

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

REGULACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA VIRULENCIA DE *BRUCELLA*
ABORTUS MEDIANTE EL SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE DOS
COMPONENTES BVRR/BVRS

Tesis sometida a la Consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Doctorado en Ciencias para optar al grado y título de Doctorado
Académico en Ciencias

OLGA LILLIANA RIVAS SOLANO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica
2023

DEDICATORIA

A mi hijo Sebastián, a mi esposo Randall y a mis papás Vilma y Alejandro.
Les agradezco infinitamente su gran amor, paciencia y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Caterina Guzmán Verri, por la oportunidad de realizar este trabajo y crecer a nivel profesional, por su dedicación para guiar mi proyecto de investigación y por todas sus enseñanzas a lo largo de mi formación doctoral.

A los miembros de mi Comité Asesor, Esteban Chaves Olarte y Edgardo Moreno Robles, por la rigurosidad de sus correcciones orientadas a mejorar la calidad científica de esta tesis y sus publicaciones.

A mis compañeros de laboratorio y amigos Nazareth Ruiz Villalobos, Amanda Castillo Zeledón, Pamela Altamirano Silva, Marcela Suárez Esquivel, César Jiménez Rojas y Reinaldo Pereira Reyes; por su amistad, cariño, risas, comilonas, amigos secretos y otras actividades sociales, consejos, apoyo moral y múltiples favores.

Al personal del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional por todo su apoyo, en especial a Elías Barquero Calvo y Lauren Esquivel Arce.

Al personal del Centro de Investigación y Extensión en Enfermedades Tropicales de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica por todo su apoyo, en especial a Carlos Chacón Díaz, Danilo Solano Quesada y Marlen Cordero Serrano.

Al personal del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica; en especial a Fabián Villalta Romero, Kattia Núñez Montero y Olman Gómez Espinoza por su colaboración; a Rossy Guillén Watson y Kattia Núñez Montero por estar anuentes cubrirme en otras labores cuando lo necesité; a Miguel Rojas por sus consejos y por estar pendiente de mi avance; y a mi jefe Carlos Alvarado Ulloa, por su comprensión, empatía y múltiples permisos.

Al personal de la “Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes”, de la “Université de Namur” en Bélgica, por su apoyo durante mi pasantía doctoral; en especial a Xavier De Bolle, por abrirme las puertas de su laboratorio; y a Mathilde Van Der Henst, por su disposición a ayudarme con aspectos logísticos, técnicos y culturales.

A los entes financiadores por su apoyo económico para la realización de esta Tesis: Programa de Becas del Departamento de Gestión del Talento Humano del Instituto Tecnológico de Costa Rica; Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica; Fondo Especial para la Educación Superior del Consejo Nacional de Rectores; y Programa de Innovación y Capital Humano para la Competitividad del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Doctorado en Ciencias de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Doctorado Académico en Ciencias”.

Ph.D. Adrián Pinto Tomás
**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**

Ph.D. Caterina Guzmán Verri
Tutora

Ph.D. Esteban Chaves Olarte
Lector

Ph.D. Edgardo Moreno Robles
Lector

Ph.D. Silvia Molina Castro
**Representante de la Directora del Programa de Posgrado en
Doctorado en Ciencias**

Olga Lilliana Rivas Solano
Sustentante

La presente tesis está basada en los siguientes artículos de investigación original, publicados o aceptados para publicación:

- I. Rivas-Solano, O., Van der Henst, M., Castillo-Zeledón, A., Suárez-Esquivel, M., Muñoz-Vargas, L., Capitan-Barrios, Z., *et al.* (2022). The regulon of *Brucella abortus* two-component system BvrR/BvrS reveals the coordination of metabolic pathways required for intracellular life. *PLOS ONE*,17, e0274397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274397>
- II. Castillo-Zeledón, A., Rivas-Solano, O., Villalta-Romero, F., Gómez-Espinoza, O., Moreno, E., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C. The *Brucella abortus* two-component system response regulator BvrR binds to three DNA regulatory boxes in the upstream region of *omp25*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1241143. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1241143>
- III. Rivas-Solano, O., Núñez-Montero, K., Altamirano-Silva, P., Ruiz-Villalobos, N., Barquero-Calvo, E., Moreno, E., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C. (2023). A *bvrR/bvrS* Non-Polar *Brucella abortus* Mutant Confirms the Role of the Two-Component System BvrR/BvrS in Virulence and Membrane Integrity. *Microorganisms*, 11, 2014-2024. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082014>

Publicaciones adicionales de divulgación:

- I. Rivas-Solano, O. (2015). *Brucella abortus*: patogénesis y regulación génica de la virulencia. *Revista Tecnología en Marcha*, 28(2), 61-73.
- II. Rivas-Solano, O. (2015). Proyecto de investigación básica genera conocimiento sobre virulencia de *Brucella abortus*. *InvestigaTEC*, (22), 21.
- III. Rivas-Solano, O. (2018). Proyecto interdisciplinario de investigación genera conocimiento sobre los mecanismos de adaptación a la vida intracelular de *Brucella abortus*. *InvestigaTEC*, (31), 2.
- IV. Rivas-Solano, O. (2018). Proyecto de investigación genera conocimiento sobre la regulación transcripcional de la virulencia en el patógeno zoonótico *Brucella abortus*. *InvestigaTEC*, (32), 2.
- V. Rivas-Solano, O. (2019). Proyectos interuniversitarios y multidisciplinarios relacionados con el patógeno zoonótico *Brucella abortus* realizados en el CIB. *Tecnología en Marcha*, 32(10), 77-84.

TABLA DE CONTENIDOS

Contenido	Página
Portada	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de aprobación	v
Resumen en español	viii
Abstract	ix
Lista de figuras	x
Lista de cuadros	xi
Lista de abreviaturas	xii
Capítulo I: Introducción	1
Capítulo II: Objetivos y Hipótesis	23
Capítulo III: Metodología	24
Capítulo IV: Resultados	40
Capítulo V: Discusión	100
Capítulo VI: Conclusiones	109
Bibliografía General	110
Anexos	135

RESUMEN EN ESPAÑOL

B. abortus es un patógeno zoonótico intracelular-extracelular facultativo. Su virulencia se relaciona con su capacidad para invadir y replicarse dentro de células hospederas. Estudios previos con mutantes por transposición en los genes *bvrR* y *bvrS* que constituyen el sistema de dos componentes BvrR/BvrS, han demostrado que estas cepas son atenuadas y que BvrR/BvrS regula más de 100 genes relevantes para la virulencia. Sin embargo, no se han reportado mutantes por delección para comparar fenotipos, y confirmar que la atenuación observada se debe directamente a la ausencia de BvrR/BvrS. No se conoce si BvrR/BvrS regula todos esos genes de forma directa, pues algunos de ellos codifican factores de transcripción. Entre los pocos genes cuya expresión se ha demostrado que está regulada positivamente por BvrR/BvrS, destacan: *omp25*, que codifica para una proteína de membrana externa conservada en *Brucella* con funciones estructurales e inmunomoduladoras; y el circuito de virulencia BvrR-VjbR-VirB, que es necesario para el tránsito intracelular, la replicación bacteriana, la salida de la célula hospedera y la infección de nuevas células. Además, en *Brucella*, pocas regiones promotoras han sido estudiadas. En esta tesis, construimos una cepa mutante de *B. abortus* con una doble delección en *bvrR/bvrS* y demostramos que presenta un fenotipo atenuado similar al de las mutantes por transposición, lo que contribuye a validar el papel de BvrR/BvrS en la virulencia. También demostramos *bvrR* y *bvrS* pertenecen a un operón de 16 genes cuya organización transcripcional se encuentra conservada solo en miembros del orden Rhizobiales capaces de transitar entre ambientes extra e intracelulares, lo que respalda la importancia de este operón para la virulencia. Además, estudiamos el regulón de BvrR en condiciones que simulan el ambiente intracelular e identificamos regiones genómicas que se pueden unir a BvrR y que están asociadas a genes diana posiblemente regulados de forma directa por BvrR y con funciones relevantes para la virulencia. Confirmamos unión directa de BvrR corriente arriba los siguientes genes relacionados con la virulencia: *omp25*, *tamA*, *pckA* y *bvrR*, lo que implica autoregulación del operón *bvrR/bvrS*. Reportamos un sitio de unión a BvrR en el promotor del operón *virB*, el cual también es regulado por otros factores de transcripción adicionales. Contrario a lo reportado en *Sinorhizobium meliloti* con ortólogos de BvrR y del regulador transcripcional TetR2, no encontramos interacción directa entre BvrR y *tetR2*, el cual regula la expresión de *vjbR* en *B. abortus* en conjunto con otros factores de transcripción, incluyendo BvrR, lo que podría indicar un evento evolutivo relacionado con virulencia, pues *S. meliloti* es un endosimbionte. Además, caracterizamos la región reguladora de *omp25* como prototipo de región regulada por BvrR y encontramos que presenta tres sitios de unión a BvrR y dos sitios de inicio de la transcripción, lo que sugiere una regulación diferencial en respuesta a condiciones ambientales. En conclusión, nuestros resultados contribuyen a comprender mejor la regulación génica de la virulencia a través de BvrR/BvrS en *B. abortus*.

ABSTRACT

B. abortus is an intracellular extracellular zoonotic pathogen. Its virulence depends on its ability to invade host cells and replicate within them. Previous studies with two transposition mutants in the genes *bvrR* and *bvrS*, both encoding the Two-Component System BvrR/BvrS, revealed attenuation of the mutant strains, and a role of BvrR/BvrS in the regulation of more than 100 virulence-related genes. However, deletion mutants have not been constructed to compare phenotypes, and to confirm that the attenuation is a consequence of the lack of BvrR/BvrS. It is unknown if all these target genes are directly regulated by BvrR/BvrS, because some of them encode other transcriptional regulators. The gene *omp25*, is among the few known positively regulated target genes. It encodes an outer membrane protein conserved in *Brucella* and it has structural and immunomodulatory roles. Other known target genes are *vjbR* and *virB*. The virulence circuit BvrR-VjbR-VirB is necessary for intracellular trafficking, bacterial replication, cell egress and infection of new cells. Moreover, in *Brucella*, few promoter regions have been studied. In this work, we constructed a *B. abortus* mutant strain with a double deletion in the genes *bvrR* and *bvrS*, which is attenuated like both transposition mutants, contributing to establish the role of BvrR/BvrS in virulence. We also demonstrated that *bvrR* and *bvrS* belong to an operon of 16 genes whose transcriptional organization is conserved in Rhizobiales members capable of transiting between extracellular and intracellular environments, which reinforces the relevance of this operon for virulence. Additionally, we studied the regulon of BvrR under conditions mimicking the intracellular environment and we identified genomic regions bound to BvrR and associated to virulence-related target genes possibly regulated directly by BvrR. We confirmed the direct binding of BvrR to the upstream region of the virulence-related genes: *omp25*, *tamA*, *pckA* and *bvrR*, implying autoregulation of the *bvrR/bvrS* operon. We also reported a BvrR binding site on the promoter of the *virB* operon. This operon is also regulated by other transcription factors. Contrary to what has been reported for *Sinorhizobium meliloti*, the transcriptional regulator TetR2 does not interact directly with BvrR. TetR2 regulates *vjbR* expression in *B. abortus* along with other transcription factors, besides BvrR. This could be related to a virulence-related evolutive event because *S. meliloti* is an endosymbiont. Moreover, we also characterized the regulatory region of *omp25*, as a prototype of a region directly regulated by BvrR, and we found three BvrR binding sites within it, suggesting differential regulation in response to environmental conditions. In conclusion, our results contribute to a better understanding of the gene regulation of virulence through BvrR/BvrS in *B. abortus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Esquema del ciclo de <i>B. abortus</i> en bovinos (hospedero de preferencia) y humanos (hospedero accidental) resumido en 10 pasos.	6
Figura 2. Modelo propuesto para el tránsito intracelular de <i>Brucella</i> spp. en macrófagos.	9
Figura 3. Funcionamiento general de los principales mecanismos de regulación transcripcional de los procariotas.	14
Figura 4. Funcionamiento del TCS BvrR/BvrS.	17
Figura 5. Resultado de EMSA entre BvrR-P y una sonda de ADN que corresponde a la región corriente arriba de los genes <i>tetR2</i> y <i>rplL</i> (control negativo).	143

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Especies reconocidas del género <i>Brucella</i> .	1
Cuadro 2. Lista de cepas y plásmidos utilizadas en esta Tesis.	24
Cuadro 3. Genes blanco en común entre los reguladores transcripcionales BvrR, VjbR, CtrA y MucR.	143

LISTA DE ABREVIATURAS

LPS: Lipopolisacárido
T4SS: Sistema de Secreción Tipo IV
RE: Retículo endoplásmico
eBVC: Vacuola endosomal que contiene a *Brucella*
rBVC: Vacuola replicativa que contiene a *Brucella*
aBVC: Vacuola autofágica que contiene a *Brucella*
TCS: Sistema de dos componentes
QS: “Quorum sensing”
OM: membrana externa
OMP: Proteína(s) de membrana externa
ChIP-Seq: Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina
EMSA: Ensayo de Movilidad Electroforética
CTS: Caldo Trypticosa Soya
ATS: Agar Trypticosa Soya
LB: Caldo Luria Bertani
Suc: Sacarosa
Km= kanamicina
Gm= Gentamicina
Amp= ampicilina
Spc: espectinomicina
Cm: Cloranfenicol
UFC: Unidades Formadoras de Colonias
PTS: Sistema de fosfotransferencia
PTS^{Ntr}: PTS relacionado al nitrógeno
TCA: Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

- **Descripción del género *Brucella***

El género *Brucella* (Meyer & Shaw, 1920) está constituido por bacterias cocobacilares, Gram negativas, aerobias, no mótils, no esporuladas y no encapsuladas (Corbel & Brinley-Morgan, 1984). Estas bacterias se comportan como patógenos intracelulares/extracelulares facultativos, causando una enfermedad zoonótica denominada brucelosis (Spink, 1956; Corbel, 2006).

Filogenéticamente, se clasifican en la clase *Alphaproteobacteria*, orden Rhizobiales, junto con patógenos de plantas y mamíferos, simbioses y organismos de vida libre (Moreno *et al.*, 1990; Batut *et al.*, 2004). Esta diversidad de estilos de vida implica que la biología de *Brucella* spp. se ha visto influenciada por una prolongada coevolución con los humanos, promovida principalmente por la domesticación y consumo de productos animales (Moreno, 2014).

El genoma de *Brucella* spp., carece de plásmidos y se compone de dos cromosomas circulares, uno de 2.1 Mb (cromosoma 1) y otro de 1.2 Mb (cromosoma 2) que codifican aproximadamente 3500 genes (Michaux *et al.*, 1993). Los miembros de este género presentan un alto grado de similitud a nivel genético, razón por la cual, durante varias décadas, se propuso que este género estaba constituido por una única especie con múltiples biovariedades. Sin embargo; por razones científicas, epidemiológicas y de bioseguridad; actualmente, se reconocen catorce especies (Cuadro 1) que varían en su preferencia de hospedero y grado de patogenicidad para los humanos, los cuales se consideran hospederos accidentales (Moreno, 2021; Whatmore & Foster, 2021).

Cuadro 1. Especies reconocidas del género *Brucella*.

Especie	Preferencia de hospedero	Patogenicidad para los humanos	Referencias bibliográficas
<i>B. melitensis</i>	Cabras	Alta	Bruce, 1887.
<i>B. abortus</i>	Ganado vacuno	Alta	Bang, 1906.

<i>B. suis</i>	Cerdos	Alta	Huddleson <i>et al.</i> , 1929.
<i>B. ovis</i>	Ovejas	Ninguna	Buddle, 1956.
<i>B. neotomae</i>	Rata del desierto	Alta	Stoenner & Lackman 1957. Suárez-Esquivel <i>et al.</i> , 2017
<i>B. canis</i>	Perros	Moderada	Carmichael & Bruner, 1968.
<i>B. ceti</i>	Cetáceos	Desconocida	Ewalt <i>et al.</i> , 1994. Roos <i>et al.</i> , 1994. Foster <i>et al.</i> , 2007. ²
<i>B. pinnipidialis</i>	Pinípedos	Desconocida	Roos <i>et al.</i> , 1994. Foster <i>et al.</i> , 2007.
<i>B. microti</i>	Zorros y roedores ¹	Desconocida	Scholz <i>et al.</i> , 2008.
<i>B. innopinata</i>	Ranas	Alta	De <i>et al.</i> , 2008. Tiller <i>et al.</i> , 2010. Scholz <i>et al.</i> , 2023
<i>B. papionis</i>	Babuinos	Desconocida ²	Schlabritz-Loutsevitch <i>et al.</i> , 2009. Whatmore <i>et al.</i> 2014. García-Méndez <i>et al.</i> , 2019.
<i>B. vulpis</i>	Zorro rojo de Australia	Desconocida	Hofer <i>et al.</i> , 2012. Scholz <i>et al.</i> , 2016.
<i>B. amazoniensis</i>	Desconocida	Alta	About <i>et al.</i> , 2023

<i>B. nosferati</i>	Murciélagos	Desconocida	Hernández-Mora <i>et al.</i> , 2023
----------------------------	-------------	-------------	-------------------------------------

¹: *B. microti* también se ha aislado del suelo; ²: *B. papionis* puede infectar trofoblastos humanos *in vitro*. **Fuente:** Adaptado de Banai & Corbel (2010); Godfroid, *et al.* (2011); Moreno (2021) y Whatmore & Foster (2021).

Algunas especies descritas en el cuadro 1 aún no han sido formalmente aceptadas por el Subcomité de Taxonomía de *Brucella*. Adicionalmente a lo descrito en el cuadro 1, existen otras especies que también esperan reconocimiento como tales y que se han aislado de una gran variedad de animales, incluyendo roedores, ranas, reptiles y peces (Moreno, 2021; Whatmore & Foster, 2021).

Las especies del género *Brucella* con capacidad de infectar mamíferos terrestres, incluyendo humanos, generalmente se conocen como clásicas por ser las primeras que se describieron (Banai & Corbel, 2010). También pueden clasificarse en lisas o rugosas, respectivamente en función de la presencia o ausencia del antígeno O en el lipopolisacárido (LPS) de su membrana externa (OM), cuya relación con la virulencia se describirá más adelante (Bowden *et al.*, 1993; Moriyón & López-Goñi, 1998; Banai & Corbel, 2010).

- **Características de la brucelosis**

La brucelosis es una enfermedad endémica en países del Mediterráneo, Norte y Este de África, Medio Oriente, Asia, Centro y Suramérica (Corbel, 2006). La Organización Mundial de la Salud considera a la brucelosis como una de las siete zoonosis más extendidas a nivel mundial y menos priorizada por los sistemas de salud (http://www.who.int/zoonoses/neglected_zoonotic_diseases/en/index.html).

Brucella afecta una gran variedad de animales, tanto domésticos, como de producción y de vida silvestre. En mamíferos terrestres, presenta tropismo por el sistema reproductor. En los machos, la infección puede ocasionar epididimitis, orquitis o atrofia testicular; mientras que las hembras infectadas desarrollan abortos, retención de placenta, infertilidad y disminución en la producción de leche (Songer & Post, 2005). En placentas de ruminantes, la replicación bacteriana intracelular destruye los trofoblastos y las bacterias se diseminan a los tejidos y fluidos

cercanos, causando la pérdida prematura del feto en gestación. En las regiones afectadas, la brucelosis causa importantes pérdidas económicas (Moreno, 2002; Moreno, 2014). La transmisión de animal a animal se da generalmente por ingestión de material contaminado después del aborto, ya que las bacterias son eliminadas a través del feto, las membranas fetales y las secreciones uterinas. También se ha descrito transmisión sexual (Corbel, 2006). De esta manera se reanuda el ciclo de infección, replicación intracelular y muerte de la célula hospedera (Anderson *et al.*, 1986a; Anderson *et al.*, 1986b).

En mamíferos marinos, los síntomas de la brucelosis incluyen placentitis, abortos, mortalidad neonatal, abscesos, meningoencefalitis, meningitis y neurobrucelosis. El análisis *post mortem* de animales infectados ha revelado fibrosis, daño vascular, infiltrados inflamatorios con linfocitos y macrófagos, congestión pulmonar y edema, así como erosiones gástricas (CFSPH & IICAB, 2009; Hernández-Mora *et al.*, 2008).

La brucelosis humana se caracteriza por síntomas inespecíficos como malestar, anorexia y postración. En ausencia de tratamiento, estos síntomas pueden persistir por semanas o meses. Algunos signos reportados son fiebre intermitente, engrosamiento del hígado, bazo o nódulos linfáticos (Corbel, 2006). La diseminación y multiplicación de *Brucella* en los nódulos linfáticos, bazo, hígado, médula ósea y órganos sexuales ocurre, principal pero no exclusivamente, por medio de los macrófagos (Ko & Splitter, 2003). La infección puede tornarse crónica y presentar complicaciones osteoarticulares, gastrointestinales, hepatobiliares, pulmonares, genitourinarias, cardiovasculares y neurológicas, entre otras consecuencias potencialmente mortales (Corbel, 2006). Las vías de transmisión al ser humano incluyen la ingestión de productos lácteos no pasteurizados, el contacto directo con animales infectados y la inhalación de aerosoles bacterianos (Godfroid *et al.*, 2005). El costo del tratamiento en humanos implica una inversión sostenida por parte de los sistemas de salud, ya que consiste en una terapia combinada de varios antibióticos durante periodos desde tres hasta ocho semanas (Akova *et al.*, 1993; Ariza *et al.*, 1985; FAO & WHO, 1986).

- **Patogénesis y ciclo de vida intracelular de *Brucella***

En una gran parte de los patógenos bacterianos conocidos se han descrito factores de virulencia considerados como clásicos, por ejemplo: cápsulas, fimbrias y exotoxinas, entre otros. Sin embargo, la mayoría de estos factores no se han encontrado en *Brucella*. La virulencia de esta bacteria pareciera estar determinada por su habilidad para internalizarse, sobrevivir y replicarse dentro de los fagocitos profesionales y no profesionales de una gran variedad de hospederos, ya sea preferidos o accidentales (Moreno & Moriyón, 2002; Moreno & Gorvel, 2004).

Una vez que *Brucella* penetra sus células hospederas, lleva a cabo un complejo tránsito intracelular compuesto por varias etapas secuenciales, durante las cuales transita en los compartimentos de las vías endocítica, secretora y autofágica de las células hospederas, logrando modificar y explotar dichos compartimentos al liberar moléculas efectoras por medio del sistema de secreción tipo IV (T4SS) VirB, el cual se describirá más adelante. Los efectores liberados modulan las funciones y la maquinaria del hospedero, primeramente, para convertir la vacuola endosomal que contiene a la bacteria en un compartimento derivado del retículo endoplásmico (RE) que permite la replicación bacteriana, y posteriormente, en una vacuola autofágica que permite la salida de la célula hospedera para colonizar nuevas células (Celli, 2019).

B. abortus usualmente ingresa al hospedero a través de las mucosas (Figura 1). Posteriormente atraviesa la submucosa y coloniza los ganglios linfáticos cercanos, a partir de los cuales puede diseminarse sistémicamente, mediante fagocitos, hacia otros órganos, para establecer una infección crónica (Enright, 1990; Moreno y Barquero, 2020).

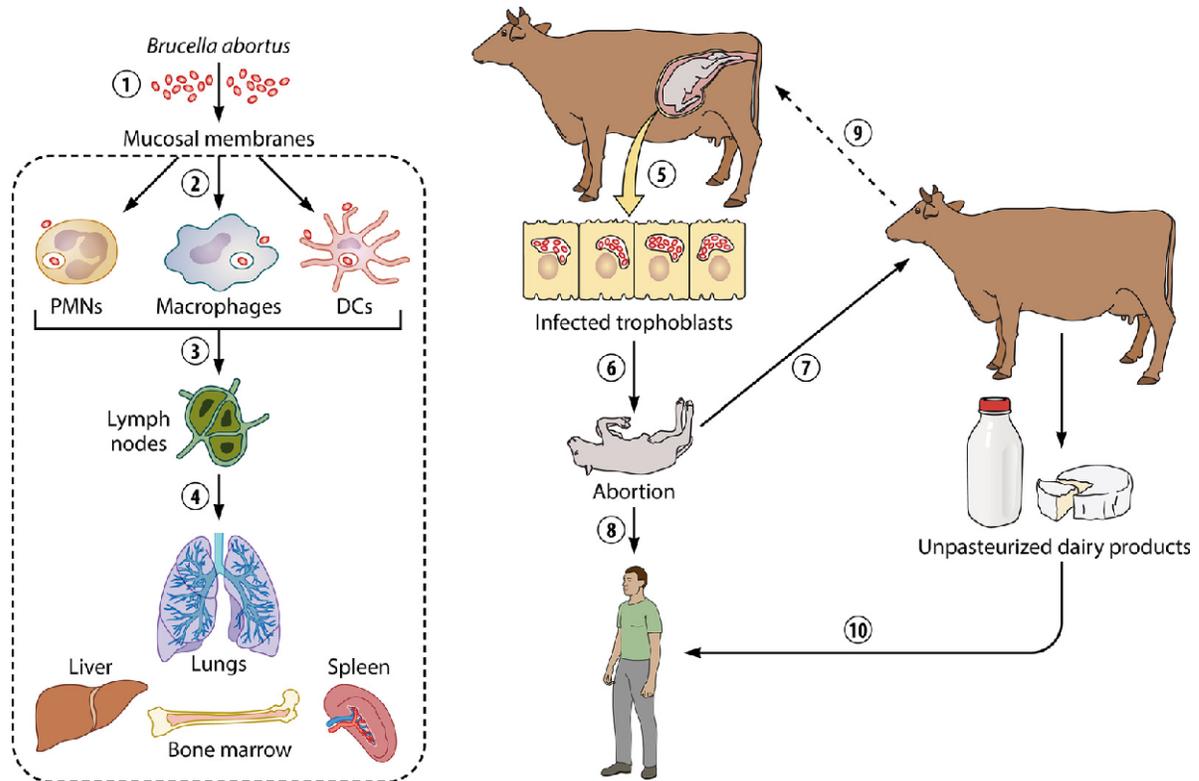


Figura 1. Esquema del ciclo de *B. abortus* en bovinos (hospedero de preferencia) y humanos (hospedero accidental) resumido en 10 pasos (Tomado de Moreno y Barquero, 2020). Paso 1: *B. abortus* usualmente ingresa al hospedero a través de las mucosas. Paso 2: Posteriormente, fagocitos profesionales como los macrófagos, células dendríticas (CD) y leucocitos polimorfonucleares (PMNs) ingieren la bacteria. Paso 3: A través de los fagocitos, la bacteria se desplaza hacia los ganglios linfáticos cercanos. Paso 4: A través del sistema retículo endotelial, la bacteria se disemina hacia otros órganos, como los pulmones, bazo, hígado y médula ósea. Paso 5: En animales preñados, *B. abortus* invade y se replica dentro de los trofoblastos de la placenta, causando placentitis. Paso 6: En el último trimestre de gestación, la replicación bacteriana dentro de los trofoblastos ocasiona abortos. Pasos 7 y 8: El feto abortado se convierte en una fuente de infección para otros animales y humanos. Paso 9: El ciclo abortivo continúa si el nuevo animal infectado está preñado (línea discontinua). Si la hembra no está preñada este paso no ocurre. Paso 10: Los humanos pueden infectarse por contacto directo con las

secreciones de los animales enfermos o por la ingesta de productos lácteos no pasteurizados y/o contaminados.

- **Mecanismos de invasión de la célula hospedera**

Brucella emplea distintas estrategias para entrar a sus células hospederas. En macrófagos, la cadena O del lipopolisacárido (LPS) liso de las bacterias no opsonizadas interactúa con moléculas receptoras ubicadas en la membrana, como FcR, C3bR, MannoR y fibronectina, entre otros. *Brucella* también puede ser ingerida por medio de balsas lipídicas o mediante un mecanismo de fagocitosis tipo “zipper”, el cual se caracteriza por la inducción de rearrreglos moderados en la membrana y el citoesqueleto de la célula hospedera, aunque no se da un reclutamiento extensivo de actina (Porte *et al.*, 2003; Moreno & Gorvel, 2004). Los macrófagos también pueden ingerir brucelas opsonizadas a través de receptores de Fc, de complemento o de fibronectina (Moreno & Gorvel, 2004).

En células intestinales M y epiteliales, también se ha constatado el ingreso de *Brucella* por medio del mecanismo tipo “zipper”. En células HeLa, *Brucella* se une a receptores en la membrana y penetra por fagocitosis con reclutamiento moderado de actina y activación de GTPasas pequeñas como Cdc42, Rac y Rho. La bacteria se une en mayor cantidad y se internaliza más eficientemente cuando las células HeLa se tratan con el factor citotóxico necrotizante (CNF), el cual induce la formación de pliegues y fibras de estrés en la membrana de la célula hospedera (Guzmán-Verri *et al.*, 2001).

Generalmente, los fagocitos profesionales logran internalizar un alto número de bacterias debido a su naturaleza fagocítica. Sin embargo, la eficiencia de internalización en fagocitos no profesionales suele ser baja, lo que sugiere que no todas las células son permisivas, o bien que no todas las bacterias son capaces de unirse a fagocitos no profesionales (Celli *et al.*, 2003).

- **Tránsito intracelular y salida de la célula hospedera**

Una vez que *Brucella* se internaliza en la célula hospedera, logra escapar la vía endocítica y se localiza en un compartimento endosomal no replicativo denominado eBVC (vacuola endosomal que contiene a *Brucella*), el cual interactúa brevemente con los lisosomas, pero escapa de ellos y se transforma en una vacuola

con pH ácido (Celli *et al.*, 2003). Es decir, tanto en macrófagos como en células epiteliales, *Brucella* inhibe o retrasa la fusión de fagosomas y lisosomas, que es una de las características de la vía endocítica (Ko & Splitter, 2003).

Posteriormente, la eBCV interactúa prolongadamente con el RE e inclusive se fusiona de forma limitada con esta organela, lo cual conlleva a la adquisición de algunas de sus propiedades, como por ejemplo el pH neutro. Así, la eBCV se transforma en una organela derivada del RE que permite la replicación bacteriana (Celli *et al.*, 2003). Esta vacuola se denomina rBCV (vacuola replicativa que contiene a *Brucella*). Cabe recalcar que, en macrófagos, la mayoría de las bacterias ingeridas son dirigidas a los fagolisosomas y solamente muy pocas logran alcanzar el RE que es su nicho replicativo. Por el contrario, en células epiteliales, la mayoría de las bacterias ingeridas son dirigidas al RE y en menor proporción a los lisosomas (Moreno & Gorvel, 2004). Sin embargo, independientemente del tipo de fagocito, una vez que la bacteria se encuentra dentro de la rBCV, permanece protegida de antibióticos y factores bactericidas del hospedero como el complemento y los anticuerpos, lo cual facilita el establecimiento de una infección crónica (Roop *et al.*, 2009).

Luego de la replicación de la bacteria, la rBCV se convierte en un compartimento con características autofágicas abreviado como aBCV (vacuola autofágica que contiene a *Brucella*). La formación de la aBCV requiere algunas proteínas que están implicadas en el inicio de la autofagia, pero es independiente de proteínas asociadas a la elongación. La aBCV es necesaria para completar el ciclo intracelular de *Brucella* y para la salida de la célula y la diseminación hacia nuevas células, lo que demuestra que esta bacteria es capaz de apropiarse selectivamente de los complejos de iniciación de la autofagia para tomar control de la célula hospedera y promover la infección (Starr *et al.*, 2012). *Brucella* también logra reconocer algunas señales de estrés (acídico o nutricional) a nivel intracelular para regular su propia expresión génica e incluso modificar algunas funciones de los fagocitos profesionales. Por ejemplo, puede inducir resistencia a la apoptosis en macrófagos, así como inhibir la capacidad de presentación de antígenos de las células dendríticas (Roop *et al.*, 2009). En la Figura 2 se ilustran los eventos

celulares y moleculares asociados al tránsito intracelular de *Brucella* spp. en macrófagos (Celli, 2019).

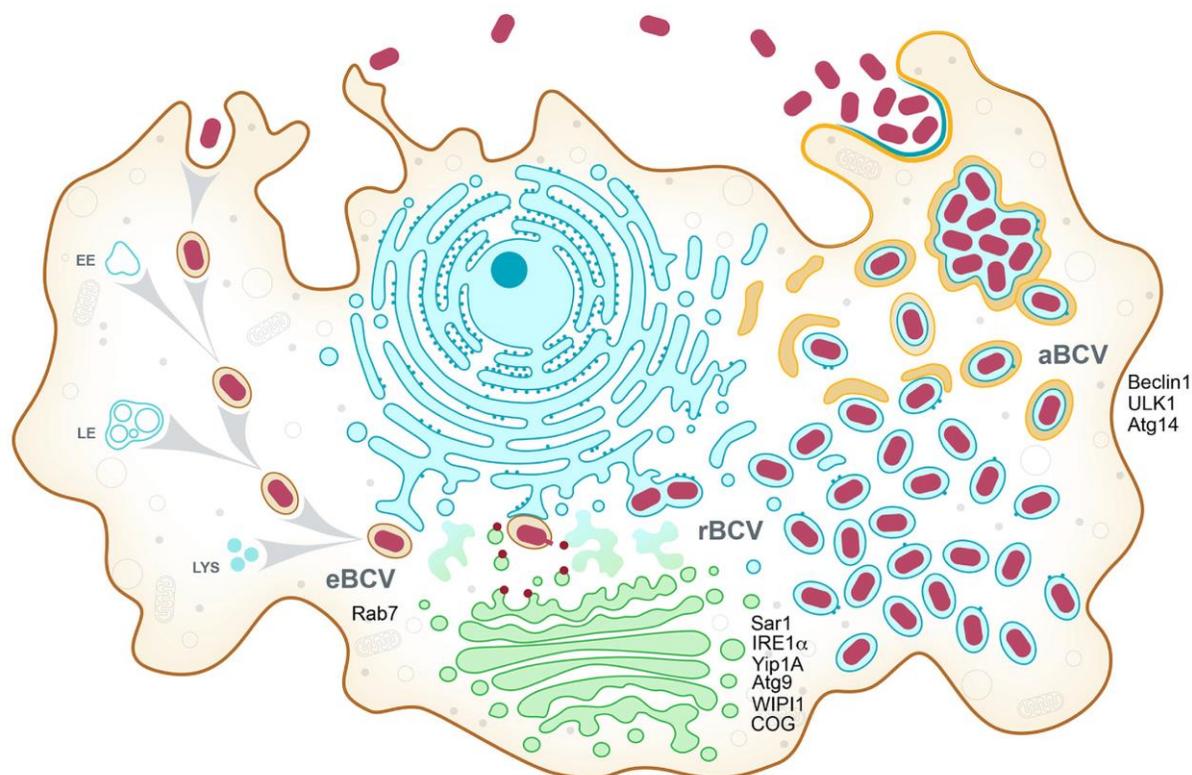


Figura 2. Modelo propuesto para el tránsito intracelular de *Brucella* spp. en macrófagos (Tomado de Celli, 2019). Una vez que los macrófagos ingieren a la bacteria por fagocitosis, ésta reside durante las primeras 8-12 h post-infección dentro de una vacuola unida a la membrana. Esta vacuola experimenta un proceso de maduración endosomal, mediante interacciones secuenciales con los endosomas tempranos (EE), los endomas tardíos (LE) y los lisosomas (LYS), pero logra escapar de la fusión con los lisosomas, convirtiéndose en un compartimento acidificado denominado eBCV. La pequeña GTPasa del hospedero Rab7 contribuye a la maduración de la eBCV. Las condiciones físico-químicas de este compartimento promueven la expresión del T4SS VirB, el cual trasloca proteínas efectoras (rojo) que median las interacciones de la eBCV con el sitio de salida del RE, así como la adquisición de membranas derivadas del RE y el aparato de Golgi. Estos eventos conllevan a la biogénesis de la vacuola rBCV, que permite la replicación bacteriana. Las proteínas del hospedero Sar1, IRE1α, Yip1A, Atg9, WIP11 y el complejo COG,

contribuyen a la biogénesis de la rBCV. Entre las 12 y 48 h post-infección, ocurre la replicación bacteriana dentro de la rBCV. Posteriormente, la rBCV es capturada dentro de estructuras similares a autofagosomas, de forma dependiente del T4SS VirB y se convierte en la vacuola autofágica aBCV. La formación de ésta última requiere de las proteínas autofágicas del hospedero beclin1, ULK1 y Atg14. La aBCV presenta características de autolisosoma y es necesaria para que la bacteria pueda salir de la célula hospedera e infectar nuevas células.

- **Determinantes bacterianos asociados a la virulencia de *Brucella***

En *Brucella* las OMPs se clasifican en tres grupos de acuerdo con su peso molecular. El denominado Omp 1 está constituido por OMP de 88-94 kDa. El Omp 2 está integrado por porinas de 36-38 kDa. Por último, el grupo Omp 3, también conocido como familia Omp25/Omp31, incluye ocho proteínas cuyas secuencias génicas se encuentran altamente conservadas en alfaproteobacterias como *Rhizobium*, *Bartonella* y *Agrobacterium*. Estas proteínas están implicadas en la interacción hospedero-patógeno (Vízcaíno & Cloeckart, 2012) y su expresión se encuentra regulada por ortólogos del TCS BvrR/BvrS. Dentro de esta familia, se consideran más relevantes las OMP de 25-27 kDa y las de 31-34 kDa, que están codificadas respectivamente por los genes *omp25* y *omp31*. En *B. abortus*, Omp25 tiene un papel estructural en la unión al peptidoglicano (Godessart *et al.*, 2021) y se ha propuesto que también interactúa con la proteína SLAMF1 presente en la superficie de células dendríticas, inhibiendo su maduración y capacidad de producir citoquinas inflamatorias, lo cual contribuye a la persistencia bacteriana (Degos *et al.*, 2020).

Otro determinante bacteriano relacionado con la interacción hospedero-patógeno, son las adhesinas autotransportadoras que facilitan la unión a las mucosas del hospedero durante la etapa inicial de la infección bacteriana. Mutantes en las adhesinas autotransportadoras denominadas OmaA, BmaC, BtaE, BtaFy BigA presentan una unión reducida a células epiteliales (Roop *et al.*, 2021). En particular, BtaE puede unirse al ácido hialurónico de las mucosas del hospedero y presenta una localización polar en la célula bacteriana, específicamente en el nuevo polo que se forma luego de la división celular (Roop *et al.*, 2021). Esta observación

en conjunto con el hecho de que *Brucella* realiza un arresto del ciclo celular en la fase G1 durante las primeras 4-6 post-infección mientras se encuentra dentro de la eBCV (Deghelt *et al.*, 2014), sugiere que BtaE podría contribuir a formar un polo adhesivo (Roop *et al.*, 2021).

En *Brucella*, así como en otras alfaproteobacterias, se ha descrito el T4SS VirB (Delrue *et al.*, 2001). Como se mencionó, *Brucella* utiliza este sistema para la traslocación de efectores de virulencia a la célula hospedera que le permiten a la bacteria escapar de la vía endocítica y transitar hacia su nicho replicativo (Backert & Meyer, 2006). Los mutantes para el T4SS VirB no pueden controlar las interacciones de la eBCV con el RE y permanecen en compartimentos inmaduros que eventualmente se fusionan con los lisosomas. Por lo tanto, el T4SS VirB es esencial para el establecimiento de un nicho intracelular seguro que posibilite la sobrevivencia a largo plazo de la bacteria (Celli *et al.*, 2003). Además, la expresión del T4SS VirB se activa nuevamente cuando la bacteria pasa de la rBCV a la aBCV, por lo que se ha postulado que también participa en el proceso de salida de la célula hospedera (Altamirano-Silva *et al.*, 2021).

El LPS de *Brucella* presenta particularidades que contribuyen a la sobrevivencia intracelular, entre ellas, una baja actividad biológica ya que no induce signos de sepsis, fase de respuesta aguda, reclutamiento de neutrófilos ni producción significativa de citoquinas. El LPS de *Brucella* confiere resistencia a péptidos catiónicos bactericidas producidos por el hospedero y no activa la vía alterna del complemento (Moreno & Moriyón, 2002; Ko & Splitter, 2003; Roop *et al.*, 2009). Generalmente la inmunidad innata reconoce los patrones moleculares asociados a patógenos ubicados en la envoltura celular (Janeway *et al.*, 2002). Pero, en el caso del LPS de *Brucella*, se requieren grandes cantidades para activar la señalización a través del receptor tipo Toll 4 (Lapaque *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 1981; Rasool *et al.*, 1992). Por lo tanto, mediante cambios en los PAMPs, *Brucella* ha logrado desarrollar una estrategia sigilosa que le permite alcanzar su nicho replicativo antes de la activación de mecanismos antimicrobianos de inmunidad innata (Barquero-Calvo *et al.*, 2007).

En *S. meliloti*, el gen *bacA*, codifica un transportador ABC que importa pequeños péptidos ricos en cisteína desde la planta hacia su citoplasma, con el fin de que estos péptidos no dañen la membrana celular. Además, estos péptidos contribuyen a la diferenciación de la célula vegetativa en un bacteroide fijador de nitrógeno (Roop *et al.*, 2021). Los mutantes de *B. abortus* en *bacA* son atenuados y tienen niveles reducidos de ácidos grasos de cadena muy larga en su lípido A, induciendo respuestas inflamatorias más fuertes en ratones que la cepa parental, lo que probablemente explica su atenuación (Roop *et al.*, 2021). Se cree que BacA también puede proteger a las cepas de *Brucella* de los péptidos antimicrobianos que encuentran durante sus interacciones con fagocitos hospedadores de manera similar a la función desempeñada por su ortólogo en *S. meliloti* (Roop *et al.*, 2021).

Otro determinante bacteriano relacionado con la modulación de la respuesta inmune del hospedero, es un polímero cíclico ubicado en el espacio periplásmico, compuesto por entre 17 y 20 residuos de glucosa y conocido como β -1,2-glucano cíclico, el cual, en macrófagos, contribuye a prevenir la fusión con los lisosomas y a la cronicidad de la infección (Roop *et al.*, 2021).

La mayoría de las cepas de *Brucella* presenta la capacidad genética de producir flagelos, pero carecen de genes de quimiotaxis y solo algunas cepas utilizan los flagelos para la función de movilidad. Las cepas de *B. melitensis* con mutaciones en los genes flagelares *fliF* y *flgF* son atenuadas en ratones y cabras preñadas, lo que sugiere que podrían desempeñar un papel en virulencia. Se cree que los flagelos podrían contribuir a la virulencia mediante la modulación de la respuesta inmune del hospedero, ya que la flagelina de *Brucella* no es reconocida por el receptor tipo Toll 5, lo que contribuye a la estrategia patogénica. Además, una vez dentro del citoplasma del hospedero, estimula una respuesta inflamatoria que facilita el establecimiento de infecciones crónicas (Roop *et al.*, 2021).

Por último, se ha postulado que ciertas adaptaciones fisiológicas al ambiente intracelular tienen relación con la virulencia, entre ellas, los ajustes en metabolismo del carbono y el nitrógeno para aprovechar las fuentes disponibles en el ambiente intracelular (Ronneau *et al.*, 2016; Barbier *et al.*, 2018). De acuerdo con Barbier y colaboradores (2011), el éxito en la adaptación de *Brucella* al ambiente intracelular

radica en su capacidad para ajustar su metabolismo de forma muy controlada, ya que esto le permite utilizar los nutrientes específicos que están disponibles en cada nicho por donde transita durante su ciclo de vida. Para su metabolismo central, *B. abortus* utiliza de preferencia azúcares de cuatro carbonos como el eritritol, el cual es catabolizado a triosa fosfato. Las hexosas por su parte pueden ser catabolizadas a través de la vía de las pentosas-fosfato; por medio de una vía glucolítica Embden-Meyerhof-Parnas incompleta, ya que *Brucella* carece de la enzima fosfofructoquinasa, y mediante el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). Las vías de Entner–Doudoroff y el ciclo del glioxilato también parecieran ser potencialmente funcionales. Se cree que varios sistemas de transporte y degradación de carbohidratos son necesarios para la sobrevivencia intracelular de *Brucella*. Por otra parte, los transportadores para la captación de aminoácidos y péptidos también parecen ser necesarios durante la infección. Estos hallazgos sugieren que la bacteria podría utilizar carbohidratos, pero también aminoácidos y péptidos como fuentes de energía y/o carbono durante su ciclo infeccioso (Barbier *et al.*, 2011).

- **Regulación de la expresión de genes implicados en la virulencia**

Generalmente las bacterias están expuestas a condiciones ambientales cambiantes y para poder adaptarse deben ajustar sus patrones de expresión génica. Los genes bacterianos están organizados como operones, que son un conjunto de genes que se encuentran bajo el control de un mismo promotor, por lo que su transcripción puede ser apagada o encendida de manera simultánea para dar una respuesta rápida a los cambios ambientales (Ralston, 2008). Los procariontes emplean distintos mecanismos para regular la expresión de sus genes. A nivel transcripcional (Figura 3), destacan los sistemas de transducción de señales de dos componentes (TCS) y el “*quorum sensing*” (QS), entre otros.

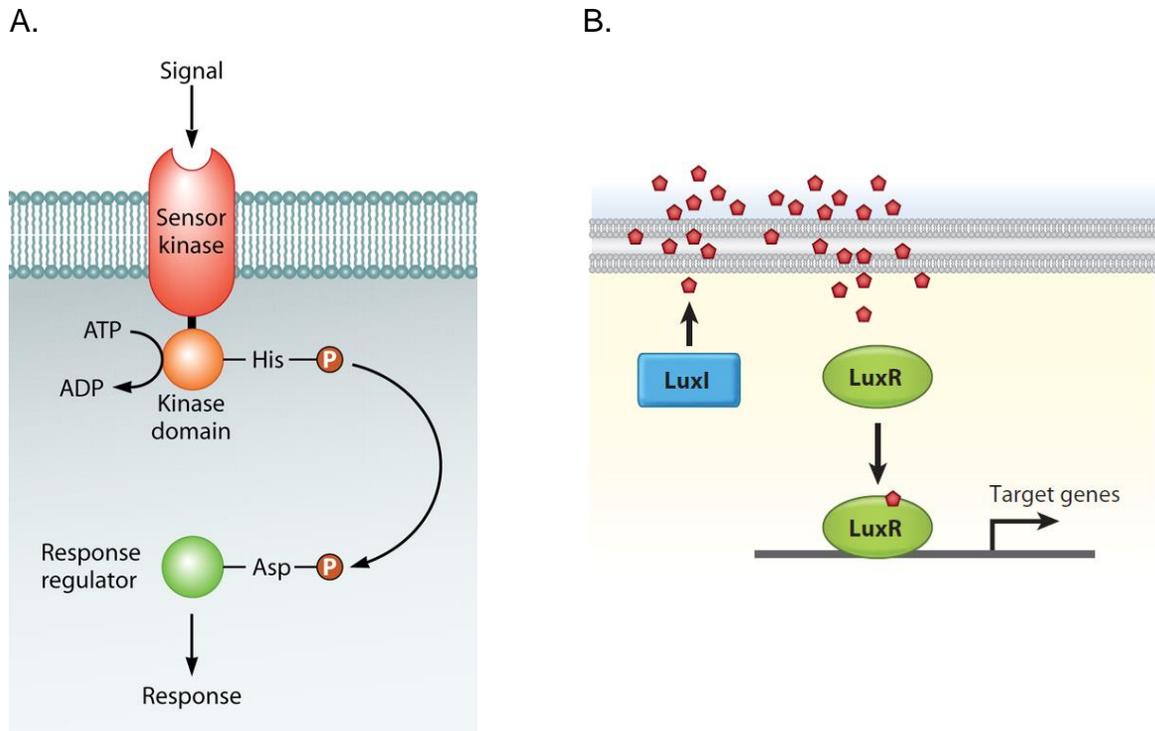


Figura 3. Funcionamiento general de los principales mecanismos de regulación transcripcional de los procariotas (Tomado de Bretl *et al.*, 2011; Ng & Bassler, 2009). A. En general, los TCS comprenden una proteína integral de membrana con actividad histidina quinasa que constituye el componente sensor y una proteína citoplasmática separada conocida como componente regulador. La proteína sensora tiene dos dominios, uno extracelular que reconoce señales externas y otro citoplasmático que transduce la señal al interior celular. Cuando una señal es reconocida por el dominio extracelular del componente sensor, se produce un cambio conformacional en el mismo, lo cual desencadena una autofosforilación del dominio citoplasmático en un residuo conservado de histidina. El sensor fosforilado interactúa con su proteína contraparte reguladora, estimulando la fosforilación de residuos de aspartato en su dominio receptor. Éste, una vez fosforilado, puede unirse al ADN mediante su dominio efector regulando la transcripción de genes blanco (Dale & Park, 2004). B. En general, el QS es un mecanismo de comunicación celular para sincronizar la expresión génica en una población bacteriana. Consiste en la liberación al medio externo de pequeñas moléculas autoinducidas. Conforme aumenta la densidad poblacional, aumenta la

concentración extracelular del autoinductor hasta alcanzar un umbral determinado. En este punto la molécula señal es reconocida por receptores y como consecuencia, se activan o reprimen factores de transcripción citoplasmáticos que regulan la expresión génica de forma coordinada en la población bacteriana (Bassler, 1999).

