vacunal en cerdos, obteniendo los mejores resultados de protección al co-inyectar la cepa con altas concentraciones de riboflavina [177,179]. El grupo de Hondalus realizó un trabajo similar con el patógeno equino y oportunista humano *Rhodococcus equi*, generando una cepa mutante por transposición en el gen *ribA/B*, lo que convierte a la bacteria en auxótrofa para riboflavina. Esta cepa fue evaluada como potencial vacuna obteniendo buenos resultados de protección en ratones [215,216].

Es posible que la atenuación de la cepa doble  $\mu ribH$  sea tan acentuada durante la infección de ratón que pueda representar una desventaja en su capacidad protectora como vacuna. La persistencia en ratón de la cepa doble  $\mu ribH$ , pudo ser extendida por medio de la expresión del transportador heterólogo de flavinas RRT de *R. leguminosarum* (**Figura 40**). Si bien son preliminares, los resultados de protección muestran que la cepa  $\mu ribH$  + pRRT puede proteger contra la infección de la cepa salvaje *B. abortus* 2308 (**Figura 42**). Como ya fue mencionado en la sección de Resultados, este resultado es alentador pero se aún queda por realizarse un experimento que incluya a los debidos controles: un grupo desafiado con una cepa vacunal conocida, como lo es la cepa *B. abortus* S19, y un grupo control *naive* sin desafiar. Se podría incluir también un grupo vacunado con la cepa doble  $\mu ribH$  sin el transportador. Es esperable que el grado de protección de la cepa doble  $\mu ribH$  + RRT no cambie si es co-inyectada con riboflavina, tal como fue informado por Fuller *et al.* (2000), ya que la persistencia en la infección en ratón de dicha cepa no mostró diferencias al ser co-inyectada o no con dicha vitamina (**Figura 40**) [179]. A su vez, queda por determinarse si el tiempo de eliminación en ratón de la cepa  $\mu ribH2$  es adecuado, evaluando así si esta cepa puede también incluirse en los ensayos de protección.

Tabla CD-1. Características de las potenciales cepas vacunales para la brucelosis generadas durante esta Tesis.

Cepa	Antígeno RibH2	Biosíntesis de riboflavina	Tiempo de eliminación del ratón
$\mu ribH2$	No	Si	demasiado largo?
doble $\mu ribH$	No	No	demasiado corto?
doble $\mu ribH$ + pRRT	No	No	adecuado?

## Blancos para quimioterapia

En esta Tesis se probó que las LSs de *Brucella* son cruciales para que la bacteria se establezca y replique en el brucelosoma. Es en el nicho replicativo en donde *Brucella*, una vez establecida, se torna más difícil de erradicar. El hecho de que la cepa doble  $\mu ribH$  sea incapaz de replicar intracelularmente, sumado a que la cepa mutante  $\mu ribH2$  tiene su virulencia atenuada y que la actividad LS es la responsable de que sea un factor de virulencia, plantea la posibilidad de obtener inhibidores de las enzimas RibH1 y RibH2 de *Brucella* para evaluarlos como posibles antibióticos. Además, debido a la ausencia de enzimas LS en mamíferos los inhibidores de LSs de *Brucella* podrían servir para la quimioterapia contra la brucelosis, generando auxotrofia para riboflavina en la bacteria o atenuación en su virulencia, sin poner en peligro al hospedador.

Tal como fue mencionado en la Introducción, tanto el diseño racional como los métodos de *screening* masivo de inhibidores de LS y RS suelen ser poco útiles para encontrar compuestos efectivos *in vivo*. Hasta la fecha, sólo muy pocos de estos compuestos resultaron tener actividad antibiótica, como es el caso de algunos inhibidores de RS de *M. tuberculosis*, obtenidos recientemente a partir de un *screening* masivo [164]. Es necesario mejorar la biodisponibilidad y aumentar la permeabilidad de los compuestos inhibitorios a las membranas celulares para lograr que éstos puedan actuar como antibióticos *in vivo*. Incluso, en el caso de *Brucella*, un hipotético compuesto inhibitorio debería poder atravesar las membranas celulares y la pared celular, así como también la membrana celular de la célula eucariota y las membranas de las vacuolas que contienen a *Brucella*.

La estrategia de la expresión del *intrabody* VHH $\alpha$ RibH2 en *Brucella*, evaluada en el segundo capítulo de esta Tesis, fue un intento de probar que la inhibición de la actividad enzimática de RibH2 trae aparejada una disminución en el crecimiento bacteriano o de su virulencia y sobrevivencia intracelular. Sin embargo, no hubo restricción en el crecimiento de la cepa  $\mu ribH$  + pVHH en medio sólido o líquido, ni se vieron modificados sus niveles de supervivencia intracelulares durante la infección en células J774.A1.

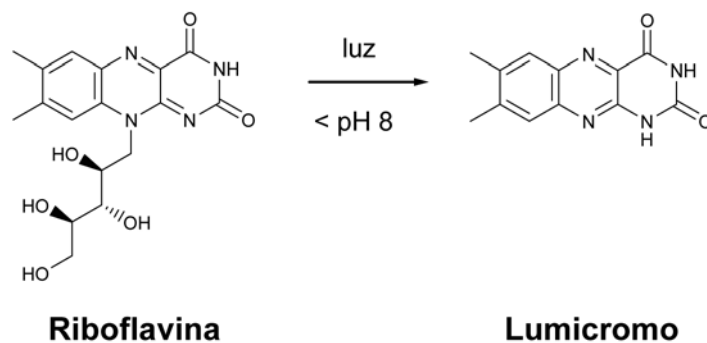
Actualmente, en el Laboratorio se están intentando encontrar inhibidores enzimáticos químicos de RibH1, RibH2 o de la enzima RS de *B. abortus* con la intención de probar dichos compuestos como antibióticos. Para ello, se estableció una colaboración con el grupo del Dr. Mark S. Cushman, coautor de numerosos trabajos científicos sobre diseño y síntesis de inhibidores de las enzimas de metabolismo de la riboflavina de forma racional o masiva [156,160,161,162,163,164,217,218]. El Dr. Cushman nos facilitó 14 compuestos que, por sus características, eran los más promisorios para ser evaluados en ensayos biológicos con *Brucella*. Lamentablemente ninguno pudo inhibir el crecimiento, en medio de cultivo sólido o líquido, de *B. abortus* 2308 ni de las cepas mutantes  $\mu$ ribH1 o  $\mu$ ribH2. Es probable que esto se deba a la baja penetración que presentan estos compuestos al citoplasma bacteriano. Con el fin de mejorar la permeabilidad de estos compuestos inhibitorios, y teniendo en cuenta que muchos de ellos son análogos de flavinas, se transformó con el plásmido pRRT a las cepas WT,  $\mu$ ribH1 o  $\mu$ ribH2 de *B. abortus*. Sin embargo, aún deben realizarse los ensayos de inhibición del crecimiento con las cepas transformadas y los compuestos químicos. De esta manera, aunque sea artificial, será posible saber qué compuestos presentan actividad antibiótica. Luego, se podrán realizar pequeñas modificaciones sobre la estructura química básica de las drogas para mejorar su permeabilidad a las membranas y lograr que accedan al citoplasma bacteriano sin necesitar la presencia del transportador RRT.