Se estima que en *Brucella* podrían existir alrededor de quince TCS (Lavín *et al.*, 2010). Uno de los más caracterizados es BvrR/BvrS, ("*Brucella virulence-related*"). Dicho sistema está constituido por BvrS que es el componente sensor localizado en la membrana celular y por BvrR que es un factor de transcripción citoplasmático (López-Goñi *et al.*, 2004). Sola-Landa *et al.* (1998) generaron y caracterizaron dos cepas mutantes de *B. abortus*, una para *bvrR* y otra para *bvrS*. Ambas mutantes se obtuvieron mediante la inserción de un transposón que interrumpió el marco de lectura de cada gen, seguida de una selección por sensibilidad a Polimixina B. Estas mutantes también son sensibles a otros péptidos bactericidas y presentan mayor permeabilidad a surfactantes, en comparación con la cepa silvestre. Además, muestran una invasión celular reducida, tráfico intracelular deficiente y ausencia de virulencia en ratones (Guzman-Verri *et al.*, 2002; Sola-Landa *et al.*, 1998). Al tratar células HeLa con CNF para promover la internalización y, posteriormente, infectarlas con la cepa mutante en *bvrS*, se observa, luego de 24 h de internalización, que las células bacterianas pierden integridad y sólo se distinguen restos celulares, es decir que las bacterias con mutaciones en este sistema no logran alcanzar su nicho replicativo (Chaves-Olarte *et al.*, 2002). Estas mutantes han sido utilizadas en varios estudios previos sobre el papel del TCS BvrR/BvrS en la virulencia de *B. abortus*, determinándose que este sistema regula la estructura del LPS, la expresión de proteínas periplásmicas y de proteínas de la familia Omp 3, también conocida como Omp25/Omp31 (Viadas *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009, Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Manterola *et al.*, 2007). En un análisis proteómico de fragmentos de membrana externa liberados espontáneamente por las mutantes en el TCS BvrR/BvrS en comparación con la cepa parental, se identificaron 60 proteínas de espacio periplásmico y 25 OMP diferencialmente expresadas, entre ellas cinco de la familia Omp 3, cuya expresión estaba disminuida (Lamontagne *et al.*, 2007). Esta observación, también fue

respaldada por un estudio de transcriptómica que analizó la expresión génica en las mutantes por transposición, en comparación con la cepa parental, encontrando una expresión diferencial de 127 genes, entre ellos genes involucrados en la biogénesis de la envoltura celular y la membrana externa como *omp25a* y *omp25d*, lipoproteínas, biosíntesis de LPS y ácidos grasos, proteínas de respuesta al estrés, chaperonas y genes flagelares (Viadas *et al.*, 2010). Además, se evidenció la expresión diferencial de genes que codifican transportadores ABC, genes relacionados con virulencia, metabolismo del carbono (como *pckA*) y desnitrificación, así como genes que codifican otros reguladores transcripcionales como VjbR, ExoR y OmpR (Viadas *et al.*, 2010; figura 4). Con base en los estudios de proteómica y transcriptómica de Lamontagne *et al.* (2007) y Viadas *et al.* (2010), respectivamente, se propone que el TCS BvrR/BvrS permite a la bacteria ajustar su envoltura celular y su metabolismo para adaptarse a los cambios ambientales que ocurren durante el tránsito intracelular y sugieren que la virulencia de *Brucella* no se puede atribuir a moléculas individuales, sino que debe ser entendida como un fenómeno multifactorial en el cual participan de forma coordinada muchos elementos discretos (Lamontagne *et al.*, 2007; Viadas *et al.*, 2010).

Como se indicó, el TCS BvrR/BvrS ejerce un control transcripcional sobre la expresión del operón *virB* (Martínez-Núñez *et al.*, 2010). El TCS BvrR/BvrS también afecta positivamente la transcripción de un regulador transcripcional de tipo QS similar a LuxR denominado VjbR (“*Vacuolar Jacking Brucella Regulator*”) (Martínez-Núñez *et al.*, 2010). Estudios previos han demostrado que, al ingresar a las células hospederas, la proteína reguladora BvrR se activa por fosforilación (BvrR-P) en el aspartato 58. Esta activación ocurre en respuesta a señales intracelulares encontradas en compartimentos tempranos, como pH ácido y escasez de nutrientes. La fosforilación de BvrR conlleva a un aumento en la expresión de VjbR y VirB. Se ha observado que la transcripción del operón *virB* inicia cuando la BCV se acidifica. A las 5 h post infección alcanza una expresión máxima pero luego la transcripción es rápidamente reprimida (Sieira *et al.* 2004). La activación *in vitro* del circuito de virulencia BvrR-P/VjbR/VirB rescata a *B. abortus* de la inhibición de la replicación intracelular inducida por el tratamiento de las células con bafilomicina,

demonstrando la relevancia de este mecanismo para la supervivencia y replicación bacteriana intracelular. Se propone que *B. abortus* percibe la transición del entorno extracelular al intracelular a través del TCS BvrR/BvrS, permitiendo que la bacteria transite de forma segura hacia su nicho replicativo. Este circuito se activa al inicio de la infección (0-6 h post-infección) para permitir el tránsito intracelular de la eBCV hacia la rBCV, así como también al final de la infección (48 h post-infección) para propiciar la salida de la célula hospedera y el comienzo de un nuevo ciclo infeccioso (Altamirano-Silva *et al.*, 2018).

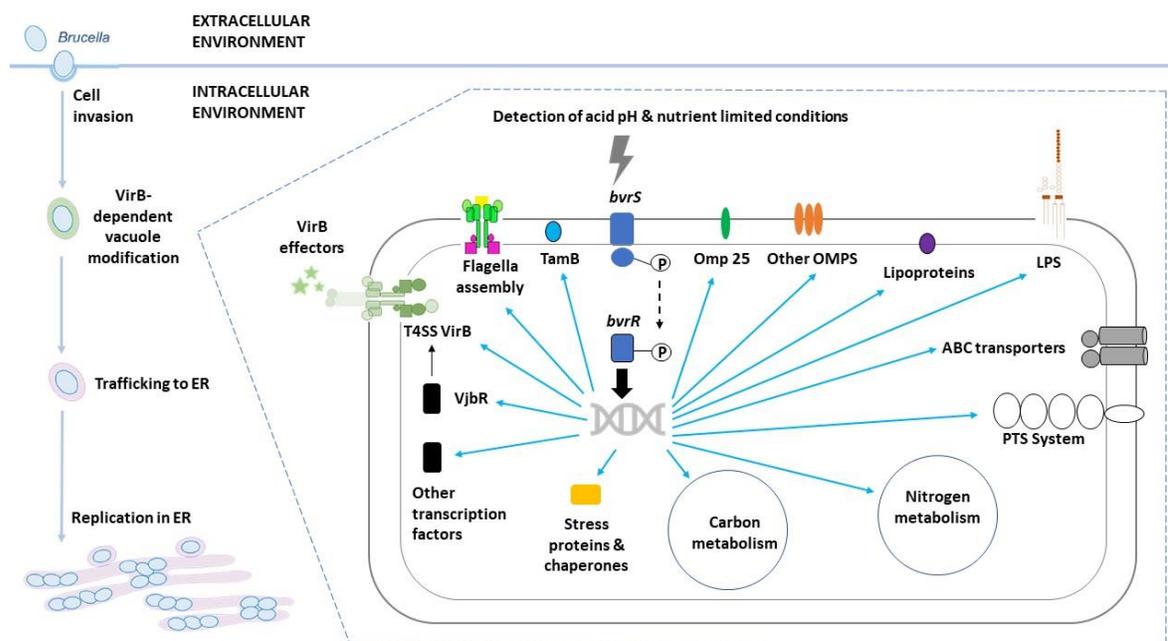


Figura 4. Funcionamiento del TCS BvrR/BvrS (Adaptado de Lamontagne *et al.*, 2007; Viadas *et al.*, 2010; Altamirano-Silva *et al.*, 2018). El modelo ilustra la coordinación intracelular realizada por *B. abortus* al durante la infección bacteriana. Una vez que la bacteria ingresa a la célula hospedera, BvrS detecta señales del ambiente intracelular como pH ácido y escasez de nutrientes, lo que desencadena su autofosforilación. Posteriormente, el grupo fosfato es transferido a BvrR, posibilitando la unión a los promotores de sus genes blancos, entre *omp25* y otras OMPs, lipoproteínas, genes para la acilación del lípido A del LPS, transportadores ABC, el sistema de fosfotransferencia (PTS), genes implicados en el metabolismo

del carbono y el nitrógeno, proteínas de estrés y chaperonas, *vjbr* y otros reguladores transcripcionales, así como el operón *virB*. El T4SS VirB secreta efectores que le permiten a la bacteria transitar dentro de la célula hospedera hasta alcanzar su nicho replicativo derivado del RE.

Los mutantes en *vjbr* presentan un fenotipo atenuado en cultivos celulares (macrófagos y células HeLa) y en ratones infectados experimentalmente (Delrue, *et al.*, 2005). Además, presentan cambios en la superficie celular (Uzureau *et al.*, 2007). En *B. melitensis*, Vjbr regula la expresión de algunas OMP implicadas en la virulencia (Uzureau *et al.*, 2010; de Jong *et al.*, 2008), incluyendo Omp25 (Roop *et al.*, 2021). En *B. abortus*, VjbR activa directamente la transcripción del T4SS VirB mediante unión al promotor del operón *virB* y a la región intergénica entre *virB1* y *virB2*. También activa la transcripción de *vceA* y *vceB* que codifican para dos efectores del T4SS VirB (de Jong *et al.*, 2008). Por último, está implicado en la regulación de genes flagelares (Léonard *et al.*, 2007) y del gen que codifica la adhesina autotransportadora BtaE (Kleinman *et al.*, 2017). Sin embargo, el impacto que tiene la unión de la molécula señal (homoserín lactona) en la actividad reguladora de VjbR es contrario a lo que se observa en los reguladores de QS clásicos, por lo que se ha postulado que VjbR y su molécula señal conforman un circuito regulador que permite a las brucelas intracelulares percibir las limitaciones espaciales de las BCVs para regular sus genes blanco de manera temporal (Roop *et al.*, 2021). Además, se ha constatado que la actividad reguladora de VjbR en algunos promotores depende de otros factores de transcripción, que en algunos casos aún no han sido identificados (Kleinman *et al.*, 2017).

Como se mencionó, la expresión de genes flagelares en *Brucella* está controlada por el regulador de QS VjbR. Sin embargo, se cree que el efecto de VjbR en estos genes flagelares está mediado por el regulador de respuesta FtcR, ya que la expresión del gen *ftcR* está parcialmente bajo el control de VjbR y la inactivación de *ftcR* ocasiona una disminución en la expresión de los genes *fliF*, *flgE* y *fliC*. Estos genes codifican respectivamente el anillo MS, el gancho y el monómero del filamento flagelar en *Brucella*. Consecuentemente, la inactivación de *ftcR* también reduce la virulencia de *Brucella*. FtcR está codificado en el primer locus flagelar de

B. melitensis. Tanto la secuencia de *ftcR* como su contexto genómico están conservados en Alphaproteobacteria (Léonard *et al.*, 2007).

Además de VjbR, en *Brucella* se ha reportado otro regulador de QS, denominado BlxR ("*Brucella LuxR-like regulator*"), el cual también es conocido como BabR (Rambow-Larsen *et al.*, 2008). VjbR activa la transcripción de *blxR* y por el contrario BlxR reprime la expresión de *vjbR*. Además, existen 27 genes blanco que son regulados por ambos mecanismos de QS. Para el 55% de ellos, los dos reguladores actúan de forma opuesta. Según la etapa de la infección, pareciera existir una interregulación entre Vjbr y BlxR (Rambow-Larsen *et al.*, 2008; Uzureau *et al.*, 2010). Se cree que VjbR actúa al inicio de la infección, posibilitando la adaptación temprana a las condiciones de estrés que predominan en la eBCV, disminuyendo el metabolismo básico para evitar la replicación bacteriana mientras la vacuola madura, y promoviendo el ensamblaje del T4SS, que es importante para alcanzar el nicho replicativo. BlxR, por su parte, actúa en etapas posteriores de la infección para reactivar el metabolismo y permitir la replicación (Uzureau *et al.*, 2010). También regula la expresión de genes flagelares (Roop *et al.*, 2021). Sin embargo, los mutantes en *babR* no presentan atenuación en modelos experimentales, por lo que, aún no está claro el papel de BabR en la virulencia de *Brucella* spp. (Roop *et al.*, 2021).

En la regulación del operón *virB* también participan otros factores de transcripción como IHF ("*Integration Host Factor*"), HutC ("*Histidine Utilization pathway*") y MdrA ("*MarR-like sodium deoxicholate-responsive activator*"). Los dos primeros se unen al promotor del operón *virB*, aumentando su expresión (Arocena *et al.*, 2010; Sieira *et al.*, 2010). Sieira *et al.* (2012) mencionan que IHF es una proteína asociada al nucleoide y HutC es un regulador de la familia GntR que relaciona la expresión del operón *virB* con el catabolismo de histidina. Por otro lado, MdrA es un regulador de la familia de factores de transcripción MarR, que regula genes de virulencia, genes implicados en el catabolismo de compuestos aromáticos y genes de respuesta a estrés (Wilkinson & Grove, 2006). MdrA se une a dos sitios diferentes en el promotor del operón *virB* y regula su expresión de acuerdo con la fase de crecimiento. La función de MdrA es redundante a la de HutC. Además,

compite con IHF y HutC por la unión al promotor del operón *virB*. Como es común en la familia de reguladores MarR, la presencia de un ligando disocia al regulador de su sitio de unión. En el caso de MdrA el ligando identificado es el deoxicolato de sodio, lo que indica que *in vivo* MdrA podría responder a señales ambientales (Sieira *et al.*, 2012).

Por otra parte, MucR es un regulador global de tipo de dedos de zinc que actúa principalmente como represor de la transcripción (Roop *et al.*, 2021). En *B. abortus* 2308, los mutantes en *mucR* son atenuados y se ha demostrado que MucR regula genes implicados en el establecimiento y mantenimiento de la integridad de la envoltura celular, la biosíntesis de polisacáridos, la homeostasis del hierro, la plasticidad del genoma y la regulación de la transcripción (Caswell *et al.*, 2013). Algunos de sus genes blanco específicos son el operón *virB*, *omp25*, *babR* y genes flagelares. Una de las funciones principales de MucR es trabajar en conjunto con activadores de la transcripción antagonistas para garantizar la adecuada expresión temporal de estos genes durante la infección. Los homólogos de MucR en *Agrobacterium tumefaciens* y *S. meliloti* ejercen funciones similares (Roop *et al.*, 2021). En *Caulobacter*, MucR colabora con el regulador transcripcional CtrA para regular el ciclo celular (Fumeaux *et al.*, 2014), y dado que los genes del ciclo celular son conservados en Alphaproteobacteria, es probable que MucR desempeñe la misma función en *Brucella*.

El regulador transcripcional CtrA es un regulador maestro del ciclo celular en *Brucella* (De Bolle *et al.*, 2015). CtrA controla la expresión de genes involucrados en la replicación del ADN, la segregación cromosómica y la división celular (Francis *et al.*, 2017). La adecuada coordinación de la expresión de estos genes es importante para mantener la persistencia intracelular de estas bacterias en las células de mamíferos (De Bolle *et al.*, 2015). CtrA también controla la expresión de *omp25* y genes involucrados en la biosíntesis de LPS, lo que también se relaciona con la virulencia de *Brucella* (Francis *et al.*, 2017).

Por último, las pequeñas moléculas de ARN con función reguladora (sRNA) desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión génica a nivel post transcripcional. Los sRNA llevan a cabo sus funciones reguladoras al unirse a

los transcritos de ARNm de sus genes blanco, lo que puede ya sea bloquear o aumentar su traducción (Roop *et al.*, 2021). Los primeros sRNA identificados y caracterizados en *Brucella* fueron AbcR1 de 110 nucleótidos y AbcR2 de 116 nucleótidos (Caswell *et al.*, 2012b; Sheehan & Caswell, 2017). Ambos desempeñan funciones redundantes en el control de la expresión de genes que codifican transportadores ABC involucrados en el transporte de aminoácidos y poliaminas y genes relacionados con la interacción con el hospedero. Además, una cepa de *B. abortus* con una doble delección en AbcR1 y AbcR2 es atenuada. Otros miembros del orden Rhizobiales también presentan ortólogos de AbcR1 y AbcR2 con funciones similares (Sheehan & Caswell, 2018).

- **Regiones promotoras caracterizadas en *Brucella***

En *Brucella*, la región promotora mejor caracterizada es la del operón *virB*, dada su relevancia para la virulencia. La transcripción comienza a 27 pb corriente arriba del gen *virB1*. La secuencia reguladora se extiende a lo largo de 430 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Durante el crecimiento vegetativo, la región de ADN que abarca desde la posición -130 hasta +1 es suficiente para activar la transcripción, mientras que la región que abarca desde la posición -430 hasta -353 está involucrada en una regulación negativa (Sieira *et al.*, 2004). Como se comentó, la expresión de este gen está bajo un control muy estricto, en el que ocurren tanto eventos de activación como de represión coordinados de forma temporal según la etapa de la infección. En este control participan varios factores de virulencia que responden a diferentes tipos de señales y condiciones, incluyendo: IHF, HutC, BvrR, VjbR, BabR, MdrA (Sieira *et al.*, 2013) y el represor MucR. Éste último se une en regiones ricas en AT, aunque con baja afinidad (Borriello *et al.*, 2020). Por otra parte, en *B. abortus*, la región promotora del gen *btaE* presenta sitios de unión para los reguladores IHF, HutC y MdrA. El sitio de inicio de la transcripción de *btaE* se ubica a 40 pb corriente arriba del codón de inicio. Sin embargo, cabe mencionar que el promotor de *btaE* presenta una alta variabilidad entre las diferentes especies y cepas de *Brucella*, lo que podría tener relación con eventos de especiación (Sieira *et al.*, 2017). Finalmente, el promotor *babR* en *B. abortus* presenta regiones ricas en AT y tiene sitios de unión para la

chaperona de sRNA denominada Hfq (Caswell *et al.*, 2012a) y MucR (Borriello *et al.*, 2020). El sitio de inicio de la transcripción de *babR* se encuentra a 119 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS Y HIPÓTESIS

- **Objetivo general:**

Establecer un modelo con base experimental que describa cómo el TCS BvrR/BvrS regula la expresión de genes implicados en la virulencia de *B. abortus*.

- **Objetivos específicos:**

1. Identificar regiones promotoras en el genoma de *B. abortus* que se encuentran directamente reguladas por el TCS BvrR/BvrS.
2. Describir la relación del TCS BvrR/BvrS con otros sistemas de regulación de la expresión génica.
3. Caracterizar la región promotora que codifica para la proteína Omp25 como región prototipo regulada por TCS BvrR/BvrS.
4. Establecer si hay diferencias fenotípicas entre una cepa mutante de *B. abortus* con la delección en los genes *bvrR/bvrS* y dos cepas mutantes generadas previamente por la inserción de un transposón en cada gen por separado.

- **Hipótesis:**

El TCS BvrR/BvR regula de forma directa la expresión de un conjunto de genes relevantes para la vida intracelular de *B. abortus*, lo cual tiene relación con la virulencia de este patógeno.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

- **Lista de cepas y plásmidos:**

Las cepas y plásmidos utilizadas en esta Tesis se detallan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Lista de cepas y plásmidos utilizadas en esta Tesis.

Cepas bacterianas / Plásmidos	Fenotipo / Características	Fuente / Referencia
<i>B. abortus</i> 2308W	Cepa parental, LPS liso, NaI ^R , virulenta	Suárez-Esquivel <i>et al.</i> , 2016
<i>B. abortus</i> 3aZ	Derivada de 2308W, portadora de la fusión transcripcional cromosomal <i>Pomp25::lacZ</i> , Gm ^R , Amp ^R	Guzmán-Verri <i>et al.</i> , 2002
<i>B. abortus</i> B392	Derivada de 2308W, portadora del p392, Km ^R	Castillo-Zeledón, 2010
<i>B. abortus</i> B262	Derivada de 2308W, portadora del p262, Km ^R	Castillo-Zeledón, 2010
<i>B. abortus</i> B151	Derivada de 2308W, portadora del p151, Km ^R	Castillo-Zeledón, 2010
<i>B. abortus</i> BpMR15	Derivada de 2308W, portadora del pMR15, Km ^R	Castillo-Zeledón, 2010
<i>B. abortus</i> <i>bvrR::Tn5</i>	Derivada de 2308, <i>bvrR::Tn5</i> , LPS liso, Km ^R , atenuada	Sola-Landa <i>et al.</i> , 1998
<i>B. abortus</i> <i>bvrS::Tn5</i>	Derivada de 2308, <i>bvrS::Tn5</i> , LPS liso, Km ^R , atenuada	Sola-Landa <i>et al.</i> , 1998
<i>B. abortus</i> Δ<i>bvrRS</i>	Derivada de 2308W, Δ <i>bvrRS</i> , LPS liso, atenuada	Este estudio
<i>Escherichia coli</i> XL1Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ (lac-	Sambrook, 1989

	proAB) [F' proAB lacIqZΔM15]. TN10(Tet')	
<i>E. coli</i> E392	Derivada de XL1Blue, portadora del p392, Km ^R	Castillo-Zeledón, 2010
<i>E. coli</i> E262	Derivada de XL1Blue, portadora del p262, Km ^R	Castillo-Zeledón, 2010
<i>E. coli</i> E151	Derivada de XL1Blue, portadora del p151, Km ^R	Castillo-Zeledón, 2010
pMR15	Vector de alto número de copias, gen <i>lacZ</i> sin promotor, Km ^R	Gober & Shapiro, 1992, Cortesía de M. Roop.
p392	Derivado de pMR15, con un fragmento clonado de 521 pb correspondientes a 392 pb de la región corriente arriba de <i>omp25</i> y las primeras 127 pb de la secuencia codificante, Km ^R	Castillo-Zeledón, 2010
p262	Derivado de pMR15, con un fragmento clonado de 391 pb correspondientes a 262 pb de la región corriente arriba de <i>omp25</i> y las primeras 127 pb de la secuencia codificante, Km ^R	Castillo-Zeledón, 2010
p151	Derivado de pMR15, con un fragmento clonado de 280 pb correspondientes a 151 pb de la región corriente arriba de <i>omp25</i> y las primeras 127 pb	Castillo-Zeledón, 2010

	de la secuencia codificante, Km ^R	
pNTPS138	Vector suicida, <i>oriT</i> , <i>sacB</i> Km ^R	M.R.K. Alley, sin publicar
pΔ<i>bvrRS</i>	Derivado de pNTPS138, <i>ΔbvrRS</i> , Km ^R	Cortesía de Clayton C. Caswell

Nal^R= resistente a ácido nalidíxico, Gm^R= resistente a gentamicina, Amp^R= resistente a ampicilina, Km^R= resistente a kanamicina.

- **Condiciones de crecimiento:**

Todos los procedimientos con cultivos de *B. abortus* se llevaron a cabo de acuerdo con el "Reglamento de Bioseguridad de la CCSS 39975-0", 2012, según el "Decreto Ejecutivo #30965-S", 2002 y el protocolo de investigación SIA 0652-19 aprobado por la Universidad Nacional de Costa Rica. Los medios de cultivo utilizados en esta Tesis fueron los siguientes: Caldo Trypticasa y Soya a pH 7.2 (CTS), Agar Trypticasa y Soya (ATS), medio limitado en nutrientes (33 mM KH₂PO₄, 60.3 mM K₂HPO₄, 0.1% de extracto de levadura) a un pH de 5.5 ajustado con ácido cítrico, Caldo Luria Bertani (LB) (Sambrook, 1989), S.O.C. (2% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa) y Agar Columbia suplementado con 5% (v/v) de sangre de oveja. Cuando fue necesario, se agregaron los siguientes suplementos a los diferentes medios de cultivo: 10% (p/v) de sacarosa (Suc), 30 µg/mL de kanamicina (Km), 20 µg/mL de gentamicina (Gm), 100 µg/mL de ampicilina (Amp), 100 µg/mL de espectinomicina (Spc) y 30 µg/mL de cloranfenicol (Cm). Los cultivos bacterianos se incubaron a 37°C, agitándose constantemente a 200 rpm cuando fue necesario (Suárez-Esquivel *et al.*, 2016). Para las curvas de crecimiento, se prepararon inóculos de 7 x 10⁹ UFC en un volumen final de 20 ml de CTS. Las densidades ópticas se midieron a 420 nm cada 2 a 4 h.

- **Extracción de ARN, RT-PCR y análisis de conservación del operón *bvrR/bvrS*:**

Para el análisis de co-transcripción de los genes corriente abajo de *bvrR*, se realizó una extracción de ARN total y una RT-PCR según lo descrito previamente (Martínez-Núñez *et al.*, 2010), a partir de cultivos de *B. abortus* 2308W crecidos en CTS hasta las fases de crecimiento logarítmico y estacionario. En el anexo 1 se detallan los cebadores utilizados para este propósito. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa siguiendo procedimientos estándar (Sambrook, 1989). Los amplicones obtenidos se secuenciaron utilizando el kit “Big Dye Terminator 3.1” (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis de conservación de los ortólogos del operón *bvrR/bvrS* en representantes de *Alphaproteobacteria* se realizó utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990). Se utilizó el genoma de *B. suis* 1330 como referencia para esta comparación, ya que ha sido resecuenciado y es uno de los genomas de *Brucella* de mayor tamaño. Se utilizó Artemis (Rutherford *et al.*, 2000) y la Herramienta de Comparación Artemis para visualizar los resultados (Carver *et al.*, 2005). Los genes 16S rRNA se utilizaron para la reconstrucción filogenética molecular mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), para inferir la historia evolutiva de los genomas seleccionados de *Alphaproteobacteria*. El árbol de consenso de bootstrap inferido a partir de 500 réplicas (Felsenstein, 1985) se tomó para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. El análisis involucró 17 secuencias nucleotídicas (Anexo 2). Se eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos faltantes. Hubo un total de 1191 posiciones en el conjunto de datos final. De acuerdo con informes anteriores (Williams *et al.*, 2007), se introdujo en el análisis un grupo externo conformado por *Escherichia coli*, *Ralstonia solanacearum* y *Geobacter sulfurreducens*; sin embargo, se recortó del árbol para mejorar la resolución visual. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

El operón *bvrR/bvrS* se examinó a través del alineamiento bwa (Li *et al.*, 2009) y el mapeo SMALT v.0.5.8 (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/smalt/>) en 126 genomas de *B. abortus* para evaluar la presencia y el nivel de identidad de los genes incluidos en la región,

utilizando como referencia una región inferida de *B. suis* 1330. Además, se registró manualmente el número de SNPs, inserciones y deleciones en cada uno de los genes.

- **Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq):**

El ensayo de ChIP-Seq se llevó a cabo como se describió anteriormente (Francis *et al.*, 2017) con las siguientes modificaciones. La cepa *B. abortus* 2308W y su cepa derivada con una mutación por transposición en *bvrR* (control negativo) se cultivaron hasta la mitad de la fase de logarítmica en CTS. Los cultivos crecidos de cada cepa se dividieron en dos partes iguales. Una parte se incubó durante cinco minutos en un medio limitado en nutrientes a un pH de 5.5 ajustado con ácido cítrico. Estas son condiciones de estrés descritas previamente para inducir la fosforilación de BvrR (Altamirano-Silva *et al.*, 2018). La otra parte de las cepas cultivadas se incubó en CTS fresco durante 5 minutos como una condición de control adicional en la que se esperaba que la fosforilación de BvrR ocurriera solo de manera transitoria (condiciones ricas) (Altamirano-Silva *et al.*, 2018). El entrecruzamiento proteína-ADN se realizó según lo descrito anteriormente (Francis *et al.*, 2017) y se detuvo agregando glicina hasta una concentración final de 125 mM, de acuerdo con lo reportado para otro regulador de *Brucella* (Kleinman *et al.*, 2017). Después de agregar un tampón de lisis con lisozima (10 mg/ml), las bacterias se lisaron en el Disruptor Celular Genie Scientific Industries, a 2800 rpm durante 1 h a 4°C, seguido de una incubación de 16 h con buffer ChIP a 37°C. El lisado se sonicó en hielo en el Disruptor Celular Digital Branson Sonifier S-450D 400W, aplicando 25 pulsos de 30 segundos al 30% de amplitud y 30 segundos de pausa. Se utilizó un anticuerpo de conejo policlonal anti-BvrR (Martínez-Núñez *et al.*, 2010) y cuentas magnéticas recubiertas con proteína A para la inmunoprecipitación. El ADN se extrajo utilizando un protocolo estándar de precipitación con isopropanol (Sambrook, 1989). La construcción de bibliotecas y la secuenciación por Illumina HiSeq 2500 HT se realizaron en el Core de Genómica de Leuven, Bélgica. El sistema Bluepippin (Sage Science) se utilizó para seleccionar fragmentos de ADN de aproximadamente 220 pb que se secuenciaron en modo pareado. Los resultados de secuenciación se analizaron utilizando herramientas de bioinformática disponibles en la plataforma

del Proyecto Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) (Afgan *et al.*, 2016). El promedio y la varianza de lecturas por nucleótido se calcularon en R Studio (<http://www.rstudio.com>) para establecer un valor de Z medido en términos de desviaciones estándar de la media, según lo descrito por otros autores (Francis *et al.*, 2017; Poncin *et al.*, 2019). Para cada condición probada, las señales de ChIP-Seq consideradas significativas fueron aquellas que cumplían con todos los siguientes criterios de selección: 1-Tener un recuento de lecturas por nucleótido por encima del umbral ($Z \geq 3$), 2-Estar ausente en el control negativo, y 3-Tener una longitud mínima de siete nucleótidos consecutivos. La visualización interactiva de las señales de ChIP-Seq para la condición de estrés se construyó utilizando la Biblioteca de Visualización Bokeh (<http://www.bokeh.pydata.org>) y un código Python personalizado. Se utilizó el buscador genómico Artemis (Rutherford *et al.*, 2000) para buscar los genes más cercanos que rodean las señales significativas de ChIP-Seq. Para las señales significativas de ChIP-Seq ubicadas cerca del inicio de dos genes divergentes, ambos genes se consideraron como posibles genes blanco de BvrR. Para las señales significativas de ChIP-Seq ubicadas dentro de secuencias codificantes, se consideraron los genes correspondientes y sus genes adyacentes corriente abajo como posibles genes diana de BvrR. La anotación de funciones de todos los genes diana potenciales de BvrR identificados por ChIP-seq fue curada manualmente utilizando la nomenclatura COG y comparando entre las condiciones. Los genes blanco potenciales encontrados bajo condiciones de estrés se utilizaron como entrada para realizar un análisis exhaustivo de las vías metabólicas con BioCyc (Karp *et al.*, 2017; Caspi *et al.*, 2016) y curación manual. Las secuencias de ADN de las señales significativas de ChIP-Seq se extrajeron de Artemis y se utilizaron como entrada para el descubrimiento de motivos con GLAM2 (Frith *et al.*, 2008) para deducir una secuencia de consenso reconocida por BvrR (Bailey *et al.*, 2009).

- **Ensayo de Movilidad Electroforética (EMSA):**

La proteína recombinante BvrR se purificó y se fosforiló *in vitro* con carbamoil fosfato según lo descrito previamente (Martínez-Núñez *et al.*, 2010; Altamirano-Silva *et al.*, 2018). La interacción directa entre BvrR fosforilada (BvrR-P) y las regiones de

ADN de interés se analizó por EMSA, según lo reportado anteriormente (Altamirano-Silva *et al.*, 2018). Las sondas de ADN se prepararon mediante amplificación por PCR o por síntesis química de oligonucleótidos (Invitrogen, USA) como se explicará más adelante. El marcaje de las sondas se realizó con el kit “DIG Gel Shift kit 2nd generation kit” (Roche®). Las sondas marcadas se incubaron con concentraciones crecientes de BvrR-P, siguiendo el protocolo descrito “DIG Gel Shift kit 2nd generation kit” (Roche®). Dependiendo del tamaño de la sonda de ADN, las mezclas de ADN-proteína se separaron mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida durante 1 h (H40 pb), 1.5 h (H200 pb) o 2.5 h (>200 pb), a 150V y 4°C. Los geles fueron transferidos a membranas de nylon con carga positiva y los resultados se visualizaron mediante un inmunoensayo enzimático utilizando el kit “DIG Gel Shift kit 2nd generation kit” (Roche®). Las señales quimioluminiscentes obtenidas se registraron en una película de rayos X.

En el estudio del regulón de BvrR, se seleccionaron los siguientes genes blanco: *tamA* (BAW_10045), *pckA* (BAW_12005), *bvrR* (BAW_12006), *omp25* (BAW_10696) y *virB1* (BAW_20068), los cuales se amplificaron por PCR utilizando respectivamente los pares de cebadores bruAb1.0048.3 y bruAb1.0048.3, 3-200pck3 y 3-200pck3, 3-200bvrR3 y 3-200bvrR5, omp25 For y omp25 Rev y pvirdown1 y pvu229 (Anexo 1). La sonda *tamA* se desnaturalizó durante 10 minutos a 95 °C antes de cada ensayo. Como controles negativos, se incluyeron regiones del gen ribosomal *rplL* (BAW_11206) y del gen *dhbR* (BAW_21104), las cuales se amplificaron por PCR utilizando respectivamente los pares cebadores L12.F y L12.R y dhbprom3 y dhbprom5 (Anexo 1). Para los EMSAs competitivos, las sondas que mostraron una interacción positiva con BvrR-P en los EMSAs directos se marcaron y se incubaron con BvrR-P (0,6 µM) y un exceso de misma sonda sin marcar (competidor), o por separado, con un exceso de la sonda usada como control negativo sin marcar.

En el análisis del motivo de unión de ADN, se diseñaron y sintetizaron químicamente diez oligonucleótidos de ≈40 pb que cubrían una región de 226 pb del promotor de *virB1* que se sabía que se unía directamente a BvrR (Martínez-

Núñez et al., 2010), con la particularidad de que cada oligonucleótido presentó un traslape de ≈ 20 pb con el siguiente (Anexo 1).

Para la caracterización de la región promotora de *omp25*, las sondas se obtuvieron mediante PCR utilizando los siguientes pares de cebadores: omp25.262 y omp25.152 o omp25.262 y omp25.122 (Anexo 1). Como control negativo, se utilizó el gen ribosomal *rplL* (Anexo 1) Además, se hizo un EMSA competitivo utilizando como sonda la región corriente arriba del gen *omp25*, amplificada por PCR con los cebadores omp25 For y omp25 For (Anexo 1). Además se diseñaron y sintetizaron químicamente oligonucleóticos que abarcaban esa región (Anexo 1). Estos oligonucleótidos se usaron inicialmente como competidores sin marcar. Posteriormente, los que compitieron se marcaron y se usaron como sondas en un EMSA directo contra BvrR-P.

- **Mapeo de los sitios de inicio de transcripción:**

Se extrajo ARN total de *B. abortus* 2308W como se describió anteriormente (Martínez-Núñez *et al.*, 2010) y se sometió a análisis de extensión de cebador de acuerdo con un protocolo descrito (Lloyd *et al.*, 2005). En el Anexo 1 los cebadores utilizados para este fin.

- **Ensayos de huella de ADNasa I:**

En el estudio del regulón de BvrR, el mismo amplicón de 226 pb analizado por EMSA se amplificó utilizando el cebador pvirDown1 marcado con 6-carboxifluoresceína en el extremo 5' (5'-FAM) (Anexo 1), bajo las condiciones descritas previamente (Sieira *et al.*, 2004).

En la caracterización de la región promotora del gen *omp25*, la misma región de 193 pb utilizada en el EMSA competitivo se marcó con hexaclorofluoresceína (HEX) o 5'-FAM (Anexo 1).

Los fragmentos marcados se purificaron del gel con el kit "Qiaquick PCR purification kit" (Qiagen) y se mezclaron con BvrR-P como se describió anteriormente para EMSA. Posteriormente se realizó una digestión con ADNasa I y se secuenciaron según lo descrito previamente (Zianni *et al.*, 2006). Las bases protegidas de la digestión se identificaron utilizando el software Peak Scanner de

Applied Biosystems al sobreponer los electroferogramas de los fragmentos de ADN digeridos y no digeridos.

- **Construcción de fusiones transcripcionales y ensayos de actividad de β -galactosidasa:**

Los cebadores utilizados en este estudio se detallan en el Anexo 1. Se amplificó un fragmento de ADN del genoma de *B. abortus* 2308W (Número de Acceso en GenBank ERS568782), que abarcaba la región *omp25* desde -392 hasta +127 y dos fragmentos más pequeños desde -262 hasta +127 y desde -151 hasta +127, mediante PCR, y se purificó con el kit "QIAquick® Gel Extraction Kit" (Qiagen). Los amplicones y el vector pMR15 (Cuadro 3) se escidieron por separado con BamHI (10U/ μ l) y XbaI (10U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific, USA) durante 18 h a 37°C. Las enzimas de restricción se inactivaron a 80°C durante 20 minutos. Los fragmentos de ADN se ligaron con el vector pMR15 utilizando la ligasa de ADN T4 (5U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific, USA) a temperatura ambiente durante 16 h, para obtener los plásmidos p392, p262 y p151 (Cuadro 2). Luego, los plásmidos se electroporaron en la cepa de *E. coli* XL1-Blue para generar las cepas E392, E262 y E151 (Cuadro 2) utilizando el Manipulador de Células Electro ECM 630 BTX®. Las colonias con los nuevos plásmidos se seleccionaron utilizando kanamicina y se examinaron con los cebadores *omp25lacZF* y *omp25lacZR* (Anexo 1). Se aisló el ADN plasmídico y se electroporó en *B. abortus* 2308W utilizando el Manipulador de Células Electro ECM 630 BTX® para obtener las cepas B392, B262 y B151 (Cuadro 2). El vector pMR15 también se electroporó en *B. abortus* como control de actividad no promotora (cepa BpMR15, Cuadro 3). Los ensayos de β -galactosidasa se realizaron con modificaciones a lo descrito previamente (Guzmán-Verri *et al.*, 2002). Las bacterias se cultivaron hasta la fase exponencial, se permeabilizaron con 0.5% de SDS y 6% de cloroformo durante 10 minutos a 28°C, y se incubaron con ONPG (O-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido) durante 10 minutos a 28°C. La reacción se detuvo con carbonato de sodio 1M, se midió la absorbancia a 420 nm y la actividad específica se expresó como nmol de O-nitrofenol producido/min \times mg de proteína (Unidades Miller). La actividad de β -galactosidasa reportada se corrigió con base en la actividad residual obtenida de la cepa con el vector vacío BpMR15. Se utilizó

una cepa de *B. abortus* con una fusión cromosómica *lacZ:omp25* previamente construida (3aZ) como control positivo de la actividad del promotor (Guzmán-Verri *et al.*, 2002, Cuadro 2). Se realizó un análisis estadístico de una vía ANOVA seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Turkey utilizando GraphPad Prism versión 8.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

- **Anisotropía de fluorescencia**

Los ensayos de anisotropía de fluorescencia se realizaron según lo reportado por otros autores (Owen y McMurray, 2009) con algunas modificaciones. La proteína recombinante BvrR según lo descrito para los EMSA y diluida en serie en buffer de unión (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 0.1 M de NaCl). El oligonucleótido (173.133omp25-O, Anexo 1)) se marcó en el extremo 5' con FAM y se mezcló con su respectivo oligonucleótido complementario sin marcar (173.133omp25-ORC, Anexo 1) a una concentración final de 50 mM. Los oligonucleótidos Oligo rpIL-O (marcado con FAM en el extremo 5') y el oligo complementario Oligo rpIL-ORC (Anexo 1) se utilizaron como control negativo a una concentración final de 50 mM. También se prepararon muestras en blanco sin proteína para estimar la fluorescencia de fondo. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en un lector de microplacas Cytation™ 3 (Biotek, Instruments). La anisotropía de fluorescencia se midió con los filtros polarizados adecuados y los resultados se representaron gráficamente siguiendo un modelo de unión específica de un sitio (Favicchio *et al.*, 2009) y utilizando GraphPad Prism (Hulme y Trevethick, 2010).

- **Docking Molecular**

Las interacciones entre BvrR y sus tres sitios de unión se exploraron mediante docking molecular utilizando el servidor HDOCK (parámetros por defecto) (Yan *et al.*, 2017). La secuencia Fasta de BvrR (UniProt: Q2YQY4) se utilizó como molécula receptora de entrada, y las siguientes secuencias: caja 1 (TTGTGTAAGGAGAATGCCAT), caja 2 (GATATGTCACCCCTGTCAGCGCGG), caja 3 (CTCGACAGATTATCTCCACACAATGGGGCA) se utilizaron como moléculas ligandos de entrada. Antes del acoplamiento libre, el software seleccionó la estructura cristalina del regulador de respuesta similar a OmpR, KdpE (RCSB PDB: 4KFC), de *E. coli*, como plantilla de modelado para la estructura de BvrR

(Seq_ID % = 29.4). Para garantizar la confiabilidad del modelo generado por HDOCK, se analizó su calidad utilizando el parámetro QMEANDisCo (Studer *et al.*, 2020) y trazados de Ramachandran. El modelo se comparó con los generados por SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018), I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) y AlphaFOLD (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2021). Las estructuras cristalinas de las siguientes proteínas con dominios de unión al ADN se utilizaron como controles positivos para los experimentos de acoplamiento: una proteína de unión al ADN de *B. abortus* (RCSB PDB: 4QPJ) y la proteína KdpE de *E. coli*. Como controles negativos, se utilizaron las estructuras cristalinas de las siguientes proteínas que carecen de dominios de unión al ADN: una hidrolasa de *B. suis* 1330 (RCSB PDB: 6NQ4) y un inhibidor de la hidrolasa de peptidoglicano de *B. abortus* (RCSB PDB: 7DPY). Para la interpretación, se consideraron puntuaciones de acoplamiento inferiores a -200 y puntuaciones de confianza superiores a 0.7 como un buen rendimiento y una alta probabilidad de unión entre las moléculas analizadas respectivamente. La herramienta NUCPLOT (Luscombe *et al.*, 1997) se utilizó para analizar y visualizar un esquema de color de interacción en 2D de los resultados de HDOCK.

- **Construcción de la cepa *B. abortus* Δ bvrRS**

Los genes *bvrR* (BAW_12006) y *bvrS* (BAW_12007) de la cepa parental *B. abortus* 2308W se mutaron utilizando una estrategia de eliminación de genes no polar sin marca previamente descrita (Caswell *et al.*, 2012a; 2012b) con modificaciones. Se amplificó un fragmento corriente arriba (Up) de *bvrR* de aproximadamente 1 kb al segundo codón de la secuencia de codificación de *bvrR* (coordenadas 2010312 a 2011285) con los cebadores bvrRS-Up-For y bvrRS-Up-Rev (Anexo 1). Se amplió un fragmento corriente abajo (Dn) de *bvrS* que contenía los dos últimos codones de la región codificante de *bvrS* y aproximadamente 1 kb corriente abajo (coordenadas 2013910 a 2014911) con los cebadores bvrRS-Dn-For y bvrRS-Dn-Rev (Anexo 1). El fragmento Up se cortó con BamHI (Thermo Fisher Scientific, USA) y el fragmento Dn se cortó con PstI (Thermo Fisher Scientific, USA). Ambos fragmentos se trataron con polinucleótido kinasa en un buffer de ligasa y se incluyeron en una mezcla de ligación única con el pNPTS138 (Cuadro 2) digerido

con BamHI/PstI. Este es un vector suicida que expresa resistencia a kanamicina (Km) y el gen *sacB* para la contraselección con sacarosa (Suc). El plásmido resultante se llamó p Δ bvrRS (Cuadro 2) y carecía de una región de 2623 pb ubicada entre los fragmentos Up y Dn en el genoma de la cepa parental y que correspondía a la mayoría de las secuencias codificantes de *bvrR* y *bvrS* (coordenadas 2011286 a 2013909). Se electroporaron 1-3 μ l de p Δ bvrRS (resuspendido en agua destilada) en 40 μ l de células competentes de *B. abortus* 2308W preparadas según lo descrito por otros autores (Caswell *et al.*, 2012a; 2012b). La electroporación se realizó en un electroportador de células BTXTM con los siguientes parámetros: 2.5 kV a 400 ohmios y 50 mF. Después de la electroporación, se agregó 1 ml de medio SOC y las células se incubaron durante toda la noche. Luego, se inocularon volúmenes de 100-200 μ l en ACS + Km para seleccionar clones que portaran p Δ bvrRS. Las placas se incubaron durante 6-10 días. Se seleccionaron colonias individuales, se transfirieron a CTS y se incubaron durante toda la noche. Se inocularon volúmenes de 50, 100 y 200 μ l en ATS + 10% Suc para seleccionar clones que integraran el constructo Up-Dn en el cromosoma de la cepa parental mediante recombinación alélica. Las placas se incubaron durante 3-6 días. Se eligieron colonias individuales y se hicieron réplicas exactas en ATS + 10% Suc y ATS + Km, para seleccionar clones Suc^R y Km^S que se esperaba que hubiesen perdido ambos genes *bvrR* y *bvrS*, así como el vector suicida. Las placas se incubaron durante 2-3 días. Los clones Suc^R y Km^S se examinaron mediante PCR de colonias con los cebadores bvrRS-Con-For y bvrRS-Con-Rev (Anexo 1) en una reacción con DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, USA). Los cebadores "Con" amplifican un fragmento de 3332 pb en la cepa parental (coordenadas 2011017 a 2014349) y un fragmento de 709 pb en la cepa mutante *B. abortus* Δ bvrRS. Los clones que dieron el resultado esperado para la cepa mutante también se sometieron a una PCR con el par de cebadores bvrR_bv1 (Anexo 1), los cuales amplifican un fragmento de 63 pb de la secuencia codificante de *bvrR* en la cepa parental (coordenadas 2011468 a 2011531) y no se espera que amplifiquen ningún producto de PCR en la cepa mutante. Los clones mutantes seleccionados en función de la presencia del amplicón Con de 709 pb y la ausencia del amplicón bv1 de 63 pb se

sometieron también a pruebas de identificación bioquímica y confirmación adicional mediante secuenciación de ADN Sanger, Southern Blot, Western Blot y secuenciación de genoma completo, como se describe más adelante.

- **Identificación bioquímica de la cepa *B. abortus* $\Delta bvrRS$**

Se realizaron pruebas bioquímicas básicas según lo descrito por otros autores (Castillo-Zeledón *et al.*, 2021), utilizando los posibles clones mutantes y la cepa *B. abortus* 2308W. Las pruebas realizadas incluyeron ureasa (1h y 24h), oxidasa, producción de H₂S, reducción de nitrato, sensibilidad a 20 µg/ml de tionina (24h y 72h) y 20 µg/ml de fucsina básica (24h y 72h). La presencia de un LPS liso se verificó mediante la prueba de aglutinación de acriflavina según lo descrito por otros autores (Castillo-Zeledón *et al.*, 2021).

- **Southern Blot:**

La mutación fue confirmada mediante Southern Blot (Castillo-Zeledón *et al.*, 2021), con algunas modificaciones. El ADN genómico de las cepas parentales y mutantes se extrajo utilizando el kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega, USA). El ADN purificado fue digerido con las enzimas de restricción BshTI (Agel) y Mlsl (MscI) (Thermo Scientific, USA), con 25 U y 12,5 U respectivamente, cortando el ADN genómico de *B. abortus* 2308W en las posiciones 2011220 (a 60 bases del codón de inicio de *bvrR*) y 2014898 (a 983 bases del codón terminación de *bvrS*), generando fragmentos de 3679 pb y 1055 pb en la cepa parental y en las cepas mutantes de *B. abortus* $\Delta bvrRS$. El ADN digerido de cada cepa se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,6% durante 2 h a 100 V, y el gel se transfirió a una membrana de nailon (Roche, Alemania). La sonda se generó utilizando los cebadores *bvrRS*-South (Anexo 1), amplificando un fragmento de 299 pb de la secuencia codificante del gen corriente abajo de *bvrS* (BAW_12008, coordenadas 2013977 a 2014276). El marcaje, hibridación y detección de la sonda se realizaron utilizando el kit “DIG DNA Labeling and detection kit” (Roche, Alemania).

- **Western Blot:**

La expresión de BvrS, BvrR y Omp25 se evaluaron por Western Blot (Castillo-Zeledón *et al.*, 2021), con algunas modificaciones. Los cultivos bacterianos se incubaron durante un máximo de 32 h para evaluar la expresión de proteínas en diferentes fases de crecimiento. El control de carga fue Omp19.

- **Secuenciación Sanger:**

El amplicón Con-mutante se secuenció mediante Secuenciación Sanger para confirmar la ausencia de *bvrR* y *bvrS*. También se secuenciaron las regiones recombinadas durante la eliminación de los genes *bvrR* y *bvrS*. La región de recombinación corriente arriba se amplificó con los cebadores pckA (Anexo 1), obteniendo un amplicón de 677 pb (coordenadas 2009968 a 2010645). La región de recombinación corriente abajo se amplificó con los cebadores revtrans20682069-2.3 y revtrans20692070-2.5 (Anexo 1), obteniendo un amplicón de 628 pb (coordenadas 2014621 a 2015249). Todos los amplicones se secuenciaron utilizando el Kit “BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Thermo Fisher Scientific, USA) y se enviaron al "Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular" de la Universidad de Costa Rica para la electroforesis capilar. Los resultados de la secuenciación se analizaron utilizando BLAST (Altschul *et al.*, 1990) como blastn y con parámetros predeterminados para buscar su correspondencia en la secuencia genómica de *B. abortus* 2308, cromosoma I (Secuencia de Referencia del NCBI: NC_007618.1).

- **Secuenciación del genoma completo:**

Para la secuenciación del genoma completo, el ADN genómico de *B. abortus* 2308W y *B. abortus* $\Delta bvrRS$ se según lo descrito más atrás para el Southern Blot. Las bibliotecas genómicas se prepararon con el kit “Rapid barcoding sequencing SQK-RBK004 kit” (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) para la secuenciación en una plataforma minION utilizando el software MinKNOW, según las recomendaciones del fabricante. El “Basecalling” y la conversión de los datos crudos al formato FASTQ se realizaron con Guppy v.3.6.0, mientras que la calidad de las lecturas se verificó con nanoplot 1.40.2 (De Coster *et al.*, 2018). Las lecturas de baja calidad (Q<10 y longitud mínima de 1000) se filtraron con nanofilt 2.8.0 (De Coster *et al.*, 2018). Los adaptadores y códigos de barras se recortaron con

Porechop 0.2.4. Las lecturas que pasaron la calidad se utilizaron para el ensamblaje del genoma completo con Unicycler v0.4.8 (Wick *et al.*, 2017). Los genomas ensamblados se verificaron con QUAST 5.0.2 (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies Version) (Gurevich *et al.*, 2013) y CheckM v1.1.3 para verificar la integridad y contaminación (Parks *et al.*, 2015). El proyecto se depositó en DDBJ/ENA/GenBank con los siguientes números de acceso: Bioproyecto PRJNA891361, ensamblajes CP109916-CP109917 y CP109914-CP109915 y datos crudos de secuenciación SRR21939256 y SRR21939255 para *B. abortus* 2308W y *B. abortus* $\Delta bvrRS$, respectivamente. Los ensamblajes completos resultantes a nivel de cromosoma se compararon mediante BLAST (Altschul *et al.*, 1990) con el tipo blastn y parámetros predeterminados para verificar las diferencias genómicas entre *B. abortus* $\Delta bvrRS$ y *B. abortus* 2308W. La cobertura del contenido genómico también se verificó mediante el mapeo de lecturas contra el genoma ensamblado utilizando la plataforma de mapeo de lecturas largas Vulcan 1.0.3 (Fu *et al.*, 2021). Las visualizaciones genómicas se realizaron con la Herramienta de Comparación Artemis 18.2.0 (Carver *et al.*, 2005).

- **Pruebas de integridad de membrana:**

La sensibilidad a la acción bactericida del suero no inmune se llevó a cabo según lo descrito en la literatura (Castillo-Zeledón *et al.*, 2021), con un período de incubación de 45 minutos con el suero no inmune en lugar de 90 minutos. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples (Castillo-Zeledón *et al.*, 2021). La concentración mínima inhibitoria a Polimixina B en CTS pH 7.0 y 6.0 fue determinada mediante el método de microdilución, según lo descrito en la literatura (Castillo-Zeledón *et al.*, 2021).

- **Ensayo de protección con gentamicina y cuantificación de la replicación intracelular:**

Se cultivaron macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) y células epiteliales HeLa (ATCC clon CCI-2) y se infectaron con cepas de *B. abortus* en fase de crecimiento exponencial, tal como lo describen otros autores (Altamirano-Silva *et al.*, 2018; Castillo-Zeledón *et al.*, 2021). El número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) viables de *B. abortus* intracelulares se determinó a las 0, 24 y 48 h

después de la infección. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples (Castillo-Zeledón *et al.*, 2021).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

- **El regulón del TCS BvrR/BvrS revela una coordinación de vías metabólicas requeridas para la vida intracelular de *B. abortus***

1. Resumen:

El TCS BvrR/BvrS está conservado en miembros de la clase *Alphaproteobacteria* y está relacionado con la expresión de genes requeridos para la interacción con el hospedero y la sobrevivencia intracelular. Sin embargo, se desconocía si esa regulación era directa o indirecta. Por lo tanto, nos interesamos por describir el regulón del TCS BvrR/BvrS. En primer lugar, reportamos que los genes *bvrR* y *bvrS* se cotranscriben con otros 14 genes corriente abajo, conformando un operón. La anotación de estos genes refleja funciones relacionadas con el metabolismo del nitrógeno, la reparación y recombinación del ADN, el arresto del ciclo celular y la respuesta al estrés. La sintenia de esta región entre miembros cercanos de *Alphaproteobacteria* sugiere un rol conservado en la coordinación y expresión de vías metabólicas relacionadas con el carbono y el nitrógeno. Adicionalmente, realizamos un análisis de ChIP-seq con anticuerpos contra BvrR después de exponer cultivos bacterianos a condiciones de estrés ácido y nutricional que simulan el ambiente intracelular. Como resultado, encontramos que BvrR se une directamente a más de 300 genes que codifican enzimas implicadas en vías metabólicas entrelazadas como la vía de las pentosas fosfato y la gluconeogénesis, además de la homeostasis de la envoltura celular, síntesis de nucleótidos, división celular y virulencia. Entre estos genes blanco seleccionamos los siguientes: *virB1*, *bvrR*, *pckA*, *omp25* y *tamA*. Además, corroboramos por EMSA la unión directa de BvrR a las regiones corriente arriba de estos genes. Por último, desciframos un motivo de unión a ADN de 14 nucleótidos, cuya presencia logramos identificar en el sitio de unión a BvrR que delimitamos en la región promotora del gen *virB1*. Consideramos que comprender la regulación génica que ejerce BvrR en *Brucella* es esencial para dilucidar cómo la bacteria logra orquestar una respuesta fisiológica que conlleva a una estrategia patogénica sigilosa.

2. Introducción:

El TCS BvrR/BvrS se relacionó inicialmente con la virulencia y la integridad de la OM de *Brucella* spp. (Sola-Landa *et al.*, 1998; Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Manterola *et al.*, 2005; Lamontagne *et al.*, 2007; Martínez-Núñez *et al.*, 2010; Viadas *et al.*, 2010; Altamirano-Silva *et al.*, 2018). Estudios posteriores revelaron que en la mutante por transposición en *bvrR* existían más de 100 genes con expresión alterada en comparación con la cepa parental (Viadas *et al.*, 2010). Sin embargo, se desconocía si todos esos genes eran regulados de forma directa por el TCS BvrR/BvrS, o más bien indirecta, pues entre estos genes se encontraban otros factores de transcripción (Viadas *et al.*, 2010). Por lo tanto, en la presente Tesis nos interesamos por estudiar el regulón controlado de forma directa por el TCS BvrR/BvrS. Para ello analizamos en primer lugar la organización transcripcional de los genes *bvrR/bvrS*. En Rhizobiales, se ha observado una sintenia conservada en las regiones genómicas que codifican los ortólogos del TCS BvrR/BvrS y varios genes corriente abajo, algunos de los cuales codifican un PTS relacionado al nitrógeno (PTS^{Ntr}) (Dozot *et al.*, 2010; Bélanger *et al.*, 2013; Sánchez-Cañizares *et al.*, 2020).

El PTS^{Ntr} es un mecanismo de regulación global utilizado para ajustar el metabolismo de acuerdo con las fuentes de carbono y nitrógeno disponibles y, en *Rhizobium leguminosarum*, actúa en conjunto con el TCS (Sánchez-Cañizares *et al.*, 2020). En *B. melitensis*, un estudio previo había demostrado la cotranscripción de los genes que codifican para ambos sistemas (Dozot *et al.*, 2010). Además, otro estudio previo de proteómica intracelular de *B. abortus* a diferentes puntos post-infección en macrófagos había revelado ajustes metabólicos consistentes con las diferentes condiciones encontradas en los compartimentos intracelulares en los cuales transita la bacteria (Lamontagne *et al.*, 2009).

En tiempos tempranos, *B. abortus* reprime la utilización de carbohidratos en el metabolismo del carbono, así como la síntesis de transportadores periplásmicos y proteínas; mientras que activa el uso de fuentes de energía alternativas basadas

principalmente en rutas anapleróticas y generación de glutamato por conversión enzimática de aminoácidos, y un tipo de respiración de baja tensión de oxígeno. Al mismo tiempo, la bacteria cambia la composición de su membrana y restringe la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, probablemente para contrarrestar las condiciones de estrés de la vacuola temprana (Lamontagne *et al.*, 2009). El T4SS VirB y los mecanismos que inhiben la apoptosis son críticos para la sobrevivencia en la BCV, la cual eventualmente se asocia con compartimentos del retículo endoplásmico a través de modificaciones en el LPS, glucanos β -cíclicos y efectores de VirB (Gorvel & Moreno, 2002). Aproximadamente a las 24 h post-infección, al alcanzar el retículo endoplásmico, el metabolismo bacteriano muestra signos de una completa adaptación al tipo de respiración de baja tensión de oxígeno, un aumento en la síntesis de transportadores de aminoácidos, péptidos y hierro. La síntesis de proteínas y ácidos nucleicos se reactiva y la topología de la OM se ajusta al nuevo ambiente. Después de dos días de vida intracelular, la bacteria se ha replicado extensivamente en una vacuola asociada al RE y ha restaurado, a niveles pre-infección, la mayoría de las proteínas diferencialmente expresadas (Lamontagne *et al.*, 2009). Seguidamente, la bacteria alcanza un compartimento con características autofágicas que le permite salir de la célula hospedera e iniciar un nuevo ciclo de infección (Starr *et al.*, 2012).

En la presente Tesis demostramos primeramente la cotranscripción, en *B. abortus* 2308W, de los genes del TCS BvrR/BvrS y el PTS^{Ntr} junto con otros diez genes corriente abajo, lo que implica que ambos sistemas forman parte de un operón de 16 genes en total. Cabe resaltar que la anotación de los genes que componen este operón refleja funciones relacionadas con la transición entre los ambientes extra e intracelular. Adicionalmente, analizamos el grado de conservación de este operón en bacterias filogenéticamente relacionadas, encontrando una mayor sintenia en bacterias que transitan entre nichos extra e intracelulares como parte de su ciclo de vida, en comparación con las intracelulares obligadas, lo cual sugiere que el operón *bvrR/bvrS* es relevante para la adaptación de *Brucella* al ambiente intracelular, lo que a su vez tiene relación con la virulencia.

Por otra parte, una vez descrito el operón *bvrR/bvrS*, nos interesamos por describir el regulón del TCS BvrR/BvrS en condiciones fisiológicamente relevantes. En *B. abortus*, la activación por fosforilación del regulador BvrR es transitoria a lo largo de la curva de crecimiento en medio rico en nutrientes y con pH neutro, pero puede ser inducida por una breve exposición a un medio ácido pobre en nutrientes (Altamirano-Silva *et al.*, 2018). De manera que realizamos un ensayo de ChIP-seq con anticuerpos contra BvrR en cultivos bacterianos crecidos hasta la fase mid-log de la curva de crecimiento y posteriormente expuestos a estrés ácido y nutricional, lo que nos permitió identificar más de 300 regiones genómicas directamente unidas a BvrR. Algunos de estos genes codifican enzimas que participan en vías metabólicas entrelazadas en el metabolismo del carbono y el nitrógeno, lo que refuerza la noción de que el TCS BvrR/BvrS coordina la expresión de genes necesarios para la adaptación al ambiente intracelular.

Entre todos los genes blanco identificados en el análisis de ChIP-Seq, seleccionamos cinco para corroborar por EMSA la unión directa de BvrR a sus regiones corriente arriba. Entre los genes seleccionados se encuentran *virB1*, *bvrR*, *pckA*, *omp25* y *tamA*. Como se comentó en el Capítulo 1, *virB1* y *omp25* han sido respectivamente relacionados con la virulencia y la integridad de la envoltura celular y por esta razón se eligieron para el EMSA. El gen *bvrR* se escogió para corroborar la posibilidad de una autorregulación del TCS, como se ha reportado en otros miembros de la subfamilia de reguladores de respuesta OmpR/PhoB (Haydel *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2006). El gen *pckA* se eligió ya que su expresión aumenta en mutantes por transposición en *bvrR* (Viadas *et al.*, 2010). Este gen se encuentra ubicado corriente arriba de *bvrR* y se transcribe en dirección opuesta (Halling *et al.*, 2005; Suárez-Esquivel *et al.*, 2016). Además, codifica una enzima denominada fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Viadas *et al.*, 2010). En *A. tumefaciens*, la expresión de *pckA* está bajo el control de un ortólogo del TCS BvrR/BvrS y es importante para la virulencia (Liu *et al.*, 2005). En *B. abortus*, *pckA* está anotado como un pseudogen (Suárez-Esquivel *et al.*, 2016). Sin embargo, la enzima de PckA de *B. abortus* conserva el dominio requerido específicamente para la actividad de la

carboxiquinasa, así como el sitio de unión al fosfato y los sitios de unión a ATP y metal, por lo que se especula que podrían ser funcionales (Zúñiga-Ripa *et al.*, 2014). Por último, el gen *tamA* se eligió debido a que está ubicado corriente arriba de *tamB*, cuya expresión está ausente en la cepa vacunal atenuada *B. abortus* S19 (Lamontagne *et al.*, 2009) y disminuida en la mutante por transposición en *bvrR* (Lamontagne *et al.*, 2007). Las proteínas TamA y TamB, están involucradas en biogénesis de la envoltura celular, división celular, virulencia y crecimiento intracelular (Sternon *et al.*, 2018; Bialer *et al.*, 2019).

Por otra parte, también demostramos por EMSA que BvrR no se une a la región corriente arriba del regulador transcripcional *tetR2* (datos no incluidos en la publicación), a diferencia de lo que se ha reportado para los ortólogos de estas dos moléculas en *S. melitoti* (Cuadro 2). Los resultados obtenidos se presentan en el anexo 3, Figura 5. También analizamos genes blanco comunes entre BvrR, VjbR, CtrA, MucR (datos no incluidos en la publicación). Los resultados obtenidos se presentan en el anexo 3, Cuadro 6. Como se puede observar, BvrR presenta una mayor cantidad de genes blanco en común con VjbR (n=29), seguido de CtrA (n=22) y MucR (n=11). Adicionalmente, BvrR-VjbR-CtrA presentan 3 genes blanco en común, principalmente relacionados con el LPS; mientras que BvrR-VjbR-MucR también presentan 3 genes en común, uno de los cuales también está relacionado con el LPS. Estos datos refuerzan la noción de que en *Brucella* se da un control transcripcional muy estricto de los genes implicados en la virulencia, de forma similar a lo que ya se ha reportado para el operón *virB*.

Por último, mediante el uso de una herramienta bioinformática para analizar las secuencias de ADN unidas a BvrR que se determinaron mediante el ensayo de CHIP-seq, generamos un motivo de unión a ADN compuesto por 14 nucleótidos, el cual fue posible localizar en la región promotora de *virB1*, sugiriendo que este motivo tiene relevancia biológica.

3. Artículo científico:

A continuación, se adjunta en pdf el artículo científico publicado en la revista “*PLOS ONE*”, el cual trata sobre el regulón controlado de forma directa por el TCS BvrR/BvrS, reflejando una coordinación de vías metabólicas necesarias para la vida intracelular.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

The regulon of *Brucella abortus* two-component system BvrR/BvrS reveals the coordination of metabolic pathways required for intracellular life

Olga Rivas-Solano¹, Mathilde Van der Henst², Amanda Castillo-Zeledón³, Marcela Suárez-Esquivel³, Lohendy Muñoz-Vargas³, Zeuz Capitan-Barrios^{3*}, Nicholas R. Thomson⁴, Esteban Chaves-Olarte⁵, Edgardo Moreno³, Xavier De Bolle², Caterina Guzmán-Verri^{3*}

1 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, **2** Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes, Université de Namur, Namur, Belgium, **3** Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, **4** Parasites and Microbes from Pathogen Genomics, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, United Kingdom, **5** Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

* Current address: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá, Panamá

* catquz@una.cr



OPEN ACCESS

Citation: Rivas-Solano O, Van der Henst M, Castillo-Zeledón A, Suárez-Esquivel M, Muñoz-Vargas L, Capitan-Barrios Z, et al. (2022) The regulon of *Brucella abortus* two-component system BvrR/BvrS reveals the coordination of metabolic pathways required for intracellular life. *PLoS ONE* 17(9): e0274397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274397>

Editor: Roy Martin Roop, II, East Carolina University Brody School of Medicine, UNITED STATES

Received: March 30, 2022

Accepted: August 26, 2022

Published: September 21, 2022

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274397>

Copyright: © 2022 Rivas-Solano et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Brucella abortus is a facultative intracellular pathogen causing a severe zoonotic disease worldwide. The two-component regulatory system (TCS) BvrR/BvrS of *B. abortus* is conserved in members of the *Alphaproteobacteria* class. It is related to the expression of genes required for host interaction and intracellular survival. Here we report that *bvrR* and *bvrS* are part of an operon composed of 16 genes encoding functions related to nitrogen metabolism, DNA repair and recombination, cell cycle arrest, and stress response. Synteny of this genomic region within close *Alphaproteobacteria* members suggests a conserved role in coordinating the expression of carbon and nitrogen metabolic pathways. In addition, we performed a ChIP-Seq analysis after exposure of bacteria to conditions that mimic the intracellular environment. Genes encoding enzymes at metabolic crossroads of the pentose phosphate shunt, gluconeogenesis, cell envelope homeostasis, nucleotide synthesis, cell division, and virulence are BvrR/BvrS direct targets. A 14 bp DNA BvrR binding motif was found and investigated in selected gene targets such as *virB1*, *bvrR*, *pckA*, *omp25*, and *tamA*. Understanding gene expression regulation is essential to elucidate how *Brucella* orchestrates a physiological response leading to a furtive pathogenic strategy.

Introduction

Brucella spp. are Gram-negative, facultative intracellular *Alphaproteobacteria* related to endosymbionts, animal, and plant pathogens [1]. These organisms cause brucellosis, a worldwide

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting information files](#). ChIP-Seq data have been deposited in the ArrayExpress database at <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-9740>. Supplementary information has been deposited at [10.6084/m9.figshare.19450661](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19450661).

Funding: Fondos del Sistema FEES/CONARE [02-2020 to C.G.-V], Fondos FIDA, Universidad Nacional [SIA 0047-17 to C. G.-V], Espacio Universitario de Estudios Avanzados, UCREA [B8762 and C0456 to E.C.-O] from the presidency of University of Costa Rica, the Vice Presidency for Research, University of Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica (TCR) [15-15-D to O.R.-S], PINN-MICITT [PND-137-15-1 to O.R.-S], Fonds de la Recherche Scientifique-Fonds National de la Recherche Scientifique (F.R.S.-FNRS) [PDR Brucell-cycle T.0060.15 to X.D.B., FRIA Doctoral Grant to M.V.d.H.], and Wellcome Trust Sanger Institute [098051 to N.R.T]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

distributed and neglected zoonotic disease [2]. *Brucella abortus* induces abortion and infertility in cattle. Humans are accidental hosts, showing an acute febrile illness that may persist and evolve into a long-lasting infection with severe complications [2]. *Brucella* pathogenicity resides in its ability to invade, survive, and replicate inside host cells, including professional and non-professional phagocytes [3]. Once inside the cell, the bacterium is found within a membrane-bound compartment avoiding the lysosomal route and redirecting its trafficking to a compartment derived from the endoplasmic reticulum (ER), where it replicates [3]. Eventually, this compartment acquires autophagosome features required for cell egress and spreading [4]. An exhaustive proteomic analysis of bacteria at different time points during macrophage trafficking revealed metabolic adjustments consistent with the different conditions found in the intracellular compartments [5]. Early in infection *B. abortus* 2308 Wisconsin downregulates carbohydrate-based carbon utilization, periplasmic transporters, and protein synthesis. Alternative energy sources based mainly on anaplerotic routes and generation of glutamate by enzymatic conversion of amino acids and low oxygen tension-type of respiration are evident. At the same time, bacteria change their membrane composition and restrict their protein and nucleic acid synthesis, probably reflecting the stress conditions in the shelter vacuole [5]. The type IV secretion system VirB and apoptosis inhibitory mechanisms are critical for the survival within these *Brucella*-containing vacuoles, which in time, associate with compartments of the ER through LPS modifications, beta-cyclic glucans, and VirB effectors [3]. Twenty-four hours after infection, after reaching the ER, bacterial metabolism shows signs of complete adaptation to a low oxygen tension-type of respiration, an increase of transporters involved in the capture of amino acids, peptides and iron. Protein and nucleic acid synthesis resume, and the outer membrane's topology shows signs of changes again according to the new environment. After two days of intracellular life, bacteria extensively replicate in a vacuole associated with the ER, restoring most of the differentially expressed proteins to pre-infection levels [5]. Bacteria then reach an autophagosome-like exit compartment where they are ready to egress from the host cell and start a new infection cycle [4].

Transitioning from an extracellular to an intracellular milieu requires a highly coordinated gene expression achieved through several regulatory mechanisms, including two-component regulatory systems (TCSs): signal transduction systems that allow bacteria to sense and respond to environmental variations [6]. The simplest TCS includes a sensor histidine kinase and a response regulator. When the histidine kinase senses external signals, it autophosphorylates on a conserved histidine residue. Then it transfers the phosphoryl group to a conserved aspartate residue in the response regulator. The phosphorylated form of this protein shows an increased affinity for DNA binding sites, activating or repressing a particular set of genes, which constitute a direct regulon [6].

Alphaproteobacteria closely associated with eukaryotic cells, such as *Bartonella*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, and occasionally *Ochrobactrum*, have ortholog TCS regulating functions involving host-microbe interactions [7, 8]. In *Brucella*, this TCS is BvrR/BvrS. *B. abortus* mutants in *bvrR* and in *bvrS* are avirulent, displaying reduced invasiveness and replication failure in cells and mice [9]. Previous studies showed transient activation of BvrR through phosphorylation in bacteria grown in nutrient-rich media at neutral pH (rich conditions) [10]. Brief exposition to an acidic nutrient-limited media (stress conditions) mimics *B. abortus* intracellular environment and also induces BvrR phosphorylation [10]. Proteomics and transcriptomics studies showed that *B. abortus* BvrR/BvrS is a master regulator of cell envelope homeostasis, carbon and nitrogen metabolism, and virulence-related proteins [11–16]. Accordingly, it regulates the expression of genes coding for outer membrane proteins, such as Omp25 and Omp22, and genes involved in lipid A acylation [12, 13]. In addition, a *bvrR*-

deficient *B. abortus* strain expresses reduced levels of TamB [15], a protein involved with TamA in cell envelope biogenesis, cell division, virulence, and intracellular growth [17, 18].

BvrS likely senses changes in pH and nutrients, such as the acidic and low nutrient environment found during the endosomal route. Activated BvrS triggers a transcriptional response that includes activation of a virulence circuit composed of the phosphorylated cognate regulator BvrR (BvrR-P), the quorum-sensing regulator VjbR and the type IV secretion system VirB (T4SS VirB) required to redirect bacterial trafficking to the ER [19]. Later in infection, BvrR/BvrS also senses environmental cues that reactivate the virulence circuit required to exit the host cell and increase bacterial infectivity [19].

Conserved synteny is observed in Rhizobiales genomic regions encoding ortholog TCS and downstream genes, encoding a nitrogen-related phosphotransferase system (PTS^{Ntr}). The PTS^{Ntr} is a global regulatory mechanism used to reach metabolic fitness according to carbon and nitrogen availability by *Rhizobium leguminosarum* [20] and probably by *Brucella melitensis* [21] and *Sinorhizobium meliloti* [22]. A coordinating role between this TCS and PTS^{Ntr} could allow bacteria to regulate the metabolic crossroad between carbon and nitrogen sources and adjust to the environments encountered during host cell interaction [23]. Recent evidence suggests that in *Rhizobium leguminosarum* this coordination is exerted by direct interaction between PtsN1 and the response regulator ChvI [20].

Here we confirm the relationship between BvrR/BvrS and the Pts^{Ntr} system, showing that *B. abortus* *bvrR* and *bvrS* belong to an operon of 16 genes with conserved synteny in analyzed *Alphaproteobacteria* genomes. Furthermore, we expand our knowledge of the BvrR/BvrS regulon, describing genomic regions bound directly by BvrR-P under conditions that mimic the intracellular environment confronted by *B. abortus* while trafficking to its replicative niche. Some of these regions were related to genes encoding enzymes at the metabolic crossroads of carbon and nitrogen pathways, reinforcing the role that BvrR/BvrS has in the coordination of gene expression required for a successful *B. abortus* infection.

Methods

Bacterial strains and growth conditions

B. abortus 2308 Wisconsin (2308W) was used as a wild-type strain [24], and its derivative *B. abortus* 65.21 *bvrR*::Tn5, a BvrR-deficient strain, was used as control [9]. Both strains were grown at 37°C in Tryptic Soy Broth (TSB), pH 7.2. All procedures involving live *B. abortus* were performed following the “Reglamento de Bioseguridad de la CCSS 39975-0”, 2012, after the “Decreto Ejecutivo #30965-S”, 2002 and research protocol SIA 0652-19 approved by the National University, Costa Rica.

RNA extraction, RT-PCR, and conservation analysis of *bvrR/bvrS* operon

For co-transcriptional analysis of *bvrR* and downstream genes, total RNA isolation and RT-PCR were performed as previously described [11] from *B. abortus* 2308W cultures grown in TSB at the log and stationary growth stages. S1 Table lists the primers used for this purpose. The PCR products were analyzed on agarose gels using standard procedures [25]. The obtained amplicons were sequenced using the Big Dye terminator kit 3.1 (Life Technologies), following manufacturer instructions.

The conservation analysis of the *bvrR/bvrS* operon homologs in representative *Alphaproteobacteria* was performed using BLAST. *B. suis* 1330 genome was used as a reference for this comparison since it has been re-sequenced and is one of the largest *Brucella* genomes.

Artemis [26] and Artemis Comparison Tool were used to visualize the results [27]. The 16S rRNA genes were used for molecular phylogenetic reconstruction by the Maximum Likelihood

method based on the Tamura-Nei model [28] to infer the evolutionary history of the *Alphaproteobacteria* selected genomes. The bootstrap consensus tree inferred from 500 replicates [29] was taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. The analysis involved 17 nucleotide sequences (S2 Table). All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 1191 positions in the final dataset. Consistent with previous reports [30], an outgroup conformed by *Escherichia coli*, *Ralstonia solanaceum*, and *Geobacter sulfurreducens* was introduced in the analysis; however, it was trimmed from the tree to enhance visual resolution. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [31].

The BvrR/BvrS operon was examined through bwa alignment [32] and SMALT v.0.5.8 mapping (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/smalt/>) in 126 *B. abortus* genomes to assess the presence and identity level of the genes included in the region, using as reference a region inferred from *B. suis* 1330. In addition, the number of SNPs, insertions, and deletions in each one of the genes was recorded manually (S3 Table).

ChIP-Seq assay

The ChIP-Seq assay was performed as previously described [33] with the following modifications. The wild-type strain *B. abortus* 2308W and its derivative *bvrR*-mutant strain (negative control) were cultured until the mid-log phase in TSB. The bacterial cultures of each strain were divided into two equal parts. One part of each cultured strain was incubated for five minutes in a nutrient-limited medium (33 mM KH₂PO₄, 60.3 mM K₂HPO₄, 0.1% yeast extract) at pH 5.5 adjusted with citric acid. Those are stress conditions described previously for inducing BvrR phosphorylation [10]. The other part of the cultured strains was incubated in fresh TSB for 5 minutes as an additional control condition in which BvrR phosphorylation was expected to occur only transiently (rich conditions) [10]. Protein-DNA crosslinking was performed as indicated [33] and stopped by adding glycine to a final concentration of 125 mM, as described elsewhere [34]. After adding lysis buffer with lysozyme at 10 mg/ml, bacteria were lysed in the cell Disruptor Genie from Scientific Industries at 2800 rpm for 1 h, at 4°C, followed by overnight incubation with ChIP buffer at 37°C. The lysate was sonicated on ice (Branson Sonifier Digital cell disruptor S-450D 400W) by applying 25 bursts of 30 s at 30% amplitude and 30 s pause. A polyclonal rabbit anti-BvrR antibody [11] and magnetic beads coated with protein A were used for immunoprecipitation. DNA was extracted using a standard protocol of isopropanol precipitation [25]. Library construction and Illumina HiSeq 2500 HT sequencing were performed at Genomics Core Leuven, Belgium. The Bluepippin system (Sage Science) was used to select DNA fragments of approximately 220 bp that were sequenced paired-end.

Sequencing results were analyzed using Bioinformatics tools available on the Galaxy Project platform (<https://usegalaxy.org/>) [35]. The average and variance of reads per nucleotide were calculated in R Studio (<http://www.rstudio.com>) to establish a Z-score measured in terms of standard deviations from the mean, as described elsewhere [33, 36]. For each condition tested, ChIP-Seq signals considered significant were those that met all the following selection criteria: 1. To have a count of reads per nucleotide above the threshold ($Z \geq 3$), 2. To be absent in the negative control, and 3. To have a minimum length of seven consecutive nucleotides. Interactive visualization of the ChIP-Seq signals for the stress condition was constructed using the Bokeh Visualization Library (<http://www.bokeh.pydata.org>), and a custom Python code available at S1 File. Artemis [26] was used to look for the closest genes surrounding the significant signals. For significant ChIP-Seq signals located near the start of two divergent genes, both genes were considered *bonafide* putative BvrR target genes. For significant ChIP-Seq signals located within coding sequences, the corresponding gene and its adjacent downstream gene were considered *bonafide* putative BvrR target genes. The function annotation of all *bonafide*

putative BvrR target genes was manually curated using COG nomenclature and compared between conditions. The *bonafide* putative BvrR target genes found under stress conditions were used as input to perform an in-depth metabolic pathway analysis with BioCyc [37, 38] and manual curation. The DNA sequences of the significant ChIP-Seq signals were extracted from Artemis [26] and used as input for motif discovery with GLAM2 [39] to deduce a consensus sequence recognized by BvrR [40].

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Recombinant BvrR protein was produced and phosphorylated *in vitro* [11]. The direct interaction between BvrR-P and the upstream intergenic region of five selected target genes was analyzed by EMSA as described [10]. The selected target genes were: *tamA* (BAW_10045), *pckA* (BAW_12005), *bvrR* (BAW_12006), *omp25* (BAW_10696) and *virB1* (BAW_20068). The intergenic upstream regions of the 50S ribosomal protein L7/L12 gene *rplL* (BAW_11206) and *dhbR* (BAW_21104) were included as a negative control. DNA probes were prepared by PCR amplification of regions of ≈ 200 bp located upstream of the selected genes with primers listed in the S1 Table. The DIG Gel Shift 2nd Generation Kit[®] (Roche) was used for probe labeling, following manufacturer instructions. For EMSAs involving the *tamA*-probe, the probe was denatured 10 minutes at 95°C before each assay. A 226 bp region from the *virB1* promoter known to bind directly to BvrR [11] was selected to analyze the described DNA binding motif. Ten overlapping oligonucleotides (S1 Table) covering this region were chemically synthesized (≈ 40 bp) (Invitrogen) and used as probes for EMSA as described [10]. Competitive EMSAs were performed as described [10]. Briefly, the digoxigenin-labeled probes tested in the direct EMSA for *tamA*, *omp25*, and *virB1* were incubated with BvrR-P (0.6 μ M) and either an excess of the respective non-labeled probe as a competitor or separately, with an excess of non-labeled negative control probe (*rplL* or *dhb*) as a competitor. Samples were then processed as described for direct EMSAs.

Mapping of transcriptional start sites

Total RNA was extracted from *B. abortus* 2308W as described above [11] and submitted to primer extension analysis according to a previously described protocol [41]. S1 Table lists the primers used for this purpose.

Dnase I footprinting analysis of *virB* upstream region

The same 226 bp amplicon analyzed by EMSA was amplified using primer pvirDownI 5'-FAM labeled (S1 Table) and conditions described previously [42]. The fragment was gel purified with QiaQuick kit (Qiagen) and mixed with BvrR-P as described above for EMSA. The amplicon was digested using Dnase I and sequenced as described [43]. The bases protected from digestion were identified using Peak Scanner software from Applied Biosystems by superimposing the electropherograms of digested and non-digested DNA fragments.

Results

BvrR/BvrS and PTS^{Ntr} form an operon with cell cycle arrest, DNA repair, and stress response genes

In a previous study, co-transcription of *bvrR*, *bvrS*, and four downstream genes encoding a PTS^{Ntr} with regulatory functions was described in *B. melitensis* [21]. Thus, we first investigated if this transcriptional organization was conserved in *B. abortus* 2308W. Co-transcription of

Table 1. Description of the 16 genes that belong to *bvrR/bvrS* operon in *B. abortus* 2308W and correspondence with *B. abortus* 2308 genome.

Name(s)	Function according to genome annotation and literature
BAW_12006, <i>bvrR</i> , BAB1_2092	Two-component transcriptional regulator BvrR [9]
BAW_12007, <i>bvrS</i> , BAB1_2093	Two-component histidine kinase BvrS [9]
BAW_12008, <i>hprK</i> , BAB1_2094	HPr kinase. Participates in the regulation of <i>B. melitensis</i> phospho-transfer system (PTS). The PTSNtr promotes the accumulation of a second messenger called (p)ppGpp in conditions of nitrogen starvation [21, 45]
BAW_12009, BAB1_2095	Predicted protein with unknown function [24]
BAW_12010, <i>ptsM</i> , BAB1_2096	PTS system fructose subfamily transporter subunit IIA [21, 24]
<i>ptsO</i>	NPr phosphocarrier protein.histidine phosphorylation site in HPr protein. Participates in <i>B. melitensis</i> PTS [21, 24]
BAW_12012, BAB1_2098	Pseudogene. Frame shift and important deletion near 5' end; similar to BS1330_12090 and BruAb1_2071 [24]
<i>ahcY</i>	Catalyzes the reversible hydrolysis of S-adenosylhomocysteine (SAH), producing homocysteine and adenosine. These compounds can be used as nitrogen sources during the intracellular life of <i>Brucella</i> spp [24, 46]
BAW_12014, BAB1_2100	Predicted protein with unknown function [24]
BAW_12015, <i>divL</i>	Two-component sensor histidine kinase. Interacts with DivK and CCKA and controls the phosphorylation and proteolysis of CtrA [24, 47]
BAW_12016, BAB1_2102	tRNA threonylcarbamoyladenosine biosynthesis protein TsaE. Participates in the processing of tRNA that read codons beginning with adenine [24]
BAW_12017, BAB1_2103	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase. Participates in amino sugar and sugar nucleotide metabolism (transferase activity). Could participate, redundantly with other genes, in the addition of mannose residues to LPS core structure, which helps to avoid the recognition by complement, antimicrobial peptides and pathogen recognition receptor complexes [24, 48, 49]
<i>addB</i>	ATP-dependent helicase/nuclease subunit B. Participates in DNA repair and recombination [24]
<i>addA</i>	Double-strand break repair helicase AddA. Also named ATP-dependent helicase UvrD/REP. AddA and AddB participate in the maintenance of DNA integrity during oxidative stress associated to a hostile intracellular environment [24, 36, 50]
BAW_12020, BAB1_2106	Predicted protein with unknown function [24]
<i>trx-1</i>	Thioredoxin. Chaperones and folding catalysts. Participates in cell redox homeostasis and stress response. Trx-1 is differentially expressed in the attenuated strain <i>B. abortus</i> S19, which suggests it has a role in bacterial virulence [5, 24]

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274397.t001>

the evolution of some groups. The absence of this operon in *Rickettsiae* and *Wolbachia* is commensurate with the genome reduction observed in these intracellular pathogens, experiencing drastic gene loss [51]. This absence reinforces the idea that the operon is required to transition from extracellular to intracellular environments.

BvrR-P binds directly to genes related to virulence, cell envelope, energy metabolism, and cell division

TCS BvrR/BvrS is a gene master regulator essential for intracellular survival [9, 17]. It contributes to the metabolic fitness required to confront the different environments *Brucellae* encounter during host interaction [15, 16]. However, the genes directly regulated by TCS BvrR/BvrS, i.e., the direct regulon, are unknown. By ChIP-Seq analysis, we described and compared this regulon after exposure to conditions promoting BvrR phosphorylation, such as acidic nutrient-limited medium (stress conditions) and after exposure to rich medium at neutral pH (rich

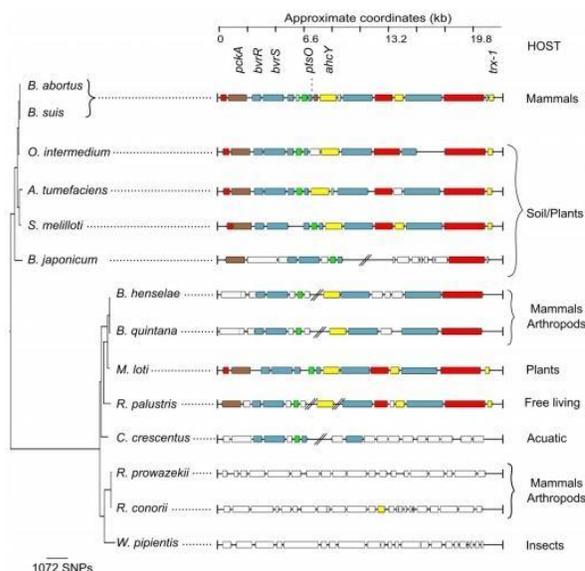


Fig 2. BvrR/BvrS operon synteny analysis within representative Alphaproteobacteria. Genes of *B. suis* 1330 were compared to representative genomes by BLAST and visualized through ACT. Blocks of different colors show the aligned coding sequences (CDs): grey—energy metabolism; red—information transfer (transcription/translation + DNA/RNA modification); green—surface (IM, OM, secreted, surface structures); pink—degradation of small molecules; light blue—regulators; orange—conserved hypothetical. CDs with no similarity with *B. suis* 1330 are white-colored. A Maximum Likelihood phylogenetic reconstruction based on the 16S rRNA gene was used to infer the evolutionary history of Alphaproteobacteria. The analysis involved 17 nucleotide sequences; the outgroup was trimmed from the tree to enhance resolution. There were a total of 1191 positions in the final dataset.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274397.g002>

conditions). Sequencing results generated a sum of reads between 7.6 and 11.91 million per strain per condition tested. After trimming, 67.2–83.7% of the reads per sample were uniquely mapped, as expected for a ChIP-Seq experiment [52]. We corrected the noise signal background using a BvrR deficient strain under both tested conditions.

S1 File includes an interactive visualization of the obtained ChIP-Seq signals under stress conditions and according to the significance criteria described in Methods, after correcting for background noise. This stringent background noise correction lowered the absolute intensity signal; however, 321 ChIP-Seq signals were statistically significant: 63% in chromosome I and 37% in chromosome II (S4 Table). There was a five-fold increase in the number of significant ChIP-Seq signals under stress conditions compared to rich conditions. Analysis of the function category of the closest gene to a significant signal showed that the number of genes in all functional categories detected under rich conditions increased under stress conditions (Fig 3A and S4 Table), an observation that has also been described in other pathogens' TCSs [53]. Functions like energy metabolism and cell cycle control that were undetected under rich conditions appeared under stress conditions. This result suggests that the BvrR/BvrS direct regulon depends on external bacterial conditions. We consistently found significant ChIP-Seq signals surrounding 18 loci regardless of the condition tested (S4 Table). For example, we detected *btaE* encoding for an adhesion molecule required for full virulence and associated with a

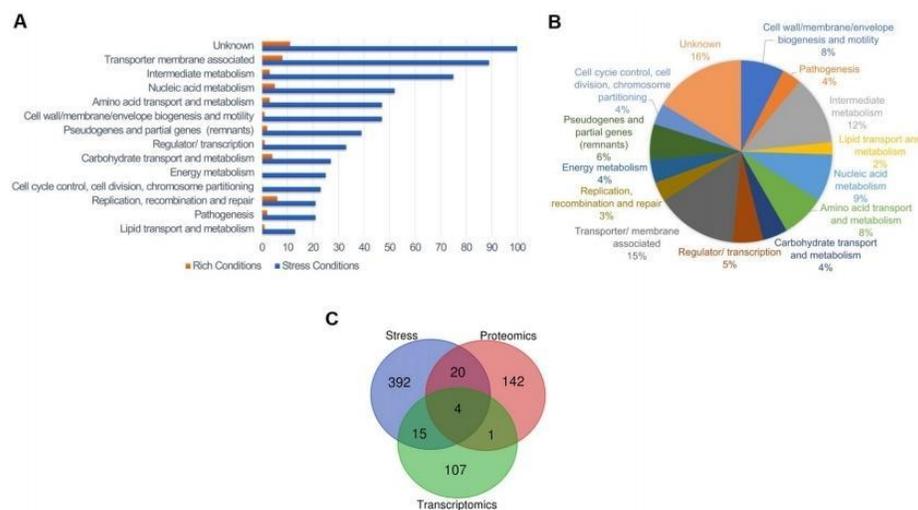


Fig 3. Stress conditions trigger binding of BvrR discriminating according to function. A. Distribution of the total number of significant signals according to the function of the closest gene and tested conditions shows a higher number of genes as BvrR putative targets under stress conditions and that targeting is selective according to function. Binding sites located close to rRNA genes were excluded from the analysis. Orange = Rich conditions. Blue = Stress conditions. B. Proportional distribution of BvrR binding sites according to the function of the closest gene in stress conditions. C. Venn Diagram generated with an online tool (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) and illustrating the relationship between the BvrR target genes inferred in this study and the differentially expressed genes identified in previous proteomics [15] and transcriptomics [16] studies performed with the *B. abortus* 2308 WT and *bvrR::Tn5* strains.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274397.g003>

specific adhesive pole in *B. suis* [54]. Other genes detected were the cyclic beta 1–2 glucan synthetase gene *cgs*, required for virulence in a mice model [55]; its upstream gene encoding an ABC transporter ATPase; and the *omp25* gene, already known to be regulated by BvrR/BvrS [12]. Additionally, the position of the significant signals related to each gene varied according to the external condition tested. In many cases, we found more than one signal close to the same gene (see below).

We detected a significant ($p \leq 0.05$) clustering of genes related to specific metabolic pathways in the dataset obtained under stress conditions (Fig 3B, Table 2). These include glutamate degradation, phospholipid biosynthesis (particularly the phosphatidylserine synthase pathway), UDP-glucose biosynthesis, LPS biosynthesis, and degradation of adenine and adenosine. The following carbohydrate related pathways had significant gene clustering: glycolysis variants, pentose-phosphate, erythritol, glucuronate interconversions, and gluconeogenesis from specific amino acids (e. g. arginine, cysteine, and glutamate). Several links between pathways related to energy metabolism and cell division are evident. GdhZ, part of the Gdh system (GdhZ/GdhA), is fundamental for the metabolic control of cell division [56]. The gene *dxs* encodes a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase linked to the pentose phosphate cycle and nucleotide synthesis and is upstream of *tlyA*, an rRNA methyltransferase related to *ftsI* (BAW_20532). The regulation of *purA*, encoding an adenylosuccinate synthetase, by BvrR seems relevant since we detected five different signals surrounding this gene (Table 3). The enzyme uses aspartate as substrate, linking amino acid pathways to nucleic acid synthesis and cell division due to its clustering with *ade* (Table 2). The gene *omp16*, involved in the

Table 2. Manually curated Biocyc enrichment analysis of metabolic pathways found in the BvrR ChIP-Seq under stress conditions.