Finalmente, la Lic. María Inés Serer se encuentra actualmente poniendo a punto en el Laboratorio un método de *screening* en placa de compuestos capaces de competir por la unión al sitio activo de la LS y de la RS de *B. abortus*. Dado que la riboflavina libre es fluorescente y que su fluorescencia pierde intensidad por *quenching* al encontrarse unida a proteínas, el desplazamiento de la riboflavina del sitio activo causado por la unión competitiva de otro ligando, resultará en un incremento de la fluorescencia medida. El cambio de fluorescencia será el parámetro de medición para la identificación de inhibidores de la LS y/o RS de *B. abortus*. Asimismo, se buscarán otros ligandos de forma masiva en bibliotecas de compuestos, y del mismo modo se evaluará su capacidad inhibitoria en la actividad de las enzimas previamente mencionadas, y por ende su actividad antibiótica sobre *B. abortus*. Tal como fue comentado, una característica deseable en un antimetabolito inhibitorio es que posea la capacidad de inhibir simultáneamente a las enzimas LS y RS, catalizadoras de pasos clave en la ruta biosintética de riboflavina, ganado efectividad en la inhibición y disminuyendo así la probabilidad de aparición de resistencia.

### **Rol de las flavinas en la simbiosis de *R. leguminosarum***

En la literatura se encuentran pocos trabajos que relacionan flavinas y simbiosis. No hay publicaciones científicas acerca de flavinas en *R. leguminosarum*. Sin embargo, existen algunos trabajos sobre ensayos realizados en otros miembros de la familia *Rhizobiaceae*. Dos

de ellos muestran que el agregado de riboflavina en la raíces aumenta la colonización de estas últimas en *Rhizobium trifolii* y *Sinorhizobium meliloti*, y sus respectivas plantas hospedadoras [204,205]. En otra publicación se determinó que el contenido de flavinas en los bacteroides de *Rhizobium trifolii* dentro de lo nódulos es mayor que el de células en cultivo, y que una mutante auxótrofa para riboflavina de *Rhizobium trifolii* no se establece tan bien en los nódulos como lo hace la cepa salvaje [204]. También, los nódulos colonizados de la planta de poroto tienen el doble de contenido de riboflavina que los no colonizados [206]. Por último, varias publicaciones informan que el lumicromo (**Figura CD-1**), un derivado de la riboflavina generado por *S. meliloti*, puede estimular el crecimiento y el desarrollo de plantas, al igual que los factores Nod de los rizobios [219,220,221]. El lumicromo también modifica la respiración de la raíces, la conducción de los estomas, la transpiración de las hojas y la tasa fotosintética en legumbres y cereales [222]. A su vez, la riboflavina y el lumicromo parecen participar en eventos de *quorum sensing* en bacterias, incluyendo a *S. meliloti* [223].



**Figura CD-1. Conversión de la riboflavina en lumicromo**

El lumicromo es producido por la fotodegradación de la riboflavina en soluciones ácidas, o por enzimas en bacterias y plantas [220].

Yang *et al.* (2002), publicaron un trabajo en el cual se crearon cepas de *S. meliloti* con múltiples copias de diferentes genes de la ruta biosintética de riboflavina: *ribA/B*, *ribC-ribD* y *ribH*, para ser posteriormente evaluadas en simbiosis. Los autores encontraron aumentada únicamente en un 55% la colonización de nódulos con la cepa con copias extra del gen *ribA/B*, mientras que el resto de las cepas, incluyendo a la sobreexpresante de *RibH*, no mostraron diferencias respecto a la cepa control. Cabe destacar aquí que los autores sólo clonaron al gen *ribH1* por tener alta identidad con el homólogo de *E. coli*, mientras que *ribH2* no fue evaluado [224].

Los cultivos de *R. leguminosarum* suplementados con riboflavina durante el crecimiento colonizan mejor los nódulos, obteniéndose mayores UFC intranodulares que con la cepa crecida sin la adición de la vitamina. A su vez, las plantas infectadas con bacterias crecidas con riboflavina aumentan la cantidad de nódulos en las raíces. Finalmente, la sobreexpresión de

RibH2 endógena o LS de *S. cerevisiae* en *Rhizobium* trae aparejado un aumento en muchas de las variables medidas relacionadas con la simbiosis.

Tomando en cuenta los datos bibliográficos, los resultados obtenidos en esta Tesis y los resultados recientes sobre la simbiosis de la mutante en el gen *rrt* en *R. leguminosarum* ya mencionados, es posible plantear un posible escenario en donde la riboflavina o el lumicromo son exportados a través del RRT y generan cambios en la planta o en el *quorum sensing* de la bacteria misma, que mejoran la asociación simbiótica. Entonces, las bacterias crecidas en alta concentración de riboflavina podrían estar exportando riboflavina o lumicromo por el gradiente de concentración y la sobreexpresión de RibH2\_rle o LS\_sce podría generar también un aumento del eflujo de riboflavina o lumicromo por un aumento en la síntesis endógena. Para evaluar esta hipótesis, por ejemplo, se debería probar la bidireccionalidad en el transporte de flavinas del transportador RRT y si éste es capaz de transportar lumicromo. De esta manera, si lo postulado fuera cierto, el aumento de las variables de la simbiosis medidas durante los ensayos de esta Tesis (por ejemplo: n° de nódulos/planta o UF C/nódulo/planta), deberían verse anulados en la mutante *rrt*, aunque ésta sobreexpresara RibH2\_rle, LS\_sce o sea cultivada en altas concentraciones de riboflavina antes del desafío con la planta. Esto se debería a que la ausencia del transportador RRT impide la salida del exceso de flavinas desde el interior celular. También, se debería generar mutantes simples de los genes *ribH1* y *ribH2*, y la cepa mutante doble *ribH* en *R. leguminosarum*, y estudiar su desempeño en la infección de plantas. De esta manera se podría determinar si efectivamente RibH2\_rle (y no RibH1\_rle) está involucrada en la simbiosis de *Rhizobium*. También, realizando ensayos de infección con una cepa auxótrofa para riboflavina de *R. leguminosarum* y con el transportador RRT intacto, sería posible analizar si es necesaria la biosíntesis de riboflavina para el establecimiento intracelular de la bacteria o bien si el transporte de flavinas por parte de RRT es suficiente para ello.