Pathways	p-values	# of Bvr binding sites	Genes found near the binding site			
			2308W locus tag	2308 locus tag	Name	Function
L-glutamate degradation	0.009982516	1	BAW_10217	BAB1_0228	<i>gdhA</i>	Glutamate dehydrogenase
		1	BAW_11748	BAB1_1827	<i>gdhZ</i>	NAD-glutamate dehydrogenase
Phospholipid biosynthesis (Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine biosynthesis)	0.009982516	1	BAW_10452	BAB1_0469	<i>psd</i>	Phosphatidylserine decarboxylase
		1	BAW_10453	BAB1_0470	<i>pssA</i>	CDP-alcohol phosphatidyltransferase
		1	BAW_11116	BAB1_1172	ND	phosphatidate cytidyltransferase
		3	BAW_11911	BAB1_1994	ND	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
UDP-alpha-D-glucose biosynthesis	0.009982516	1	BAW_10055	BAB1_0055	<i>pgm</i>	Phosphoglucosaminase catalyzes the interconversion of alpha-D-glucose 1-phosphate to alpha-D-glucose 6-phosphate
		1	BAW_10301	BAB1_0316	<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase
		1	BAW_11625	BAB1_1702	<i>glmM</i>	Phosphoglucosamine mutase, catalyzes the conversion of glucosamine-6-phosphate to glucosamine-1-phosphate. Peptidoglycan precursor biosynthesis.
		2	BAW_20070	BAB2_0070	<i>galU</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
		1	BAW_10506	BAB1_0525	<i>ppdK</i>	Pyruvate phosphate dikinase
Glycolysis variants	0.017889686	1	BAW_11576	BAB1_1650	<i>rbsA-2</i>	Ribose import ATP-binding protein rbsA-2 xyliitol transporter
		2	BAW_11664	BAB1_1741	<i>gap</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
		2	BAW_11665	BAB1_1742	<i>pgk</i>	Phosphoglycerate kinase: G-protein beta WD-40 repeat
		1	BAW_12010	BAB1_2096	ND	PTS system fructose subfamily transporter subunit IIA*
		2	BAW_10366	BAB1_0382	ND	Cysteine desulfurase
		1	BAW_20108	BAB2_0109	<i>gnd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase, catalyzes the formation of D-ribulose 5-phosphate from 6-phospho-D-gluconate*
		1	BAW_10912	BAB1_0951	ND	Class V aminotransferase. Cysteine desulfurase.
		2	BAW_10445	BAB1_0462	<i>dxs</i>	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
Lipopolysaccharide biosynthesis	0.025337795	1	BAW_10036	BAB1_0035	<i>kdsB</i>	CMP-2-keto-3-deoxyoctulosonic acid synthetase, LPS biosynthesis (KDO)*
		1	BAW_11115	BAB1_1171	<i>lpxB</i>	Lipid-A-disaccharide synthase
		1	BAW_11116	BAB1_1172	ND	phosphatidate cytidyltransferase
		2	BAW_20204	BAB2_0209	<i>waaA (kdtA)</i>	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase
Adenine and adenosine salvage	0.027998101	5	BAW_11618	BAB1_1695	<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase, catalyzes the formation of N6-(1,2;-dicarboxyethyl)-AMP from L-aspartate; inosine monophosphate and GTP in AMP biosynthesis*
		1	BAW_11903	BAB1_1986	<i>hpt</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
		1	BAW_20563	BAB2_0587	<i>ade</i>	Adenine deaminase regulator of chromosome condensation

ND: not determined,

*manually inferred

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274397.t002>

invagination of the outer membrane during cell division [33], seems regulated by the TCS; this gene is next to *ftsH*, a protease upregulated during intracellular growth [57]. As anticipated, BvrR/BvrS seems to regulate other metabolic pathways related to membrane composition and virulence (Table 2) [16, 58, 59]. Fig 3C compares the results of this study and those reporting putative BvrR/BvrS targets, using transcriptomic and proteomic analysis of *B. abortus* 2308

and *bvrR* mutant strains. The three studies converged on identifying four common target genes, while our study compared only to proteomics or transcriptomics presented respectively 20 and 15 additional common target genes (S4 Table). Altogether, these results suggest that BvrR/BvrS TCS regulates crucial pathways vital for intracellular trafficking and survival. This is probably achieved by directly regulating enzymes located at crossroads or in tandem within these metabolic pathways [5, 57]. More work is needed to establish whether these *bonafide* BvrR-P binding sites are gene regulation sites.

We manually searched for genes relevant to intracellular survival [5, 16, 46, 75, 76] in this dataset and counted the significant ChIP-Seq signals near them. We identified 71 genes with one and up to five associated significant ChIP-Seq signals (S4 Table). We consider these genes as target genes putatively regulated by BvrR under stress conditions. Table 3 shows a selection of virulence-related genes. The genes with the highest number of binding sites detected (five) are involved in membrane transport and secretion (*virB1*, zinc, and arginine transport) and cell division. We found four binding sites in between *bvrR* and the upstream pseudogene *pckA*. Two genes, *bvrS* and *ftsY* (encoding part of the signal recognition particle), have three BvrR binding sites near them. Other genes related to the BvrR/BvrS and virulence such as *vjbR*, *virB2*, *virB4*, *virB5*, VirB effectors (*btpB*, *bspB*, *vceA*), *ptsH* genes related to flagella, and membrane-associated genes such as *omp25*, *omp16*, *tamA*, *tamB*, *sagB*, and *btaE*, have two or one binding sites near them. Genes related to cell cycle, receptor binding, erythritol metabolism, nickel, manganese, and magnesium transport showed one or two BvrR-P binding sites. Additional genes related to virulence, such as *cgs*, *ppdK*, and *ureC* had one binding site [44, 55, 57, 68, 77]. These observations suggest that the regulation of virulence genes is complex and that bacterial transcription factors do not always behave as per the textbook operon model. The interactions between BvrR-P and its binding sites probably depend on the concentration of BvrR-P at a given moment. The involvement of additional transcription factors might also be possible, as described for *virB* (see below).

To confirm that genes *tamA*, *pckA*, *bvrR*, *omp25*, and *virB1* are direct BvrR-target genes, we evaluated by EMSA the interaction of DNA fragments encoding their upstream intergenic regions with recombinant *in vitro* BvrR-P. As shown in Fig 4A, incubation of BvrR-P with these DNA probes retarded the electrophoretic migration pattern compared to identical probes incubated without the BvrR-P, indicating DNA-protein interaction. We did not observe differences in the migration pattern of the two DNA probes selected as negative controls (*rpL* and *dhbR*). The interaction was specific because an excess of unlabeled control probes did not alter the migration pattern, compared to experiments with an excess of unlabeled target probes (Fig 4B).

In S4 Table, we have included the information obtained after mapping the transcriptional start sites (TSS) of target genes confirmed by EMSA and previously known information about additional TSS. For example, the TSS of *tamA* is downstream of the EMSA binding site, and in the case of *omp25* and *virB1*, the TSS is within the EMSA binding site. Furthermore, through ChIP-Seq, we detected five binding sites related to *virB* (Table 3 and Fig 5F), suggesting that additional TSS located within the coding region could function under different conditions [8, 79].

BvrR recognizes a consensus sequence of at least 14 bp nucleotides long

The sequences of the significant ChIP-Seq signals were used as input for motif discovery with GLAM2 [39] to unveil a possible DNA primary structure pattern recognized by BvrR-P under conditions that mimic the intracellular environment. The 14 nucleotides long DNA binding motif is depicted in Fig 5A, with the last six nucleotides matching a previously reported *in silico*

Table 3. Selection of manually curated genes of interest according to number of significant signals close or within their CDS.

2308W	2308	Name	Function
Genes with 5 binding sites			
BAW_11618	BAB1_1695	<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase, important for virulence [17]
BAW_20068	BAB2_0068	<i>virB1</i>	Type IV secretion system protein VirB1, important for virulence, important for virulence [60]
BAW_11934	BAB1_2018	<i>zntR</i>	Zn responsive regulator of zntA, important for virulence [61]
BAW_11935	BAB1_2019	<i>zntA</i>	Zn exporter, important for virulence [61]
BAW_11873	BAB1_1956	BAW_11873	ABC transporter permease binding-protein dependent transport system inner membrane protein
BAW_11874	BAB1_1957	BAW_11874	Arginine ABC transporter ATP-binding protein
Genes with 4 binding sites			
BAW_12005	BAB1_2090 -BAB1_2091	<i>pckA</i>	Pseudogene. Premature stop codon. Similar to BS1330_12083 and BruAb1_2064; phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP). A <i>pckA</i> mutation in <i>B. abortus</i> 2308 has no effect in Raw 264.7 macrophage intracellular replication and is not attenuated in the mice model
BAW_12006	BAB1_2092	<i>bvrR</i>	Two-component transcriptional regulator BvrR, important for virulence [9]
Genes with 3 binding sites			
BAW_11853	BAB1_1934	<i>ftsY</i>	Cell division protein
BAW_12007	BAB1_2093	<i>bvrS</i>	Two-component histidine kinase BvrS, important for virulence [9]
Genes with 2 binding sites			
BAW_20152	BAB2_0156	<i>flgH</i>	Flagellar basal body L-ring protein, important for virulence [62]
BAW_21057	BAB2_1103	<i>motB</i>	Flagellar motor protein MotB, important for virulence [62]
BAW_10069	BAB1_0069	<i>btaE</i>	Hyaluronate-binding autotransporter adhesin required for virulence, important for virulence [54]
BAW_10727	BAB1_0756	<i>btvB</i>	VirB type IV secreted effector, important for virulence [63]
BAW_20067	BAB2_0067	<i>virB2</i>	Type IV secretion system protein VirB2, important for virulence [60]
BAW_20116	BAB2_0118	<i>vjbR</i>	LuxR family regulatory protein VjbR, important for virulence [64]
BAW_20365	BAB2_0377	<i>eryG; rbsB-2</i>	Erythritol periplasmic binding protein, important for virulence [65]
BAW_20366	BAB2_0378	<i>deoR</i>	DeoR family regulatory protein, erythritol regulator [66]
BAW_20415	BAB2_0432	<i>nikR</i>	Nickel-responsive regulator of nikA, nikB, nikC, nickD and nikE
BAW_20417	BAB2_0435	<i>nickB</i>	Nickel transporter permease NikB
Genes with 1 binding site			
BAW_10106	BAB1_0108	<i>egs</i>	Cyclic beta 1-2 glucan synthetase, important for virulence [67]
BAW_10506	BAB1_0525	<i>ppdK</i>	Pyruvate phosphate dikinase, important for virulence [68]
BAW_20108	BAB2_0109	<i>gnd</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase, catalyzes the formation of D-ribulose 5-phosphate form 6-phospho-D-gluconate
BAW_11379	BAB1_1445	<i>ftsA</i>	Cell division protein FtsA. Is involved in the assembly of the Z ring. May serve as a membrane anchor for the Z ring
BAW_11380	BAB1_1446	<i>ftsQ</i>	Cell division protein FtsQ
BAW_10696	BAB1_0045	<i>tamA</i>	Bacterial surface antigen (D15), important for virulence [17]
BAW_10045	BAB1_0722	<i>omp25</i>	Outer membrane protein Omp25 precursor
BAW_11648	BAB1_1725	<i>motA</i>	Flagellar motor protein MotA, important for virulence [69]
BAW_11649	BAB1_1726	ND	COG1360 Flagellar Motor Protein
BAW_21059	BAB2_1105	<i>fljF</i>	Flagellar MS-ring protein, the MS-ring anchors the flagellum to the cytoplasmic membrane; part of the flagellar basal body which consists of four rings L; P; S; and M mounted on a central rod, important for virulence [62]
BAW_11312	BAB1_1378	<i>ureC</i>	Urease subunit alpha
BAW_11626	BAB1_1703	<i>ftsH</i>	ATP-dependent zinc metalloprotease
BAW_11630	BAB1_1707	<i>omp16</i>	Pal = peptidoglycan-associated lipoprotein; also called omp16
BAW_10046	BAB1_0046	<i>tamB</i>	Autotransporter translocation and assembly factor TamB This protein translocates adhesins and is essential for full virulence and intracellular trafficking, important for virulence [70]
BAW_10686	BAB1_0712	<i>bspB</i>	Type IV secretion effector. This protein mediates inhibition of host secretion, important for virulence [71]
BAW_11394	BAB1_1460	<i>mntH</i>	Manganese transport protein MntH, important for virulence [72]
BAW_11577	BAB1_1652	<i>vceA</i>	VirB type IV secreted effector vceA, important for virulence [73]
BAW_20064	BAB2_0064	<i>virB5</i>	Type IV secretion system protein VirB5, important for virulence [60]

(Continued)

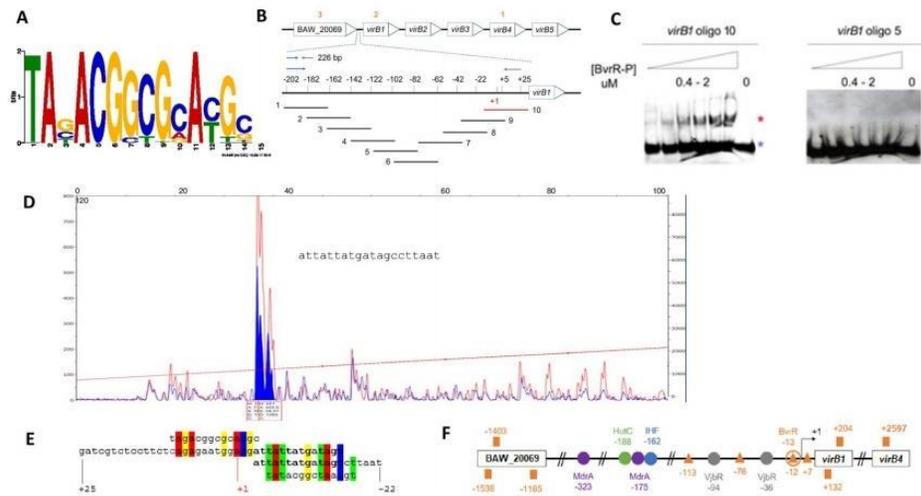


Fig 5. Location of the DNA binding motif recognized by BvrR-P in the promoter region of *virB1*. A. DNA binding motif recognized by BvrR-P under conditions that mimic the intracellular environment obtained using GLAM2 for motif discovery within the significant ChIP-Seq signals dataset. B. Schematic non-scale representation of the *virB* operon and upstream gene BAW_20069. Orange numbers represent each of the three significant ChIP-Seq signals in this region. The zoomed area represents a 226bp *virB1* upstream region, with a promoter region previously reported [42]. Red and black lines represent oligonucleotides that did and did not interact with BvrR-P by EMSA. C. EMSA results for the *virB1*-oligonucleotides number 10 and 5. Red and blue asterisks represent the migration patterns of a protein-DNA complex (shift) and a free probe (no shift). D. DNase I footprinting results using BvrR-P and the 226 bp DNA fragment encoding the *virB1* promoter region. The traces are the DNase I digested DNA fragments incubated with bovine serum albumin as control (red) or with BvrR (blue). Blue-filled peaks represent the DNase I-protected region inferred according to [43]. The panel includes the DNA sequence obtained after Sanger sequencing. E. Sequence alignment between two configurations of the DNA binding motif (first and last line) derived from the motif shown in Fig 5A, the *virB1*-oligonucleotide 10 (second line), and the DNase I-protected region (third line). F. BvrR-P binding sites in the *virB* regulatory region. The orange squares represent the location of ChIP-Seq signals obtained in this study. The orange triangles represent the location of regions with percentages of sequence similarity to the DNA binding motif shown in A, ranging from 50 to 71.43%. The orange circle represents the BvrR-P binding site confirmed by EMSA and DNase I footprinting. The colored circles (purple, green, blue, and gray) represent the binding sites for other transcription factors described to regulate the expression of the *virB* operon [80]. Number coordinates are relative to the transcription start site (black arrow). These results are representative of at least three independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274397.g005>

design and test by EMSA ten overlapping oligonucleotides (Fig 5B) encompassing the 226 bp intergenic upstream region of *virB1*, previously used as a probe (Fig 4A). *VirB1*-oligonucleotide number 10 was the only one interacting with BvrR-P (Fig 5C). DNase I footprinting analysis using BvrR-P and the *virB1* upstream 226 bp fragment confirmed BvrR-P binding (Fig 5D). The protected sequence partially matches *virB1*-oligonucleotide number 10 (Fig 5E, third and second lanes). Additionally, it contains one of the nucleotide sequences with similarity (71.43%) to the DNA binding motif (Fig 5E, third and fourth lanes). Next to the protected sequence, another DNA fragment showed 50% sequence similarity to the DNA binding motif (Fig 5E, second and first lanes), suggesting that alternative DNA binding sites with different affinities might be available under different environmental conditions. Fig 5F shows a schematic representation of the location of the five ChIP-Seq signals found within the vicinity of *virB1* and BAW_20069, the four putative DNA binding motifs found within the *virB* promoter, and the BvrR-P binding site confirmed by EMSA and DNase I footprinting. Fig 5E also shows the location of other binding sites for different transcription factors previously shown to regulate the expression of the *virB* operon. As shown, the ChIP-Seq signals did not match

the location of the biochemically confirmed BvrR-P binding site. The reason why the described binding site found by EMSA and Dnase I footprinting was not detected by ChIP-Seq remains elusive. However, the experimental conditions for EMSA and Dnase I footprinting are by principle different than those of ChIP-Seq. These results contribute to highlighting the complexity of the *virB* promoter fine-tuning expression.

Discussion

In *B. abortus*, the ability to sense environmental changes through BvrR/BvrS TCS is transcriptionally linked to strategic functions for successful trafficking and survival in different milieus [5, 10, 16, 45, 48–50]. Dozot and collaborators demonstrated that in *B. melitensis*, *bvrR* and *bvrS* were transcriptionally coupled to a downstream encoded PTS^{Ntr} with regulatory functions [21]. Our results indicate that BvrR/BvrS TCS is co-transcribed with 14 additional genes in *B. abortus*, independently of the growth stage. The synteny and organization of this operon in some *Alphaproteobacteria* members closely related to *Brucella* suggest that this region is responsible for coordinating the expression of carbon and nitrogen metabolic pathways, according to the energy sources and environmental conditions found during events leading to host association. This observation agrees with recent reports [20].

Orthologs to BvrR/BvrS TCS described in the *Alphaproteobacteria*, required for pathogenic/symbiotic lifestyles, sense and respond to local conditions associated with their specific environments. For example, BatR/BatS from *Bartonella* spp. senses the physiological pH of the mammalian blood (pH 7.4), discriminating the host environment from the arthropod vector and regulating the expression of several virulence genes, like the T4SS VirB and its effectors [82]. In *A. tumefaciens*, ChvG/ChvI is essential for membrane integrity, virulence, and bacterial growth under acidic conditions [83]. In the plant endosymbiont *S. meliloti*, the TCS ExoS/ChvI is essential to establish endosymbiosis [84, 85]. Interestingly, this transcriptional organization is not conserved in all the *Alphaproteobacteria*, which correlates with the group evolution and lifestyles. Intracellular bacteria associated with invertebrates, animals, humans, or both have evolved by gene loss, such as *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp., and *Wolbachia* spp., intracellular pathogens with smaller genomes than *Brucella* spp., a facultative intracellular extracellular parasite [10, 86].

During intracellular stages, it is likely that *B. abortus* grows using a low oxygen tension type of respiration with a rate reduction of central carbon metabolic pathways, such as the TCA cycle, the pentose phosphate pathway, and decrease of periplasmic transporters. When sugar supplies are limited, the bacterium switches to anaplerotic routes increasing amino acid catabolism. Therefore, glutamate fuels the TCA as an energy source, and role of the glyoxylate shunt is minimum [5, 46, 76]. As in *Rhizobium* species, glutamate could be used as carbon, nitrogen, and energy source. This double role of glutamate can be explained by its connection with the TCA cycle, gluconeogenesis, and the urea cycle [46, 56].

The TCS BvrR/BvrS could regulate these energy pathways in a temporal and spatial simultaneous fashion since most of the described target genes are at these pathways' crossroads or in tandem. The proposed model of energy influx [76, 87] agrees with our results (Fig 6). Due to a lack of phosphofructokinase, glycolysis is unlikely to be active in *B. abortus*. Accordingly, in zoonotic *Brucella*, the pentose phosphate pathway fuels the TCA cycle for glucose oxidation [88, 89]. Phosphorylated glucose enters the pentose cycle to produce glyceraldehyde-3-phosphate, channeled into the TCA via pyruvate. The TCS BvrR/BvrS also controls sugar transporters (PTS) genes as well as the metabolism of erythritol and xylitol. These monosaccharides can enter the pentose phosphate pathway. The energy pathways under BvrR/BvrS control probably include anaplerotic routes using glutamate and other gluconogenic amino acids (arginine,

an incomplete LPS core and is defective in synthesizing periplasmic β -glucans [59, 91]. Expression of this enzyme increases when erythritol is present and is highly increased during intracellular *Brucella* stages [5].

Genes related to virulence show direct binding to BvrR-P, including the BvrR/BvrS operon itself. Some new BvrR-P virulence-related targets are unveiled, reinforcing the idea that BvrR/BvrS coordinates the expression of virulence traits according to environmental signals. Some of these targets were selected to confirm the direct and specific binding of BvrR-P to their upstream regions by EMSA and Dnase I footprinting. Transcription of the T4SS VirB is tightly controlled as *Brucella* transit in different intracellular compartments [4, 92]. Several regulators have been implicated in the expression of the *virB* operon besides BvrR [34, 42, 93–96], suggesting that the expression of *virB* is regulated through an intricate regulatory network as depicted in Fig 5F. Five putative binding sites were detected related to *virB* by ChIP-Seq. Additionally, four regions with sequence similarity to the DNA binding motif were identified within the *virB1* promoter, and one of them was confirmed as a BvrR-binding site by biochemical means. These binding sites show different degrees of similarity to the obtained consensus sequence, suggesting that the affinity of BvrR-P for these sites might play a role in controlling *virB* transcription in coordination with other regulatory molecules previously described [75]. The detection of more than one significant ChIP-Seq signal close to a gene, including some within the coding region and even at the 3' end of the coding region, is opening possibilities for further research related to the role of antisense transcription [97] within the BvrR/BvrS regulon, the presence of gene overlapping [98] and non-conventional promoter structure [99] in *Brucella*. To our knowledge, transcription could be promoted from unusual sites, and multiple binding sites could be needed for optimal binding. Some activators are known to bind to unusual regions and induce promoter activity, as it has been described for other bacterial pathogens [100, 101]. PhoP of *B. subtilis* is a response regulator for phosphate starvation, which induces activation of *pstS* by binding to an upstream region (-40 to -132) and a coding region (+17 to +270) required for complete promoter activity. In addition, the coding region box had a low affinity for PhoP-P, suggesting a dynamic DNA-protein binding, in which the regulator is required to start transcription [102]. Global regulators are known to bind to a collection of sites, and the regulatory effect on each binding site would be dependent on the protein concentration at any given moment, its affinity, and additional transcription factors. Hence, they can be activators, repressors, have dual regulatory roles, or have no described regulatory function [103–107].

In *Salmonella*, the global response regulator OmpR activates the expression of SsrAB, a two-component system located on the pathogenicity island 2 (SPI-2). Several OmpR binding sites were found upstream of *ssrA* and upstream and within the *ssrB* coding sequence [108–110].

The BvrR binding sites described in this work should be considered *bonafide* putative gene regulation sites. Some of these regions have been previously identified as putative BvrR/BvrS targets [15, 16] and deserve further investigation. Additionally, to our knowledge, very few *Brucella* promoter regions have been functionally characterized; hence, this essential information to unveil the mechanisms of gene regulation is missing. In this sense, confirmation of the role of each BvrR-P binding site, by itself or in combination with other BvrR-P binding sites or additional regulatory mechanisms, as well as gene promoter characterization, certainly will shed some light on understanding this complex phenomenon.

The work presented here helps to understand how a conserved TCS contributes to the dynamics and complex gene regulatory functions during host-microbe interactions. BvrR/BvrS seems to contribute to metabolic fitness at several levels: i) regulating specific carbon and nitrogen pathways via interaction with a Pts^{Ntr} co-transcribed system, ii) by direct interaction

with genetic regions coding for enzymes located at the crossroads of these specific pathways, iii) possible interaction of different BvrR-P binding sites according to BvrR-P concentration and presence of additional transcriptional factors known to be involved in this process and iv) adjusting the target genes according to the external bacterial conditions. Further work is needed to understand the role of BvrR/BvrS in the *Brucella* life cycle. Similar metabolic controls might be present in other *Alphaproteobacteria* living in close association with cells.

Supporting information

S1 Raw images. Raw gels and EMSAs from this study.

(PDF)

S1 Table. List of oligonucleotides used in this study.

(PDF)

S2 Table. Genomes used for α -Proteobacteria phylogenetic reconstruction.

(PDF)

S3 Table. WGS-Metadata_operon.

(XLSX)

S4 Table. ChIP-seq analysis results.

(XLSX)

S1 File. Interactive visualization of all the ChIP-seq signals obtained under stress conditions. The X-axis displays the number of reads per nucleotide, and the Y-axis shows the coordinates of the *Brucella abortus* 2308 W genome (3.26 Mb). Significant signals are colored in yellow and non-significant signals in blue. Significant signals have reads per nucleotide above the threshold ($Z \geq 3$), are absent in the BvrR-deficient strain (negative control), and have a minimum length of seven consecutive nucleotides. The graphic below displays all the signals in a condensed fixed version, while the graphic above zooms in the region delimited by the selection box. The selection box is represented in the graphic below by a blue rectangle surrounded by a dotted line. To zoom other regions, drag the selection box's middle or edges in the graphic below. As shown in this visualization, having a negative control allowed us to confidently discriminate between significant and non-significant signals, regardless of their Z-score or size in nucleotides. We recommend visualization using Mozilla Firefox.
(ZIP)

Acknowledgments

We thank Reynaldo Pereira-Reyes for his technical assistance with Dnase I footprinting and the purification of recombinant BvrR for EMSA experiments. We also thank Gustavo Segura-Umaña for his help with the interactive visualization of the genomic regions considered to be bound to BvrR under stress conditions.

Author Contributions

Conceptualization: Xavier De Bolle, Caterina Guzmán-Verri.

Data curation: Olga Rivas-Solano, Mathilde Van der Henst, Amanda Castillo-Zeledón, Marcela Suárez-Esquivel, Lohendy Muñoz-Vargas, Zeuz Capitan-Barrios, Caterina Guzmán-Verri.

Formal analysis: Olga Rivas-Solano, Mathilde Van der Henst, Amanda Castillo-Zeledón, Marcela Suárez-Esquivel, Lohendy Muñoz-Vargas, Zeuz Capitan-Barrios, Caterina Guzmán-Verri.

Funding acquisition: Olga Rivas-Solano, Nicholas R. Thomson, Esteban Chaves-Olarte, Edgardo Moreno, Xavier De Bolle, Caterina Guzmán-Verri.

Investigation: Olga Rivas-Solano, Mathilde Van der Henst, Amanda Castillo-Zeledón, Marcela Suárez-Esquivel, Lohendy Muñoz-Vargas, Zeuz Capitan-Barrios, Caterina Guzmán-Verri.

Project administration: Xavier De Bolle, Caterina Guzmán-Verri.

Resources: Nicholas R. Thomson, Esteban Chaves-Olarte, Edgardo Moreno, Xavier De Bolle, Caterina Guzmán-Verri.

Supervision: Xavier De Bolle, Caterina Guzmán-Verri.

Validation: Olga Rivas-Solano, Mathilde Van der Henst, Amanda Castillo-Zeledón, Marcela Suárez-Esquivel, Lohendy Muñoz-Vargas, Zeuz Capitan-Barrios, Caterina Guzmán-Verri.

Visualization: Olga Rivas-Solano, Amanda Castillo-Zeledón, Marcela Suárez-Esquivel.

Writing – original draft: Olga Rivas-Solano, Amanda Castillo-Zeledón, Caterina Guzmán-Verri.

Writing – review & editing: Olga Rivas-Solano, Mathilde Van der Henst, Marcela Suárez-Esquivel, Lohendy Muñoz-Vargas, Zeuz Capitan-Barrios, Nicholas R. Thomson, Esteban Chaves-Olarte, Edgardo Moreno, Xavier De Bolle, Caterina Guzmán-Verri.

References

- Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol.* 1990; 172: 3569–3576. <https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3569-3576.1990> PMID: 2113907
- Spink WW. *The Nature of Brucellosis.* Minneapolis: U of Minnesota Press.; 1956.
- Gorvel JP, Moreno E. *Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00214-6)
- Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic.* 2008; 9: 678–694. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x> PMID: 18266913
- Lamontagne J, Forest A, Marazzo E, Denis F, Butler H, Michaud JF, et al. Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J Proteome Res.* 2009; 8: 1594–1609. <https://doi.org/10.1021/pr800978p> PMID: 19216536
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69: 183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183> PMID: 10966457
- Batut J, Andersson SGE, O’Callaghan D. The evolution of chronic infection strategies in the α -Proteobacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2: 933–945. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1044> PMID: 15550939
- Heavner ME, Qiu WG, Cheng HP. Phylogenetic co-occurrence of ExoR, ExoS, and ChvI, components of the RSI bacterial invasion switch, suggests a key adaptive mechanism regulating the transition between free-living and host-invading phases in Rhizobiales. *PLoS One.* 2015; 10: 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135655> PMID: 26309130
- Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, et al. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol.* 1998; 29: 125–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00913.x> PMID: 9701808
- Altamirano-Silva P, Meza-Torres J, Castillo-Zeledón A, Ruiz-Villalobos N, Zufiga-Pereira AM, Chacón-Díaz C, et al. *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the BvrR/BvrS two-

- component system, which allows *B. abortus* to adapt to its replicative niche. *Infect Immun*. 2018; 86: 1–15. <https://doi.org/10.1128/IAI.00713-17> PMID: 29378792
11. Martínez-Núñez C, Altamirano-Silva P, Alvarado-Guillén F, Moreno E, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E. The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J Bacteriol*. 2010; 192: 5603–5608. <https://doi.org/10.1128/JB.00567-10> PMID: 20833814
 12. Guzmán-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckeaert A, Garin J, et al. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 12375–12380. <https://doi.org/10.1073/pnas.192439399> PMID: 12218183
 13. Manterola L, Moriyón I, Moreno E, Sola-Landa A, Weiss DS, Koch MHJ, et al. The Lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR Mutants Contains Lipid A Modifications and Has Higher Affinity for Bactericidal Cationic Peptides. *Microbiology*. 2005; 187: 5631–5639.
 14. Manterola L, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Barquero-Calvo E, de Miguel MJ, Moriyón I, et al. BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect Immun*. 2007; 75: 4867–4874. <https://doi.org/10.1128/IAI.00439-07> PMID: 17664262
 15. Lamontagne J, Butler H, Chaves-Olarte E, Hunter J, Schirm M, Paquet C, et al. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res*. 2007; 6: 1519–1529. <https://doi.org/10.1021/pr060636a> PMID: 17343405
 16. Viadas C, Rodríguez MC, Sangari FJ, Gorvel JP, García-Lobo JM, López-Gofi I. Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One*. 2010; 5: 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010216> PMID: 20422049
 17. Sternon JF, Godessart P, de Freitas RG, van der Henst M, Poncin K, Francis N, et al. Transposon sequencing of *Brucella abortus* uncovers essential genes for growth in vitro and inside macrophages. *Infect Immun*. 2018; 86: 1–20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00312-18> PMID: 29844240
 18. Bialer MG, Ruiz-Ranwez V, Sycz G, Estein SM, Russo DM, Altabe S, et al. MapB, the *Brucella suis* TamB homologue, is involved in cell envelope biogenesis, cell division and virulence. *Sci Rep*. 2019; 9: 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37668-3> PMID: 30770847
 19. Altamirano-Silva P, Cordero-Serrano M, Méndez-Montoya J, Chacón-Díaz C, Guzmán-Verri C, Moreno E, et al. Intracellular Passage Triggers a Molecular Response in *Brucella abortus* That Increases Its Infectiousness. *Infect Immun*. 2021; 89. <https://doi.org/10.1128/iai.00004-21> PMID: 33820813
 20. Sánchez-Cañizares C, Prell J, Pini F, Rutten P, Kraxner K, Wynands B, et al. Global control of bacterial nitrogen and carbon metabolism by a PTSNtr-regulated switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; 117: 10234–10245. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917471117> PMID: 32341157
 21. Dozot M, Poncet S, Nicolas C, Copin R, Bouraoui H, Mazé A, et al. Functional characterization of the incomplete phosphotransferase system (PTS) of the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PLoS One*. 2010; 5: 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012679> PMID: 20844759
 22. Bélanger L, Charles TC. Members of the *Sinorhizobium meliloti* ChvI regulon identified by a DNA binding screen. *BMC Microbiol*. 2013; 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-132> PMID: 23758731
 23. Boël G, Mijakovic I, Mazé A, Poncet S, Taha MK, Larribe M, et al. Transcription regulators potentially controlled by HPr kinase/phosphorylase in gram-negative bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2003; 5: 206–215. <https://doi.org/10.1159/000071072> PMID: 12867744
 24. Suárez-Esquivel M, Ruiz-Villalobos N, Castillo-Zeledón A, Jiménez-Rojas C, Roop RM, Comerç DJ, et al. *Brucella abortus* strain 2308 Wisconsin genome: Importance of the definition of reference strains. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01557> PMID: 27746773
 25. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold spring harbor laboratory press.; 1989.
 26. Rutherford KM, Parkhill J, Crook J, Hornsnel T, Rice P, Rajandream MA, et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 2000; 16: 944–945. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.10.944> PMID: 11120685
 27. Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG, Parkhill J. ACT: The Artemis comparison tool. *Bioinformatics*. 2005; 21: 3422–3423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti553> PMID: 15976072
 28. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*. 1993; 10: 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023> PMID: 8336541

29. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* (N Y). 1985; 39: 783. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x> PMID: 28561359
30. Williams KP, Sobral BW, Dickerman AW. A robust species tree for the Alphaproteobacteria. *J Bacteriol.* 2007; 189: 4578–4586. <https://doi.org/10.1128/JB.00269-07> PMID: 17483224
31. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33: 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054> PMID: 27004904
32. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009; 25: 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352> PMID: 19505943
33. Francis N, Poncin K, Fioravanti A, Vassen V, Willemart K, Ong TAP, et al. CtrA controls cell division and outer membrane composition of the pathogen *Brucella abortus*. *Mol Microbiol.* 2017; 103: 780–797. <https://doi.org/10.1111/mmi.13589> PMID: 27893179
34. Kleinman CL, Sycz G, Bonomi HR, Rodriguez RM, Zorreguieta A, Sieira R. ChIP-seq analysis of the LuxR-type regulator VjbR reveals novel insights into the *Brucella* virulence gene expression network. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: 5757–5769. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx165> PMID: 28334833
35. Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Čech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: 1–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw343> PMID: 27137889
36. Poncin K, Roba A, Jimmidì R, Potemberg G, Fioravanti A, Francis N, et al. Occurrence and repair of alkylating stress in the intracellular pathogen *Brucella abortus*. *Nat Commun.* 2019; 10: 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12516-8> PMID: 31649248
37. Karp PD, Billington R, Caspi R, Fulcher CA, Latendresse M, Kothari A, et al. The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Brief Bioinform.* 2017; 20: 1085–1093. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx085> PMID: 29447345
38. Caspi R, Billington R, Ferrer L, Foerster H, Fulcher CA, Keseler IM, et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: D471–D480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1164> PMID: 26527732
39. Frith MC, Saunders NFW, Kobe B, Bailey TL. Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. *PLoS Comput Biol.* 2008; 4: e1000071. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000071> PMID: 18437229
40. Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, et al. MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: 202–208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335> PMID: 19458158
41. Lloyd AL, Marshall BJ, Mee BJ. Identifying cloned *Helicobacter pylori* promoters by primer extension using a FAM-labelled primer and GeneScan[®] analysis. *J Microbiol Methods.* 2005; 60: 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.10.009> PMID: 15649531
42. Sieira R, Comerici DJ, Pietrasanta LI, Ugalde RA. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus virB* operon. *Mol Microbiol.* 2004; 54: 808–822. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04316.x> PMID: 15491369
43. Zianni M, Tessanne K, Merighi M, Laguna R, Tabita FR. Identification of the DNA bases of a DnaE I footprint by the use of dye primer sequencing on an automated capillary DNA analysis instrument. *J Biomol Tech.* 2006; 17: 103–113. PMID: 16741237
44. Zúñiga-Ripa A, Barbier T, Lázaro-Antón L, de Miguel MJ, Conde-álvarez R, Muñoz PM, et al. The fast-growing *Brucella suis* Biovar 5 depends on phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate phosphate dikinase but not on Fbp and GlpX fructose-1,6-bisphosphatases or isocitrate lyase for full virulence in laboratory models. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00641> PMID: 29675004
45. Ronneau S, Caballero-Montes J, Coppine J, Mayard A, Garcia-Pino A, Hallez R. Regulation of (p)ppGpp hydrolysis by a conserved archetypal regulatory domain. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47: 843–854. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1201> PMID: 30496454
46. Ronneau S, Moussa S, Barbier T, Conde-Álvarez R, Zuniga-Ripa A, Moriyon I, et al. *Brucella*, nitrogen and virulence. *Crit Rev Microbiol.* 2014; 42: 507–525. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.962480> PMID: 25471320
47. de Bolle X, Crosson S, Matroule JY, Letesson JJ. *Brucella abortus* Cell Cycle and Infection Are Coordinated. *Trends in Microbiology.* 2015; 23: 812–821. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.09.007> PMID: 26497941

48. de Barsey M, Mirabella A, Letesson JJ, de Bolle X. A *Brucella abortus* *cstA* mutant is defective for association with endoplasmic reticulum exit sites and displays altered trafficking in HeLa cells *Microbiology* (N Y). 2012; 158: 2610–2618. <https://doi.org/10.1099/mic.0.060509-0> PMID: 22820839
49. Conde-Álvarez R, Arce-Gorvel V, Iriarte M, Manček-Keber M, Barquero-Calvo E, Palacios-Chaves L, et al. The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS Pathog*. 2012; 8: e1002675. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002675> PMID: 22589715
50. Mertens K, Lantsheer L, Ennis DG, Samuel JE. Constitutive SOS expression and damage-inducible AddAB-mediated recombinational repair systems for *Coxiella burnetii* as potential adaptations for survival within macrophages. *Mol Microbiol*. 2008; 69: 1411–1426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06373.x> PMID: 18647165
51. Moreno E. Genome evolution within the alpha Proteobacteria: Why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev*. 1998; 22: 255–275. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00370.x> PMID: 9862123
52. Bailey T, Krajewski P, Ladunga I, Lefebvre C, Li Q, Liu T, et al. Practical Guidelines for the Comprehensive Analysis of ChIP-seq Data. *PLoS Comput Biol*. 2013; 9: 5–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003326> PMID: 24244136
53. Chakraborty S, Kenney LJ. A new role of OmpR in acid and osmotic stress in *Salmonella* and *E. coli*. *Front Microbiol*. 2018; 9: 2656. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02656> PMID: 30524381
54. Ruiz-Ranwez V, Posadas DM, van der Henst C, Estein SM, Arocena GM, Abdian PL, et al. BtaE, an adhesin that belongs to the trimeric autotransporter family, is required for full virulence and defines a specific adhesive pole of *Brucella suis*. *Infect Immun*. 2013; 81: 996–1007. <https://doi.org/10.1128/IAI.01241-12> PMID: 23319562
55. Briones G., Iñón de Iannino N., Roset M., Viggliocco A., Silva Paulo P., and Ugalde RA. *Brucella abortus* Cyclic b-1,2-Glucan Mutants Have Reduced Virulence in Mice and Are Defective in Intracellular Replication in HeLa Cells. *Infect Immun*. 2001; 69: 4528–4535.
56. Beaufay F, de Bolle X, Hallez R. Metabolic control of cell division in α -proteobacteria by a NAD-dependent glutamate dehydrogenase. *Commun Integr Biol*. 2016; 9: 1–5. <https://doi.org/10.1080/19420889.2015.1125052> PMID: 27066186
57. Roset MS, Aefantis TG, Delvecchio VG, Briones G. Iron-dependent reconfiguration of the proteome underlies the intracellular lifestyle of *Brucella abortus*. *Sci Rep*. 2017; 7: 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11283-0> PMID: 28878308
58. Bukata L, Altabe S, de Mendoza D, Ugalde RA, Comerci DJ. Phosphatidylethanolamine synthesis is required for optimal virulence of *Brucella abortus*. *J Bacteriol*. 2008; 190: 8197–8203. <https://doi.org/10.1128/JB.01069-08> PMID: 18931122
59. Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamón MS, Ugalde RA. Evaluation of *Brucella abortus* Phosphoglucosyltransferase (pgm) Mutant as a New Live Rough-Phenotype Vaccine. *Infect Immun*. 2003; 71: 6264–6269. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6264-6269.2003> PMID: 14573645
60. Sieira R, Comerci DJ, Sanchez DO, Ugalde RA. A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol*. 2000; 182: 4849–4855. <https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4849-4855.2000> PMID: 10940027
61. Sheehan LM, Budnick JA, Roop RM, Caswell CC. Coordinated zinc homeostasis is essential for the wild-type virulence of *Brucella abortus*. *J Bacteriol*. 2015; 197: 1582–1591. <https://doi.org/10.1128/JB.02543-14> PMID: 25691532
62. Fretin D, Fauconnier A, Köhler S, Halling S, Léonard S, Nijskens C, et al. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol*. 2005; 7: 687–698. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00502.x> PMID: 15839898
63. Salcedo SP, Marchesini MI, Degos C, Terwagne M, von Bargen K, Lepidi H, et al. BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 4: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00028> PMID: 23847770
64. Delrue RM, Deschamps C, Léonard S, Nijskens C, Danese I, Schaus JM, et al. A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol*. 2005; 7: 1151–1161. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00543.x> PMID: 16008582
65. Crasta OR, Folkerts O, Fei Z, Mane SP, Evans C, Martino-Catt S, et al. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes *PLoS One*. 2008; 3: e2193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002193> PMID: 18478107
66. Haine V, Sinon A, van Steen F, Rousseau S, Dozot M, Lestrade P, et al. Systematic Targeted Mutagenesis of *Brucella melitensis* 16M Reveals a Major Role for GntR Regulators in the Control of Virulence. *Infect Immun*. 2005; 73: 5578–5586.