Por lo tanto, el rol del metabolismo de flavinas en la patogénesis de *Brucella* es una cuestión de relevancia biológica y parece no estar limitado únicamente al género *Brucella*. Existen varios genomas bacterianos con dos RibH codificadas identificados por métodos bioinformáticos y bioquímicos por nuestro Laboratorio [128,129]. Muchas de estas bacterias son simbiosis de plantas, como *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* spp. siendo otras patógenas, como *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Roseobacter denitrificans*. En la mayoría de los genomas, los genes *ribH* están dispuestos con cierto grado de conservación entre ellos, en donde *ribH1* está codificado en el opero *rib*, mientras que *ribH2* está localizado como un ORF aislado localizado río abajo de la secuencia regulatoria *rfn-box*.

Existe al menos un ejemplo en la literatura en el que se postula que un gen correspondiente a una enzima de la ruta biosintética de la riboflavina (GTP ciclohidrolasa II) de *Streptomyces coelicolor* pudo haber sufrido una duplicación, evolucionando hacia otra función

[225]. De la misma manera, en un ancestro bacteriano pudo ocurrir una duplicación de un gen *ribH* que codificaba una LS Tipo-I y de su secuencia regulatoria *rfn*-box, que luego evolucionó hacia una LS Tipo-II otorgándole mayor adaptabilidad para la simbiosis o patogénesis. Las transferencias verticales u horizontales del “novedoso” gen *ribH2* y su secuencia regulatoria podrían ser responsables de distribuirlos entre los diferentes taxones en donde se encuentran los dos tipos de LS.

## Mejora potencial para inoculantes

Diversos géneros y especies del orden *Rhizobiales* son simbioses naturales de plantas leguminosas de interés agronómico, entre ellas, soja, garbanzo, arveja, poroto, maní, trébol y alfalfa. El resultado de esta simbiosis es la formación de nódulos fijadores de N<sub>2</sub>, que conlleva a un aumento en la producción de las cosechas y a una mejora en las condiciones del suelo en general. Los efectos beneficiosos del mutualismo entre rizobios y leguminosas ya fueron explotados tecnológicamente, dando como resultado la generación de diversos inoculantes, creados a partir de cepas silvestres de rizobios. En este trabajo de tesis presentamos dos estrategias alternativas que pueden ser útiles para mejorar el desempeño como inoculante de *Rhizobium leguminosarum* u otros *Rhizobiales* que presentan 2 genes *ribH* en sus genomas, como *Bradyrhizobium japonicum* (inoculante de la soja): la sobreexpresión de RibH2 endógena y el cultivo con altas concentraciones de riboflavina.

En la actualidad, en colaboración con la empresa *Rizobacter* S.A. (Pergamino - Bs. As.), se están realizando ensayos a campo con cepas comerciales y de laboratorio de *R. leguminosarum*. Estos ensayos involucran la inoculación de semillas de arveja de variedades comerciales con cepas de *Rhizobium* cultivadas en altas concentraciones de riboflavina o sobreexpresando RibH2<sub>rle</sub>. Luego, se medirán variables de interés agronómico como el número de plantas/m<sup>2</sup>, peso fresco aéreo (g/m<sup>2</sup>), peso seco aéreo (g/m<sup>2</sup>) y rendimiento (kg/ha).

Por los efectos generados en las raíces de las plantas de arveja, se está evaluando a las cepas sobreexpresantes de RibH2 como potenciales cepas promotoras del crecimiento radicular también en plantas no leguminosas como el trigo y el maíz. De esta forma, las plantas podrían incorporar mejor los nutrientes del suelo y aprovechar mejor la disponibilidad de agua. En los ensayos con plantas de trigo también se medirán variables de interés agronómico como el número de plantas/ m<sup>2</sup>, biomasa de espigas (g/m<sup>2</sup>), peso fresco de los macollos (g /m<sup>2</sup>), peso seco de los macollos (g/m<sup>2</sup>), rendimiento (kg/ha), n° de espigas/m<sup>2</sup>, n° de macollos/m<sup>2</sup> y peso seco espigas (g/m<sup>2</sup>).

## **Comentarios finales**

En esta última parte, se discutieron los resultados más relevantes de la Tesis. Actualmente se está continuando con los estudios para tratar de contestar los interrogantes planteados en esta sección.

Finalmente, los hallazgos de este trabajo de tesis doctoral pueden dar lugar a estudios más profundos y específicos que lleven al desarrollo de vacunas y drogas contra la brucelosis y mejoras en las cepas bacterianas de inoculantes para el uso agronómico.

## Referencias

1. Godfroid J, Cloeckert A, Liutard JP, Kohler S, Fretin D, et al. (2005) 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* 36: 313-326.
2. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N (2010) Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol* 140: 392-398.
3. Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS (2007) Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian J Med Microbiol* 25: 188-202.
4. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV (2006) The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 6: 91-99.
5. D'Anastasio R, Staniscia T, Milia ML, Manzoli L, Capasso L (2011) Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiol Infect* 139: 149-156.
6. D'Anastasio R, Zipfel B, Moggi-Cecchi J, Stanyon R, Capasso L (2009) Possible brucellosis in an early hominin skeleton from Sterkfontein, South Africa. *PLoS One* 4: e6439.
7. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E (2005) Brucellosis. *N Engl J Med* 352: 2325-2336.
8. Pappas G (2010) The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int J Antimicrob Agents* 36 Suppl 1: S8-11.
9. Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA, Splitter GA (2004) Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J Bacteriol* 186: 5040-5051.
10. Whatmore AM, Dawson CE, Groussaud P, Koylass MS, King AC, et al. (2008) Marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection. *Emerg Infect Dis* 14: 517-518.
11. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, et al. (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* 187: 2715-2726.
12. Carmichael LE, Kenney RM (1968) Canine abortion caused by *Brucella canis*. *J Am Vet Med Assoc* 152: 605-616.
13. Buddle MB (1956) Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J Hyg (Lond)* 54: 351-364.
14. Stoenner HG, Lackman DB (1957) A preliminary report on a *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *J Am Vet Med Assoc* 130: 411-412.
15. Ewalt DR, Payeur JB, Martin BM, Cummins DR, Miller WG (1994) Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest* 6: 448-452.
16. Ross HM, Foster G, Reid RJ, Jahans KL, MacMillan AP (1994) *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet Rec* 134: 359.



17. Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, et al. (2008) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 375-382.
18. De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, et al. (2008) Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol* 46: 43-49.
19. Schlabritz-Loutsevitch NE, Whatmore AM, Quance CR, Koylass MS, Cummins LB, et al. (2009) A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *J Med Primatol* 38: 70-73.
20. Tiller RV, Gee JE, Lonsway DR, Gribble S, Bell SC, et al. (2010) Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiol* 10: 23.
21. Whatmore AM (2009) Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect Genet Evol* 9: 1168-1184.
22. Gandara B, Merino AL, Rogel MA, Martinez-Romero E (2001) Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 39: 235-240.
23. Verger JMMG (1985) *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriology* 35: 292-295.
24. Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C (2010) Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat Med J* 51: 296-305.
25. Le Fleche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, et al. (2006) Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol* 6: 9.
26. Palanduz A, Palanduz S, Guler K, Guler N (2000) Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. *Int J Infect Dis* 4: 55-56.
27. Giannacopoulos I, Eliopoulou MI, Ziambaras T, Papanastasiou DA (2002) Transplacentally transmitted congenital brucellosis due to *Brucella abortus*. *J Infect* 45: 209-210.
28. Mesner O, Riesenberk K, Biliar N, Borstein E, Bouhnik L, et al. (2007) 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* 45: e135-140.
29. Ruben B, Band JD, Wong P, Colville J (1991) Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet* 337: 14-15.
30. Mandrell G (1995) *Infectología*. Madrid: Editorial Medica Panamericana.
31. DeVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, et al. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 443-448.
32. Gwida M, Al Dahouk S, Melzer F, Rosler U, Neubauer H, et al. (2010) Brucellosis - regionally emerging zoonotic disease? *Croat Med J* 51: 289-295.
33. Agasthya AS, Isloor S, Prabhudas K (2007) Brucellosis in high risk group individuals. *Indian J Med Microbiol* 25: 28-31.
34. Robertson L (1967) Diagnosis and treatment of infection with *Brucella abortus*, biotype 5. *J Clin Pathol* 20: 199-203.

35. Young EJ (1995) An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 21: 283-289; quiz 290.
36. Minas M, Minas A, Gourgulianis K, Stournara A (2007) Epidemiological and clinical aspects of human brucellosis in Central Greece. *Jpn J Infect Dis* 60: 362-366.
37. Wallach JC, Ferrero MC, Victoria Delpino M, Fossati CA, Baldi PC (2008) Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina. *Clin Microbiol Infect* 14: 805-807.
38. Singh K (2009) Laboratory-acquired infections. *Clin Infect Dis* 49: 142-147.
39. Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC, Fossati CA (2004) Human infection with M-strain of *Brucella canis*. *Emerg Infect Dis* 10: 146-148.
40. Gorvel JP (2008) *Brucella*: a Mr "Hide" converted into Dr Jekyll. *Microbes Infect* 10: 1010-1013.
41. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL (2007) Human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 7: 775-786.
42. Mantur BG, Amarnath SK (2008) Brucellosis in India - a review. *J Biosci* 33: 539-547.
43. Solera J (2010) Update on brucellosis: therapeutic challenges. *Int J Antimicrob Agents* 36 Suppl 1: S18-20.
44. Szyfres PNAB (2001) Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Organización Panamericana de la Salud; OMS.
45. Carvalho Neta AV, Mol JP, Xavier MN, Paixao TA, Lage AP, et al. (2010) Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J* 184: 146-155.
46. Samartino LE, Enright FM (1993) Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 16: 95-101.
47. Yang X, Thornburg T, Walters N, Pascual DW (2010) DeltaznuADeltapurE *Brucella abortus* 2308 mutant as a live vaccine candidate. *Vaccine* 28: 1069-1074.
48. Ficht TA, Kahl-McDonagh MM, Arenas-Gamboa AM, Rice-Ficht AC (2009) Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. *Vaccine* 27 Suppl 4: D40-43.
49. Ashford DA, di Pietra J, Lingappa J, Woods C, Noll H, et al. (2004) Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine* 22: 3435-3439.
50. Ko J, Splitter GA (2003) Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16: 65-78.
51. Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE, Stevens MG, Palmer MV, et al. (1996) Effects of age at vaccination on efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am J Vet Res* 57: 1153-1156.
52. Olsen SC, Bricker B, Palmer MV, Jensen AE, Cheville NF (1999) Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Res Vet Sci* 66: 101-105.
53. Elzer PH, Enright FM, Colby L, Hagius SD, Walker JV, et al. (1998) Protection against infection and abortion induced by virulent challenge exposure after oral vaccination of cattle with *Brucella abortus* strain RB51. *Am J Vet Res* 59: 1575-1578.

54. Poester FP, Goncalves VS, Paixao TA, Santos RL, Olsen SC, et al. (2006) Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. *Vaccine* 24: 5327-5334.
55. Samartino LE (2002) Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* 90: 71-80.
56. Georgios Pappas MD, Nikolaos Akritidis, M.D., Mile Bosilkovski, M.D., and Epameinondas Tsianos, M.D. (2005) Brucellosis. *New England Journal of Medicine* Volume 352:2325-2336.
57. OMS (2000) Definiciones de caso:Brucelosis, Carbunco (Ántrax) y Rabia. *Boletín Epidemiológico*.
58. Araj GF (2010) Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents* 36 Suppl 1: S12-17.
59. Ruiz Castaneda M (1961) Laboratory diagnosis of brucellosis in man. *Bull World Health Organ* 24: 73-84.
60. Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ (2005) Brucellosis--new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol* 98: 1270-1281.
61. Wright A, Smith F (1897) On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever. *Lancet* 1: 656-659.
62. Ozsoyler I, Yilik L, Bozok S, El S, Emreacan B, et al. (2005) Brucella endocarditis: the importance of surgical timing after medical treatment (five cases). *Prog Cardiovasc Dis* 47: 226-229.
63. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N (2006) Brucella as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci* 63: 2229-2236.
64. Neubauer H (2010) Brucellosis: new demands in a changing world. *Prilozi* 31: 209-217.
65. Greenfield RA, Drevets DA, Machado LJ, Voskuhl GW, Cornea P, et al. (2002) Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism. *Am J Med Sci* 323: 299-315.
66. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, et al. (1990) Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* 172: 3569-3576.
67. Ugalde RA (1999) Intracellular lifestyle of Brucella spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes Infect* 1: 1211-1219.
68. Batut J, Andersson SG, O'Callaghan D (2004) The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nat Rev Microbiol* 2: 933-945.
69. Ettema TJ, Andersson SG (2009) The alpha-proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. *Biol Lett* 5: 429-432.
70. Andersson SG, Karlberg O, Canback B, Kurland CG (2003) On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 165-177; discussion 177-169.
71. Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481.
72. Berg G, Eberl L, Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* 7: 1673-1685.

73. Young JP, Crossman LC, Johnston AW, Thomson NR, Ghazoui ZF, et al. (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* 7: R34.
74. Wattam AR, Williams KP, Snyder EE, Almeida NF, Jr., Shukla M, et al. (2009) Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J Bacteriol* 191: 3569-3579.
75. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, Ramuz M, Allardet-Servent A (1998) Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J Bacteriol* 180: 2749-2755.
76. Bavishi A, Abhishek A, Lin L, Choudhary M (2010) Complex prokaryotic genome structure: rapid evolution of chromosome II. *Genome* 53: 675-687.
77. Viadas C, Rodriguez MC, Garcia-Lobo JM, Sangari FJ, Lopez-Goni I (2009) Construction and evaluation of an ORFeome-based *Brucella* whole-genome DNA microarray. *Microb Pathog* 47: 189-195.
78. Castaneda-Roldan EI, Avelino-Flores F, Dall'Agnol M, Freer E, Cedillo L, et al. (2004) Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol* 6: 435-445.
79. Watarai M, Makino S, Fujii Y, Okamoto K, Shirahata T (2002) Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* 4: 341-355.
80. Celli J (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* 157: 93-98.
81. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, et al. (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* 6: 618-625.
82. Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP (2003) Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* 71: 1481-1490.
83. Porte F, Liautard JP, Kohler S (1999) Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* 67: 4041-4047.
84. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J (2008) *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* 9: 678-694.
85. Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, et al. (2003) *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 198: 545-556.
86. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N (2008) *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Vet Microbiol* 129: 1-14.
87. Roop RM, 2nd, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW (2009) Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* 198: 221-238.
88. Roop RM, 2nd, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA (2004) Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol* 52: 621-630.

89. Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Didembourg C, Taminiau B, et al. (2000) Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol* 38: 543-551.
90. Kohler S, Foulongne V, Ouahrani-Bettache S, Bourg G, Teyssier J, et al. (2002) The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15711-15716.
91. Kohler S, Porte F, Jubier-Maurin V, Ouahrani-Bettache S, Teyssier J, et al. (2002) The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Vet Microbiol* 90: 299-309.
92. Foulongne V, Bourg G, Cazevieille C, Michaux-Charachon S, O'Callaghan D (2000) Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun* 68: 1297-1303.
93. Letesson JJ, Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Bellefontaine F, et al. (2002) Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug". *Vet Microbiol* 90: 317-328.
94. Bandara AB, Contreras A, Contreras-Rodriguez A, Martins AM, Dobrea V, et al. (2007) *Brucella suis* urease encoded by *ure1* but not *ure2* is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC Microbiol* 7: 57.
95. Sangari FJ, Seoane A, Rodriguez MC, Aguero J, Garcia Lobo JM (2007) Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect Immun* 75: 774-780.
96. Spera JM, Ugalde JE, Mucci J, Comerci DJ, Ugalde RA (2006) A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16514-16519.
97. Radhakrishnan GK, Splitter GA (2010) Biochemical and functional analysis of TIR domain containing protein from *Brucella melitensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 397: 59-63.
98. Radhakrishnan GK, Yu Q, Harms JS, Splitter GA (2009) *Brucella* TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP. *J Biol Chem* 284: 9892-9898.
99. Sengupta D, Koblansky A, Gaines J, Brown T, West AP, et al. (2010) Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *J Immunol* 184: 956-964.
100. Comerci DJ, Altabe S, de Mendoza D, Ugalde RA (2006) *Brucella abortus* synthesizes phosphatidylcholine from choline provided by the host. *J Bacteriol* 188: 1929-1934.
101. Bukata L, Altabe S, de Mendoza D, Ugalde RA, Comerci DJ (2008) Phosphatidylethanolamine synthesis is required for optimal virulence of *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 190: 8197-8203.
102. Inon de Iannino N, Briones G, Tolmasky M, Ugalde RA (1998) Molecular cloning and characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic beta(1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti* *ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens* *chvB* mutants. *J Bacteriol* 180: 4392-4400.
103. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, et al. (2002) The *Brucella suis* *virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1544-1549.

104. Comerci DJ, Martinez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA (2001) Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* 3: 159-168.
105. de Jong MF, Sun YH, den Hartigh AB, van Dijl JM, Tsolis RM (2008) Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 70: 1378-1396.
106. Gee JM, Valderas MW, Kovach ME, Grippe VK, Robertson GT, et al. (2005) The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect Immun* 73: 2873-2880.
107. Tatum FM, Detilleux PG, Sacks JM, Halling SM (1992) Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. *Infect Immun* 60: 2863-2869.
108. Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig G, Misra H (1991) Superoxide dismutases of virulent and avirulent strains of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 26: 359-366.
109. Tatum FM, Morfitt DC, Halling SM (1993) Construction of a *Brucella abortus* RecA mutant and its survival in mice. *Microb Pathog* 14: 177-185.
110. Gross A, Spiesser S, Terraza A, Rouot B, Caron E, et al. (1998) Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages. *Infect Immun* 66: 1309-1316.
111. Loisel-Meyer S, Jimenez de Bagues MP, Basseres E, Dornand J, Kohler S, et al. (2006) Requirement of norD for *Brucella suis* virulence in a murine model of in vitro and in vivo infection. *Infect Immun* 74: 1973-1976.
112. Paulley JT, Anderson ES, Roop RM, 2nd (2007) *Brucella abortus* requires the heme transporter BhuA for maintenance of chronic infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 75: 5248-5254.
113. Swartz TE, Tseng TS, Frederickson MA, Paris G, Comerci DJ, et al. (2007) Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* 317: 1090-1093.
114. Fretin D, Fauconnier A, Kohler S, Halling S, Leonard S, et al. (2005) The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* 7: 687-698.
115. Ferooz J, Letesson JJ (2010) Morphological analysis of the sheathed flagellum of *Brucella melitensis*. *BMC Res Notes* 3: 333.
116. Viadas C, Rodriguez MC, Sangari FJ, Gorvel JP, Garcia-Lobo JM, et al. (2010) Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One* 5: e10216.
117. Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckert A, et al. (2002) The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12375-12380.
118. Martinez-Nunez C, Altamirano-Silva P, Alvarado-Guillen F, Moreno E, Guzman-Verri C, et al. (2010) The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 192: 5603-5608.