67. Ciocchini AE, Roset MS, Briones G, Iñón de Iannino N, Ugalde RA. Identification of active site residues of the inverting glycosyltransferase Cgs required for the synthesis of cyclic β -1,2-glucan, a *Brucella abortus* virulence factor. *Glycobiology*. 2006; 16: 679–691. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj113> PMID: 16603625
68. Zúñiga-Ripa A, Barbier T, Conde-Álvarez R, Martínez-Gómez E, Palacios-Chaves L, Gil-Ramírez Y, et al. *Brucella abortus* depends on pyruvate phosphate dikinase and malic enzyme but not on fbp and glpX fructose-1,6-bisphosphatases for full virulence in laboratory models *J Bacteriol*. 2014; 196: 3045–3057. <https://doi.org/10.1128/JB.01663-14> PMID: 24936050
69. Tian M, Qu J, Li P, Bao Y, Liu J, Ding C, et al. Identification of novel genes essential for *Brucella abortus* to establish infection by signature-tagged mutagenesis. *Vet Microbiol*. 2019; 230: 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.005> PMID: 30827378
70. Lamontagne J, Béland M, Forest A, Côté-Martin A, Nassif N, Tomaki F, et al. Proteomics-based confirmation of protein expression and correction of annotation errors in the *Brucella abortus* genome. *BMC Genomics* 2010; 11: 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-300> PMID: 20462421
71. Myeni S, Child R, Ng TW, Kupko JJ, Wehrly TD, Porcella SF, et al. *Brucella* Modulates Secretory Trafficking via Multiple Type IV Secretion Effector Proteins. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003556. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003556> PMID: 23950720
72. Anderson ES, Paulley JT, Gaines JM, Valderas MW, Martin DW, Menscher E, et al. The manganese transporter MntH is a critical virulence determinant for *Brucella abortus* 2308 in experimentally infected mice. *Infect Immun*. 2009; 77: 3466–3474. <https://doi.org/10.1128/IAI.00444-09> PMID: 19487482
73. de Jong MF, Sun YH, den Hartigh AB, van Dijk JM, Tsolis RM. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol*. 2008; 70: 1378–1396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06487.x> PMID: 19019140
74. Paulley JT, Anderson ES, Roop RM. *Brucella abortus* requires the heme transporter BhuA for maintenance of chronic infection in BALB/c mice. *Infect Immun*. 2007; 75: 5248–5254. <https://doi.org/10.1128/IAI.00460-07> PMID: 17709407
75. Roop RM, Barton IS, Hoppersberger D, Martin DW. Uncovering the Hidden Credentials of *Brucella* Virulence. *Microbiol Molec Biol Rev*. 2021; 85: 1–45. <https://doi.org/10.1128/mmlbr.00021-19> PMID: 33568459
76. Barbier T, Zúñiga-Ripa A, Moussa S, Plovier H, Steron JF, Lázaro-Antón L, et al. *Brucella* central carbon metabolism: an update. *Crit Rev Microbiol*. 2018; 44: 182–211. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332002> PMID: 28604247
77. Paixão TA, Roux CM, den Hartigh AB, Sankaran-Walters S, Dandekar S, Santos RL, et al. Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infect Immun*. 2009; 77: 4197–4208. <https://doi.org/10.1128/IAI.00417-09> PMID: 19651862
78. Heinz E, Selkrig J, Belousoff MJ, Lithgow T. Evolution of the translocation and assembly module (TAM). *Genome Biol Evol*. 2015; 7: 1628–1643. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv097> PMID: 25994932
79. Mendoza-Vargas A, Olvera L, Olvera M, Grande R, Vega-Alvarado L, Taboada B, et al. Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*. *PLoS One*. 2009; 4: e7526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007526> PMID: 19838305
80. Sieira R. Regulation of virulence in *Brucella*: an eclectic repertoire of transcription factors defines the complex architecture of the *virB* promoter. *Future Microbiol*. 2013; 8: 1193–1208. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.83> PMID: 24020745
81. Ramírez-González EA, Moreno-Lafont MC, Méndez-Tenorio A, Cancino-Díaz ME, Estrada-García I, López-Santiago R. Prediction of structure and molecular interaction with DNA of BvrR, a virulence-associated regulatory protein of *Brucella*. *Molecules*. 2019; 24: 3137–3151. <https://doi.org/10.3390/molecules24173137> PMID: 31470504
82. Quebatte M, Dehio M, Tropel D, Basler A, Toller I, Raddatz G, et al. The BatR/BatS two-component regulatory system controls the adaptive response of *Bartonella henselae* during human endothelial cell infection. *J Bacteriol*. 2010; 192: 3352–3367. <https://doi.org/10.1128/JB.01676-09> PMID: 20418395
83. Wu CF, Lin JS, Shaw GC, Lai EM. Acid-Induced Type VI Secretion System Is Regulated by ExoR-ChvG/ChvI Signaling Cascade in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS Pathog*. 2012; 8: e1002938. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002938> PMID: 23028331
84. Cheng HP, Walker GC. Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J Bacteriol*. 1998; 180: 20–26. <https://doi.org/10.1128/jb.180.1.20-26.1998> PMID: 9422587

85. Bélanger L, Dimmick KA, Fleming JS, Charles TC. Null mutations in *Sinorhizobium meliloti* *exoS* and *chvI* demonstrate the importance of this two-component regulatory system for symbiosis. *Mol Microbiol*. 2009; 74: 1223–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06931.x> PMID: 19843226
86. Moreno E, Moriyón I. *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 1–3.
87. Moreno E, Moriyón I. The genus *Brucella*. Vol 5. In: Dorkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH S E, editor. *The prokaryotes*. Vol 5. New York: Springer-Verlag; 2006. pp. 315–456.
88. Gottschalk G. Regulation of Bacterial Metabolism. *Bacterial Metabolism*. Springer, New York, NY; 1986. pp. 178–207. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1072-6_7
89. Machelart A, Willemart K, Zúñiga-Ripa A, Godard T, Plovier H, Wittmann C, et al. Convergent evolution of zoonotic *Brucella* species toward the selective use of the pentose phosphate pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; 202008939.
90. Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, et al. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*. 2007; 2: e631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000631> PMID: 17637846
91. González D, Grilló MJ, de Miguel MJ, Ali T, Arce-Gorvel V, Delrue RM, et al. Brucellosis vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One*. 2008; 3: e2760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002760> PMID: 18648644
92. Boschirolí ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, et al. The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 1544–1549. <https://doi.org/10.1073/pnas.032514299> PMID: 11830669
93. Dozot M, Boigegrain RA, Delrue RM, Hallez R, Ouahrani-Bettache S, Danese I, et al. 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*. 2006; 8: 1791–1802. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00749.x> PMID: 16803581
94. Rambow-Larsen AA, Rajashekara G, Petersen E, Splitter G. Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J Bacteriol*. 2008; 190: 3274–3282. <https://doi.org/10.1128/JB.01915-07> PMID: 18310341
95. Sieira R, Arocena GM, Bukata L, Comerci DJ, Ugalde RA. Metabolic control of virulence genes in *Brucella abortus*: HutC coordinates *virB* expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters. *J Bacteriol*. 2010; 192: 217–224. <https://doi.org/10.1128/JB.01124-09> PMID: 19854911
96. Sieira R, Arocena GM, Zorreguieta A, Comerci DJ, Ugalde RA. A MarR-type regulator directly activates transcription from the *Brucella abortus virB* promoter by sharing a redundant role with HutC. *J Bacteriol*. 2012; 194: 6431–6440. <https://doi.org/10.1128/JB.01007-12> PMID: 23002224
97. Brophy JA, Voigt CA. Antisense transcription as a tool to tune gene expression. *Molecular Systems Biology*. 2016; 12: 854. <https://doi.org/10.15252/msb.20156540> PMID: 26769567
98. Wright BW, Molloy MP, Jaschke PR. Overlapping genes in natural and engineered genomes. *Nat Rev Genet*. 2022. pp. 154–168. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00417-w> PMID: 34611352
99. Lagator M, Sarikas S, Steinrueck M, Toledo-Aparicio D, Bollback JP, Guet CC, et al. Predicting bacterial promoter function and evolution from random sequences. *Elife*. 2022; 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.64543> PMID: 35080492
100. Coutte L, Antoine R, Slupek S, Solans L, Derop J, Bonfond A, et al. Combined RNAseq and ChIP-seq Analyses of the BvgA Virulence Regulator of *Bordetella pertussis*. *mSystems*. 2020; 5.
101. Shimada T, Ishihama A, Busby SJW, Grainger DC. The *Escherichia coli* RutR transcription factor binds at targets within genes as well as intergenic regions. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36: 3950–3955. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn339> PMID: 18515344
102. Liu W, Qi Y, Hulett FM. Sites internal to the coding regions of *phoA* and *pstS* bind PhoP and are required for full promoter activity. *Mol Microbiol*. 1998; 119–130. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00779.x> PMID: 9593301
103. Balleza E, López-Bojorquez LN, Martínez-Antonio A, Resendis-Antonio O, Lozada-Chávez I, Balleza-Martínez YI, et al. Regulation by transcription factors in bacteria: Beyond description. *FEMS Microbiol Rev*. 2009; 133–151. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00145.x> PMID: 19076632
104. Lozada-Chávez I, Espinosa Angarica V, Collado-Vides J, Contreras-Moreira B. The role of DNA-binding specificity in the evolution of bacterial regulatory networks. *J Mol Biol*. 2008, 379(3): 627–43. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.008> PMID: 18466918

105. Martínez-Antonio A, Collado-Vides J. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2003; 5:482–489. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.002> PMID: 14572541
106. Choi G, Jang KK, Lim JG, Lee ZW, Im H, Choi SH. The transcriptional regulator IscR integrates host-derived nitrosative stress and iron starvation in activation of the *vvhBA* operon in *Vibrio vulnificus*. *J Biol Chem*. 2020; 295: 5350–5361. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012724> PMID: 32169898
107. Gao R, Helfant LJ, Wu T, Li Z, Brokaw SE, Stock AM. A balancing act in transcription regulation by response regulators: Titration of transcription factor activity by decoy DNA binding sites. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49: 11537–11549. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab935> PMID: 34669947
108. Feng X, Oropeza R, Kenney LJ. Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*. 2003.
109. Lee AK, Detweiler CS, Falkow S. OmpR Regulates the Two-Component System SsrA-SsrB in *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *J BACTERIOL*. 2000.
110. Kenney LJ, Anand GS. EnvZ/OmpR Two-Component Signaling: An Archetype System That Can Function Noncanonically. *EcoSal Plus*. 2020; 9. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2019> PMID: 32003321

- **El regulador BvrR se une a tres cajas de regulación génica en la región corriente arriba del gen *omp25***

1. Resumen:

El TCS BvrR/BvrS modula la expresión de genes necesarios para la transición entre estilos de vida extra e intracelular. Sin embargo, se han estudiado pocas regiones reguladoras de los genes directamente regulados por BvrR. En esta Tesis, caracterizamos la región reguladora de *omp25*, un gen que codifica una OMP y que es regulado positivamente por el TCS BvrR/BvrS. Mediante fusiones transcripcionales *omp25-lacZ* y ensayos de actividad de β -galactosidasa, descubrimos que la región entre -262 y +127 es necesaria para la actividad transcripcional, en particular un fragmento de 111 pb de longitud, ubicado entre -262 y -152. Además, demostramos la unión de BvrR fosforilada *in vitro* a tres sitios dentro de la región -140 a +1. Dos de estos sitios fueron delimitados entre -18 y +1 y entre -99 y -76 mediante un ensayo de huella de ADNasa I, y se denominaron cajas reguladoras 1 y 2, respectivamente. El tercer sitio de unión (caja 3) se delimitó entre -140 y -122 mediante una combinación de resultados de ensayos de movilidad electroforética y anisotropía de fluorescencia. Un análisis de acoplamiento molecular con HDOCK predijo interacciones entre BvrR y sus cajas reguladoras. Estas interacciones involucran 11, 13 y 12 nucleótidos en las cajas 1, 2 y 3 respectivamente. El alineamiento manual de las secuencias de las tres cajas reveló la presencia de repeticiones invertidas y no invertidas de cinco a ocho nucleótidos que coinciden parcialmente con los motivos de unión de ADN descritos para BvrR. Por lo tanto, proponemos que BvrR se une directamente al menos a tres cajas reguladoras y probablemente interactúa con otros factores de transcripción para regular la expresión de *omp25*. Este modelo de regulación génica podría aplicarse a otros genes regulados por BvrR y a los ortólogos del TCS BvrR/BvrS y *Omp25* en Rhizobiales filogenéticamente relacionados con *Brucella*.

2. Introducción:

El gen *omp25* codifica para una OMP que se encuentra conservada en *Brucella*. Este gen fue el primer gen diana descrito para el TCS BvrR/BvrS en *B. abortus* (Guzmán-Verri *et al.*, 2002). Se conocía que BvrR lo regulaba positivamente y su región corriente arriba fue detectada entre las regiones unidas por BvrR en el ensayo de ChIP-Seq reportado en el primer artículo científico derivado de la presente Tesis. Adicionalmente, en dicho artículo científico se describió, mediante EMSA, una interacción directa entre BvrR y la región corriente arriba del gen *omp25* ubicada entre las coordenadas -159 a +34 desde el codón de inicio. También se reportó un motivo de unión a ADN comprobado experimentalmente. Anterior a ello, se había descrito otro motivo de unión a ADN mediante predicciones *in silico* (Ramírez-González *et al.*, 2019). Además, se han reportado, de forma independiente, dos sitios de inicio de transcripción (TSS) para *omp25*, en las posiciones -131 (Suárez-Esquivel *et al.*, 2016) y -82 (esta Tesis). Por lo tanto, elegimos la región corriente arriba de este gen como un prototipo de región promotora regulada por el TCS BvrR/BvrS, para adentrarnos en el estudio de las interacciones proteína-ADN que establece el regulador transcripcional BvrR con sus genes blanco. Para ello, en primer lugar, mediante ensayos de actividad β -galactosidasa, delimitamos la región promotora de *omp25*, la cual no había sido estudiada anteriormente. Luego, mediante el uso de diferentes técnicas experimentales para el estudio de interacciones proteína-ADN; como EMSA con sondas que comprendían distintas regiones corriente arriba de *omp25*, encontramos que existía unión directa de BvrR a tres regiones de aproximadamente 40 pb. Mediante ensayos de huella de ADNasa, dos de esas tres regiones se delimitaron a fragmentos de aproximadamente 20 pb y por medio de ensayos de anisotropía de fluorescencia, se logró corroborar el tercer sitio de unión a BvrR.

Adicionalmente, llevamos a cabo un modelaje molecular *in silico* con la herramienta HDOCK, para predecir las posibles interacciones teóricas entre BvrR y los tres sitios de unión delimitados en el estudio. Nuestros resultados sugieren que el TCS BvrR/BvrS regula la expresión de *omp25* mediante la unión directa a al menos tres cajas reguladoras con repeticiones invertidas y no invertidas de ADN. La presencia de estos tres sitios de unión a BvrR o cajas reguladoras en la región

promotora de *omp25*, respalda la posibilidad de una regulación diferencial de este gen en respuesta a condiciones ambientales, lo cual coincide con lo reportado para otros reguladores de la familia OmpR, a la cual pertenece BvrR. La investigación presentada aquí contribuye a comprender cómo el TCS BvrR/BvrS regula sus genes diana y podría aplicarse a otros sistemas TCS ortólogos en Rhizobiales.

3. Manuscrito aceptado para publicación:

A continuación se adjunta en pdf el artículo publicado en la revista "*Frontiers in Microbiology*", el cual trata sobre la descripción de los tres sitios de unión a BvrR en la región corriente arriba de *omp25*.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Axel Cloeckert,
Institut National de recherche pour
l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
(INRAE), France

REVIEWED BY
Clayton Caswell,
Virginia Tech, United States
Alfonso Mendez Tenorio,
National Polytechnic Institute (IPN), Mexico

*CORRESPONDENCE
Caterina Guzmán-Verri
✉ catguz@una.cr

PRESENT ADDRESS
Olman Gómez-Espinoza,
Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular
Vegetal, Instituto de Agroindustria,
Departamento de Ciencias Agronómicas y
Recursos Naturales, Facultad de Ciencias
Agropecuarias y Medioambiente, Universidad
de La Frontera, Temuco, Chile

These authors have contributed equally to this
work and share first authorship

RECEIVED 16 June 2023
ACCEPTED 15 August 2023
PUBLISHED 14 September 2023

CITATION
Castillo-Zeledón A, Rivas-Solano O,
Villalta-Romero F, Gómez-Espinoza O,
Moreno E, Chaves-Olarte E and
Guzmán-Verri C (2023) The *Brucella abortus*
two-component system response regulator
BvrR binds to three DNA regulatory boxes in
the upstream region of *omp25*.
Front. Microbiol. 14:1241143.
doi: 10.3389/fmicb.2023.1241143

COPYRIGHT
© 2023 Castillo-Zeledón, Rivas-Solano, Villalta-
Romero, Gómez-Espinoza, Moreno, Chaves-
Olarte and Guzmán-Verri. This is an open-
access article distributed under the terms of
the [Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

The *Brucella abortus* two-component system response regulator BvrR binds to three DNA regulatory boxes in the upstream region of *omp25*

Amanda Castillo-Zeledón^{1†}, Olga Rivas-Solano^{1,2†},
Fabián Villalta-Romero², Olman Gómez-Espinoza^{2†},
Edgardo Moreno¹, Esteban Chaves-Olarte³ and
Caterina Guzmán-Verri^{3*}

¹Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica, ²Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Central Cartago, Cartago, Costa Rica, ³Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Brucella abortus is a facultative extracellular-intracellular bacterial zoonotic pathogen worldwide. It is also a major cause of abortion in bovines, generating economic losses. The two-component regulatory system BvrR/BvrS modulates the expression of genes required to transition from extracellular to intracellular lifestyles. However, few regulatory regions of BvrR direct target genes have been studied. In this study, we characterized the regulatory region of *omp25*, a gene encoding an outer membrane protein that is positively regulated by TCS BvrR/BvrS. By *omp25-lacZ* reporter fusions and β -galactosidase activity assays, we found that the region between -262 and +127 is necessary for transcriptional activity, particularly a 111-bp long fragment located from -262 to -152. In addition, we demonstrated the binding of P-BvrR to three sites within the -140 to +1 region. Two of these sites were delimited between -18 to +1 and -99 to -76 by DNase I footprinting and called DNA regulatory boxes 1 and 2, respectively. The third binding site (box 3) was delimited from -140 to -122 by combining EMSA and fluorescence anisotropy results. A molecular docking analysis with HDock predicted BvrR-DNA interactions between 11, 13, and 12 amino acid residue-nucleotide pairs in boxes 1, 2, and 3, respectively. A manual sequence alignment of the three regulatory boxes revealed the presence of inverted and non-inverted repeats of five to eight nucleotides, partially matching DNA binding motifs previously described for BvrR. We propose that P-BvrR binds directly to up to three regulatory boxes and probably interacts with other transcription factors to regulate *omp25* expression. This gene regulation model could apply to other BvrR target genes and to orthologs of the TCS BvrR/BvrS and *Omp25* in phylogenetically closed *Rhizobiales*.

KEYWORDS

two-component regulatory system, outer membrane protein (OMP), *Rhizobiales*, *Brucella*, *Brucella abortus*

1. Introduction

Brucella abortus is a facultative extracellular-intracellular Gram-negative pathogen. It belongs to *Rhizobiales*, an order composed of cell-associated pathogens, symbionts, and free-living bacteria (Batut et al., 2004; Moreno, 2021). *B. abortus* causes brucellosis, a widely distributed zoonotic disease. In infected cattle, the disease manifests with abortion and infertility, causing economic losses (Spink, 1957).

The pathogenicity of brucellae resides in their ability to invade, survive, and replicate inside host cells (Roop et al., 2021). In *B. abortus*, the two-component regulatory system (TCS), BvrR/BvrS, is important for the transition from the extracellular to the intracellular milieu (Sola-Landa et al., 1998; Guzman-Verri et al., 2002; López-Goñi et al., 2002; Altamirano-Silva et al., 2018). This TCS comprises a transmembrane sensor protein with histidine kinase activity called BvrS and a cytoplasmic response regulator called BvrR, which has homology to OmpR (López-Goñi et al., 2002; Altamirano-Silva et al., 2018).

Phylogenetic analyses revealed that the TCS BvrR/BvrS is orthologous to other *Rhizobiales* TCSs, including ExoS/ChvI from the plant endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*, ChvG/ChvI from the plant pericellular pathogen *Agrobacterium tumefaciens*, and BatR/BatS from the intracellular zoonotic pathogen *Bartonella* sp. Those orthologous TCSs respond to environmental conditions and regulate the expression of target genes involved in distinct stages of host invasion and intracellular survival (Charles and Nester, 1993; Cheng and Walker, 1998; Batut et al., 2004; Beier and Gross, 2006; Quebatte et al., 2010; Bélanger and Charles, 2013; Heavner et al., 2015; Ratib et al., 2018).

In brucellae, BvrS senses low pH and low nutrient availability, conditions probably encountered when the bacterium is trafficking through the endosomal pathway (Altamirano-Silva et al., 2018, 2021). Following this, BvrS probably auto-phosphorylates and transduces the signal via a phosphate group to BvrR, increasing its affinity for specific chromosomal regions (López-Goñi et al., 2002; Nguyen et al., 2015; Altamirano-Silva et al., 2021). A *B. abortus* *bvrR* mutant lacks virulence in murine models and does not replicate in cell culture models (Sola-Landa et al., 1998). This mutant differentially expresses outer membrane and periplasmic proteins (Guzman-Verri et al., 2002; Lamontagne et al., 2007; Viadas et al., 2010) and shows a distinctive lipopolysaccharide acylation pattern compared to the wild-type strain (Manterola et al., 2005). Regarding outer membrane proteins, the TCS BvrR/BvrS positively regulates the expression of *omp25* (Guzman-Verri et al., 2002; Lamontagne et al., 2007; Viadas et al., 2010). This gene encodes a major outer-membrane protein of 25 kDa (Omp25) belonging to the Omp25/31 family (Vizcaino et al., 2001), the most abundant outer-membrane proteins of brucellae (Martín-Martín et al., 2009). In *B. abortus*, although Omp25 is not essential for the invasion, survival, and replication inside RAW macrophages and HeLa cells, it has a structural function in the covalent attachment of the outer membrane to peptidoglycan (Manterola et al., 2007; Godessart et al., 2021).

The TCS BvrR/BvrS also regulates the expression of virulence genes related to intracellular trafficking and cell egress, like the Type IV Secretion System VirB and the quorum-sensing regulator VjbR (Lamontagne et al., 2009; Martínez-Núñez et al., 2010; Viadas et al., 2010; Altamirano-Silva et al., 2018, 2021), and is related to the carbon and nitrogen metabolic fitness according to the encountered

environment (Lamontagne et al., 2009; Viadas et al., 2010; Rivas-Solano et al., 2022).

Recently, two DNA binding motifs putatively recognized by BvrR have been reported by *in silico* predictions (Ramírez-González et al., 2019) and experimental approaches (Rivas-Solano et al., 2022).

A direct interaction has been described between BvrR and the upstream region of *omp25*, located between coordinates -159 and $+34$ from the start codon (Rivas-Solano et al., 2022). Two transcriptional start sites (TSS) have been independently reported for *omp25*, at positions -131 and -82 (Suárez-Esquivel et al., 2016; Rivas-Solano et al., 2022).

Here, we characterized the *omp25* transcriptional regulatory region as a prototype of a regulatory element directly controlled by the TCS BvrR/BvrS. Our results suggest that the TCS BvrR/BvrS regulates *omp25* expression directly by binding to up to three regulatory boxes with inverted and non-inverted DNA repeats. The research presented here contributes to understanding how the TCS BvrR/BvrS regulates target genes and might apply to other orthologous TCSs in *Rhizobiales*.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

Escherichia coli and *B. abortus* strains (Table 1) were incubated at 37°C at 200 rpm and grown on Luria Bertani Broth (LB) (Sambrook et al., 1989) or Tryptic Soy Broth (TSB) (Suárez-Esquivel et al., 2016). Additionally, culture media were supplemented with antibiotics (kanamycin 30 µg/ml, gentamicin 20 µg/ml, or ampicillin 100 µg/ml) when necessary. All procedures involving live *B. abortus* were performed according to the “Reglamento de Bioseguridad de la CCSS 39975-0,” 2012, after the “Decreto Ejecutivo #30965-S,” 2002, and research protocol SIA 0652-19, approved by the National University, Costa Rica.

2.2. Construction of transcriptional fusions and β-galactosidase activity assays

The primers used in this study are detailed in Supplementary Table 1. A DNA fragment from the genome of *B. abortus* 2308 W (GenBank Accession ERS568782), encompassing the *omp25* region from -392 to $+127$ and two smaller ones from -262 to $+127$ and -151 to $+127$ (Figure 1A), was amplified by PCR and purified with the QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). The amplicons and the pMR15 vector (Table 1) were excised separately with BamHI (10 U/µl) and XbaI (10 U/µl) (Fermentas®) for 18 h at 37°C. The restriction enzymes were inactivated at 80°C for 20 min. The DNA fragments were ligated with the pMR15 vector using T4 DNA ligase (5 U/µl) (Fermentas®) at room temperature overnight to obtain plasmids p392, p262, and p151 (Table 1). Then, the plasmids were electroporated into the *E. coli* strain XL1-Blue to generate the strains E392, E262, and E151 (Table 1) using the Electro Cell Manipulator ECM 630 BTX®. Colonies with the new plasmids were selected using kanamycin and screened using primers *omp25lacZF* and *omp25lacZR* (Supplementary Table 1). Plasmid DNA was isolated and electroporated into *B. abortus* using the

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids.

Strain	Relevant characteristics	Reference
<i>E. coli</i>		
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' proAB lacIqΔM15], Tn10(Tet^r)</i>	Sambrook et al. (1989)
E392	XL1Blue carrier of p392, Km ^r	This study
E262	XL1Blue carrier of p262, Km ^r	This study
E151	XL1Blue carrier of p151, Km ^r	This study
<i>B. abortus</i>		
2308 W	Wild-type, virulent strain, Na ^r	Suárez-Esquivel et al. (2016)
3aZ	2308 W carrier of transcriptional chromosomal fusion <i>Pomp3a::lacZ</i> , Gm ^r Amp ^r	Guzman-Verri et al. (2002)
B392	2308 W carrier of p392, Km ^r	This study
B262	2308 W carrier of p262, Km ^r	This study
B151	2308 W carrier of p151, Km ^r	This study
BpMR15	2308 W carrier of pMR15, Km ^r	This study
Plasmids		
pMR15	High copy number vector, promoterless <i>lacZ</i> gene, Km ^r	Gober and Shapiro (1992), Courtesy of M. Roop.
p392	pMR15-derivative with a cloned fragment of 521-bp, 392-bp upstream <i>omp25</i> , and the first 127-bp of the coding sequence, Km ^r	This study
p262	pMR15-derivative with a cloned fragment of 391-bp, 262-bp upstream <i>omp25</i> , and the first 127-bp of the coding sequence, Km ^r	This study
p151	pMR15-derivative with a cloned fragment of 280-bp, 151-bp upstream <i>omp25</i> , and the first 127-bp of the coding sequence, Km ^r	This study

Na^r, resistance to nalidixic acid; Gm^r, resistance to gentamicin; Amp^r, resistance to ampicillin; Km^r, resistance to kanamycin.

Electro Cell Manipulator ECM 630 BTX[®] to obtain the strains B392, B262, and B151 (Table 1). The vector pMR15 was also electroporated into *B. abortus* as a non-promoter activity control (strain BpMR15, Table 1). The β-galactosidase assays were performed with modifications (Guzman-Verri et al., 2002). Bacteria were grown until the exponential phase, permeabilized with 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 6% chloroform for 10 min at 28°C, and incubated with O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) for 10 min at 28°C. The reaction was stopped with 1 M sodium carbonate, the absorbance was measured at 420 nm, and the specific activity was expressed as nmol of O-nitrophenol produced/min × mg protein (Miller Units). The reported β-galactosidase activity was corrected according to the residual activity obtained from the empty vector strain, BpMR15. A previously constructed *lacZ::omp25* chromosomal fusion *B. abortus* strain (3aZ) was used as a positive control of promoter activity (Guzman-Verri et al., 2002; Table 1). A one-way ANOVA statistical analysis followed by Tukey's multiple comparisons test was performed using GraphPad Prism version 8.00 for Windows (Graph Pad, 2019).

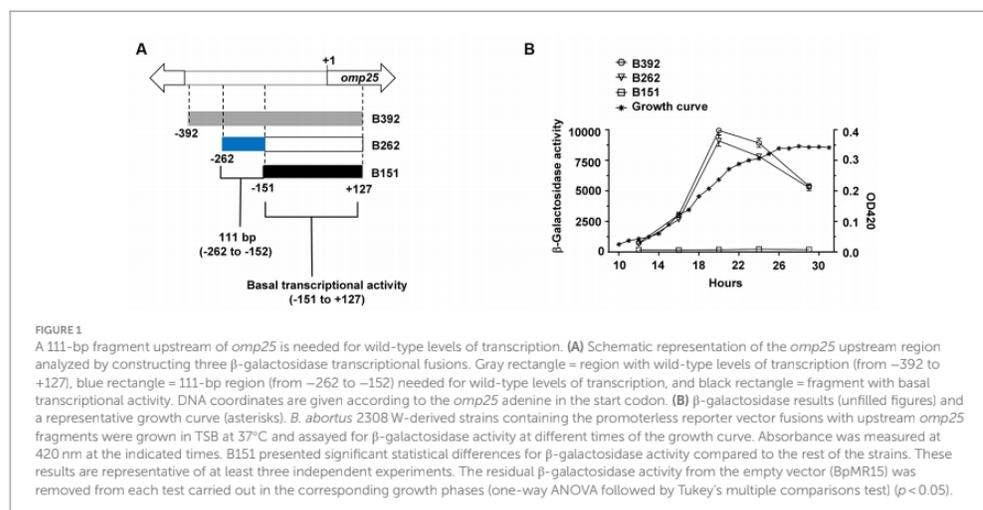
2.3. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Expression and purification of GST-BvrR were carried out as described (Martínez-Núñez et al., 2010). Before each assay, BvrR was phosphorylated with carbamoyl phosphate as described previously (Altamirano-Silva et al., 2018). DNA probes were labeled using the DIG Gel Shift Kit 2nd Generation (Roche[®]). Protein and DNA probes were incubated together following the protocol described in the DIG Gel Shift Kit 2nd Generation (Roche[®]). Protein-DNA mixtures were

separated by native polyacrylamide electrophoresis at 150 V at 4°C for 1, 1.5, or 2.5 h, depending on the size of the DNA probe. The gels were electro-blotted into positively charged Nylon membranes, and the results were visualized by an enzymatic immunoassay using anti-digoxigenin-alkaline phosphatase (Invitrogen[™] Electrophoretic Mobility Shift Assay Kit). The generated chemiluminescent signals were recorded on an X-ray film. Size and shape are factors that affect the electrophoretic migratory pattern of a molecule (Hellman and Fried, 2007). In our assays, the same protein is used, but the DNA fragments differ, so specific protein-DNA complexes for each DNA fragment run by EMSA were identified based on the following criteria: absence of shifted bands in the lane without P-BvrR, absence of shifted bands in the specificity binding control, P-BvrR concentration-dependent shifted bands, and consistency between independent replicas. If any of these criteria were not met, the shifted band was classified as unspecific (Hellman and Fried, 2007; Altamirano-Silva et al., 2018).

For direct EMSA, two DNA fragments used as probes were obtained by PCR using the following primer pairs: *omp25.262* and *omp25.152* or *omp25.262* and *omp25.122* (Supplementary Table 1). Labeled probes at 0.033 μM were incubated with increasing concentrations of phosphorylated BvrR (P-BvrR) (0.1–1.6 μM) for 15 min on ice. Mixtures were electrophoresed for 2.5 h and analyzed as described above. A coding region of the ribosomal protein (*rplL*) was amplified by PCR with the primers L12.F and L12.R (Supplementary Table 1) and used as a specificity-binding control.

For competitive EMSA, a 193-bp fragment (coordinates –159 to +34 from the *omp25* start codon), previously shown to interact with P-BvrR by EMSA (Rivas-Solano et al., 2022), was amplified by PCR with primers *omp25R* and *omp25F* (Supplementary Table 1). The 193-bp labeled probe (0.033 μM) was mixed with P-BvrR



(0.4 μ M) and an excess (1,000 \times) of each nine \sim 40 pb unlabeled oligonucleotide pairs obtained by chemical synthesis (Supplementary Table 2), encompassing the region covered by the 193-bp probe. The protein-DNA mixtures were incubated as described for direct EMSA, electrophoresed for 1.5 h, and analyzed as described above.

The oligonucleotide pairs that competed with the 193-bp probe for binding to P-BvrR were then labeled and used as probes in another direct EMSA with increasing concentrations of P-BvrR, as described for the direct EMSA above. Mixtures were electrophoresed for 1 h and analyzed as described above. One of the oligonucleotide pairs that did not compete for P-BvrR was used as a specificity-binding control.

2.4. DNase I footprinting

For DNase I footprinting, the same 193-bp region used for competitive EMSA was amplified as described above, labeled with HEX (hexachlorofluorescein) or FAM (5' 6-carboxyfluorescein), incubated with P-BvrR at 8.32 μ M, and proceeded as described for EMSA. The samples were then incubated for 15 min at 15–25°C and placed again in ice. DNase I (0.05 U) was added, and the samples were incubated for 2 min at 15°C in a thermocycler, followed by 10-min incubation at 75°C. The samples were purified using the Qiagen Qiaquick PCR purification kit and eluted with 30 μ l of EB buffer. The samples (10 μ l) were run in a 3730 Genetic Analyzer after mixing with 7 μ l of HiDi formamide and 0.1 μ l of GeneScan 500 Liz size marker and the following running parameters: genotyping module, injection time: 30 s, and injection voltage: 3 kV (Zianni et al., 2006). The Peak Scanner software was used to infer the protected regions by superimposing the electropherograms from digested DNA in the presence of P-BvrR or BSA (3.64 nM). Base pair coordinates of the protected regions were inferred after Sanger sequencing of the 193-bp DNA fragment.

2.5. Fluorescence anisotropy

The fluorescence anisotropy assays were performed as described (Owen and McMurray, 2009) with modifications. Recombinant BvrR was phosphorylated as described for EMSA and serially diluted in a binding buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl). The forward oligonucleotide 2 (173.133omp25-O, Supplementary Table 2) was 5'-labeled with FAM and mixed with the non-labeled reverse complementary oligo (173.133omp25-ORC, Supplementary Table 2) at a final concentration of 50 mM. The oligonucleotides Oligo rpL-O (5'-FAM labeled) and the reverse complementary Oligo rpL-ORC (Supplementary Table 2) were used as a negative control at a final concentration of 50 mM. Blank samples without protein were also prepared for background fluorescence estimation. Samples were incubated for 30 min at 37°C inside a CytationTM 3 microplate reader (Biotek, Instruments). Fluorescence anisotropy was measured with the appropriate polarized filters, and the results were graphed following a one-site-specific binding model (Favichio et al., 2009) using the GraphPad Prism (Hulme and Trevethick, 2010; Graph Pad, 2019).

2.6. Molecular docking analysis of BvrR-DNA interactions

The interactions between BvrR and its three binding sites were explored by molecular docking using the HDOCK server (default parameters) (Yan et al., 2017). The Fasta BvrR sequence (UniProt accession: Q2YQY4) was used as an input receptor molecule, and the sequences Box 1 (TTGTGTAAGGAGAATGCCAT), Box 2 (GATA TGTCACCCCTGTCAGGCGG), and Box 3 (CTGCACAGAT TATCTCCACACAATGGGGCA) were used as input ligand molecules. Before the free docking, the software selected the crystal structure of the OmpR-like response regulator KdpE from *E. coli* (RCSB PDB: 4KFC) as a modeling template for the BvrR structure (Seq_ID % = 29.4). To ensure the reliability of the model generated by

HDOCK, its quality was analyzed using the QMEANDisCo parameter (Studer et al., 2020) and Ramachandran plots. The model was compared to those generated by SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018), I-TASSER (Yang et al., 2015), and AlphaFOLD (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022). The crystal structures of two proteins with DNA-binding domains were used as positive controls for the docking experiments: a *B. abortus* DNA binding protein (RCSB PDB: 4QPJ) and the KdpE protein from *E. coli*. As negative controls, the crystal structures of two proteins lacking DNA-binding domains were used: a *B. suis* 1330 hydrolase (RCSB PDB: 6NQ4) and a *B. abortus* peptidoglycan hydrolase inhibitor (RCSB PDB: 7DPY). For the interpretation, docking scores lower than -200 and confidence scores superior to 0.7 were considered to have good performance and a high likelihood of binding between the analyzed molecules. The NUCPLOT tool (Luscombe et al., 1997) was used to analyze and visualize a 2D interaction coloring scheme of the HDOCK results.

3. Results

3.1. A 111-bp long fragment at position -262 to -152 is needed for transcriptional activity

In *B. abortus* 2308 W, the *omp25* upstream intergenic region comprises 401 nucleotides (Suárez-Esquivel et al., 2016). To characterize the minimal promoter region of *omp25*, we constructed three plasmid-borne *omp25-lacZ* reporter fusions harboring 392-, 262-, and 151-bp upstream of *omp25*, respectively. All three reporter fusions included the first 127-bp of the *omp25* coding sequence (Figure 1A). The resulting plasmids were introduced into *B. abortus* 2308 W-generating strains B392, B262, and B151. Then, we assayed the β -galactosidase activity of each resulting strain at different time points of the growth curve. We used strain 3aZ, carrying a transcriptional chromosomal fusion *Pomp3a::lacZ*, as the positive control (Table 1). The strain B392 exhibited similar β -galactosidase activity compared to strain 3aZ, except for the late log phase of the growth curve (Supplementary Figure 1; Supplementary Table 3). The strains B392 and B262 reached a peak of β -galactosidase activity at mid-log phase, between 18 and 22 h of growth, without significant statistical differences along the curve (Figure 1B; Supplementary Table 3). However, strain B151, harboring 111-bp less than B262 (Figure 1A), presented significantly reduced β -galactosidase activity compared to B262 and B392. Yet some basal transcriptional activity was observed in this strain at all time points tested, as compared to the empty vector activity (Supplementary Table 3). Therefore, the *omp25* promoter region is located between coordinates -262 and $+127$ from the start codon, and the additional 111-bp region in B262 (-262 to -152), as compared to B151, is needed for wild-type transcriptional levels.

3.2. The upstream *omp25* regulatory region displays three BvrR binding sites

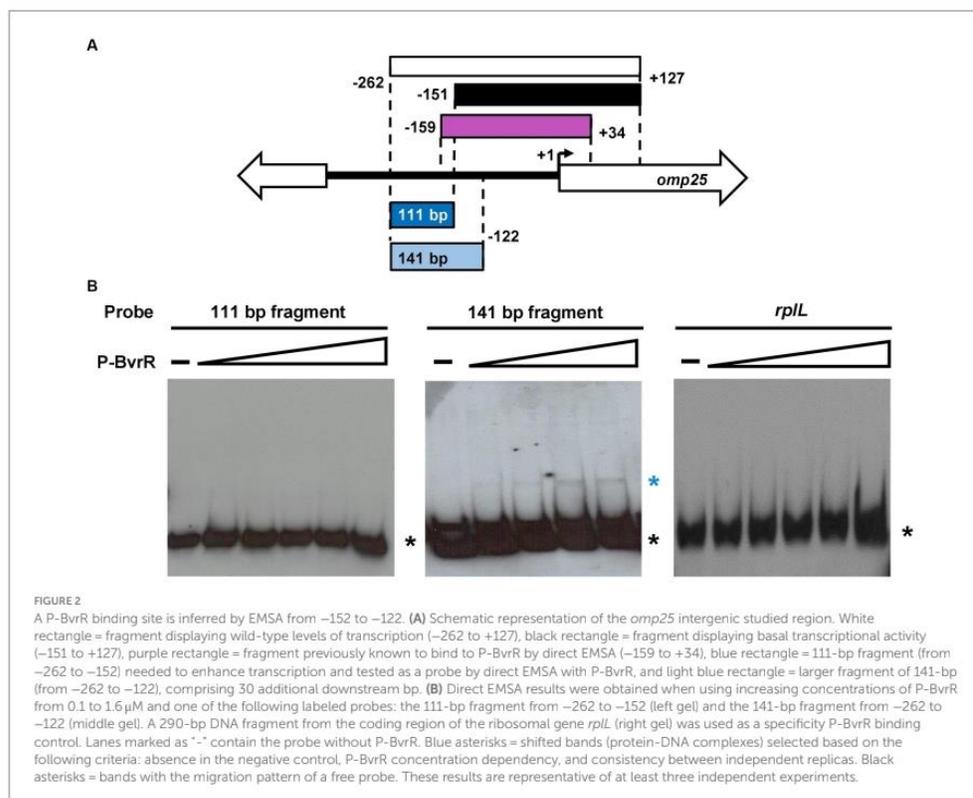
In *B. abortus* 2308 W, BvrR positively regulates the expression of *omp25* (Guzman-Verri et al., 2002), and a direct binding to the region between -159 and $+34$ from the *omp25* start codon has been

demonstrated previously (Rivas-Solano et al., 2022). Therefore, based on the results of the β -galactosidase assay, we tested if P-BvrR could also bind by EMSA to the 111-bp fragment required for optimal transcription (-262 to -152 , Figure 2A). However, the 111-bp fragment used as a labeled probe and incubated with increasing concentrations of P-BvrR did not reveal shifted bands as compared to the probe alone or to the binding specificity control using *rplL* (Figure 2B), indicating a lack of interaction. Thus, we tested if a larger fragment of 141-bp (-262 to -122 , Figure 2A), which included 30 additional bp from the region known to bind to P-BvrR (-159 to $+34$) (Rivas-Solano et al., 2022), could bind to P-BvrR by direct EMSA. As a result, the probe incubated with growing concentrations of P-BvrR showed shifted bands as compared to the probe alone and the binding specificity control *rplL* (Figure 2B), indicating a specific protein-DNA interaction with the *omp25* upstream region between coordinates -262 and -122 . Altogether, these two direct EMSA results prompted us to infer a putative P-BvrR binding site between positions -151 and -122 from the *omp25* start codon.

However, since OmpR has been shown to bind to multiple binding sites on the promoter of its target gene *ompF* (Kenney, 2002), we decided to look for multiple BvrR binding sites in the region from -159 to $+34$, already known to bind to P-BvrR (Rivas-Solano et al., 2022), including the putatively inferred binding site from -151 to -122 . This 193-bp region (-159 to $+34$) was depicted in nine overlapping sequences of ~ 40 pb (Figure 3A; Supplementary Table 2). An excess of each non-labeled oligonucleotide was tested in a competitive EMSA with the 193-bp region (-159 to $+34$) as the labeled probe and P-BvrR at a final concentration of $0.4 \mu\text{M}$. As shown in Figure 3B, the oligonucleotides 4 (-100 to -59) and 7 (-39 to $+1$) outcompeted the 193-bp probe, indicating a specific P-BvrR binding to these oligonucleotides. Additionally, for oligonucleotide 2 (-140 to -100), we observed a less defined lower band that suggested a possible partial competition, although less evident than the one observed for oligonucleotides 4 and 7.

Subsequently, the oligonucleotides 2, 4, and 7 were labeled to perform a direct EMSA with P-BvrR. We also tested the non-competing oligonucleotide 5 (-80 to -39) as a specificity-binding control. As a result, oligonucleotides 2, 4, and 7 showed shifted bands (Figure 4). We did not observe these interactions with the probe in the absence of P-BvrR and with the specificity binding control (oligonucleotide 5), confirming binding specificity to the three oligonucleotides.

To validate and further delimit the P-BvrR binding sites suggested by the competitive and direct EMSA results, we performed a DNase I footprinting analysis using the entire 193-bp fragment (-159 to $+34$) and P-BvrR. As a result, we found two protected sequences that we called DNA regulatory boxes: one spanning from -18 to $+1$ (box 1) and the other from -99 to -76 (box 2) (Figure 5A). Boxes 1 and 2 matched oligonucleotides 7 and 4. However, any clear protected sequence matched oligonucleotide 2 (-140 to -100), which was the one that showed a less clear result in the competitive EMSA (Figure 3B), despite showing binding to P-BvrR in the direct EMSA (Figure 4). To further confirm the binding of P-BvrR to oligonucleotide 2 by another experimental approach, we performed a fluorescence anisotropy assay with 5'-FAM-labeled oligonucleotide 2 and increasing concentrations of P-BvrR. In this method, a fluorescent signal is placed on the smaller DNA molecule, and when it binds to the much larger protein, a change in the fluorescence anisotropy is



produced, confirming protein-DNA interactions (Owen and McMurray, 2009). As a BvrR specificity binding control, we included a 5'-FAM-labeled oligonucleotide called oligo *rplL* (Supplementary Table 2). The fluorescence anisotropy results showed a positive change in the anisotropy DNA-binding curve for oligonucleotide 2 compared to the specificity binding control (Figure 5B), confirming P-BvrR-DNA-specific interactions with oligonucleotide 2.

Since oligonucleotide 2 (-140 to -100) partially overlaps the first EMSA-inferred binding site between -151 and -122 , these EMSA and fluorescence anisotropy results allowed us to narrow down this third binding site to a 19-bp region between -140 and -122 , which was named box 3.

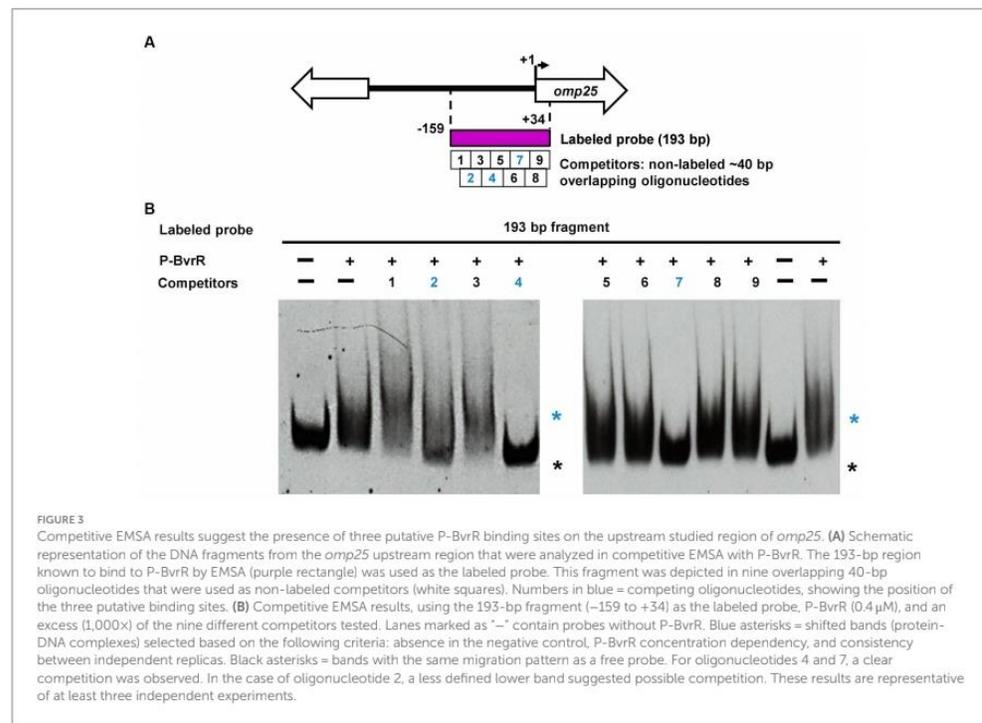
3.2.1. Molecular docking and sequence alignment of the three DNA regulatory boxes predict BvrR recognition of inverted and non-inverted DNA repeats

To investigate the theoretical interaction between BvrR and the three DNA regulatory boxes confirmed by different experimental approaches including direct and competitive EMSAs, DNase I footprinting, and fluorescence anisotropy, we performed molecular docking using the HDock web server. The quality report of the

homology modeling showed that the BvrR model falls within the range of low to medium based on the Seq_ID (Supplementary Table 4). However, based on the TMscore, the model demonstrates high quality (Supplementary Figure 2). Similarly, upon comparing HDock's BvrR model with models generated by SWISS-MODEL, I-TASSER, and AlphaFold using standard quality parameters, we observed only minimal differences among the models (Supplementary Table 5), suggesting that despite its low identity to the template, the model generated by HDock shares similarities with those produced by other widely used software.

The three sequences and the positive controls achieved docking scores lower than -200 (Supplementary Table 6), indicating good performance. Furthermore, BvrR and the positive controls exhibited confidence scores superior to 0.7, suggesting a high likelihood of binding between the molecules, while the negative controls scored more than -200 and their confidence scores were lower than 0.7. These results increase the confidence in the binding of BvrR to its ligands.

The docking results predicted the possibility of hydrogen bonds and non-bonded contacts between 13, 15, and 14 amino acid residues from the C terminal domain (Trans_reg_C) of BvrR and DNA portions from boxes 1 (GTAAGGAGAAT), 2 (ACCCCTGTCA), and 3 (AATGGGGC), respectively, with distances in the appropriate



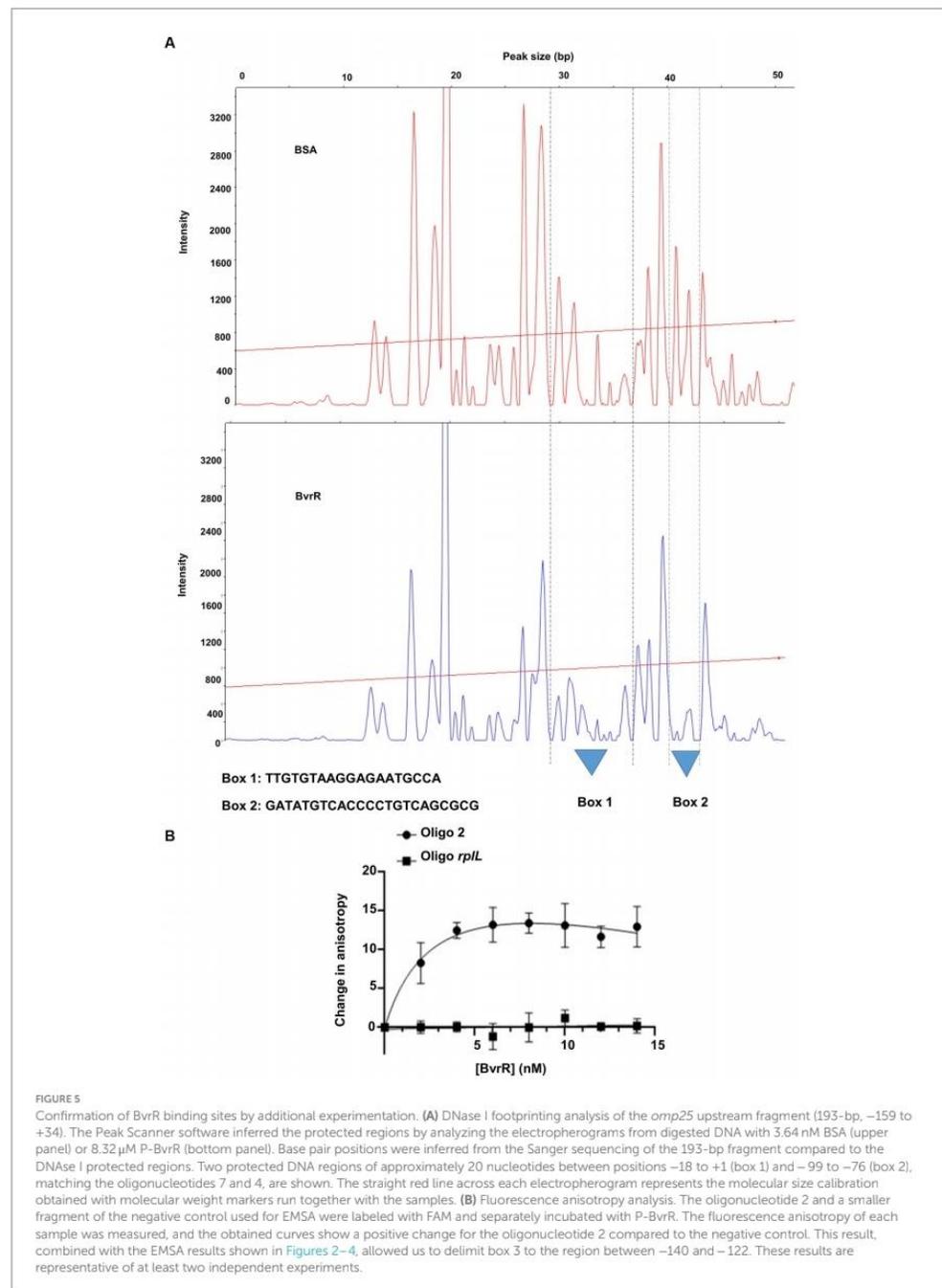
range for these bonds (Figure 6 and Supplementary Figure 3). Regarding the amino acids interacting with DNA, in all three boxes, BvrR utilizes the polar and positively charged amino acids Tyr 230, Thr 228, Arg 213, Lys 210, and Tyr 234 to interact with the DNA molecule through hydrogen bonds. When comparing BvrR with the KdpE template, it becomes apparent that the *E. coli* protein primarily utilizes the Tyr, Ile, Gln, and Arg residues to interact with DNA. However, it is worth noting that the DNA interaction site (TTTATA) differs between BvrR and KdpE (Narayanan et al., 2014).