119. Manterola L, Moriyon I, Moreno E, Sola-Landa A, Weiss DS, et al. (2005) The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J Bacteriol* 187: 5631-5639.
120. Dozot M, Boige grain RA, Delrue RM, Hallez R, Ouahrani-Bettache S, et al. (2006) The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB. *Cell Microbiol* 8: 1791-1802.
121. Kim S, Watanabe K, Suzuki H, Watarai M (2005) Roles of *Brucella abortus* SpoT in morphological differentiation and intramacrophagic replication. *Microbiology* 151: 1607-1617.
122. Bacher A, Eberhardt S, Fischer M, Kis K, Richter G (2000) Biosynthesis of vitamin b2 (riboflavin). *Annu Rev Nutr* 20: 153-167.
123. Joosten V, van Berkel WJ (2007) Flavoenzymes. *Curr Opin Chem Biol* 11: 195-202.
124. Losi A (2007) Flavin-based Blue-Light photosensors: a photobiophysics update. *Photochem Photobiol* 83: 1283-1300.
125. Ritsert K, Huber R, Turk D, Ladenstein R, Schmidt-Base K, et al. (1995) Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*: crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* 253: 151-167.
126. Meining W, Mortl S, Fischer M, Cushman M, Bacher A, et al. (2000) The atomic structure of pentameric lumazine synthase from *Saccharomyces cerevisiae* at 1.85 Å resolution reveals the binding mode of a phosphonate intermediate analogue. *J Mol Biol* 299: 181-197.
127. Gerhardt S, Haase I, Steinbacher S, Kaiser JT, Cushman M, et al. (2002) The structural basis of riboflavin binding to *Schizosaccharomyces pombe* 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *J Mol Biol* 318: 1317-1329.
128. Zylberman V, Klinke S, Haase I, Bacher A, Fischer M, et al. (2006) Evolution of vitamin B2 biosynthesis: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthases of *Brucella*. *J Bacteriol* 188: 6135-6142.
129. Klinke S, Zylberman V, Bonomi HR, Haase I, Guimaraes BG, et al. (2007) Structural and kinetic properties of lumazine synthase isoenzymes in the order Rhizobiales. *J Mol Biol* 373: 664-680.
130. Goldbaum FA, Leoni J, Wallach JC, Fossati CA (1993) Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *J Clin Microbiol* 31: 2141-2145.
131. Hemmen F, Weynants V, Scarcez T, Letesson JJ, Saman E (1995) Cloning and sequence analysis of a newly identified *Brucella abortus* gene and serological evaluation of the 17-kilodalton antigen that it encodes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2: 263-267.
132. De Mot R, Nagy I, Schoofs G, Vanderleyden J (1996) Identification of a *Rhodococcus* gene cluster encoding a homolog of the 17-kDa antigen of *Brucella* and a putative regulatory protein of the AsnC-Lrp family. *Curr Microbiol* 33: 26-30.
133. Goldbaum FA, Polikarpov I, Cauerhff AA, Velikovskiy CA, Braden BC, et al. (1998) Crystallization and preliminary x-ray diffraction analysis of the lumazine synthase from *Brucella abortus*. *J Struct Biol* 123: 175-178.

134. Braden BC, Velikovsky CA, Cauerhff AA, Polikarpov I, Goldbaum FA (2000) Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from *Brucella abortus*. *J Mol Biol* 297: 1031-1036.
135. Zylberman V, Craig PO, Klinke S, Braden BC, Cauerhff A, et al. (2004) High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* sp. lumazine synthase. *J Biol Chem* 279: 8093-8101.
136. Klinke S, Zylberman V, Vega DR, Guimaraes BG, Braden BC, et al. (2005) Crystallographic studies on decameric *Brucella* spp. Lumazine synthase: a novel quaternary arrangement evolved for a new function? *J Mol Biol* 353: 124-137.
137. Baldi PC, Velikovsky CA, Braden BC, Giambartolomei GH, Fossati CA, et al. (2000) Structural, functional and immunological studies on a polymeric bacterial protein. *Braz J Med Biol Res* 33: 741-747.
138. Klinke S (2007) Estudio cristalográfico y catalítico de la enzima Lumazina sintetasa en *Brucella* y otros miembros del orden Rhizobiales [PhD]. Buenos Aires, Argentina: UBA.
139. Zylberman V (2006) Estudios estructurales, funcionales y evolutivos de una proteína de *B. abortus* relacionada con la vía biosintética de la riboflavina [PhD]. Buenos Aires, Argentina: UBA.
140. Fischer M, Haase I, Feicht R, Richter G, Gerhardt S, et al. (2002) Biosynthesis of riboflavin: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem* 269: 519-526.
141. Koch M, Breithaupt C, GerhardtHaase S, Weber S, Cushman M, et al. (2004) Structural basis of charge transfer complex formation by riboflavin bound to 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Eur J Biochem* 271: 3208-3214.
142. Mack M, van Loon AP, Hohmann HP (1998) Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. *J Bacteriol* 180: 950-955.
143. Blouin S, Mulhbachter J, Penedo JC, Lafontaine DA (2009) Riboswitches: ancient and promising genetic regulators. *Chembiochem* 10: 400-416.
144. Serganov A (2009) The long and the short of riboswitches. *Curr Opin Struct Biol* 19: 251-259.
145. Nudler E, Mironov AS (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci* 29: 11-17.
146. Barrick JE, Breaker RR (2007) The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol* 8: R239.
147. Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS (2002) Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Res* 30: 3141-3151.
148. Mandal M, Breaker RR (2004) Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat Struct Mol Biol* 11: 29-35.
149. Vogl C, Grill S, Schilling O, Stulke J, Mack M, et al. (2007) Characterization of riboflavin (vitamin B2) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 189: 7367-7375.
150. Mathes T, Vogl C, Stolz J, Hegemann P (2009) In vivo generation of flavoproteins with modified cofactors. *J Mol Biol* 385: 1511-1518.