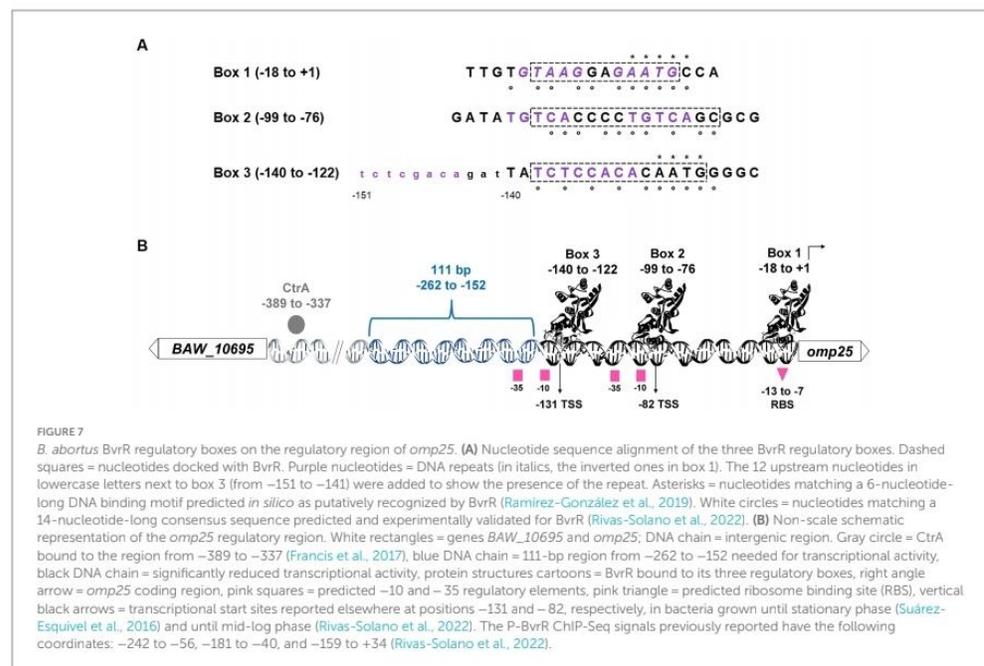
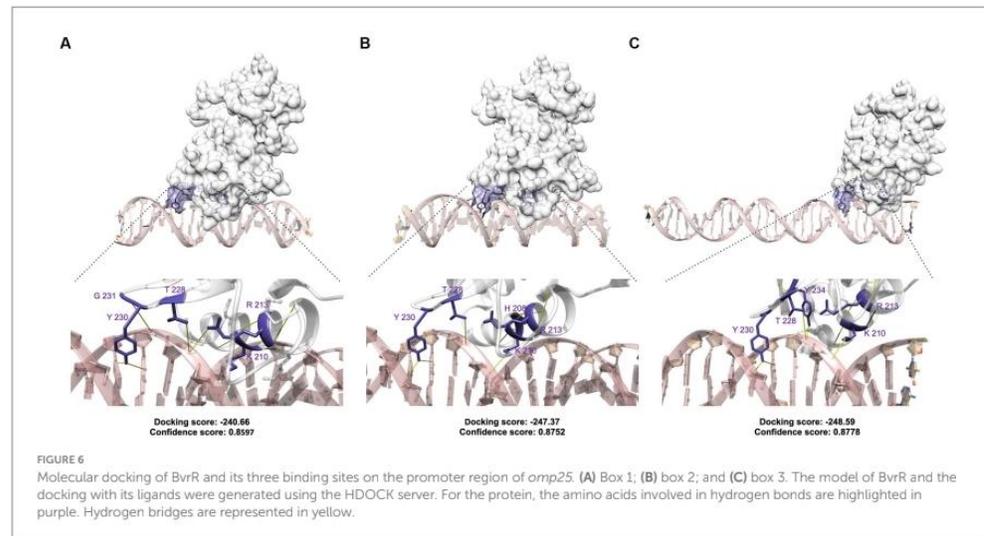
The sequence alignment of the three boxes (Figure 7A) revealed the presence of the inverted DNA repeat GTAAG – GAATG, separated by two nucleotides (GA) in box 1. In box 2, the non-inverted DNA repeat TGTCA – TGTCA is separated by four nucleotides (CCCC), and nearby in box 3, we found the non-inverted repeat TCTCNACA – TCTCNACA (where N = G or C), separated by five nucleotides (GATTA). Moreover, the sequences of boxes 1 and 3 partially match (83.33 and 66.67%, respectively) a 6-nucleotide long DNA binding motif predicted *in silico* as putatively recognized by BvrR (Ramírez-González et al., 2019). The location of the three boxes is also in agreement with previous P-BvrR ChIP-Seq data, suggesting P-BvrR binding upstream of *omp25* (Rivas-Solano et al., 2022). Since the P-BvrR ChIP-Seq data was used to infer a P-BvrR consensus sequence, it was expected that this region would have some similarity to this sequence. In fact, the three boxes show 78.57 and 71.42% similarity to the 14-bp long consensus sequence (Rivas-Solano et al., 2022).

As shown in Figure 7B, we manually predicted the –35 and –10 elements and the ribosome binding site according to the canonical *E. coli* models. The –35 elements possibly have the sequence GCATTT. This sequence is located at positions –35 to –30 from the first *omp25* TSS, which was described at position –131 from the start codon (Suárez-Esquivel et al., 2016). The sequence GCATTT is also located at positions –41 to –36 from the second TSS described at position –82 from the *omp25* start codon (Rivas-Solano et al., 2022). The –10 elements may have a TATNTC sequence (where N = C or G) located between –10 and –6 and –15 and –10 from the –131 and –82 TSSs, respectively. The ribosome binding sequence is probably TAAGGAG, located at –13 to –7 from the *omp25* start codon. Detailed sequence information is presented in Supplementary Figure 4.

4. Discussion

Despite the crucial role of the TCS BvrR/BvrS in *Brucella*, the DNA-regulatory regions controlled by this TCS are not characterized. Here, we delimited a DNA regulatory region for the gene *omp25*, encoding an outer-membrane protein in *B. abortus* and positively regulated by the TCS BvrR/BvrS (Guzman-Verri et al., 2002). Our results show that a DNA fragment of 380-bp, including 127-bp from the coding region and the first 262-bp upstream of the *omp25* start codon, allows transcription. Additionally, a 111-bp sequence between –262





(Martínez-Antonio and Collado-Vides, 2003; Lozada-Chávez et al., 2008; Balleza et al., 2009). The *E. coli* global response regulator OmpR regulates the expression of the gene *ompF* by binding to four sites with different affinities. At low osmolarity, OmpR concentration is low, and

the regulator binds to the four boxes, which promotes OmpF expression. At high osmolarity, OmpR concentration increases, and new interactions of OmpR with a distant box (-380 to -350) repress *ompF* transcription (Huang et al., 1994; Kenney, 2002).

Although hydrogen bonds may vary *in vivo*, hydrogen bond formation capability, the docking scores, and the protein-DNA binding position suggest that BvrR has a binding affinity for the three boxes in the Trans_reg_C domain. The DNA-sequence alignment of the three boxes revealed the presence of inverted and non-inverted repeats separated by variable distances, suggesting that variations in the recognition sequences may influence BvrR affinity for a differential regulation of its target genes. The effector domains of some OmpR-like regulators are known to bind tandem sequences or, more rarely, to inverted repeats for the regulation of transcription. The recognition site in the DNA ranges from 18 to 23-bp, with binding sites between 6 and 10-bp separated by 2 to 5-bp of the intervening sequence (Harlocker et al., 1995; Blanco et al., 2002; He and Wang, 2014). However, the regulator ChvI from *S. meliloti* recognizes an 11-bp-long motif sequence present at least once in the analyzed sequences (Chen et al., 2009). Therefore, the target promoters of the OmpR-like response regulators contain multiple binding sites that vary in nucleotide frequency, position, and relative binding affinities. As a result, cooperativity and differential binding are critical components of the transcriptional regulation exerted by the OmpR-like response regulators.

In brucellae, the current model postulates that the TCS BvrR/BvrS senses environmental conditions and regulates gene expression accordingly (Lamontagne et al., 2007; Viadas et al., 2010; Altamirano-Silva et al., 2018, 2021). Based on the results described here, we conclude that (i) A 111-bp region upstream of BvrR binding boxes is needed for wild-type transcriptional levels at different times of the growth curve, suggesting that additional regulators are binding to this region; (ii) P-BvrR could differentially regulate *omp25* expression by direct binding to three DNA regulatory boxes. Whether a particular condition such as phosphorylation or oligomerization affects BvrR binding remains elusive, as well as how many sites are bound simultaneously or independently; and (iii) BvrR possibly recognizes repeated sequences as has been described for other OmpR-like response regulators, and their influence on BvrR binding affinity and preferences remains to be clarified. The oligonucleotides predicted to bind to BvrR by molecular docking could be mutated and tested by EMSA or fluorescence anisotropy with P-BvrR, to prove the impact of each nucleotide on binding affinity. Additionally, crystallography studies of BvrR and BvrR-DNA complexes could also contribute to revealing the mechanistic insights of the binding of BvrR to the regulatory boxes identified here. The results presented here are observations that contribute to a better understanding of the gene regulation mediated by a TCS conserved in *Rhizobiales*, an essential component for environmental adaptation and host-microbe interactions in these organisms. Additional studies should be performed to elucidate the *omp25* transcriptional regulation.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Author contributions

AC-Z: conceptualization, formal analysis, investigation, methodology, validation, visualization, roles and writing—original

draft, writing—review and editing. OR-S: conceptualization, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, validation, visualization, roles and writing—original draft, writing—review and editing. FV-R: conceptualization, formal analysis, investigation, methodology, resources, writing—review and editing. OG-E: conceptualization, formal analysis, methodology, resources, writing—review and editing. EM: conceptualization, funding acquisition, supervision, writing—review and editing. EC-O: conceptualization, funding acquisition, resources, supervision, writing—review and editing. CG-V: conceptualization, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, validation, visualization, roles and writing—original draft, writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study has been funded by grants from “Fondos del Sistema FEES/CONARE” (FS-CN-02-2020 to CG-V), “Fondos FIDA, Universidad Nacional” (SIA 0047-17 to CG-V), and ICGBE (contract CRP/21/005 to CG-V). OR-S holds a Ph.D. scholarship from “Instituto Tecnológico de Costa Rica,” contract number 15-15-D, and from “PINN-MICITT,” contract number PND-137-15-1.

Acknowledgments

We would like to thank Laura Monturiol-Gross from Instituto Clodomiro Picado for providing access to the laboratory equipment and facilities to perform the fluorescence anisotropy assays and Reynaldo Pereira-Reyes for his technical assistance with recombinant BvrR purification, EMSA, and DNase I footprinting assays.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1241143/full#supplementary-material>

References

- Altamirano-Silva, P., Cordero-Serrano, M., Méndez-Montoya, J., Chacón-Díaz, C., Guzmán-Verri, C., Moreno, E., et al. (2021). Intracellular passage triggers a molecular response in *Brucella abortus* that increases its infectiousness. *Infect. Immun.* 89:e0000421. doi: 10.1128/IAI.00004-21
- Altamirano-Silva, P., Meza-Torres, J., Castillo-Zeledón, A., Ruiz-Villalobos, N., Zuñiga-Pereira, A. M., Chacón-Díaz, C., et al. (2018). *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the BvrR/BvrS two-component system, which allows *B. abortus* to adapt to its replicative niche. *Infect. Immun.* 86:e00713-17. doi: 10.1128/IAI.00713-17
- Balleza, E., López-Bojorquez, L. N., Martínez-Antonio, A., Resendis-Antonio, O., Lozada-Chávez, I., Balderas-Martínez, Y. L., et al. (2009). Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 133–151. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00145.x
- Batut, J., Andersson, S. G. E., and O’Callaghan, D. (2004). The evolution of chronic infection strategies in the α -proteobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 933–945. doi: 10.1038/nrmicro1044
- Beier, D., and Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 143–152. doi: 10.1016/j.mib.2006.01.005
- Béanger, L., and Charles, T. C. (2013). Members of the *Sinorhizobium meliloti* ChvI regulon identified by a DNA binding screen. *BMC Microbiol.* 13:132. doi: 10.1186/1471-2180-13-132
- Blanco, A. G., Sola, M., Gomis-Rüth, F. X., and Coll, M. (2002). Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure* 10, 701–713. doi: 10.1016/S0969-2126(02)00761-X
- Caswell, C. C., Gaines, J. M., and Roop, R. M. II. (2012). The RNA chaperone Hfq independently coordinates expression of the VirB type IV secretion system and the LuxR-type regulator BabR in *Brucella abortus* 2308. *J. Bacteriol.* 194, 3–14. doi: 10.1128/JB.05623-11
- Charles, T. C., and Nester, E. W. (1993). A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 175, 6614–6625. doi: 10.1128/jb.175.20.6614-6625.1993
- Chen, E. J., Fisher, R. F., Perovich, V. M., Sabio, E. A., and Long, S. R. (2009). Identification of direct transcriptional target genes of ExoS/ChvI two-component signaling in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 191, 6833–6842. doi: 10.1128/JB.00734-09
- Cheng, H. P., and Walker, G. C. (1998). Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* 180, 20–26. doi: 10.1128/jb.180.1.20-26.1998
- De Jong, M. E., Sun, Y. H., Den Hartigh, A. B., Van Dijk, J. M., and Tsolis, R. M. (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. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06487.x
- Dorman, C. J., Schumacher, M. A., Bush, M. J., Brennan, R. G., and Buttner, M. J. (2020). When is a transcription factor a NAP? *Curr. Opin. Microbiol.* 55, 26–33. doi: 10.1016/j.mib.2020.01.019
- Favichio, R., Dragan, A. I., Kneale, G. G., and Read, C. M. (2009). Fluorescence spectroscopy and anisotropy in the analysis of DNA-protein interactions. *Methods Mol. Biol.* 543, 589–611. doi: 10.1007/978-1-60327-015-1_35
- Francis, N., Poncin, K., Fioravanti, A., Vassen, V., Willemart, K., Ong, T. A. P., et al. (2017). CtrA controls cell division and outer membrane composition of the pathogen *Brucella abortus*. *Mol. Microbiol.* 103, 780–797. doi: 10.1111/mmi.13589
- Gober, J. W., and Shapiro, L. (1992). A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. *Mol. Biol. Cell* 3, 913–926. doi: 10.1091/mbc.3.8.913
- Godessart, P., Lannoy, A., Dieu, M., Van der Verren, S. E., Soumillion, P., Collet, J. F., et al. (2021). β -Barrels covalently link peptidoglycan and the outer membrane in the α -proteobacterium *Brucella abortus*. *Nat. Microbiol.* 6, 27–33. doi: 10.1038/s41564-020-00799-3
- Graph Pad (2019). *Home-Graph Pad*. Available at: <https://www.graphpad.com/> (Accessed September 20, 2021).
- Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Clockaert, A., Garin, J., 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. doi: 10.1073/pnas.192439399
- Harlocker, S. L., Bergstrom, L., and Inouye, M. (1995). Tandem binding of six OmpR proteins to the ompF upstream regulatory sequence of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 26849–26856. doi: 10.1074/JBC.270.45.26849
- He, X., and Wang, S. (2014). DNA consensus sequence motif for binding response regulator PhoP, a virulence regulator of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 53, 8008–8020. doi: 10.1021/bi501019u
- Heavner, M. E., Qiu, W. G., and Cheng, H. P. (2015). Phylogenetic co-occurrence of ExoR, ExoS, and ChvI, components of the RSI bacterial invasion switch, suggests a key adaptive mechanism regulating the transition between free-living and host-invading phases in rhizobiales. *PLoS One* 10:e0135655. doi: 10.1371/journal.pone.0135655
- Hellman, L. M., and Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nat. Protoc.* 2, 1849–1861. doi: 10.1038/nprot.2007.249
- Huang, K.-J., Schiebel, J. L., and Igo, M. M. (1994). A distant upstream site involved in the negative regulation of the *Escherichia coli* ompF gene. *J. Bacteriol.* 176, 1309–1315. doi: 10.1128/jb.176.5.1309-1315.1994
- Hulme, E. C., and Trevethick, M. A. (2010). Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1219–1237. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2
- Kenney, L. (2002). Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 135–141. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00310-7
- Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., et al. (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J. Proteome Res.* 6, 1519–1529. doi: 10.1021/pr060636a
- Lamontagne, J., Forest, A., Marazzo, E., Denis, F., Butler, H., Michaud, J. F., et al. (2009). Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J. Proteome Res.* 8, 1594–1609. doi: 10.1021/pr800978p
- Li, Z. Q., Zhang, J. L., Xi, L., Yang, G. L., Wang, S. L., Zhang, X. G., et al. (2017). Deletion of the transcriptional regulator GntR down regulated the expression of genes related to virulence and conferred protection against wild-type *Brucella* challenge in BALB/c mice. *Mol. Immunol.* 92, 99–105. doi: 10.1016/j.molimm.2017.10.011
- Liu, W., Qi, Y., and Hulett, F. M. (1998). Sites internal to the coding regions of phoA and pstS bind PhoP and are required for full promoter activity. *Mol. Microbiol.* 28, 119–130. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00779.x
- López-Goñi, I., Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Moriyón, I., and Moreno, E. (2002). Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet. Microbiol.* 90, 329–339. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00218-3
- Lozada-Chávez, I., Angarica, V. E., Collado-Vides, J., and Contreras-Moreira, B. (2008). The role of DNA-binding specificity in the evolution of bacterial regulatory networks. *J. Mol. Biol.* 379, 627–643. doi: 10.1016/j.jmb.2008.04.008
- Luscombe, N. M., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M. (1997). NUCPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein–nucleic acid interactions. *Nucleic Acids Res.* 25, 4940–4945. doi: 10.1093/nar/25.24.4940
- Manterola, L., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Barquero-Calvo, E., de Miguel, M.-J., Moriyón, I., et al. (2007). BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect. Immun.* 75, 4867–4874. doi: 10.1128/IAI.00439-07
- Manterola, L., Moriyón, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D. S., Koch, M. H. J., et al. (2005). The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J. Bacteriol.* 187, 5631–5639. doi: 10.1128/JB.187.16.5631-5639.2005
- Martínez-Antonio, A., and Collado-Vides, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 482–489. doi: 10.1016/j.mib.2003.09.002
- Martínez-Núñez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillén, F., Moreno, E., Guzmán-Verri, C., and Chaves-Olarte, E. (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. doi: 10.1128/JB.00567-10
- Martin-Martín, A. I., Caro-Hernández, P., Sancho, P., Tejedor, C., Clockaert, A., Fernández-Lago, L., et al. (2009). Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. *Vet. Microbiol.* 137, 74–82. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.003
- Moreno, E. (2021). The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). *FEMS Microbiol. Rev.* 45, 1–22. doi: 10.1093/femsre/fuab045
- Narayanan, A., Kumar, S., Eppard, A. N., Paul, L. N., and Yernool, D. A. (2014). An asymmetric heterodomain interface stabilizes a response regulator–DNA complex. *Nat. Com.* 5:3282. doi: 10.1038/ncomms4282
- Nguyen, M. P., Yoon, J. M., Cho, M. H., and Lee, S. W. (2015). Prokaryotic 2-component systems and the OmpR/Phob superfamily. *Can. J. Microbiol.* 61, 799–810. doi: 10.1139/cjm-2015-0345
- Owen, B., and McMurray, C. (2009). Rapid method for measuring DNA binding to protein using fluorescence anisotropy. *Protoc. Exch.* doi: 10.1038/NPROT.2009.80
- Poncin, K., Gillet, S., and De Bolle, X. (2018). Learning from the master: targets and functions of the CtrA response regulator in *Brucella abortus* and other alpha-proteobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 500–513. doi: 10.1093/femsre/fuy019

- Quebatte, M., Dehio, M., Tropel, D., Basler, A., Toller, I., Raddatz, G., et al. (2010). The BatR/BatS two-component regulatory system controls the adaptive response of *Bartonella henselae* during human endothelial cell infection. *J. Bacteriol.* 192, 3352–3367. doi: 10.1128/JB.01676-09
- Ramírez-González, E. A., Moreno-Lafont, M. C., Méndez-Tenorio, A., Cancino-Díaz, M. E., Estrada-García, I., and López-Santiago, R. (2019). Prediction of structure and molecular interaction with DNA of BvrR, a virulence-associated regulatory protein of *Brucella*. *Molecules* 24, 1–15. doi: 10.3390/molecules24173137
- Ratib, N. R., Sabio, E. Y., Mendoza, C., Barnett, M. J., Clover, S. B., Ortega, J. A., et al. (2018). Genome-wide identification of genes directly regulated by Chv1 and a consensus sequence for Chv1 binding in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 110, 596–615. doi: 10.1111/mmi.14119
- Rivas-Solano, O., Van der Henst, M., Castillo-Zeledón, A., Suárez-Esquivel, M., Muñoz-Vargas, L., Capitan-Barrios, Z., et al. (2022). The regulon of *Brucella abortus* two-component system BvrR/BvrS reveals the coordination of metabolic pathways required for intracellular life. *PLoS One* 17:e0274397. doi: 10.1371/journal.pone.0274397
- Roop, R. M., Barton, I. S., Hopersberger, D., and Martin, D. W. (2021). Uncovering the hidden credentials of *Brucella* virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 85:e00021-19. doi: 10.1128/mmb.00021-19
- Ruiz-Ranwez, V., Posadas, D. M., Estein, S. M., Abdian, P. L., Martin, F. A., and Zorreguieta, A. (2013). The BtaF trimeric autotransporter of *Brucella suis* is involved in attachment to various surfaces, resistance to serum and virulence. *PLoS One* 8:e79770. doi: 10.1371/journal.pone.0079770
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sieira, R. (2013). Regulation of virulence in *Brucella*: an eclectic repertoire of transcription factors defines the complex architecture of the virB promoter. *Future Microbiol.* 8, 1193–1208. doi: 10.2217/fmb.13.83
- Sieira, R., Bialer, M. G., Roset, M. S., Ruiz-Ranwez, V., Langer, T., Arocena, G. M., et al. (2017). Combinatorial control of adhesion of *Brucella abortus* 2308 to host cells by transcriptional rewiring of the trimeric autotransporter btaE gene. *Mol. Microbiol.* 103, 553–565. doi: 10.1111/MML.13576
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerdá, J., Grilló, M. J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J. M., et al. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.* 29, 125–138. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00913.x
- Spink, W. W. (1957). The nature of brucellosis. *Q. Rev. Biol.* 32:311. doi: 10.1086/401954
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., and Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* 36, 1765–1771. doi: 10.1093/bioinformatics/bt2828
- Suárez-Esquivel, M., Ruiz-Villalobos, N., Castillo-Zeledón, A., Jiménez-Rojas, C., Roop, R. M., Comerci, D. J., et al. (2016). *Brucella abortus* strain 2308 Wisconsin genome: importance of the definition of reference strains. *Front. Microbiol.* 7:1557. doi: 10.3389/fmicb.2016.01557
- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X., and Letesson, J. J. (2007). Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J. Bacteriol.* 189, 6035–6047. doi: 10.1128/JB.00265-07
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., et al. (2022). AlphaFold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 50, D439–D444. doi: 10.1093/nar/gkab1061
- Viadas, C., Rodríguez, M. C., Sangari, F. J., Gorvel, J. P., García-Lobo, J. M., and López-Goñi, I. (2010). Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One* 5, 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0010216
- Vizcaino, N., Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., and Fernández-Lago, L. (2001). Characterization of a *Brucella* species 25-kilobase DNA fragment deleted from *Brucella abortus* reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide. *Infect. Immun.* 69, 6738–6748. doi: 10.1128/IAI.69.11.6738-6748.2001
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., et al. (2018). T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–W303. doi: 10.1093/nar/gky427
- Yan, Y., Zhang, D., Zhou, P., Li, B., and Huang, S. Y. (2017). HDock: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Res.* 45, W365–W373. doi: 10.1093/nar/gkx407
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8. doi: 10.1038/nmeth.3213
- Zianni, M., Tessanne, K., Merighi, M., Laguna, R., and Tabita, F. R. (2006). Identification of the DNA bases of a DNase I footprint by the use of dye primer sequencing on an automated capillary DNA analysis instrument. *J. Biomol. Tech.* 17, 103–113.

- **La construcción y caracterización fenotípica de una cepa de *B. abortus* con una doble delección en los genes *bvrR* y *bvrS* permitió confirmar el papel del TCS BvrR/BvrS en la virulencia y la integridad de la membrana:**

1. Resumen:

El TCS BvrR/BvrS se describió mediante el aislamiento de dos mutantes atenuados denominados *bvrR*::Tn5 y *bvrS*::Tn5, los cuales fueron generados por transposición. La caracterización de estos mutantes permitió la comprensión del papel del TCS BvrR/BvrS en la sobrevivencia intracelular. Sin embargo, no se había podido realizar una comparación fenotípica con mutantes por delección, debido a que su construcción, consistentemente, se había reportado como infructuosa en *Brucella* y difícil en Rhizobiales filogenéticamente relacionadas con ortólogos de BvrR/BvrS. En este trabajo, utilizamos una estrategia de escisión de genes sin marcadores de resistencia a antimicrobianos, para generar una cepa mutante de *B. abortus* que carece de ambos genes, llamada *B. abortus* Δ *bvrRS*. La doble delección se verificó mediante PCR, Southern blot, Western blot, secuenciación Sanger y secuenciación de genoma completo, confirmando una mutación limpia sin otras alteraciones a nivel genómico. La cepa *B. abortus* Δ *bvrRS* compartió rasgos fenotípicos atenuados con ambos mutantes de transposición, confirmando el papel de BvrR/BvrS en la virulencia y la integridad de la membrana. Esta nueva cepa será una excelente herramienta para continuar los estudios sobre el papel de BvrR/BvrS en el estilo de vida de *B. abortus*.

2. Introducción:

El TCS BvrR/BvrS fue descrito en 1998 mediante el aislamiento y la caracterización fenotípica de dos cepas mutantes de *B. abortus* generadas por transposición, una en *bvrR* y otra en *bvrS*. Estas mutantes son resistentes a la kanamicina y fueron seleccionadas con base en una asociación de la virulencia con ciertas propiedades de membrana que rara vez están presentes de forma simultánea en otros patógenos Gram negativos (Sola-Landa *et al.*, 1998), como un

LPS poco inmunogénico, permeabilidad a agentes hidrofóbicos y resistencia a péptidos catiónicos bactericidas y a polimixina B.

Ambos mutantes por transposición presentan un fenotipo atenuado caracterizado por una reducida capacidad de invasión celular y ausencia de replicación en células HeLa y macrófagos, incapacidad para evitar la vía endocítica y ausencia de virulencia en el modelo murino (Sola-Landa *et al.*, 1998). De acuerdo con estudios posteriores, BvrS probablemente detecta señales asociadas al entorno intracelular, como bajo pH y disponibilidad de nutrientes (Altamirano-Silva *et al.*, 2018; 2021), y BvrR regula proteínas de la envoltura celular para las interacciones hospedero-patógeno, entre ellas Omp25 (Guzmán-Verri *et al.*, 2002), una OMP con funciones estructurales (Godessart *et al.*, 2021) que está asociada con la persistencia bacteriana *in vivo* (Degos *et al.*, 2020). BvrR también regula el estado metabólico (Viadas *et al.*, 2010) y los circuitos de virulencia para el tránsito intracelular y la salida de la célula hospedera (Altamirano-Silva *et al.*, 2018; 2021).

El uso de mutantes de transposición que codifican resistencia a los antimicrobianos, aunque no es ideal, ha sido una alternativa a la construcción de mutantes en este TCS, la cual ha resultado difícil en *Brucella* (Sola-Landa *et al.*, 1998; Barbier *et al.*, 2011) y en Rhizobiales filogenéticamente relacionados que tienen ortólogos de BvrR/BvrS, como el TCS ExoS/ChvI de *S. meliloti* (Doherty *et al.*, 1988; Osterås *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1988; Wells *et al.*, 2007; Bélanger *et al.*, 2009), el TCS ChvG/ChvI de *A. tumefaciens* (Charles & Nester, 1993; Mantis *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2012) y el TCS BatR/BatS de *Bartonella henselae* (Quebatte *et al.*, 2010). Por lo tanto, obtener un mutante por delección sin resistencia adquirida a antibióticos es de utilidad para comparar y corroborar los fenotipos (Maksymiuk *et al.*, 2015).

En esta Tesis, construimos cepa de *B. abortus* con una doble delección en *bvrR* y *bvrS* llamada *B. abortus* $\Delta bvrRS$. El fenotipo de *B. abortus* $\Delta bvrRS$ resultó atenuado en el modelo de cultivo celular, al igual que el descrito para ambos mutantes de transposición, lo cual contribuyó a validar el papel de BvrR/BvrS en la virulencia.

3. Artículo científico:

A continuación, se adjunta en pdf el artículo publicado en la revista "*Microorganisms*" sobre la generación de la doble mutante en los genes que codifican el TCS BvrR/BvrS y su caracterización fenotípica.



Article

A *bvrR/bvrS* Non-Polar *Brucella abortus* Mutant Confirms the Role of the Two-Component System BvrR/BvrS in Virulence and Membrane Integrity

Olga Rivas-Solano ^{1,*}, Kattia Núñez-Montero ², Pamela Altamirano-Silva ³, Nazareth Ruiz-Villalobos ⁴, Elías Barquero-Calvo ⁴, Edgardo Moreno ⁴, Esteban Chaves-Olarte ³ and Caterina Guzmán-Verri ⁴

- ¹ Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago 30109, Costa Rica
² Laboratorio Facultad Ciencias de la Salud, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Chile, Temuco 4813003, Chile; kattia.nunez@uautonoma.cl
³ Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José 2060, Costa Rica; pamelaltamiranosilva@ucr.ac.cr (P.A.-S.); esteban.chaves@ucr.ac.cr (E.C.-O.)
⁴ Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad Nacional, Heredia 40104, Costa Rica; nazareth.ruiz.villalobos@una.cr (N.R.-V.); elias.barquero.calvo@una.cr (E.B.-C.); edgardo.moreno.robles@una.cr (E.M.); catguz@una.cr (C.G.-V.)
* Correspondence: orivas@itcr.ac.cr; Tel.: +506-2550-9546



Citation: Rivas-Solano, O.; Núñez-Montero, K.; Altamirano-Silva, P.; Ruiz-Villalobos, N.; Barquero-Calvo, E.; Moreno, E.; Chaves-Olarte, E.; Guzmán-Verri, C. A *bvrR/bvrS* Non-Polar *Brucella abortus* Mutant Confirms the Role of the Two-Component System BvrR/BvrS in Virulence and Membrane Integrity. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2014. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082014>

Academic Editors:
Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat and Charalambos Billinis

Received: 28 June 2023
Revised: 25 July 2023
Accepted: 2 August 2023
Published: 5 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Brucella abortus* is a bacterial pathogen causing bovine brucellosis worldwide. This facultative extracellular–intracellular pathogen can be transmitted to humans, leading to a zoonotic disease. The disease remains a public health concern, particularly in regions where livestock farming is present. The two-component regulatory system BvrR/BvrS was described by isolating the attenuated transposition mutants *bvrR::Tn5* and *bvrS::Tn5*, whose characterization led to the understanding of the role of the system in bacterial survival. However, a phenotypic comparison with deletion mutants has not been performed because their construction has been unsuccessful in brucellae and difficult in phylogenetically related *Rhizobiales* with BvrR/BvrS orthologs. Here, we used an unmarked gene excision strategy to generate a *B. abortus* mutant strain lacking both genes, called *B. abortus* $\Delta bvrRS$. The deletion was verified through PCR, Southern blot, Western blot, Sanger sequencing, and whole-genome sequencing, confirming a clean mutation without further alterations at the genome level. *B. abortus* $\Delta bvrRS$ shared attenuated phenotypic traits with both transposition mutants, confirming the role of BvrR/BvrS in pathogenesis and membrane integrity. This *B. abortus* $\Delta bvrRS$ with a non-antimicrobial marker is an excellent tool for continuing studies on the role of BvrR/BvrS in the *B. abortus* lifestyle.

Keywords: *Brucella abortus*; two-component system BvrR/BvrS; attenuated mutants

1. Introduction

Brucella organisms are Gram-negative facultative extracellular–intracellular pathogens that cause brucellosis, a neglected zoonotic disease with a worldwide distribution. *Brucella abortus* infects cattle and exhibits a strong tropism for the reproductive system, causing abortion, infertility, decreased milk production, reproductive failure, epididymitis, and hence, economic losses. Humans are accidental hosts, initially developing an acute febrile disease that could become a chronic infection with osteoarticular, gastrointestinal, hepatobiliary, pulmonary, genitourinary, cardiovascular, and neurological complications [1].

Brucellae lack classical virulence factors, and their pathogenicity depends on their ability to invade, survive, and replicate inside host professional and non-professional phagocytes. During their intracellular lifecycle, brucellae avoid the endocytic pathway and redirect their trafficking to a replicative compartment derived from the endoplasmic reticulum [2,3]. Therefore, the adaptation to this intracellular trafficking requires extremely

well-coordinated gene expression, mainly through two-component signal transduction systems (TCSs).

In brucellae, the TCS BvrR/BvrS comprises the sensor membrane protein BvrS and its cognate cytoplasmic response regulator BvrR. This TCS was described in 1998 through the isolation and phenotypic characterization of two *B. abortus* kanamycin-resistant transposition mutants, one in *bvrR* and the other in *bvrS*. These mutants were selected based on an association of brucellae virulence with peculiar membrane properties rarely present simultaneously in other Gram-negative pathogens [4], like a low-immunogenic LPS, permeability to hydrophobic agents, and resistance to bactericidal cationic peptides and polymyxin B. Both transposition mutants exhibited an attenuated phenotype characterized by reduced invasiveness and absence of replication in HeLa cells and macrophages, incapability to avoid the lysosomal route, and lack of virulence in the murine model [4]. According to subsequent studies, BvrS probably senses signals associated with the intracellular environment, like low pH and nutrient availability [5,6], and BvrR regulates cell envelope proteins for host–pathogen interactions, among them Omp25 [7], an outer membrane protein with structural functions [8] that is associated with bacterial persistence *in vivo* [9]. BvrR also regulates metabolic fitness [10], pathways for intracellular life [11], and virulence circuits for intracellular traffic and cell egress [5,6].

The use of transposition mutants encoding antimicrobial resistance, although not ideal, has been an alternative to the construction of mutants in this TCS, which has proven difficult to generate in brucellae [4,12] and in other phylogenetically related *Rhizobiales* having orthologs of BvrR/BvrS, like the *Sinorhizobium meliloti* TCS ExoS/ChvI [13–17], the *Agrobacterium tumefaciens* TCS ChvG/ChvI [18–20], and the *Bartonella henselae* TCS BatR/BatS [21]. Therefore, a clean deletion mutant with non-acquired antibiotic resistance should be obtained to compare and corroborate phenotypes [22]. Here, we constructed a *B. abortus* double-null mutant strain in *bvrR* and *bvrS* called *B. abortus* Δ *bvrRS*. The phenotype of *B. abortus* Δ *bvrRS* was attenuated in the cell culture model like the one described for both transposition mutants, validating the role of BvrR/BvrS in virulence.

2. Materials and Methods

Bacterial strains, growth conditions, and plasmids. All procedures involving live *B. abortus* were carried out according to the “Reglamento de Bioseguridad de la CCSS 39975–0”, 2012, after the “Decreto Ejecutivo #30965-S”, 2002, and research protocol SIA 0652–19 approved by the National University, Costa Rica. The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. The culture media were Tryptic Soy Broth (TSB), Tryptic Soy Agar (TSA), SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, and 20 mM glucose), Columbia Agar supplemented with 5% (*v/v*) of sheep blood (CBA), and Luria–Bertani (LB) medium. When required, the following supplements were added to the different culture media: 10% (*w/v*) sucrose (Suc), 30 µg/mL kanamycin (Km), 100 µg/mL spectinomycin (Spc), and 30 µg/mL chloramphenicol (Cm). All bacterial cultures were incubated at 37 °C, under constant shaking at 200 rpm when necessary. The cultures were inoculated with 7×10^9 CFU in a final volume of 20 mL TSB to obtain growth curves. The optical densities were measured at 420 nm every 2 to 4 h.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Bacterial Strains/Plasmids	Phenotype/Characteristics	Source/Reference
<i>B. abortus</i> 2308W	Parental strain, smooth LPS, Nal ^R , virulent	[23]
<i>B. abortus</i> <i>bvrS</i> ::Tn5	2308-derivative, <i>bvrS</i> ::Tn5, smooth LPS, attenuated	[4]
<i>B. abortus</i> <i>bvrR</i> ::Tn5	2308-derivative, <i>bvrR</i> ::Tn5, smooth LPS, attenuated	[4]
<i>B. abortus</i> Δ <i>bvrRS</i>	2308W-derivative, Δ <i>bvrRS</i> , smooth LPS, attenuated	This study
pNTPS138	Suicide vector, <i>oriT</i> , <i>sacB</i> Km ^R	M.R.K. Alley, unpublished
p Δ <i>bvrRS</i>	pNTPS138 derivative, Δ <i>bvrRS</i> , Km ^R	Courtesy of Clayton C. Caswell

The construction of *B. abortus* $\Delta bvrRS$. The genes *bvrR* (BAW_12006) and *bvrS* (BAW_12007) of the parental strain *B. abortus* 2308W were mutated using a previously described [24,25], non-polar, unmarked gene excision strategy with modifications (Supplementary Figure S1). A *bvrR* upstream (Up) fragment from approximately 1 kb to the second codon of the *bvrR* coding sequence (coordinates 2010312 to 2011285) was amplified with the primers *bvrRS*-Up-For and *bvrRS*-Up-Rev (Supplementary Table S1). A *bvrS* downstream (Dn) fragment containing the last two codons of the *bvrS* coding region to approximately 1 kb downstream (coordinates 2013910 to 2014911) was amplified with the primers *bvrRS*-Dn-For and *bvrRS*-Dn-Rev (Supplementary Table S1). The Up fragment was cut with *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania), and the Dn fragment was cut with *Pst*I (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). Both fragments were treated with polynucleotide kinase in a ligase buffer and included in a single ligation mix with *Bam*HI/*Pst*I-digested pNPTS138 (Table 1), a suicide vector expressing kanamycin (Km) resistance, and the gene *sacB* for sucrose (Suc) counterselection. The resulting plasmid was called p $\Delta bvrRS$ (Table 1) and lacked a 2623 bp region located between the Up and Dn fragments in the genome of the parental strain and corresponding to most of the coding sequences of *bvrR* and *bvrS* (coordinates 2011286 to 2013909). Subsequently, 1–3 μ L of p $\Delta bvrRS$ in distilled water was electroporated into 40 μ L of *B. abortus* 2308W competent cells prepared as described in [24,25]. Electroporation was performed in a BTXTM cell electroporator using the following parameters: 2.5 kV at 400 ohms and 50 mF. After electroporation, 1 mL of SOC medium was added, and the cells were incubated overnight. Then, 100–200 μ L volumes were plated on CBA + Km to select the clones harboring p $\Delta bvrRS$. The plates were incubated for 6–10 days. Single colonies were selected, transferred into TSB, and incubated overnight. Volumes of 50, 100, and 200 μ L were plated on TSA + 10% Suc to counterselect clones integrating the Up–Dn construct into the chromosome of the parental strain by allelic exchange. The plates were incubated for 3–6 days. Single colonies were picked, and exact replicas were cultured on TSA + 10% Suc and TSA + Km, to select Suc^R and Km^S clones that were expected to have lost both *bvrRS* genes and the suicidal plasmid. The plates were incubated for 2–3 days. The Suc^R and Km^S clones were screened by colony PCR with the primers *bvrRS*-Con-For and *bvrRS*-Con-Rev (Supplementary Table S1) in a reaction with DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). The “Con” primers amplify a 3332 bp fragment in the parental strain (coordinates 2011017 to 2014349) and a 709 bp fragment in the *B. abortus* $\Delta bvrRS$ mutant strain. Clones giving the expected result for the mutant strain were also subjected to PCR with the *bvrR*_bv1 pair of primers (Supplementary Table S1). The “bv1” primers amplify a 63 bp fragment of the *bvrR* coding sequence in the parental strain (coordinates 2011468 to 2011531) and are not expected to amplify any PCR product in the mutant strain. Mutant clones selected based on the presence of the 709 bp Con-amplicon and the absence of the 63 bp bv1-amplicon, were subjected to biochemical identification tests and further confirmation by DNA Sanger sequencing, Southern blot, Western blot, and whole-genome sequencing, as described below.

Biochemical identification. Basic biochemical tests were performed as described in [26] using the potential mutant clones and the strain *B. abortus* 2308W. The performed tests included urease (1 h and 24 h), oxidase, H₂S production, nitrate reduction, and sensitivity to thionine (20 μ g/mL) (24 h and 72 h) and basic fuchsin (20 μ g/mL) (24 h and 72 h). The presence of a smooth LPS was verified through the acriflavine agglutination test as described in [26].

Southern Blot. The mutation was confirmed by a Southern blot as described in [27], with a few modifications. Genomic DNA from the parental and the mutant strains was extracted with the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Purified DNA was double digested with 25 U of *Bsh*TI (*Age*I) and 12.5 U of *Mls*I (*Msc*I) restriction enzymes (Thermo Scientific, USA), respectively, cutting the *B. abortus* 2308W genomic DNA at positions 2011220 (–60 from *bvrR* start codon) and 2014898 (+983 from *bvrS* stop codon) and, respectively, generating 3679 bp and 1055 bp fragments in the parental strain and in the *B. abortus* $\Delta bvrRS$ mutant strains. The digested DNA of each

strain was separated through electrophoresis in a 0.6% agarose gel for 2 h at 100 V, and the gel was blotted onto a nylon membrane (Roche, Mannheim, Germany). The probe was generated using the primers *bvrRS*-South (Supplementary Table S1), amplifying a fragment of 299 bp of the coding sequence of the *bvrS* downstream gene (BAW_12008, coordinates 2013977 to 2014276). Probe labeling, hybridization, and detection were performed using the DIG DNA Labeling and Detection kit (Roche, Mannheim, Germany).

Western Blot. The *BvrS*, *BvrR*, and *Omp25* expressions were assessed as described in [27], with modifications. The bacterial cultures were grown for up to 32 h to test protein expression at different growth phases. The loading control was *Omp19*.

Sanger sequencing. The Con-amplicon of the mutant strain was Sanger sequenced to confirm the absence of *bvrR* and *bvrS*. The regions recombined during the deletion of the *bvrR* and *bvrS* genes were also sequenced. The upstream recombination region was amplified with *pckA* primers (Supplementary Table S1), obtaining an amplicon of 677 bp (coordinates 2009968 to 2010645). The downstream recombination region was amplified with the *revtrans20682069-2.3* and *revtrans20692070-2.5* primers (Supplementary Table S1), obtaining an amplicon of 628 bp (coordinates 2014621 to 2015249). All amplicons were cycle sequenced using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) and sent to “Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular”, at the University of Costa Rica, for capillary electrophoresis. The sequencing results were analyzed using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [28], with *blastn* and default parameters to look for their correspondence in the genomic sequence of *B. abortus* 2308, chromosome I (NCBI Reference Sequence: NC_007618.1).

Whole-genome sequencing. For whole-genome sequencing, genomic DNA from *B. abortus* 2308W and *B. abortus* Δ *bvrRS* was obtained using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) from liquid cultures grown to the stationary phase. Genomic libraries were prepared with the rapid barcoding sequencing SQK-RBK004 kit (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) for sequencing on a minION platform using the MinKNOW software version 22.08.4, according to the manufacturers’ recommendations. Base calling and the conversion of the raw data to the FASTQ format were performed with Guppy v.3.6.0., while the reads’ quality was verified with nanoplot 1.40.2 [29]. Low-quality reads ($Q < 10$ and minimum length of 1000) were filtered using nanofilt 2.8.0 [29]. Adapters and barcodes were trimmed with Porechop 0.2.4. Reads that passed the quality check were used for whole-genome assembly with Unicycler v0.4.8 [30]. The assembled genomes were verified with QUAST 5.0.2 (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies Version) [31] and CheckM v1.1.3 for completeness and contamination [32]. The project was deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the following accession numbers: Bioproject PRJNA891361, assemblies CP109916–CP109917 and CP109914–CP109915, and raw sequencing data SRR21939256 and SRR21939255 for *B. abortus* 2308W and *B. abortus* Δ *bvrRS*, respectively. The resulting complete-genome assemblies at the chromosome level were compared using BLAST [33] with *blastn* type and default parameters to verify the genomic differences between *B. abortus* Δ *bvrRS* and *B. abortus* 2308W. Genome content coverage was also verified by read mapping against the assembled genome using the long-read mapping pipeline Vulcan 1.0.3 [34]. Genomic visualizations were conducted with Artemis Comparison Tool 18.2.0 [35].

Gentamicin-protection assay and intracellular replication quantification. Murine RAW 264.7 macrophages (ATCC TIB-71) or HeLa epithelial cells (ATCC clone CCL-2) were cultivated and infected with *B. abortus* strains in the exponential growth phase as described in [5,27]. The number of intracellular, viable *B. abortus* CFUs was determined at 0, 24, and 48 h after infection.

Membrane integrity tests. The sensitivity to the bactericidal action of non-immune serum was tested as described in [27], with an incubation time of 45 min with the non-immune serum instead of 90 min. The minimal inhibitory concentration of polymyxin B in TSB at pH 7.0 and 6.0 was determined by the microdilution method as described in [27].

Statistical analyses. The Kruskal–Wallis test for multiple comparisons was used as described in [27].

3. Results

3.1. The $\Delta bvrRS$ Mutant Strain Is a Null Mutant

In this study, we constructed a null mutant with a deletion in *bvrR* and *bvrS* using an unmarked gene excision approach. The colony PCR screening of the Suc^R and Km^S clones revealed four potential mutant clones lacking *bvrR* and *bvrS*, numbered 3, 4, 41, and 42 (Supplementary Figure S2). Clone 4 was selected for further analysis and renamed *B. abortus* $\Delta bvrRS$. This strain tested positive in the following biochemical tests used for the identification of the *Brucella* genus: urease at 1 h and 4 h; oxidase, H_2S production, and resistance to fuchsin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and thionine (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 72 h; and negative reactions to nitrate reduction and resistance to fuchsin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and thionine (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 24 h.

Like the parental strain, *B. abortus* $\Delta bvrRS$ excluded crystal violet, did not agglutinate with acriflavine, and agglutinated with antibodies against smooth LPS, indicating the conservation of the S-LPS phenotype as the parental strain. In TSB, *B. abortus* $\Delta bvrRS$ consistently exhibited a prolonged lag phase in all independent replicas, retarding entry into the log phase and catching up with *B. abortus* 2308 W in the stationary phase (Figure 1a). The Southern blot results demonstrated a deletion of approximately 3000 bp (Figure 1b); the Western blot results confirmed a lack of expression of BvrR and BvrS (Figure 1c), and the Sanger sequencing results showed an in-frame deletion of the *bvrRS* genes and the correct recombination of the U_p and the D_n fragments.

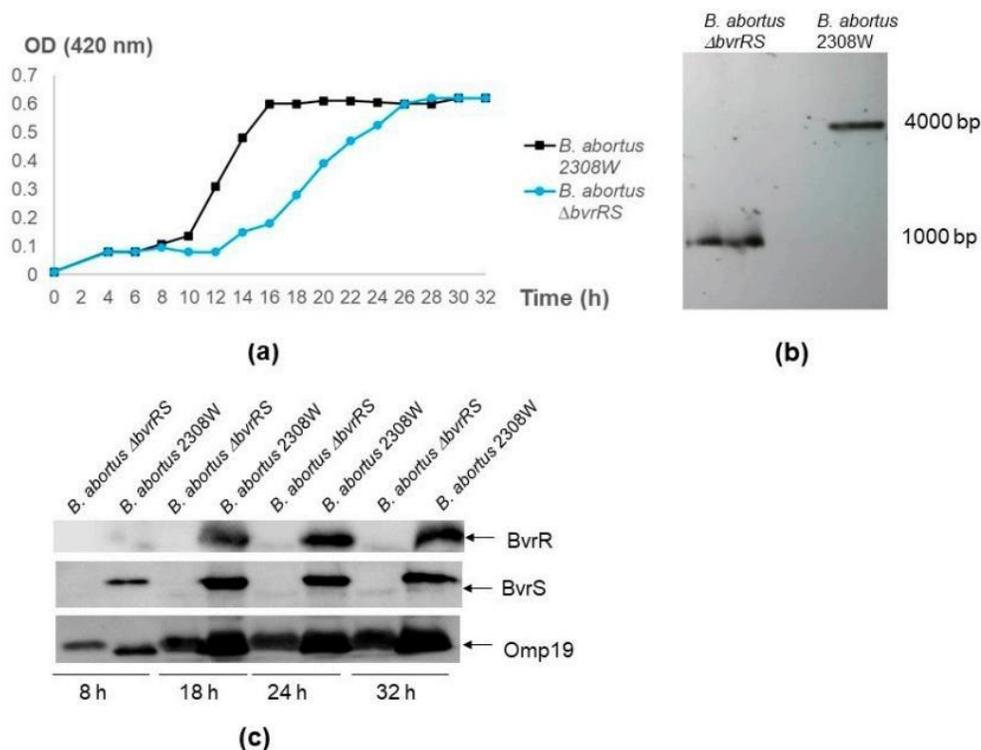


Figure 1. Confirmation of the *B. abortus* $\Delta bvrRS$ double-mutant strain. (a) Growth curve of *B. abortus* $\Delta bvrRS$ compared to *B. abortus* 2308W. An inoculum of 7×10^9 CFU/mL was incubated in TSB at 37 °C

and 200 rpm. Optical density (OD) at 420 nm was measured every 2–3 h, up to 32 h. (b) Southern blot assay. Genomic DNA of *B. abortus* $\Delta bvrRS$ and *B. abortus* 2308W was extracted and digested with *BshTI* (*AgeI*) and *MslI* (*MscI*). A probe targeting the coding sequence of BAW_12008 downstream of *bvrS*, hybridized with a ~1000 bp band in *B. abortus* $\Delta bvrRS$ and a ~4000 bp band in *B. abortus* 2308W. The difference in molecular weight between these two bands matched the size of the excised genes (2635 bp), confirming the deletion of the *bvrRS* genes. (c) Western blot analysis of BvrR and BvrS expression according to growth phase in *B. abortus* $\Delta bvrRS$ and *B. abortus* 2308W. Both strains were grown in TSB for 32 h, and representative time points of the different growth phases were analyzed according to the growth curves shown in the first panel. Equal amounts (20 μ g) of whole-bacterium lysates were separated through 12.5% SDS-PAGE, blotted, and analyzed with anti-BvrR, anti-BvrS, and anti-Omp19 as the loading control. The results are representative of at least three independent experiments.

3.2. Whole-Genome Sequencing

The obtained coverage was over 68 \times ; the GC content was 57.22% GC, and over 97.99% predicted completeness was achieved with contamination below 0.71% (complete sequencing and assembly results in Supplementary Table S2). The genome assembly resulted in two contigs for both strains, representing the complete chromosomes of *B. abortus* composed of 2.1 and 1.2 Mb, respectively.

BLAST comparison between the strain 2308W and the mutant strain confirmed the deletion of the *bvrRS* genes (coordinates 2011286 to 2013909) without further alterations in the genome (Figure 2).

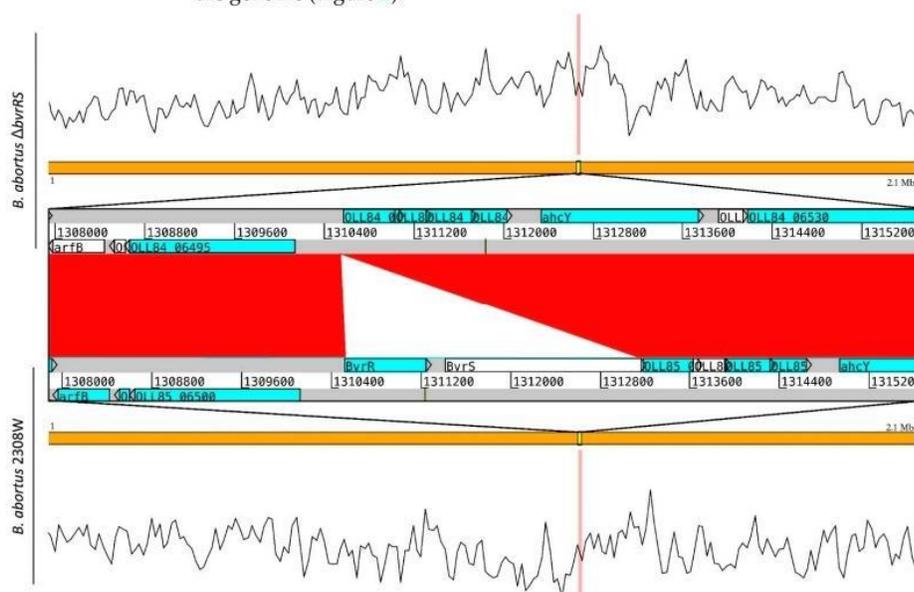


Figure 2. BLAST comparison of the genomic sequences obtained from the strains *B. abortus* $\Delta bvrRS$ and *B. abortus* 2308W, confirming the deletion of the *bvrRS* genes in *B. abortus* $\Delta bvrRS$. The orange lines show the 2.1 Mb chromosome of *B. abortus*, with the reads' coverage across the genome shown by a mapping visualization in the upper and lower graphs. The section of the chromosome with alignment gaps is highlighted and amplified, showing gray lines as the genome sequences and blue boxes as coding sequences (CDSs), and the red in the middle represents 99% identity among regions compared. Deletion of the genes *bvrR* and *bvrS* is shown by the absence of similarity among both regions (white triangle). Up- and downstream CDSs show no additional alterations in *B. abortus* $\Delta bvrRS$.

3.3. The $\Delta bvrRS$ Mutant Strain Displays an Attenuated Phenotype

To characterize the virulence phenotype of *B. abortus* $\Delta bvrRS$, we assessed its ability to replicate intracellularly in HeLa cells and RAW macrophages. As shown in Figure 3, *B. abortus* 2308W was able to replicate intracellularly in both types of cells, but *B. abortus* $\Delta bvrRS$ and the transposition mutants, *B. abortus* *bvrR*::Tn5 and *B. abortus* *bvrS*::Tn5, did not, confirming attenuation in the cell model.

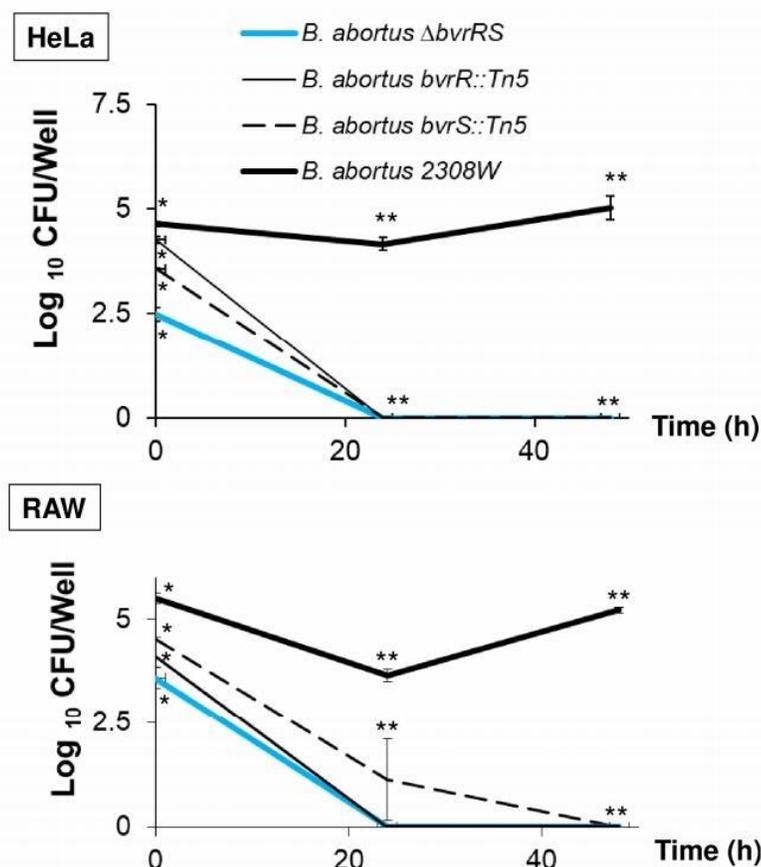


Figure 3. *B. abortus* $\Delta bvrRS$ displays lack of replication in HeLa cells and RAW macrophages. Cell cultures were grown in DMEM until approximately 80% of confluence and then inoculated in triplicate with an MOI of 100 for HeLa and 500 for the RAW macrophages. The extracellular bacteria were killed with gentamicin, and the infected cells were incubated for 0, 24, and 48 h, and bacterial counts were performed in triplicate at the three post-infection times. The results are representative of at least three independent experiments. * Statistically significant differences ($p < 0.05$) between the four strains (Kruskal–Wallis test for multiple comparisons). ** Statistically significant differences ($p < 0.05$) between *B. abortus* 2308W and the other three strains (Kruskal–Wallis test for multiple comparisons).

3.4. The $\Delta bvrRS$ Mutant Strain Exhibits Altered Membrane Integrity

To assess the membrane integrity of *B. abortus* $\Delta bvrRS$, we first performed a susceptibility to polymyxin B test. As shown in Table 2, at pH 7.0 and pH 6.0, the MIC values of *B. abortus* $\Delta bvrRS$ and both transposition mutants, *B. abortus* *bvrR*::Tn5 and *B. abortus* *bvrS*::Tn5, were lower by at least two dilutions of difference than those of the parental

strain, suggesting altered membrane integrity. All the MICs increased by at least two dilutions of difference compared to that at pH 7.0, indicating a higher resistance under acidic conditions.

Table 2. Results of the susceptibility test for polymyxin B.

Strain	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	
	pH 7.0	pH 6.0
<i>B. abortus</i> 2308W	4–8	64
<i>B. abortus</i> ΔbvrRS	1–4	4–8
<i>B. abortus</i> $\text{bvrR}::\text{Tn5}$	2	8–16
<i>B. abortus</i> $\text{bvrS}::\text{Tn5}$	2	16

Then, we confirmed that *B. abortus* ΔbvrRS was susceptible to the action of a non-immune serum, unlike the parental strain (Figure 4a), and we evaluated the expression of Omp25, known to be directly regulated by the TCS BvrR/BvrS, confirming that *B. abortus* ΔbvrRS displayed a lack of expression of this outer membrane protein, unlike *B. abortus* 2308W (Figure 4b).

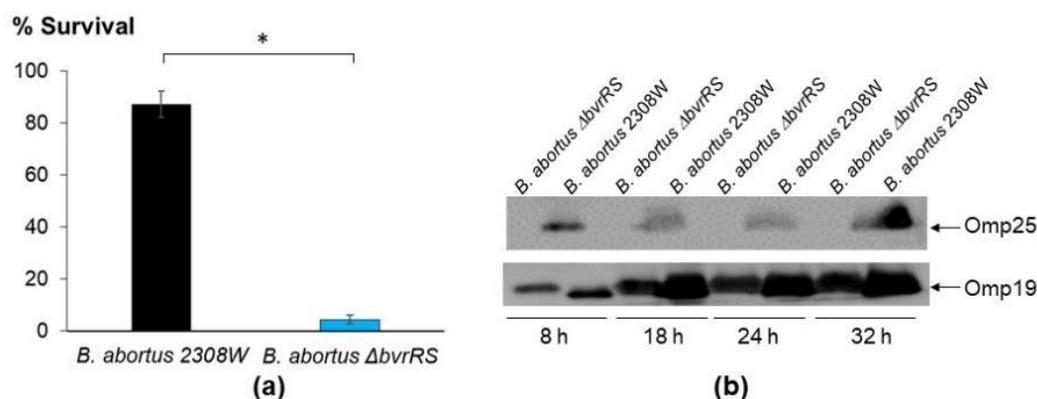


Figure 4. Characterization of the membrane integrity of *B. abortus* ΔbvrRS . (a) Loss of resistance to non-immune serum in *B. abortus* ΔbvrRS compared to *B. abortus* 2308W. Both strains were exposed to non-immune human serum at 37 °C for 45 min, and the survival percentage was calculated. (b) Western blot analysis of Omp25 expression, according to growth phase in *B. abortus* ΔbvrRS and *B. abortus* 2308W. Both strains were grown in TSB for 32 h, and representative time points of the different growth phases were analyzed according to the growth curves shown in Figure 1a. Equal amounts (20 μg) of whole-bacterium lysates were separated through 12.5% SDS-PAGE, blotted, and analyzed with anti-Omp25 and Omp19 as the loading control. These results are representative of at least three independent experiments. * $p < 0.05$ (Kruskal–Wallis test for multiple comparisons).

4. Discussion

The role of the TCS BvrR/BvrS in the virulence of brucellae has been studied in transposition mutants with a kanamycin-resistance marker in the inserted transposon [4]. Construction and characterization of a null mutant was necessary to compare and corroborate phenotypic traits and to obtain an antibiotic-marker-free mutant strain. However, previous attempts to construct clean mutants were unsuccessful, prompting the designation of the *bvrRS* genes as essential [12]. Later it was shown that they did not seem to be essential for extracellular growth [36], which implied that they could be mutated. Since the construction of single mutants in several orthologs of BvrR/BvrS in other cell-associated *Rhizobiales* was consistently reported as difficult [13–21], we employed a non-polar, unmarked gene

excision strategy [24,25] to construct a *B. abortus* mutant strain with a deletion in both *bvrRS* genes. Different experimental approaches confirmed the in-frame double deletion, and the whole-genome sequencing results demonstrated a clean null mutation without further alterations in the genome.

The phenotypic characterization of *B. abortus* $\Delta bvrRS$ revealed a smooth LPS, unaltered biochemical characteristics, retarded lag growth phase defects, inability to replicate intracellularly in cell models, susceptibility to polymyxin B and to human non-immune serum, and lack of expression of Omp25. These results are consistent with previous studies about the role of the TCS BvrR/BvrS that were performed using the transposition mutants *B. abortus bvrR::Trn5* and *B. abortus bvrS::Trn5* [4,7,37].

In conclusion, a *B. abortus* null mutant in the *bvrR/bvrS* genes was successfully obtained through allelic replacement. This novel mutant does not harbor any resistant marker gene and will be useful for further studies on the TCS BvrR/BvrS.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11082014/s1>: Figure S1: Unmarked gene excision approach used in this study to generate the $\Delta bvrRS$ mutant; Figure S2: Colony PCR screening of the Suc^R and Km^S clones to look for potential mutants; Table S1: List of primers used in this study; Table S2: Quality results of *B. abortus* sequencing and whole-genome assembly.

Author Contributions: Conceptualization, C.G.-V.; methodology, O.R.-S. and K.N.-M.; validation, P.A.-S., N.R.-V. and E.B.-C.; formal analysis, O.R.-S., K.N.-M. and P.A.-S.; investigation, O.R.-S., K.N.-M., P.A.-S., N.R.-V., E.B.-C., E.M., E.C.-O. and C.G.-V.; resources, E.C.-O. and K.N.-M.; data curation, K.N.-M.; writing—original draft preparation, O.R.-S. and C.G.-V.; writing—review and editing, O.R.-S., K.N.-M., P.A.-S., N.R.-V., E.B.-C., E.M., E.C.-O. and C.G.-V.; visualization, O.R.-S., K.N.-M. and P.A.-S.; supervision, C.G.-V., E.M. and E.C.-O.; project administration, C.G.-V., E.C.-O., O.R.-S. and K.N.-M.; funding acquisition, C.G.-V., E.C.-O., O.R.-S. and K.N.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by FEES-CONARE, grant 02-2020 to C.G.-V.; FIDA-UNA, grant SIA 0047-17 to C.G.-V.; UCREA-UCR, grant B8762 and C0456 to E.C.-O.; ITCR, grant 15-15-D to O.R.-S. and 1510171 to K.N.-M.; PINN-MICITT, grant PND-137-15-1 to O.R.-S.; and ANID-CHILE, grant FONDECYT 1210563 to K.N.-M.

Data Availability Statement: The data presented in this study are openly available in GenBank, accession numbers [CP109914, CP109915, CP109916, CP109917], and the SRA accession numbers for the raw reads are SRR21939256 and SRR21939255.

Acknowledgments: To Clayton C. Caswell and Roy Martin Roop II for the p $\Delta bvrRS$. To Axel Cloeck-aert for providing monoclonal antibodies against Omp19 and Omp25. To Danilo Solano Quesada for his technical help with Western blot assays.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of this study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of this manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Corbel, M.J.; Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization; World Organisation for Animal Health. *Brucellosis in Humans and Animals*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2006.
2. Gorvel, J.P.; Moreno, E. *Brucella* Intracellular Life: From Invasion to Intracellular Replication. *Vet. Microbiol.* **2002**, *90*, 281–297. [CrossRef] [PubMed]
3. Moreno, E.; Moriyón, I. *Brucella melitensis*: A Nasty Bug with Hidden Credentials for Virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1–3. [CrossRef] [PubMed]
4. Sola-Landa, A.; Pizarro-Cerdá, J.; Grilló, M.; Moreno, E.; Moriyón, I.; Blasco, J.; Gorvel, J.; López-Goñi, I. A Two-component Regulatory System Playing a Critical Role in Plant Pathogens and Endosymbionts Is Present in *Brucella abortus* and Controls Cell Invasion and Virulence. *Mol. Microbiol.* **1998**, *29*, 125–138. [CrossRef] [PubMed]
5. Altamirano-Silva, P.; Meza-Torres, J.; Castillo-Zeledón, A.; Ruiz-Villalobos, N.; Zuñiga-Pereira, A.M.; Chacón-Díaz, C.; Moreno, E.; Guzmán-Verri, C.; Chaves-Olarte, E. *Brucella abortus* Senses the Intracellular Environment through the BvrR/BvrS Two-Component System, Which Allows *B. abortus* To Adapt to Its Replicative Niche. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, e00713-17. [CrossRef]

6. Altamirano-Silva, P.; Cordero-Serrano, M.; Méndez-Montoya, J.; Chacón-Díaz, C.; Guzmán-Verri, C.; Moreno, E.; Chaves-Olarte, E. Intracellular Passage Triggers a Molecular Response in *Brucella abortus* That Increases Its Infectiousness. *Infect. Immun.* **2021**, *89*, e00004–21. [[CrossRef](#)]
7. Guzmán-Verri, C.; Manterola, L.; Sola-Landa, A.; Parra, A.; Cloeckart, A.; Garin, J.; Gorvel, J.-P.; Moriyón, I.; Moreno, E.; López-Goñi, I. 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. USA* **2002**, *99*, 12375–12380. [[CrossRef](#)]
8. Godessart, P.; Lannoy, A.; Dieu, M.; Van der Verren, S.E.; Soumillion, P.; Collet, J.-F.; Remaut, H.; Renard, P.; De Bolle, X. β -Barrels Covalently Link Peptidoglycan and the Outer Membrane in the α -Proteobacterium *Brucella abortus*. *Nat. Microbiol.* **2021**, *6*, 27–33. [[CrossRef](#)]
9. Degos, C.; Hysenaj, L.; Gonzalez-Espinoza, G.; Arce-Gorvel, V.; Gagnaire, A.; Papadopoulos, A.; Pasquevich, K.A.; Méresse, S.; Cassataro, J.; Mémet, S.; et al. Omp25-dependent Engagement of SLAMF1 by *Brucella abortus* in Dendritic Cells Limits Acute Inflammation and Favours Bacterial Persistence in Vivo. *Cell. Microbiol.* **2020**, *22*, e13164. [[CrossRef](#)]
10. Viadas, C.; Rodriguez, M.C.; Sangari, F.J.; Gorvel, J.-P.; Garcia-Lobo, J.M.; López-Goñi, I. Transcriptome Analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS Two-Component Regulatory System. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10216. [[CrossRef](#)]
11. Rivas-Solano, O.; Van der Henst, M.; Castillo-Zeledón, A.; Suárez-Esquivel, M.; Muñoz-Vargas, L.; Capitan-Barríos, Z.; Thomson, N.R.; Chaves-Olarte, E.; Moreno, E.; De Bolle, X.; et al. The Regulon of *Brucella abortus* Two-Component System BvrR/BvrS Reveals the Coordination of Metabolic Pathways Required for Intracellular Life. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0274397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Barbier, T.; Nicolas, C.; Letesson, J.J. *Brucella* Adaptation and Survival at the Crossroad of Metabolism and Virulence. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 2929–2934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Doherty, D.; Leigh, J.A.; Glazebrook, J.; Walker, G.C. *Rhizobium meliloti* Mutants That Overproduce the *R. meliloti* Acidic Calcofluor-Binding Exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 4249–4256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Osterås, M.; Stanley, J.; Finan, T.M. Identification of *Rhizobium*-Specific Intergenic Mosaic Elements within an Essential Two-Component Regulatory System of *Rhizobium* Species. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5485–5494. [[CrossRef](#)]
15. Cheng, H.-P.; Walker, G.C. Succinoglycan Production by *Rhizobium meliloti* Is Regulated through the ExoS-ChvI Two-Component Regulatory System. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 20–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wells, D.H.; Chen, E.J.; Fisher, R.F.; Long, S.R. ExoR Is Genetically Coupled to the ExoS-ChvI Two-Component System and Located in the Periplasm of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *64*, 647–664. [[CrossRef](#)]
17. BÄ@langer, L.; Dimmick, K.A.; Fleming, J.S.; Charles, T.C. Null Mutations in *Sinorhizobium meliloti* ExoS and ChvI Demonstrate the Importance of This Two-Component Regulatory System for Symbiosis. *Mol. Microbiol.* **2009**, *74*, 1223–1237. [[CrossRef](#)]
18. Charles, T.C.; Nester, E.W. A Chromosomally Encoded Two-Component Sensory Transduction System Is Required for Virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 6614–6625. [[CrossRef](#)]
19. Mantis, N.J.; Winans, S.C. The Chromosomal Response Regulatory Gene ChvI of *Agrobacterium tumefaciens* Complements an *Escherichia coli* PhoB Mutation and Is Required for Virulence. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 6626–6636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wu, C.-F.; Lin, J.-S.; Shaw, G.-C.; Lai, E.-M. Acid-Induced Type VI Secretion System Is Regulated by ExoR-ChvG/ChvI Signaling Cascade in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002938. [[CrossRef](#)]
21. Quebatte, M.; Dehio, M.; Tropel, D.; Basler, A.; Toller, I.; Raddatz, G.; Engel, P.; Huser, S.; Schein, H.; Lindroos, H.L.; et al. The BatR/BatS Two-Component Regulatory System Controls the Adaptive Response of *Bartonella henselae* during Human Endothelial Cell Infection. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 3352–3367. [[CrossRef](#)]
22. Maksymiuk, C.; Ioerger, T.; Balakrishnan, A.; Bryk, R.; Rhee, K.; Sacchetti, J.; Nathan, C. Comparison of Transposon and Deletion Mutants in *Mycobacterium tuberculosis*: The Case of Rv1248c, Encoding 2-Hydroxy-3-Oxoacid Synthase. *Tuberculosis* **2015**, *95*, 689–694. [[CrossRef](#)]
23. Suárez-Esquivel, M.; Ruiz-Villalobos, N.; Castillo-Zeledón, A.; Jiménez-Rojas, C.; Roop II, R.M.; Commerci, D.J.; Barquero-Calvo, E.; Chacón-Díaz, C.; Caswell, C.C.; Baker, K.S.; et al. *Brucella abortus* Strain 2308 Wisconsin Genome: Importance of the Definition of Reference Strains. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Caswell, C.C.; Gaines, J.M.; Roop, R.M. The RNA Chaperone Hfq Independently Coordinates Expression of the VirB Type IV Secretion System and the LuxR-Type Regulator BabR in *Brucella abortus* 2308. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 3–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Caswell, C.C.; Gaines, J.M.; Ciborowski, P.; Smith, D.; Borchers, C.H.; Roux, C.M.; Sayood, K.; Dunman, P.M.; Roop II, R.M. Identification of Two Small Regulatory RNAs Linked to Virulence in *Brucella abortus* 2308: *Brucella* Small RNAs Are Required for Virulence. *Mol. Microbiol.* **2012**, *85*, 345–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Alton, G.G.; Jones, L.M.; Angus, R.D.; Verger, J.M. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*; INRA: Paris, France, 1988; ISBN 978-2-7380-0042-2.
27. Castillo-Zeledón, A.; Ruiz-Villalobos, N.; Altamirano-Silva, P.; Chacón-Díaz, C.; Barquero-Calvo, E.; Chaves-Olarte, E.; Guzmán-Verri, C. A *Sinorhizobium meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens* ExoR Ortholog Is Not Crucial for *Brucella abortus* Virulence. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0254568. [[CrossRef](#)]
28. Altschu, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]

29. De Coster, W.; D’Hert, S.; Schultz, D.T.; Cruys, M.; Van Broeckhoven, C. NanoPack: Visualizing and Processing Long-Read Sequencing Data. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 2666–2669. [CrossRef]
30. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Gorrie, C.L.; Holt, K.E. Unicycler: Resolving Bacterial Genome Assemblies from Short and Long Sequencing Reads. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005595. [CrossRef]
31. Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G. QUASt: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 1072–1075. [CrossRef]
32. Parks, D.H.; Imelfort, M.; Skennerton, C.T.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W. CheckM: Assessing the Quality of Microbial Genomes Recovered from Isolates, Single Cells, and Metagenomes. *Genome Res.* **2015**, *25*, 1043–1055. [CrossRef]
33. BLAST Help Page. Available online: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs (accessed on 24 October 2022).
34. Fu, Y.; Mahmoud, M.; Muraliraman, V.V.; Sedlazeck, F.J.; Treangen, T.J. Vulcan: Improved Long-Read Mapping and Structural Variant Calling via Dual-Mode Alignment. *GigaScience* **2021**, *10*, giab063. [CrossRef] [PubMed]
35. Carver, T.J.; Rutherford, K.M.; Berriman, M.; Rajandream, M.-A.; Barrell, B.G.; Parkhill, J. ACT: The Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3422–3423. [CrossRef] [PubMed]
36. Sternon, J.-F.; Godessart, P.; Gonçalves de Freitas, R.; Van der Henst, M.; Poncin, K.; Francis, N.; Willemart, K.; Christen, M.; Christen, B.; Letesson, J.-J.; et al. Transposon Sequencing of *Brucella abortus* Uncovers Essential Genes for Growth In Vitro and Inside Macrophages. *Infect. Immun.* **2018**, *86*, e00312-18. [CrossRef] [PubMed]
37. Manterola, L.; Moriyón, I.; Moreno, E.; Sola-Landa, A.; Weiss, D.S.; Koch, M.H.J.; Howe, J.; Brandenburg, K.; López-Goñi, I. The Lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR Mutants Contains Lipid A Modifications and Has Higher Affinity for Bactericidal Cationic Peptides. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 5631–5639. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

En esta Tesis planteamos la hipótesis de que la regulación ejercida por el TCS BvrR/BvrS sobre genes relevantes para la virulencia (entendida como la capacidad de invadir, sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del hospedero) es directa. Para demostrar dicha hipótesis, nos propusimos cuatro objetivos específicos. El primero consistió en identificar regiones genómicas directamente unidas a BvrR en condiciones fisiológicamente relevantes; el segundo en describir la relación del TCS BvrR/BvrS con otros sistemas de regulación génica; el tercero en caracterizar la región promotora del gen *omp25*, como región prototipo regulada positivamente por el TCS BvrR/BvrS; y el último en construir una mutante por delección en los genes que codifican el TCS BvrR/BvrS y comparar su fenotipo con el de las mutantes generadas por transposición.

Para cumplir con nuestros dos primeros objetivos específicos, nos dedicamos a definir el regulón de BvrR, lo que incluía a su propio operón. En procariotas, los genes relacionados con una misma vía metabólica o un mismo proceso fisiológico generalmente se encuentran agrupados y se transcriben bajo el control de un mismo promotor, lo que se conoce con el nombre de operón (Jacob & Monod, 1961). Un estudio previo había demostrado que, en *B. melitensis*, *bvrR* y *bvrS* estaban acoplados transcripcionalmente a cuatro genes corriente abajo que codifican un PTS^{Ntr} con funciones reguladoras (Dozot *et al.*, 2010). Nuestros resultados indican que, independientemente de la etapa de crecimiento bacteriano, el TCS BvrR/BvrS se transcribe junto con los genes del PTS^{Ntr} y otros diez genes más que se ubican corriente debajo de los genes del PTS^{Ntr}, es decir que el operón *bvrR/bvrS* está compuesto por un total de 16 genes. Este operón incluye genes que codifican proteínas con funciones de regulación, lo cual tiene relación con objetivo 2. Por ejemplo, los ya comentados genes del PTS^{Ntr} (que regulan el metabolismo del nitrógeno), y *divL*, que es el sensor del TCS DivL/DivK, y está implicado (junto con CCKA) en controlar la fosforilación y proteólisis del regulador de respuesta CtrA, el cual a su vez se encuentra conservado en Alphaproteobacteria y está implicado en la regulación del ciclo celular (Suárez-Esquivel *et al.*, 2016; de Bolle *et al.*, 2015).

La sintenia y organización transcripcional del operón *bvrR/BvrS* en miembros de *Alphaproteobacteria* estrechamente relacionados con *Brucella* sugieren que esta región es responsable de coordinar la expresión de vías metabólicas de carbono y nitrógeno, de acuerdo con las fuentes de energía y las condiciones ambientales encontradas durante los eventos que conducen a la asociación con el hospedador. Esta observación concuerda con informes recientes (Sánchez-Cañizares *et al.*, 2020).

En *Alphaproteobacteria*, los ortólogos del TCS BvrR/BvrS son necesarios para los respectivos modos de vida patogénicos/simbióticos, ya que permiten sensor y responder a condiciones ambientales asociadas con sus hospederos específicos. Por ejemplo, BatR/BatS de *Bartonella spp.* percibe el pH fisiológico de la sangre de mamíferos (pH 7.4), logrando discriminar entre el entorno del hospedador y el del vector artrópodo, para regular la expresión de varios genes de virulencia, como el sistema de secreción tipo IV (*T4SS VirB*) y sus efectores (Quebatte *et al.*, 2010). En *A. tumefaciens*, ChvG/ChvI es esencial para la integridad de la membrana, la virulencia y el crecimiento bacteriano en condiciones ácidas (Wu *et al.*, 2012). En el endosimbionte vegetal *S. meliloti*, el sistema ExoS/ChvI es necesario para establecer la endosimbiosis (Cheng & Walker, 1998; Bélanger *et al.*, 2009). Sin embargo, la organización transcripcional descrita en esta Tesis para *B. abortus* no se encuentra conservada en todos los miembros de *Alphaproteobacteria* por igual, sino que se evidencia una correlación con la evolución y los diversos modos de vida de estas bacterias. Efectivamente, los patógenos intracelulares obligados como *Bartonella spp.*, *Rickettsia spp.* y *Wolbachia spp.*, no transitan entre ambientes extra e intracelulares y sus genomas son más pequeños que el de *Brucella spp.*, debido a que han evolucionado mediante la pérdida de genes (Moreno & Moriyón, 2002).

Una vez dilucidada la organización transcripcional del operón *bvrR/bvrS* y su relación con genes que codifican proteínas con funciones de regulación (PTS^{Ntr} y *divL*), nos enfocamos en realizar un ensayo de ChIP-seq, para continuar adentrándonos en el cumplimiento de los objetivos específicos 1 y 2. Nuestros resultados permitieron identificar más de 300 regiones genómicas unidas a BvrR-P

en condiciones fisiológicamente relevantes. Muchos de los nuevos genes blanco que detectamos en esta Tesis tienen relación con vías metabólicas necesarias para la vida intracelular. Durante las etapas intracelulares, es probable que *B. abortus* crezca utilizando un tipo de respiración con baja tensión de oxígeno y una reducción de las vías metabólicas centrales de carbono, como el TCA, la vía de fosfato pentosa y la disminución de los transportadores periplásmicos. Cuando los suministros de azúcares son limitados, la bacteria cambia a rutas anapleróticas aumentando el catabolismo de aminoácidos. Por lo tanto, el glutamato alimenta el TCA como fuente de energía (Lamontagne *et al.*, 2009; Ronneau *et al.*, 2014; Barbier *et al.*, 2018). Al igual que en *Rhizobium* spp., el glutamato podría usarse como fuente de carbono y nitrógeno. Este doble papel del glutamato puede explicarse por su conexión con el TCA, la gluconeogénesis y el ciclo de urea (Ronneau *et al.*, 2014; Beaufayy *et al.*, 2016). El TCS BvrR/BvrS podría regular estas vías energéticas de manera simultánea y temporal, ya que la mayoría de los genes blanco descritos se encuentran en las intersecciones de estas vías o en tándem. El modelo propuesto de afluencia de energía en *Brucella* spp. (Barbier *et al.*, 2018; Moreno & Moriyón, 2006) concuerda con nuestros resultados, ya que, debido a la ausencia de la fosfofructoquinasa, es probable que la vía de la glucólisis esté inactiva. Bajo este escenario, la vía de fosfato pentosa alimenta el ciclo de TCA para la oxidación de glucosa (Gottschalk, 1986; Machelart *et al.*, 2020). La glucosa fosforilada entra en el ciclo de pentosa para producir gliceraldehído-3-fosfato, el cual es canalizado hacia el TCA a través del piruvato. El TCS BvrR/BvrS también controla los genes de los transportadores de azúcar, así como el metabolismo de eritritol y xilitol. Estos monosacáridos pueden entrar en la vía de fosfato pentosa. Las vías de energía bajo el control de BvrR/BvrS probablemente incluyen rutas que utilizan glutamato y otros aminoácidos glucogénicos (arginina, cisteína) como fuente de energía. La evidencia presentada en esta Tesis también indica que el TCS BvrR/BvrS regula este flujo de energía junto con funciones vitales, como la división celular, la síntesis de ácidos nucleicos y la homeostasis de la envoltura celular.

Cabe resaltar que la detección de más de una señal significativa de ChIP-Seq cerca de un gen, incluidas algunas dentro de la región codificante e incluso al

final de esta, abre posibilidades para futuras investigaciones relacionadas con el papel de la transcripción antisentido (Brophy & Voigt, 2016) dentro del regulón BvrR/BvrS, el solapamiento de genes (Wright *et al.*, 2022) y la estructura no convencional de los promotores (Lagator *et al.*, 2022) en *Brucella*. La transcripción podría promoverse desde sitios inusuales, y la interacción con más de un sitio de unión podría ser necesaria para una transcripción óptima, así como reclutamiento de otros factores de transcripción que trabajen en conjunto. Por ejemplo, la transcripción del T4SS *VirB* está estrictamente controlada a medida que *Brucella* transita en diferentes compartimentos intracelulares (Boschiroli *et al.*, 2002; Altamirano-Silva *et al.*, 2018; 2021) y se ha implicado a varios reguladores en el control de la expresión del operón *virB* además de BvrR (Sieira *et al.*, 2004; Dozot *et al.*, 2006; Rambow-Larsen *et al.*, 2008; Sieira *et al.*, 2010; 2012; Kleinman *et al.*, 2017), lo que sugiere que la expresión de *virB* se regula a través de una compleja red de regulación.

Dentro de todos los genes blanco identificados en el ChIP-Seq, seleccionamos cinco para confirmar la unión directa y específica de BvrR-P a sus regiones corriente arriba mediante técnicas bioquímicas, incluyendo *virB1*, cuya relación con la virulencia ha sido ampliamente estudiada. Además, en relación con el objetivo 2, corroboramos que no existe interacción, por ChIP-seq ni bioquímica, entre BvrR y el regulador *tetR2*, a diferencia de lo que se ha reportado para los ortólogos de estos reguladores en *S. meliloti* (Chen *et al.*, 2008; Wells *et al.*, 2007; Lu & Cheng, 2010). También, con base en los resultados del ChIP-seq, analizamos genes blanco en común entre los factores de transcripción BvrR, VjbR, CtrA y MucR. Los resultados obtenidos refuerzan la noción de que *Brucella* regula de forma muy controlada los genes implicados en funciones vitales, como virulencia y división celular.

Consideramos que la evidencia discutida hasta el momento permitió cumplir con los objetivos específicos 1 y 2 de esta tesis, resaltando principalmente que el TCS BvrR/BvrS tiene un papel importante en: i) participación en la regulación del metabolismo a través de la interacción con el sistema regulador PTS^{NIR}, ii) interacción directa con regiones genéticas que codifican enzimas ubicadas en las

encrucijadas de vías específicas necesarias para la virulencia, iii) posible unión diferentes sitios en un mismo gen blanco y iv) posible interacción con otros factores de transcripción adicionales en la respuesta a condiciones ambientales externas a la bacteria.

Por otra parte, en relación con el objetivo específico 3, a pesar del papel crucial del TCS BvrR/BvrS en *Brucella*, muy pocas regiones reguladoras de ADN controladas por éste habían sido estudiadas. Por lo tanto, elegimos la región promotora de *omp25*, que codifica una OMP regulada positivamente por el TCS BvrR/BvrS (Guzmán-Veri *et al.*, 2002), como región prototipo. Primeramente, nos enfocamos en delimitar la región reguladora de este gen. Nuestros resultados muestran que un fragmento de ADN de 380 pb, que incluye 127 pb de la región codificante y los primeros 262 pb corriente arriba del codón de inicio de *omp25*, permite la transcripción. Además, una secuencia de 111 pb entre -262 y -151 es necesaria para una transcripción óptima. P-BvrR se une corriente abajo de esta secuencia de 111 pb en tres cajas diferentes. Es posible que la unión de P-BvrR a estas cajas pueda reclutar a otros factores de transcripción para activar la transcripción de *omp25*. Muchos factores de transcripción desempeñan un papel arquitectónico en el genoma y remodelan la estructura del ADN a través de flexiones, torceduras, enrollamientos o puentes (Dorman *et al.*, 2020). En *Brucella*, otras regiones reguladoras de ADN interactúan con diferentes factores de transcripción (de Jong *et al.*, 2008; Sieira, 2013). Por ejemplo, la región reguladora del operón *virB* muestra una arquitectura compleja con sitios de unión para seis tipos diferentes de reguladores transcripcionales, incluido BvrR, lo que demuestra una alta versatilidad para responder a varias señales ambientales en diferentes etapas del proceso de infección (Sieira, 2013). Además, algunas moléculas de ARN de pequeño tamaño también parecen influir en la expresión del operón *virB* en *B. abortus* a nivel post-transcripcional (Caswell *et al.*, 2012a). En sintonía con lo anterior, la región reguladora de *btaE*, un gen que codifica una adhesina autotransportadora trimérica relevante para la virulencia (Ruiz-Ranwez *et al.*, 2013), contiene sitios de unión para tres reguladores de transcripción diferentes que también están involucrados en la regulación del operón *virB* (Sieira *et al.*, 2017). Por

lo tanto, parece factible que otros factores de transcripción puedan trabajar en conjunto con BvrR para regular la expresión de *omp25*. En *B. abortus*, el regulador del ciclo celular *CtrA*, conservado en miembros de la clase *Alphaproteobacteria*, ha sido implicado en el control de la composición de la OM, en particular la abundancia y distribución espacial de *Omp25* (Francis *et al.*, 2017; Poncin *et al.*, 2019). El sitio de unión de *CtrA* en la región corriente arriba de *omp25* está entre las posiciones -389 a -337 (Francis *et al.*, 2017). Sin embargo, se desconocen los mecanismos de regulación transcripcional adicionales involucrados en la interacción BvrR-CtrA. Las cepas de *Brucella* con mutaciones en los reguladores transcripcionales *VjbR* y *GntR* muestran una producción disminuida de *omp25* y una composición alterada de la OM (Uzureau *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2017). Sin embargo, la interacción directa entre estos reguladores transcripcionales y la región reguladora de *omp25* aún no ha sido estudiada.

Cabe mencionar que las posiciones de las cajas reguladoras de BvrR descritas en esta Tesis no concuerdan con los modelos canónicos de *E. coli* para la regulación transcripcional positiva. La Caja 1 (-18 a +1) está junto al primer codón anotado de *omp25* (Suárez-Esquivel *et al.*, 2016), y la Caja 3 (-140 a -122) incluye el sitio de inicio de transcripción reportado para *omp25* en bacterias cultivadas hasta la fase estacionaria (Suárez-Esquivel *et al.*, 2016), cerca de los elementos -35 y -10. Además, la Caja 2 (-99 a -76) coincide con otro sitio de inicio de transcripción reportado en la posición -82, en bacterias cultivadas hasta fase logarítmica (esta Tesis). Aunque se desconocen los mecanismos y el tipo de interacción entre estas regiones, en procariontes, se sabe que algunos activadores de la transcripción se unen a regiones inusuales para inducir la actividad del promotor. Por ejemplo, en *Bacillus subtilis*, *PhoP*, un regulador de respuesta ante la escasez de fosfato, induce la activación del gen *pstS* mediante la unión a una región corriente arriba (-40 a -132) y una región codificante (+17 a +270) (Liu, Qi y Hulett, 1998). La región codificante tiene una baja afinidad por *PhoP-P* (Liu, Qi y Hulett, 1998), lo que sugiere una unión dinámica de ADN-proteína en la que el regulador es necesario para iniciar la transcripción, pero puede desligarse fácilmente para permitir que la ARN polimerasa se una. Los reguladores globales como BvrR pueden unirse a una

colección de sitios, por lo que el efecto regulador en cada sitio de unión depende de la concentración de la proteína y su afinidad. De esta forma, pueden tener roles duales como activadores, represores o ambos (Martínez-Antonio y Collado-Vides, 2003; Lozada-Chávez *et al.*, 2008; Balleza *et al.*, 2009). En *E. coli*, el regulador global de respuesta *OmpR* regula la expresión del gen *ompF* al unirse a cuatro sitios con diferentes afinidades. En condiciones de baja osmolaridad, la concentración de *OmpR* es baja, y el regulador se une a las cuatro cajas, lo que promueve la expresión de *OmpF*. En condiciones de alta osmolaridad, la concentración de *OmpR* aumenta, lo que posibilita interacciones adicionales de *OmpR* con una caja distante (-380 a -350), lo cual tiene como consecuencia que se reprima la transcripción de *ompF* (Huang *et al.*, 1994; Kenney, 2002).

Con respecto a la predicción *in silico* de interacciones entre *BvrR* y sus cajas reguladoras, aunque los enlaces de hidrógeno pueden variar *in vivo*, la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno, los puntajes de acoplamiento y la posición de unión proteína-ADN sugieren que *BvrR* tiene una afinidad de unión para las tres cajas en el dominio *Trans_reg_C*.

El alineamiento de secuencia de ADN de las tres cajas reveló la presencia de repeticiones invertidas y no invertidas separadas por distancias variables, lo que sugiere que las variaciones en las secuencias de reconocimiento pueden influir en la afinidad de *BvrR* para una regulación diferencial de los genes objetivo. Los dominios efectores de algunos reguladores de respuesta tipo *OmpR* se sabe que se unen a secuencias tándem o, más raramente, a repeticiones invertidas para la regulación de la transcripción. El sitio de reconocimiento en el ADN varía entre 18 y 23 pb, con sitios de unión entre 6 y 10 pb separados por una secuencia de intervención de 2 a 5 pb (Harlocker *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 2002; He y Wang, 2014). Sin embargo, el regulador *ChvI* de *S. meliloti* reconoce una secuencia de motivo de 11 pb presente al menos una vez en las secuencias analizadas (Chen *et al.*, 2008). Por lo tanto, los promotores objetivo de los reguladores de respuesta tipo *OmpR* contienen múltiples sitios de unión que varían en frecuencia de nucleótidos, posición y afinidades relativas de unión. Como resultado, la cooperatividad y la

unión diferencial son componentes críticos para la regulación transcripcional ejercida por los reguladores de respuesta tipo *OmpR*.

Consideramos que los resultados discutidos hasta el momento, nos permitieron cumplir con nuestro objetivo específico 3, del cual resultamos que: i) la unión de BvrR a las cajas reguladoras descritas en esta investigación podría reclutar otros factores de transcripción que se unen corriente arriba, en la región de 111 pb que identificamos como necesaria para la transcripción de *omp25*; ii) *P-BvrR* podría regular diferencialmente la expresión de *omp25* mediante la unión directa a tres cajas reguladoras de ADN. Algunas condiciones particulares como la fosforilación o la oligomerización de BvrR podrían afectar la afinidad e incluso la unión a estos sitios; iii) *BvrR* posiblemente reconoce secuencias repetidas, como se ha descrito para otros reguladores de respuesta tipo *OmpR*, y su influencia en la afinidad de unión y las preferencias de *BvrR* aún no se conoce. Los oligonucleótidos predichos para unirse a *BvrR* mediante acoplamiento molecular podrían mutarse y probarse mediante EMSA o anisotropía de fluorescencia con *P-BvrR*, para demostrar el impacto de cada nucleótido en la afinidad de unión. Además, estudios futuros de cristalografía de BvrR y los complejos BvrR-ADN también podrían contribuir a revelar los detalles mecánicos de la unión de *BvrR* a las cajas reguladoras identificadas en esta Tesis.