151. Zhang P, Wang J, Shi Y (2010) Structure and mechanism of the S component of a bacterial ECF transporter. *Nature* 468: 717-720.
152. Grill S, Yamaguchi H, Wagner H, Zwahlen L, Kusch U, et al. (2007) Identification and characterization of two *Streptomyces davawensis* riboflavin biosynthesis gene clusters. *Arch Microbiol* 188: 377-387.
153. Rodionov DA, Gelfand MS (2005) Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. *Trends Genet* 21: 385-389.
154. Torrents E, Grinberg I, Gorovitz-Harris B, Lundstrom H, Borovok I, et al. (2007) NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol* 189: 5012-5021.
155. Burmann BM, Luo X, Rosch P, Wahl MC, Gottesman ME (2010) Fine tuning of the *E. coli* NusB:NusE complex affinity to BoxA RNA is required for processive antitermination. *Nucleic Acids Res* 38: 314-326.
156. Morgunova E, Illarionov B, Saller S, Popov A, Sambaiah T, et al. (2010) Structural study and thermodynamic characterization of inhibitor binding to lumazine synthase from *Bacillus anthracis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 1001-1011.
157. Long Q, Ji L, Wang H, Xie J (2010) Riboflavin biosynthetic and regulatory factors as potential novel anti-infective drug targets. *Chem Biol Drug Des* 75: 339-347.
158. Persson K, Schneider G, Jordan DB, Viitanen PV, Sandalova T (1999) Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly. *Protein Sci* 8: 2355-2365.
159. Zhang X, Meining W, Cushman M, Haase I, Fischer M, et al. (2003) A structure-based model of the reaction catalyzed by lumazine synthase from *Aquifex aeolicus*. *J Mol Biol* 328: 167-182.
160. Cushman M, Sambaiah T, Jin G, Illarionov B, Fischer M, et al. (2004) Design, synthesis, and evaluation of 9-D-ribitylamino-1,3,7,9-tetrahydro-2,6,8-purinetriones bearing alkyl phosphate and alpha,alpha-difluorophosphonate substituents as inhibitors of riboflavin synthase and lumazine synthase. *J Org Chem* 69: 601-612.
161. Chen J, Illarionov B, Bacher A, Fischer M, Haase I, et al. (2005) A high-throughput screen utilizing the fluorescence of riboflavin for identification of lumazine synthase inhibitors. *Anal Biochem* 338: 124-130.
162. Kaiser J, Illarionov B, Rohdich F, Eisenreich W, Saller S, et al. (2007) A high-throughput screening platform for inhibitors of the riboflavin biosynthesis pathway. *Anal Biochem* 365: 52-61.
163. Talukdar A, Breen M, Bacher A, Illarionov B, Fischer M, et al. (2009) Discovery and development of a small molecule library with lumazine synthase inhibitory activity. *J Org Chem* 74: 5123-5134.
164. Zhao Y, Bacher A, Illarionov B, Fischer M, Georg G, et al. (2009) Discovery and development of the covalent hydrates of trifluoromethylated pyrazoles as riboflavin synthase inhibitors with antibiotic activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Org Chem* 74: 5297-5303.
165. Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 280-300.
166. Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* 42: 413-441.

167. Nakagawa T, Kaku H, Shimoda Y, Sugiyama A, Shimamura M, et al. (2011) From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-Rhizobium symbiosis. *Plant J* 65: 169-180.
168. Prell J, Poole P (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol* 14: 161-168.
169. Deakin WJ, Broughton WJ (2009) Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7: 312-320.
170. Pauly N, Pucciariello C, Mandon K, Innocenti G, Jamet A, et al. (2006) Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-Rhizobium symbiosis. *J Exp Bot* 57: 1769-1776.
171. Minder AC, de Rudder KE, Narberhaus F, Fischer HM, Hennecke H, et al. (2001) Phosphatidylcholine levels in Bradyrhizobium japonicum membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. *Mol Microbiol* 39: 1186-1198.
172. Moris M, Braeken K, Schoeters E, Verreth C, Beullens S, et al. (2005) Effective symbiosis between Rhizobium etli and Phaseolus vulgaris requires the alarmone ppGpp. *J Bacteriol* 187: 5460-5469.
173. Simon R, Priefer U, Pühler A (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* 1: 784 - 791.
174. Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, 2nd, Peterson KM (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16: 800-802.
175. Jacobsson K, Rosander A, Bjerketorp J, Frykberg L (2003) Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. *Biol Proced Online* 5: 123-135.
176. Gerhardt P (1958) The nutrition of brucellae. *Bacteriol Rev* 22: 81-98.
177. Fuller TE, Thacker BJ, Mulks MH (1996) A riboflavin auxotroph of Actinobacillus pleuropneumoniae is attenuated in swine. *Infect Immun* 64: 4659-4664.
178. Wang A (1992) Isolation of vitamin B2 auxotroph and preliminary genetic mapping in Salmonella typhimurium. *Yi Chuan Xue Bao* 19: 362-368.
179. Fuller TE, Thacker BJ, Duran CO, Mulks MH (2000) A genetically-defined riboflavin auxotroph of Actinobacillus pleuropneumoniae as a live attenuated vaccine. *Vaccine* 18: 2867-2877.
180. Abreu-Goodger C, Merino E (2005) RibEx: a web server for locating riboswitches and other conserved bacterial regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 33: W690-692.
181. Taga ME, Larsen NA, Howard-Jones AR, Walsh CT, Walker GC (2007) BluB cannibalizes flavin to form the lower ligand of vitamin B12. *Nature* 446: 449-453.
182. Butland G, Peregrin-Alvarez JM, Li J, Yang W, Yang X, et al. (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in Escherichia coli. *Nature* 433: 531-537.
183. Parrish JR, Yu J, Liu G, Hines JA, Chan JE, et al. (2007) A proteome-wide protein interaction map for Campylobacter jejuni. *Genome Biol* 8: R130.
184. Bacher A, Mailander B (1978) Biosynthesis of riboflavin in Bacillus subtilis: function and genetic control of the riboflavin synthase complex. *J Bacteriol* 134: 476-482.

185. Ladenstein R, Ritsert K, Huber R, Richter G, Bacher A (1994) The lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. X-ray structure analysis of hollow reconstituted beta-subunit capsids. *Eur J Biochem* 223: 1007-1017.
186. Posadas DM (2010) Transporte y adhesión en *Brucella suis*: rol de una proteína de la familia TolC en el eflujo de compuestos tóxicos y de tres posibles adhesinas en la colonización del hospedador [PhD]. Buenos Aires, Argentina: UBA.
187. Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317.
188. Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, Gelfand MS (2004) Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet* 20: 44-50.
189. Garcia-Ramirez JJ, Santos MA, Revuelta JL (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* RIB4 gene codes for 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase involved in riboflavin biosynthesis. Molecular characterization of the gene and purification of the encoded protein. *J Biol Chem* 270: 23801-23807.
190. Mortl S, Fischer M, Richter G, Tack J, Weinkauff S, et al. (1996) Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 271: 33201-33207.
191. Duurkens RH, Tol MB, Geertsma ER, Permentier HP, Slotboom DJ (2007) Flavin binding to the high affinity riboflavin transporter RibU. *J Biol Chem* 282: 10380-10386.
192. Burgess CM, Slotboom DJ, Geertsma ER, Duurkens RH, Poolman B, et al. (2006) The riboflavin transporter RibU in *Lactococcus lactis*: molecular characterization of gene expression and the transport mechanism. *J Bacteriol* 188: 2752-2760.
193. Ferrero MC, Fossati CA, Baldi PC (2009) Smooth *Brucella* strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death. *Microbes Infect* 11: 476-483.
194. Delpino MV, Barrionuevo P, Scian R, Fossati CA, Baldi PC (2010) *Brucella*-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses. *J Hepatol* 53: 145-154.
195. Eze MO, Yuan L, Crawford RM, Paranaivitana CM, Hadfield TL, et al. (2000) Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro. *Infect Immun* 68: 257-263.
196. Arenas GN, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga LS (2000) Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* 68: 4255-4263.
197. Briones G, Inon de Iannino N, Roset M, Vigliocco A, Paulo PS, et al. (2001) *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun* 69: 4528-4535.
198. Elzer PH, Phillips RW, Kovach ME, Peterson KM, Roop RM, 2nd (1994) Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant. *Infect Immun* 62: 4135-4139.
199. Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, et al. (1998) *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 66: 5711-5724.
200. Kahl-McDonagh MM, Ficht TA (2006) Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect Immun* 74: 4048-4057.

201. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, et al. (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* 198: 157-174.
202. Alzogaray V, Danquah W, Aguirre A, Urrutia M, Berguer P, et al. (2011) Single-domain llama antibodies as specific intracellular inhibitors of SpvB, the actin ADP-ribosylating toxin of *Salmonella typhimurium*. *FASEB J* 25: 526-534.
203. Jurado P, Ritz D, Beckwith J, de Lorenzo V, Fernandez LA (2002) Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 320: 1-10.
204. Pankhurst CE (1974) The Flavin Content of Clovers Relative to Symbiosis with a Riboflavin-requiring Mutant of *Rhizobium trifoli*. *Plant Physiol* 53: 198-205.
205. Streit WR, Joseph CM, Phillips DA (1996) Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. *Mol Plant Microbe Interact* 9: 330-338.
206. Shemakhanova NM, Bun'ko IP (1969) [Criteria of activity of bean nodule bacteria]. *Mikrobiologiya* 38: 1070-1074.
207. Arnvig KB, Zeng S, Quan S, Papageorge A, Zhang N, et al. (2008) Evolutionary comparison of ribosomal operon antitermination function. *J Bacteriol* 190: 7251-7257.
208. Kis K, Bacher A (1995) Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 270: 16788-16795.
209. Al Dahouk S, Jubier-Maurin V, Scholz HC, Tomaso H, Karges W, et al. (2008) Quantitative analysis of the intramacrophagic *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to late stage of cellular infection. *Proteomics* 8: 3862-3870.
210. Lamontagne J, Forest A, Marazzo E, Denis F, Butler H, et al. (2009) Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J Proteome Res* 8: 1594-1609.
211. Foraker AB, Khantwal CM, Swaan PW (2003) Current perspectives on the cellular uptake and trafficking of riboflavin. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1467-1483.
212. Moriyon I, Grillo MJ, Monreal D, Gonzalez D, Marin C, et al. (2004) Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res* 35: 1-38.
213. Arenas-Gamboa AM, Ficht TA, Kahl-McDonagh MM, Gomez G, Rice-Ficht AC (2009) The *Brucella abortus* S19 DeltavjbR live vaccine candidate is safer than S19 and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice when delivered in a sustained-release vehicle. *Infect Immun* 77: 877-884.
214. Baldi PC, Wanke MM, Loza ME, Monachesi N, Fossati CA (1997) Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp. *Vet Microbiol* 57: 273-281.
215. Ashour J, Hondalus MK (2003) Phenotypic mutants of the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi* created by in vivo Himar1 transposon mutagenesis. *J Bacteriol* 185: 2644-2652.
216. Lopez AM, Townsend HG, Allen AL, Hondalus MK (2008) Safety and immunogenicity of a live-attenuated auxotrophic candidate vaccine against the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Vaccine* 26: 998-1009.
217. Morgunova E, Meining W, Illarionov B, Haase I, Jin G, et al. (2005) Crystal structure of lumazine synthase from *Mycobacterium tuberculosis* as a target for rational drug

- design: binding mode of a new class of purinetrione inhibitors. *Biochemistry* 44: 2746-2758.
218. Ramsperger A, Augustin M, Schott AK, Gerhardt S, Krojer T, et al. (2006) Crystal structure of an archaeal pentameric riboflavin synthase in complex with a substrate analog inhibitor: stereochemical implications. *J Biol Chem* 281: 1224-1232.
  219. Matiru VN, Dakora FD (2005) The rhizosphere signal molecule lumichrome alters seedling development in both legumes and cereals. *New Phytol* 166: 439-444.
  220. Phillips DA, Joseph CM, Yang GP, Martinez-Romero E, Sanborn JR, et al. (1999) Identification of lumichrome as a sinorhizobium enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12275-12280.
  221. Supanjani S, Habib A, Mabood F, Lee KD, Donnelly D, et al. (2006) Nod factor enhances calcium uptake by soybean. *Plant Physiol Biochem* 44: 866-872.
  222. Matiru VN, Dakora FD (2005) Xylem transport and shoot accumulation of lumichrome, a newly recognized rhizobial signal, alters root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic rates in legumes and cereals. *New Phytol* 165: 847-855.
  223. Rajamani S, Bauer WD, Robinson JB, Farrow JM, 3rd, Pesci EC, et al. (2008) The vitamin riboflavin and its derivative lumichrome activate the LasR bacterial quorum-sensing receptor. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1184-1192.
  224. Yang G, Bhuvaneshwari TV, Joseph CM, King MD, Phillips DA (2002) Roles for riboflavin in the Sinorhizobium-alfalfa association. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 456-462.
  225. Spoonamore JE, Dahlgran AL, Jacobsen NE, Bandarian V (2006) Evolution of new function in the GTP cyclohydrolase II proteins of *Streptomyces coelicolor*. *Biochemistry* 45: 12144-12155.

## Publicaciones

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en los siguientes trabajos:

1. Ainciart N, Zylberman V, Craig P, Nygaard D, Bonomi HR, Cauerhff AA, Goldbaum FA. **“Sensing the Dissociation of a Polymeric Enzyme by Means of an Engineered Intrinsic Probe”**. Proteins. (2010). 79(4):1079-88.
2. Bonomi HR, Marchesini MI, Klinke S, Ugalde JE, Zylberman V, Ugalde RA, Comerci DJ, Goldbaum FA. **“An Atypical Riboflavin Pathway is Essential for Brucella abortus Virulence”**. PLoS One. (2010). 5: e9435.
3. Klinke S, Zylberman V, Bonomi HR, Haase I, Guimaraes BG, Braden BC, Bacher A, Fischer M, Goldbaum FA. **“Structural and Kinetic Properties of Lumazine Synthase Isoenzymes in the Order Rhizobiales”**. J Mol Biol. (2007). 373: 664-680.

## Firmas

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio Inmunología y Microbiología Molecular, en la Fundación Instituto Leloir, bajo la dirección del Dr. Fernando A. Goldbaum.

La misma fue finalizada en diciembre de 2010,

---

Hernán Ruy Bonomi  
Becario

---

Dr. Fernando A. Goldbaum  
Director