En relación con nuestro último objetivo específico, es necesario recordar que todas las investigaciones previas sobre el papel del TCS BvrR/BvrS referidas en esta Tesis habían sido realizadas en mutantes por transposición. Estas mutantes datan de 1998 y presentan un marcador de resistencia a kanamicina insertado en el transposón (Sola-Landa *et al.*, 1998). Los intentos previos de obtener mutantes limpios, sin el uso de marcadores de resistencia a antibióticos, habían resultado infructuosos, lo que llevó a pensar que *bvrR* y *bvrS* eran genes esenciales en *Brucella* spp. (Barbier *et al.*, 2011). Sin embargo, un estudio reciente demostró que estos genes, si bien son esenciales para la vida intracelular, no lo son para el crecimiento extracelular (Sternon *et al.*, 2018), lo que implicaba que, encontrando la estrategia correcta, estos podrían ser mutados de forma limpia, lo que, a su vez, permitiría comparar y corroborar fenotipos con las mutantes por transposición para

validar el papel atribuido al TCS BvrR/BvrS y también para disponer de una herramienta genética sin marcadores de resistencia, para estudios futuros.

Sin embargo, la construcción de mutantes sencillos bacterias filogenéticamente relacionadas había sido consistentemente reportada como difícil (Doherty *et al.*, 1988; Osterås *et al.*, 1995; Cheng & Walker, 1998; Wells *et al.*, 2007; Bélanger *et al.*, 2009; Charles & Nester, 1993; Mantis *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 2012; Quebatte *et al.*, 2010). Por esta razón, se decidió construir una cepa de *B. abortus* con una doble delección en los genes *bvrR/bvrS*, usando una estrategia de intercambio alélico. La mutación se verificó mediante distintas técnicas experimentales, incluyendo secuenciación del genoma completo, lo que permitió demostrar la obtención de una mutación limpia y libre de marcadores de resistencia.

El análisis fenotípico de la cepa *B. abortus* $\Delta bvrRS$ reveló un LPS liso, características bioquímicas inalteradas, defectos de crecimiento en la fase lag, incapacidad para replicarse dentro de las células hospedadoras, susceptibilidad a la polimixina B, susceptibilidad al suero humano no inmune y ausencia de expresión de la proteína Omp25. Estos hallazgos son consistentes con los resultados reportados en estudios previos realizados con las mutantes por transposición (Sola-Landa *et al.*, 1998; Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Manterola *et al.*, 2005), lo cual contribuye a validar el papel asignado al TCS BvrR/BvrS en la virulencia y la integridad de la membrana en *Brucella*. Como se indicó, esta herramienta será de utilidad para investigaciones futuras que profundicen en la función y los mecanismos asociados al TCS BvrR/BvrS.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

1. Por ChIP-seq, se logró determinar que BvrR se une de forma directa a más de 300 regiones del genoma de *B. abortus* en condiciones de estrés ácido y nutricional que mimetizan el ambiente intracelular. Entre estas regiones, corroboramos, por EMSA, la unión *in vitro* a cinco genes blanco relacionados con virulencia, por lo que, a futuro, sería de interés continuar confirmando más genes diana.
2. BvrR no se une de forma directa a la región corriente arriba del regulador transcripcional *tetR2*, a diferencia de lo que ocurre con los ortólogos de BvrR y de *tetR2* en *S. meliloti*, lo que señala una diferencia en la evolución de redes de regulación génicas conservadas. Sin embargo, BvrR si presenta genes blanco en común con otros factores de transcripción conservados en Alphaproteobacteria, como VjbR, CtrA y MucR. Para futuras investigaciones, sería de interés continuar caracterizando estas interacciones.
3. La región reguladora de *omp25* presenta tres sitios de unión a BvrR, lo que respalda la posibilidad de que BvrR pueda ejercer una regulación diferencial en respuesta a condiciones ambientales. A futuro, sería de interés poder describir detalles mecánicos de estas interacciones, así como caracterizar las regiones reguladoras de otros genes diana.
4. La mutante por delección en los genes *bvrR/bvrS* presenta un fenotipo atenuado similar al de las mutantes por transposición en *bvrR* y en *bvrS* construidas en 1998, lo que contribuye a validar el papel del TCS BvrR/BvrS en la virulencia y la integridad de la membrana en *B. abortus*. La nueva cepa generada será de utilidad para investigaciones futuras sobre el TCS BvrR/BvrS en *B. abortus*.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- About, F., Pastre, T., Boutrou, M., Martinez, A. Y., Melzani, A., Peugny, S., ... & Keriél, A. (2023). Novel species of *Brucella* causing human brucellosis, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases*, 29(2), 333. <https://doi.org/10.3201/eid2902.220725>
- Afgan, E., Baker, D., Van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., ... & Goecks, J. (2016). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic acids research*, 44(W1), W3-W10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw343>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anderson, T.D., Meador, V.P. & Cheville, N.F. (1986a). Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*: I. Gross and histologic lesions. *Veterinary pathology*, 23, 219-226. <https://doi.org/10.1177/030098588602300301>
- Anderson, T.D., Cheville, N.F. & Meador, V.P. (1986b). Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*: II. Ultrastructural studies. *Veterinary pathology*, 23, 227-239. <https://doi.org/10.1177/030098588602300302>
- Akova, M., Uzun, O., Akalin, H.E., Hayran, M., Unal, S. & Gur, D. (1993). Quinolones in the treatment of human brucellosis; comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycyclinerifampin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37, 1831-1834. <https://doi.org/10.1128/aac.37.9.1831>
- Altamirano-Silva, P., Meza-Torres, J., Castillo-Zeledón, A., Ruiz-Villalobos, N., Zuñiga-Pereira, A. M., Chacón-Díaz, C., ... & Chaves-Olarte, E. (2018). *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the BvrR/BvrS two-component system, which allows *B. abortus* to adapt to its replicative niche. *Infection and Immunity*, 86(4), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/iai.00713-17>

- Altamirano-Silva, P., Cordero-Serrano, M., Méndez-Montoya, J., Chacón-Díaz, C., Guzmán-Verri, C., Moreno, E., & Chaves-Olarte, E. (2021). Intracellular passage triggers a molecular response in *Brucella abortus* that increases its infectiousness. *Infection and Immunity*, 89(7). <https://doi.org/10.1128/iai.00004-21>
- Ariza, J., Gudiol, F., Pallarés, R., Rufi, G. & Fernández-Viladrich P. (1985). Comparative trial of rifampicin-doxycycline versus tetracycline-streptomycin in the therapy of human brucellosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 28, 548-551. <https://doi.org/10.1128/AAC.28.4.548>
- Arocena, G.M., Sieira, R., Comerçi, D.J. & Ugalde, R.A. (2010). Identification of the quorum-sensing target DNA sequence and *N*-acyl homoserine lactone responsiveness of the *Brucella abortus virB* promoter. *Journal of Bacteriology*, 192(13), 3434–3440. <https://doi.org/10.1128/jb.00232-10>
- Backert, S. & Meyer, T.F. (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 207-217. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.008>
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(suppl_2), W202-W208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>
- Balleza, E., Lopez-Bojorquez, L. N., Martínez-Antonio, A., Resendis-Antonio, O., Lozada-Chavez, I., Balderas-Martínez, Y. I., ... & Collado-Vides, J. (2008). Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS microbiology reviews*, 33(1), 133-151. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00145.x>
- Banai, M. & Corbel, M. (2010). Taxonomy of *Brucella*. *Open Veterinary Science J*, 2010, 4, 85-101. <https://doi.org/10.2174/1874318801004010085>
- Bang, B. (1906). Infectious abortion in cattle. *Journal of Comparative Pathology*, 19, 191–202. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(06\)80043-3](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(06)80043-3)

- Barbier, T., Nicolas, C., & Letesson, J. J. (2011). *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS letters*, 585(19), 2929-2934. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.08.011>
- Barbier, T., Zúñiga-Ripa, A., Moussa, S., Plovier, H., Sternon, J. F., Lázaro-Antón, L., ... & Letesson, J. J. (2018). *Brucella* central carbon metabolism: an update. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(2), 182-211. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1332002>
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D.S., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., Moriyón, I., Moreno, E. (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLOS ONE*, 2(7), 631-644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000631>
- Bassler, B.L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 2(6), 582-587. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00025-9)
- Batut, J., Andersson, S. G., & O'Callaghan, D. (2004). The evolution of chronic infection strategies in the α -proteobacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2(12), 933-945. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1044>
- Beaufay, F., De Bolle, X., & Hallez, R. (2016). Metabolic control of cell division in α -proteobacteria by a NAD-dependent glutamate dehydrogenase. *Communicative & Integrative Biology*, 9(1), e1125052. <https://doi.org/10.1080/19420889.2015.1125052>
- Bélanger, L., Dimmick, K. A., Fleming, J. S., & Charles, T. C. (2009). Null mutations in *Sinorhizobium meliloti* *exoS* and *chvI* demonstrate the importance of this two-component regulatory system for symbiosis. *Molecular microbiology*, 74(5), 1223-1237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06931.x>
- Bélanger, L., & Charles, T. C. (2013). Members of the *Sinorhizobium meliloti* ChvI regulon identified by a DNA binding screen. *BMC Microbiology*, 13, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-132>

- Bialer, M. G., Ruiz-Ranwez, V., Sycz, G., Estein, S. M., Russo, D. M., Altabe, S., ... & Zorreguieta, A. (2019). MapB, the *Brucella suis* TamB homologue, is involved in cell envelope biogenesis, cell division and virulence. *Scientific Reports*, 9(1), 2158. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37668-3>
- Blanco, A. G., Sola, M., Gomis-Rüth, F. X., & Coll, M. (2002). Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure*, 10(5), 701-713. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00761-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00761-X)
- Boschiroli, M. L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., ... & O'Callaghan, D. (2002). The *Brucella suis* *virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1544-1549. <https://doi.org/10.1073/pnas.032514299>
- Bowden, R. A., Verger, J. M., Grayon, M., Limet, J. N., & Dubray, G. (1993). Simultaneous expression of smooth and rough phase properties related to lipopolysaccharide in a strain of *Brucella melitensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 39(5), 363-370. <https://doi.org/10.1099/00222615-39-5-363>
- Bretl, D. J., Demetriadou, C., & Zahrt, T. C. (2011). Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(4), 566-582. <https://doi.org/10.1128/mmb.05004-11>
- Brophy, J. A., & Voigt, C. A. (2016). Antisense transcription as a tool to tune gene expression. *Molecular systems biology*, 12(1), 854. <https://doi.org/10.15252/msb.20156540>
- Bruce, D. (1887). Note on the discovery of a microorganism in Malta fever. *Practitioner*, 39, 161.
- Buddle, M. B. (1956). Studies on *Brucella ovis* (n. sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *Epidemiology & Infection*, 54(3), 351-364. <https://doi.org/10.1017/S0022172400044612>

- Carmichael, L. E., & Bruner, D. W. (1968). Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *The Cornell Veterinarian*, 48(4), 579-592.
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M. A., Barrell, B. G., & Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics*, 21(16), 3422-3423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti553>
- Castillo-Zeledón, A. 2010. Caracterización de la región promotora del gen *omp25* de *Brucella abortus*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Costa Rica. Costa Rica.
- Castillo-Zeledón, A., Ruiz-Villalobos, N., Altamirano-Silva, P., Chacón-Díaz, C., Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., & Guzmán-Verri, C. (2021). A *Sinorhizobium meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens* ExoR ortholog is not crucial for *Brucella abortus* virulence. *PLOS ONE*, 16(8), e0254568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254568>
- Caswell, C. C., Gaines, J. M., & Roop, R. M. (2012a). The RNA chaperone Hfq independently coordinates expression of the VirB type IV secretion system and the LuxR-type regulator BabR in *Brucella abortus* 2308. *Journal of Bacteriology*, 194(1), 3-14. <https://doi.org/10.1128/JB.05623-11>
- Caswell, C. C., Gaines, J. M., Ciborowski, P., Smith, D., Borchers, C. H., Roux, C. M., ... & Roop II, R. M. (2012b). Identification of two small regulatory RNAs linked to virulence in *Brucella abortus* 2308. *Molecular microbiology*, 85(2), 345-360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08117.x>
- Caswell, C. C., Elhassanny, A. E., Planchin, E. E., Roux, C. M., Weeks-Gorospe, J. N., Ficht, T. A., ... & Roop, R. M. (2013). Diverse genetic regulon of the virulence-associated transcriptional regulator MucR in *Brucella abortus* 2308. *Infection and Immunity*, 81(4), 1040-1051. <https://doi.org/10.1128/iai.01097-12>
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J.P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Medicine*, 198, 545-556. <https://doi.org/10.1084/jem.20030088>

- Celli, J. (2019). The intracellular life cycle of *Brucella* spp. *Microbiology spectrum*, 7(2), 7-2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bai-0006-2019>
- CFSPH (Center for Food Security & Public Health) & IICAB (Institute for International Cooperation in Animal Biologics). (2009). Brucellosis in Marine Mammals. College of Veterinary Medicine. Iowa State University. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_marine.pdf
- Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Méresse, S., Desjardins, M., Pizarro-Cerdá, J., Badilla, J., Gorvel, J-P., Moreno, E. (2002). Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cellular microbiology*, 4(10), 663-675. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00221.x>
- Charles, T. C., & Nester, E. W. (1993). A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 175(20), 6614-6625. <https://doi.org/10.1128/jb.175.20.6614-6625.1993>
- Chen, E.J., Sabio, E.A. & Long S.R. (2008). The periplasmic regulator ExoR inhibits ExoS/Chvltwo-component signalling in *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular microbiology*, 69(5), 1290-303. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06362.x>
- Cheng, H. P., & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *Journal of Bacteriology*, 180(1), 20-26. <https://doi.org/10.1128/jb.180.1.20-26.1998>
- Corbel, M. J. & Brinley-Morgan, W.J. (1984). Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173 AL. En Holt, J.G. (Ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. (pp. 377-388). Baltimore: MD Williams and Wilkins.
- Corbel, M.J. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. Genova: WHO Press.
- Dale, J.W. & Park, S.F. (2004). *Molecular genetics of bacteria*. (p. 92). John Wiley & Sons, Ltd.
- De, B.K., Stauffer L., Koylass M.S., Sharp, S.E., Gee, J.E., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Vega, R., Clark, T.A., Daneshvar, M.I., Wilkins, P.P. & Whatmore, A.M.

- (2008). Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 43–49. <https://doi.org/10.1128/jcm.01494-07>
- De Bolle, X., Crosson, S., Matroule, J. Y., & Letesson, J. J. (2015). *Brucella abortus* cell cycle and infection are coordinated. *Trends in microbiology*, 23(12), 812–821. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.09.007>
- De Coster, W., D'hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 34(15), 2666–2669. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149>
- Deghelt, M., Mullier, C., Sternon, J. F., Francis, N., Laloux, G., Dotreppe, D., ... & De Bolle, X. (2014). G1-arrested newborn cells are the predominant infectious form of the pathogen *Brucella abortus*. *Nature Communications*, 5(1), 4366. <https://doi.org/10.1038/ncomms5366>
- Degos, C., Hysenaj, L., Gonzalez-Espinoza, G., Arce-Gorvel, V., Gagnaire, A., Papadopoulos, A., ... & Gorvel, J. P. (2020). Omp25-dependent engagement of SLAMF1 by *Brucella abortus* in dendritic cells limits acute inflammation and favours bacterial persistence *in vivo*. *Cellular microbiology*, 22(4), e13164. <https://doi.org/10.1111/cmi.13164>
- de Jong, M.F., Sun, Y.H., den Hartingh, A.B., Maarten van Dijl, J. & Tsolis R.N. (2008). Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* Type IV secretion system. *Molecular microbiology*, 70(6), 1378–1396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06487.x>
- Delrue, R.M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J.-P. & Letesson, J.-J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cellular microbiology*, 3(7), 487–497. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00131.x>
- Delrue, R.M., Deschamps, C., Léonard, S., Nijskens, C., Danese I., Shaus, J. M, Bonnot, S., Ferooz, J., Tibor A., De Bolle, X. & Letesson, J.J. (2005). A

- quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cellular microbiology*, 7(8), 1151-1161. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00543.x>
- Dillon, S.C., Cameron, A.D.S., Hokamp, K., Lucchini, S., Hinton, J.C.D. & Dorman, C.J. (2010). Genome-wide analysis of the H-NS and Sfh regulatory networks in *Salmonella* Typhimurium identifies a plasmid-encoded transcription silencing mechanism. *Molecular microbiology*, 76(5), 1250–1265. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07173.x>
- Doherty, D., Leigh, J. A., Glazebrook, J., & Walker, G. C. (1988). *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 170(9), 4249-4256. <https://doi.org/10.1128/jb.170.9.4249-4256.1988>
- Dorman, C. J., Schumacher, M. A., Bush, M. J., Brennan, R. G., & Buttner, M. J. (2020). When is a transcription factor a NAP?. *Current opinion in microbiology*, 55, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.01.019>
- Dozot, M., Boigegrain, R. A., Delrue, R. M., Hallez, R., Ouahrani-Bettache, S., Danese, I., ... & Köhler, S. (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*. *Cellular microbiology*, 8(11), 1791-1802. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00749.x>
- Dozot, M., Poncet, S., Nicolas, C., Copin, R., Bouraoui, H., Maze, A., ... & Letesson, J. J. (2010). Functional characterization of the incomplete phosphotransferase system (PTS) of the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PLOS ONE*, 5(9), e12679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012679>
- Enright, F. M. (1990). The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. *Animal brucellosis*, 301, 320.
- Ewalt, D. R., Payeur, J. B., Martin, B. M., Cummins, D. R. & Miller, G. M. (1994). Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops*

- truncatus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6, 448–452. <https://doi.org/10.1177/104063879400600408>
- FAO & WHO. (1986). *Expert Committee on Brucellosis*. (6th Report, Series No. 740). Genève: World Health Organization.
- Favicchio, R., Dragan, A. I., Kneale, G. G., & Read, C. M. (2009). Fluorescence spectroscopy and anisotropy in the analysis of DNA-protein interactions. *DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols, Third Edition*, 589-611. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-015-1_35
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Foster, G., Osterman, B., Godfroid, J., Jacques, I. & Cloeckaert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2688–2693. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65269-0>
- Francis, N., Poncin, K., Fioravanti, A., Vassen, V., Willemart, K., Ong, T. A. P., ... & De Bolle, X. (2017). CtrA controls cell division and outer membrane composition of the pathogen *Brucella abortus*. *Molecular Microbiology*, 103(5), 780-797. <https://doi.org/10.1111/mmi.13589>
- Frith, M. C., Saunders, N. F., Kobe, B., & Bailey, T. L. (2008). Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. *PLOS computational biology*, 4(5), e1000071. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000071>
- Fu, Y., Mahmoud, M., Muraliraman, V. V., Sedlazeck, F. J., & Treangen, T. J. (2021). Vulcan: Improved long-read mapping and structural variant calling via dual-mode alignment. *GigaScience*, 10(9), giab063. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab063>
- Fumeaux, C., Radhakrishnan, S. K., Ardisson, S., Théraulaz, L., Frandi, A., Martins, D., ... & Viollier, P. H. (2014). Cell cycle transition from S-phase to G1 in *Caulobacter* is mediated by ancestral virulence regulators. *Nature communications*, 5(1), 4081. <https://doi.org/10.1038/ncomms5081>

- García-Méndez, K.B., Hielpos, S.M., Soler-Llorens, P.F. *et al.* (2019). Infection by *Brucella melitensis* or *Brucella papionis* modifies essential physiological functions of human trophoblasts. *Cellular microbiology*, 21, e13019. <https://doi.org/10.1111/cmi.13019>
- Gober, J. W., & Shapiro, L. (1992). A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3'enhancer and IHF binding elements. *Molecular Biology of the Cell*, 3(8), 913-926. <https://doi.org/10.1091/mbc.3.8.913>
- Godessart, P., Lannoy, A., Dieu, M., Van der Verren, S. E., Soumillion, P., Collet, J. F., ... & De Bolle, X. (2021). β -Barrels covalently link peptidoglycan and the outer membrane in the α -proteobacterium *Brucella abortus*. *Nature microbiology*, 6(1), 27-33. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00799-3>
- Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B. & Letesson, J.J. (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. *Veterinary research*, 36(3), 313-326. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005003>
- Godfroid, J., Scholz, H.C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., Whatmore, A.M., Cloeckaert, A., Blasco, J.M., Moriyon, I., Saegerman, C., Muma, J.B., Al Dahouk, S., Neubauer, H. & Letesson, J.J. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine*, 102(2), 118-31. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.007>
- Gorvel, J. P., & Moreno, E. (2002). *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary microbiology*, 90(1-4), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00214-6)
- Gottschalk, G. (1986). *Regulation of bacterial metabolism* (pp. 178-207). Springer New York.
- Gupta, S., Sinha, A., & Sarkar, D. (2006). Transcriptional autoregulation by *Mycobacterium tuberculosis* PhoP involves recognition of novel direct repeat

- sequences in the regulatory region of the promoter. *FEBS letters*, 580(22), 5328-5338. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.004>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J.P. & Moreno, E. (2001). GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non-professional phagocytes: direct activation of CDC42. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 44435-44443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105606200>
- Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, L. Parra, A., Cloeckert, A., Garin, J., Gorvel, J-P, Moriyón, I. & López-Goñi, I. (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12375–12380. <https://doi.org/10.1073/pnas.192439399>
- Halling, S. M., Peterson-Burch, B. D., Bricker, B. J., Zuerner, R. L., Qing, Z., Li, L. L., ... & Olsen, S. C. (2005). Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2715-2726. <https://doi.org/10.1128/jb.187.8.2715-2726.2005>
- Harlocker, S. L., Bergstrom, L., & Inouye, M. (1995). Tandem binding of six OmpR proteins to the *ompF* upstream regulatory sequence of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26849-26856. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26849>
- Haydel, S. E., Benjamin Jr, W. H., Dunlap, N. E., & Clark-Curtiss, J. E. (2002). Expression, autoregulation, and DNA binding properties of the *Mycobacterium tuberculosis* TrcR response regulator. *Journal of Bacteriology*, 184(8), 2192-2203. <https://doi.org/10.1128/jb.184.8.2192-2203.2002>

- He, X., & Wang, S. (2014). DNA consensus sequence motif for binding response regulator PhoP, a virulence regulator of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 53(51), 8008-8020. <https://doi.org/10.1021/bi501019u>
- Hernández-Mora, G., González-Barrientos, R., Morales, J.A., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Barquero-Calvo, E., De-Miguel, M.J., Marín, C.M., Blasco, J.M. & Moreno, E. (2008). Neurobrucellosis in Stranded Dolphins, Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), 1430-1433. <https://doi.org/10.3201/eid1409.071056>
- Hernández-Mora, G., Chacón-Díaz, C., Moreira-Soto, A., Barrantes-Granados, O., Suárez-Esquivel, M., Viquez-Ruiz, E., ... & Moreno, E. (2023). Virulent *Brucella nosferati* infecting *Desmodus rotundus* has emerging potential due to the broad foraging range of its bat host for humans and wild and domestic animals. *Msphere*, e00061-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00061-23>
- Hofer, E., Revilla-Fernandez, S., Al Dahouk, S., Riehm, J.M., Nöckler, K., Zygmunt, M.S., Cloeckert, A., Tomaso, H., Scholz, H.C. (2012). A potential novel *Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes in Austria. *Veterinary microbiology*, 155, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.009>
- Huang, K. J., Schieberl, J. L., & Igo, M. M. (1994). A distant upstream site involved in the negative regulation of the *Escherichia coli ompF* gene. *Journal of Bacteriology*, 176(5), 1309-1315. <https://doi.org/10.1128/jb.176.5.1309-1315.1994>
- Huddleson, F. & Hallman, E.T. (1929). The pathogenicity of the species of the genus *Brucella* for monkeys. *The Journal of Infectious Diseases*, 45, 293–303. <https://www.jstor.org/stable/30084624>
- Hulme, E. C., & Trevethick, M. A. (2010). Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *British journal of pharmacology*, 161(6), 1219-1237. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x>

- Jacob, F., & Monod, J. (1961, January). On the regulation of gene activity. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 26, pp. 193-211). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Janeway, C.A. Jr. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20, 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Karp, P. D., Billington, R., Caspi, R., Fulcher, C. A., Latendresse, M., Kothari, A., ... & Subhraveti, P. (2019). The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Briefings in bioinformatics*, 20(4), 1085-1093. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx085>
- Kędracka-Krok, S. & Wasylewski, Z. (2003). A differential scanning calorimetry study of tetracycline repressor. *European Journal of Biochemistry*. 270, 4564–4573. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03856.x>
- Kenney, L. J. (2002). Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *Current opinion in microbiology*, 5(2), 135-141. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00310-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00310-7)
- Kleinman, C. L., Sycz, G., Bonomi, H. R., Rodríguez, R. M., Zorreguieta, A., & Sieira, R. (2017). ChIP-seq analysis of the LuxR-type regulator VjbR reveals novel insights into the *Brucella* virulence gene expression network. *Nucleic acids research*, 45(10), 5757-5769. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx165>
- Ko, J. & Splitter, G.A. (2003). Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 65-78. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.1.65-78.2003>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

- Lagator, M., Sarikas, S., Steinrueck, M., Toledo-Aparicio, D., Bollback, J. P., Guet, C. C., & Tkačik, G. (2022). Predicting bacterial promoter function and evolution from random sequences. *Elife*, *11*, e64543. <https://doi.org/10.7554/eLife.64543>
- Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., Tian, M., Kearney, P., Hamaidi, L., Chelsky, D., Moriyón, I., Moreno, E. & Paramithiotis, E. (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *Journal of Proteome Research*, *6*, 1519-1529. <https://doi.org/10.1021/pr060636a>
- Lamontagne, J., Forest, A., Marazzo, E., Denis, F., Butler, H., Michaud, J. F., ... & Paramithiotis, E. (2009). Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *Journal of proteome research*, *8*(3), 1594-1609. <https://doi.org/10.1021/pr800978p>
- Lapaque N., Takeuchi O., Corrales F., Akira S., Moriyón I., Howard, J.C. & Gorvel, J-P. (2006). Differential inductions of TNF-alpha and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cellular microbiology*, *8*, 401-413. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00629.x>
- Lavín, J.L., Binnewies, T.T., Pisabarro, A.G., Ussery, D.W., García-Lobo, J.M. & Oguiza, J.A. (2010). Differences in two-component signal transduction proteins among the genus *Brucella*: implications for host preference and pathogenesis. *Veterinary microbiology*, *144*, 478-483. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.007>
- Léonard, S., Ferooz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., de Walque, S., De Bolle, X. & Letesson, J.J. (2007). FtcR is a new master regulator of the flagellar system of *Brucella melitensis* 16M with homologs in *Rhizobiaceae*. *Journal of Bacteriology*, *189*, 131-141. <https://doi.org/10.1128/jb.00712-06>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078-2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Liu, W., Qi, Y., & Hulett, F. M. (1998). Sites internal to the coding regions of *phoA* and *pstS* bind PhoP and are required for full promoter activity. *Molecular*

- microbiology*, 28(1), 119-130. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00779.x>
- Liu, P., Wood, D., & Nester, E. W. (2005). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is an acid-induced, chromosomally encoded virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 187(17), 6039-6045. <https://doi.org/10.1128/jb.187.17.6039-6045.2005>
- Lloyd, A. L., Marshall, B. J., & Mee, B. J. (2005). Identifying cloned *Helicobacter pylori* promoters by primer extension using a FAM-labelled primer and GeneScan® analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 60(3), 291-298. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.10.009>
- López-Goñi, I., Manterola, L. & Pan, S.Q. (2004). The *Brucella* BvrR/BvrS and related two component regulatory systems of the α -2 Proteobacteria: common regulatory strategies of animal and plant pathogens and endosymbionts. En López-Goñi, I. & Moriyón, I. (Ed.), *Brucella Molecular and Cellular Biology*. (pp. 287-312). Wymondham: Horizon Bioscience.
- Lozada-Chávez, I., Angarica, V. E., Collado-Vides, J., & Contreras-Moreira, B. (2008). The role of DNA-binding specificity in the evolution of bacterial regulatory networks. *Journal of molecular biology*, 379(3), 627-643. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.008>
- Lu, H-Y. & Cheng, H-P. (2010). Autoregulation of *Sinorhizobium meliloti* *exoR* gene expression. *Microbiology*, 156, 2092-2101. <https://doi.org/10.1099/mic.0.038547-0>
- Luscombe, N. M., Laskowski, R. A., & Thornton, J. M. (1997). NUCPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-nucleic acid interactions. *Nucleic acids research*, 25(24), 4940-4945. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4940>
- Machelart, A., Willemart, K., Zúñiga-Ripa, A., Godard, T., Plovier, H., Wittmann, C., ... & Barbier, T. (2020). Convergent evolution of zoonotic *Brucella* species toward the selective use of the pentose phosphate pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(42), 26374-26381. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008939117>

- Maksymiuk, C., Ioerger, T., Balakrishnan, A., Bryk, R., Rhee, K., Sacchettini, J., & Nathan, C. (2015). Comparison of transposon and deletion mutants in *Mycobacterium tuberculosis*: The case of rv1248c, encoding 2-hydroxy-3-oxoadipate synthase. *Tuberculosis*, 95(6), 689-694. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.08.009>
- Manterola, L., Moriyón, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D. S., Koch, M. H., ... & López-Goni, I. (2005). The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5631-5639. <https://doi.org/10.1128/jb.187.16.5631-5639.2005>
- Manterola, L., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Barquero-Calvo, E., de Miguel, M., Moriyón, I., Grilló, M-J, López-Goñi, I. & Moreno, E. (2007). BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infection and Immunity*, 75(10), 4867–4874. <https://doi.org/10.1128/iai.00439-07>
- Mantis, N. J., & Winans, S. C. (1993). The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *Escherichia coli* *phoB* mutation and is required for virulence. *Journal of Bacteriology*, 175(20), 6626-6636. <https://doi.org/10.1128/jb.175.20.6626-6636.1993>
- Martinez-Antonio, A., & Collado-Vides, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 6(5), 482-489. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.002>
- Martínez-Núñez, C., Altamirano-Silva, P.; Alvarado-Guillén, F., Moreno, E., Guzmán-Verri, C. & Chaves-Olarte, E. (2010). The Two-Component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *Journal of Bacteriology*, 192(21), 5603-5608. <https://doi.org/10.1128/jb.00567-10>
- Meyer, K.F. & Shaw, E.B. (1920). A comparison of the morphological, cultural, and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*. *The Journal of infectious diseases*, 27, 173–184. <https://www.jstor.org/stable/30082262>

- Michaux- S., Paillisson J., Carles-Nurit M.J., Bourg, G., Allardet-Servent, A. & Ramuz, M. (1993). Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *Journal of Bacteriology*, 175(3), 701-705. <https://doi.org/10.1128/jb.175.3.701-705.1993>
- Moreno E., Berman D.T. & Boettcher L.A. (1981). Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity*, 31,362–370. <https://doi.org/10.1128/iai.31.1.362-370.1981>
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. & Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3569–3576. <https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3569-3576.1990>
- Moreno, E. (2002). Brucellosis in Central America. *Veterinary microbiology*. 90, 31-38. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00242-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00242-0)
- Moreno, E. & Moriyón, I. (2002). *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 1-3. <https://doi.org/10.1073/pnas.022622699>
- Moreno, E., & Moriyón, I. (2006). The genus *Brucella*. *The prokaryotes*, 5(Part 1), 315-456.
- Moreno, E. & Gorvel, J.P. (2004). Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes. En López-Goñi, I. & Moriyón, I. (Ed.), *Brucella Molecular and Cellular Biology*. (pp. 287-312). Norfolk: Horizon Bioscience.
- Moreno, E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*, 5, 213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213>
- Moreno, E., & Barquero-Calvo, E. (2020). The role of neutrophils in brucellosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(4), e00048-20. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00048-20>

- Moreno, E. (2021). The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). *FEMS Microbiology Reviews*, 45(1), fuaa045. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa045>
- Moriyón, I., & López-Goñi, I. (1998). Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *International Microbiology*, 1(1), 19-26.
- Ng, W. L., & Bassler, B. L. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics*, 43, 197-222. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>
- Osterås, M., Stanley, J., & Finan, T. M. (1995). Identification of *Rhizobium*-specific intergenic mosaic elements within an essential two-component regulatory system of *Rhizobium* species. *Journal of Bacteriology*, 177(19), 5485-5494. <https://doi.org/10.1128/jb.177.19.5485-5494.1995>
- Owen, B., & McMurray, C. (2009). Rapid method for measuring DNA binding to protein using fluorescence anisotropy. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.80>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, 25(7), <https://doi.org/1043-1055.10.1101/gr.186072.114>
- Poncin, K., Roba, A., Jimmidi, R., Potemberg, G., Fioravanti, A., Francis, N., ... & De Bolle, X. (2019). Occurrence and repair of alkylating stress in the intracellular pathogen *Brucella abortus*. *Nature communications*, 10(1), 4847. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12516-8>
- Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S. & Liautard, J.P. (2003). Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infection and Immunity*, 71(3), 1481-1490. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1481-1490.2003>
- Quebatte, M., Dehio, M., Tropel, D., Basler, A., Toller, I., Raddatz, G., ... & Dehio, C. (2010). The BatR/BatS two-component regulatory system controls the

- adaptive response of *Bartonella henselae* during human endothelial cell infection. *Journal of Bacteriology*, 192(13), 3352-3367. <https://doi.org/10.1128/jb.01676-09>
- Ralston, A. (2008). Operons and prokaryotic gene regulation. *Nature Education*, 1(1), 216.
- Rambow-Larsen, A.A., Rajashekara, G., Petersen, E. & Petersen, G. (2008). Putative Quorum-Sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3274–3282. <https://doi.org/10.1128/jb.01915-07>
- Ramírez-González, E. A., Moreno-Lafont, M. C., Méndez-Tenorio, A., Cancino-Díaz, M. E., Estrada-García, I., & López-Santiago, R. (2019). Prediction of structure and molecular interaction with DNA of BvrR, a virulence-associated regulatory protein of *Brucella*. *Molecules*, 24(17), 3137. <https://doi.org/10.3390/molecules24173137>
- Rasool O., Freer E., Moreno E., Jarstrand C. (1992) Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharides on the oxidative metabolism and enzyme release of neutrophils. *Infection and Immunity*, 60, 4–7. <https://doi.org/10.1128/iai.60.4.1699-1702.1992>
- Ronneau, S., Moussa, S., Barbier, T., Conde-Alvarez, R., Zuniga-Ripa, A., Moriyon, I., & Letesson, J. J. (2016). *Brucella*, nitrogen and virulence. *Critical reviews in microbiology*, 42(4), 507-525. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.962480>
- Roop, R.M. II, Gaines, J.M., Anderson, E.S., Caswell, C.C. & Martin, D.W. (2009). Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Medical Microbiology and Immunology*, 198, 221-238. <https://doi.org/10.1007/s00430-009-0123-8>
- Roop, R. M., Barton, I. S., Hoppersberger, D., & Martin, D. W. (2021). Uncovering the Hidden Credentials of *Brucella* virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00021-19>
- Ruiz-Ranwez, V., Posadas, D. M., Estein, S. M., Abdian, P. L., Martin, F. A., & Zorreguieta, A. (2013). The BtaF trimeric autotransporter of *Brucella suis* is

- involved in attachment to various surfaces, resistance to serum and virulence. *PLoS One*, 8(11), e79770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079770>
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., & Barrell, B. (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16(10), 944-945. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.10.944>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sánchez-Cañizares, C., Prell, J., Pini, F., Rutten, P., Kraxner, K., Wynands, B., ... & Poole, P. S. (2020). Global control of bacterial nitrogen and carbon metabolism by a PTSNtr-regulated switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(19), 10234-10245. <https://doi.org/10.1073/pnas.191747111>
- Schlabritz-Loutsevitch, N. E., Whatmore, A. M., Quance, C. R., Koylass, M. S., Cummins, L. B., Dick Jr, E. J., ... & Hubbard, G. B. (2009). A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates—first report. *Journal of Medical Primatology*, 38(1), 70-73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2008.00314.x>
- Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedlacek, I., Vergnaud, G., Tomaso, H. Dahouk, S.A., Melzer, F., Kampf, P., Neubauer, H., Cloeckert, A., Maquart, M. Zygmunt, S., Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Gollner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Bussel, H.J. & Nockler, K. (2008). *Brucella microti* sp nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 375–382. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65356-0>
- Scholz, H.C., Revilla-Fernández, S., Dahouk, S.A. et al. (2016). *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66,2090–2098. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000998>
- Scholz, H. C., Heckers, K. O., Appelt, S., Geier-Dömling, D., Schlegel, P., & Wattam, A. R. (2023). Isolation of *Brucella inopinata* from a White's tree frog (*Litoria*

- caerulea*): pose exotic frogs a potential risk to human health?. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1173252. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1173252>
- Sheehan, L. M., & Caswell, C. C. (2017). A 6-nucleotide regulatory motif within the AbcR small RNAs of *Brucella abortus* mediates host-pathogen interactions. *MBio*, 8(3), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.00473-17>
- Sheehan, L. M., & Caswell, C. C. (2018). An account of evolutionary specialization: the AbcR small RNAs in the Rhizobiales. *Molecular microbiology*, 107(1), 24-33. <https://doi.org/10.1111/mmi.13869>
- Sieira, R., Comerci, D.J., Pietrasanta, L.I. & Ugalde, R.A. (2004). Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus virB* operon. *Molecular microbiology*, 54(3), 808–822. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04316.x>
- Sieira, R., Arocena, G.M., Bukata, L., Comerci, D.J. & Ugalde, R.A. (2010). Metabolic control of virulence genes in *Brucella abortus*: HutC coordinates *virB* expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 217-224. <https://doi.org/10.1128/jb.01124-09>
- Sieira, R., Arocena, G.M., Zorreguieta, A., Comerci, D.J. & Ugalde, R.A. (2012). A MarR-type regulator directly activates transcription 2 from the *Brucella abortus virB* promoter by sharing a redundant role with HutC. *Journal of Bacteriology*, 194:6431-6440. <https://doi.org/10.1128/jb.01007-12>
- Sieira, R. (2013). Regulation of virulence in *Brucella*: an eclectic repertoire of transcription factors defines the complex architecture of the *virB* promoter. *Future microbiology*, 8(9), 1193-1208. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.83>
- Sieira, R., Bialer, M. G., Roset, M. S., Ruiz-Ranwez, V., Langer, T., Arocena, G. M., ... & Zorreguieta, A. (2017). Combinatorial control of adhesion of *Brucella abortus* 2308 to host cells by transcriptional rewiring of the trimeric autotransporter *btaE* gene. *Molecular Microbiology*, 103(3), 553-565. <https://doi.org/10.1111/mmi.13576>

- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerdá, J., Grilló, M-J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J-M., Gorvel, J-P. & López-Goñi, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Molecular microbiology*, 29(1), 125-138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00913.x>
- Songer, J.G. & Post, K.W. (2005). *Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease*. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri.
- Spink WW. *The Nature of Brucellosis*. Minneapolis: U of Minnesota Press.; 1956.
- Starr, T., Child, R., Wehrly, T.D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C. Virgin, H.W. & Celli, J. (2012). Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host & Microbe*, 11(1), 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.12.002>
- Sternon, J. F., Godessart, P., Gonçalves de Freitas, R., Van der Henst, M., Poncin, K., Francis, N., ... & De Bolle, X. (2018). Transposon sequencing of *Brucella abortus* uncovers essential genes for growth in vitro and inside macrophages. *Infection and immunity*, 86(8), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/iai.00312-18>
- Stoenner, H.G. & Lackman, D.B. (1957). A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotomalepida thomasi*. *American Journal of Veterinary Research*, 18, 947–951.
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36(6), 1765-1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>
- Suárez-Esquivel, M., Ruiz-Villalobos, N., Castillo-Zeledón, A., Jiménez-Rojas, C., Roop li, R. M., Comerçi, D. J., ... & Guzmán-Verri, C. (2016). *Brucella abortus* strain 2308 Wisconsin genome: importance of the definition of reference strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1557. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01557>

- Suárez-Esquivel, M., Ruiz-Villalobos, N., Jiménez-Rojas, C., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Víquez-Ruiz, E., ... & Guzmán-Verri, C. (2017). *Brucella neotomae* infection in humans, Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases*, 23(6), 997. <https://doi.org/10.3201/eid2306.162018>
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tiller, R.V., Gee, J.E., Lonsway, D.R., Gribble, S., Bell, S.C., Jennison, A.V., Bates, J., Coulter, C. Hoffmaster, A.R. & De, B.K. (2010). Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiology*, 10, 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-23>
- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X. & Letesson, J.J. (2007). Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *Journal of Bacteriology*, 189(16), 6035–6047. <https://doi.org/10.1128/jb.00265-07>
- Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., De Bolle, X. & Letesson, J.J. (2010). Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *Journal of Proteome Research*, 9, 3200-3217. <https://doi.org/10.1021/pr100068p>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., ... & Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*, 50(D1), D439-D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Viadas, C., Rodríguez, C., Sangari, F., Gorvel, J.P., García, J. & López, I. (2010). Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLOS ONE*, 5(4), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010216>

- Wang, Y., Chen, Z., Qiao, F., Zhong, Z., Xu, J., Wang, Z., Du, X., Qu, Q., Yuan, J., Jia, L., Song, H., Sun, Y. & Huang, L. (2009). The type IV secretion system affects the expression of Omp25/Omp31 and the outer membrane properties of *Brucella melitensis*. *FEMS microbiology letters*, 303(20), 92-100. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01866.x>
- Wright, B. W., Molloy, M. P., & Jaschke, P. R. (2022). Overlapping genes in natural and engineered genomes. *Nature Reviews Genetics*, 23(3), 154-168. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00417-w>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46(W1), W296-W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wells, D.H., Chen, E.J., Fisher, R.F. & Long, S.R. (2007). ExoR is genetically coupled to the ExoS/ChvI two-component system and located in the periplasm of *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular microbiology*, 64, 647-664. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05680.x>
- Whatmore, A.M., Davison, N., Cloeckaert, A., et al. (2014). *Brucella papionis* sp.nov., isolated from baboons (*Papio* spp). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 4120–4128. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.065482-0>
- Whatmore, A. M., & Foster, J. T. (2021). Emerging diversity and ongoing expansion of the genus *Brucella*. *Infection, Genetics and Evolution*, 92, 104865. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104865>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS computational biology*, 13(6), e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Williams, K. P., Sobral, B. W., & Dickerman, A. W. (2007). A robust species tree for the alphaproteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 189(13), 4578-4586. <https://doi.org/10.1128/jb.00269-07>

- Wu, C. F., Lin, J. S., Shaw, G. C., & Lai, E. M. (2012). Acid-induced type VI secretion system is regulated by ExoR-ChvG/ChvI signaling cascade in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLOS Pathogens*, 8, e1002938. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002938>
- Wilkinson, S.P. & Grove, A. (2006). Ligand-responsive transcriptional 772 regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Current Issues in Molecular Biology*, 8, 51-62. <https://doi.org/10.21775/cimb.008.051>
- Yan, Y., Zhang, D., Zhou, P., Li, B., & Huang, S. Y. (2017). HDOCK: a web server for protein–protein and protein–DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic acids research*, 45(W1), W365-W373. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx407>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Zianni, M., Tessanne, K., Merighi, M., Laguna, R., & Tabita, F. (2006). Identification of the DNA bases of a DNase I footprint by the use of dye primer sequencing on an automated capillary DNA analysis instrument. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 17(2), 103.
- Zúñiga-Ripa, A., Barbier, T., Conde-Álvarez, R., Martínez-Gómez, E., Palacios-Chaves, L., Gil-Ramírez, Y., ... & Moriyón, I. (2014). *Brucella abortus* depends on pyruvate phosphate dikinase and malic enzyme but not on Fbp and GlpX fructose-1, 6-bisphosphatases for full virulence in laboratory models. *Journal of Bacteriology*, 196(16), 3045-3057. <https://doi.org/10.1128/jb.01663-14>

ANEXOS

Anexo 1. Nombre y secuencia de los cebadores y oligonucleótidos usados en esta Tesis.

Nombre	Secuencia (5´-3´)
bruAb1.0048.3	CTGGATACAGGCGTTGAG
bruAb1.0048.5	CTGTTACTCCAAATCATACG
3-200pck3	GCGGCCTTATTGTGGATGC
3-200pck5	GGTAAATGTACGCCAGGGTTG
3-200bvrR3	CACTGATTCGCTTGAGGACG
3-200bvrR5	CGTCTGCGTTGCCGAAGC
omp25 For	GCCATCTTCTCGACAGATTATC
omp25 Rev	GTCTCTCGTAATCGTCTCGG
pvirDownI	GATCGTCTCCTTCTCAGAG
pvu229	CGCATACCACTTGTATATAAG
L12.F	GGCTGATCTCGCAAAGAT
L12.R	CCAGGTCCTTGGCTTCCTTGAG
dhbprom3	CGGCATCCAGCCATCTGCAAAA
dhbprom5	ATCACCTCACGCATGCCGCT
46.00virBO	TTAGAAAATTCTTTTTTAACAAAATCTTATATACAA GTGGTATGCG
46.00virBOR	CGCATACCACTTGTATATAAGATTTTGTAAAAAA GAATTTTCTAA
66.26virBO	GGGCACTTGTATTGGTTCTATTAGAAAATTCTTTTT TAACA
66.26virBOR	TGTTAAAAAAGAATTTTCTAATAGAACCAATACAA GTGCCC
86.46virBO	GACGCCAGTCAGAATTTTGGGGCACTTGTATTG GTTCTAT

86.46virBOR	ATAGAACCAATACAAGTGCCCCAAAATTCTGACTG GGCGTC
106.66virBO	GGGCTATATATTGTGTGAATGACGCCCAGTCAGA ATTTTGG
106.66virBOR	CCAAAATTCTGACTGGGCGTCATTACACAATATA TAGCCC
126.86virBO	GGACAAATATGCTTGTGAGGGGGCTATATATTGT GTGAATG
126.86virBOR	CATTACACAATATATAGCCCCCTCACAGCATAT TTGTCC
146.106virBO	TGTTGTTTAAGCCGATATATGGACAAATATGCTTG TGAGGG
146.106virBOR	CCCTCACAAGCATATTTGTCCATATATCGGCTTAA ACAACA
166.126virBO	TATCGGTCATTATTGGGTAGTGTTGTTTAAGCCGA TATATG
166.126virBOR	CATATATCGGCTTAAACAACACTACCCAATAATGA CCGATA
186.146virBO	CCTTAATTATAGATCAGCGATATCGGTCATTATTG GGTAGT
186.146virBOR	ACTACCCAATAATGACCGATATCGCTGATCTATAA TTAAGG
206.166virBO	ATGGACGATTATTATGATAGCCTTAATTATAGATC AGCGAT
206.166virBOR	ATCGCTGATCTATAATTAAGGCTATCATAATAATC GTCCAT
226.186virBO	GATCGTCTCCTTCTCAGAGAATGGACGATTATTAT GATAGC
226.186virBOR	GCTATCATAATAATCGTCCATTCTCTGAGAAGGAG ACGATC

revtrRSintergen1.3	CGCACCATCGACAGCCACATC
revtrRSintergen1.5	CGTTGCCGCCGTGCTCTG
revtransRSintergen2.3	GCTCTACGGCGTCGGTTATCG
revtransRSintergen2.5	CAAGGGCGACAGAAAGCGGC
revtrbvrS2067intergen1. 3	CATTCCTATCGAGAATATCGAGC
revtrbvrS2067intergen1. 5	GTGGTGGCGTGAAGACCG
revtrbvrS2067intergen2. 3	GTGCCCGCTTTATCGTTGATC
revtrbvrS2067intergen2. 5	GATGCAGGAGTGTGCGATCATC
revtr206720681.3	GCCTGTTCCGCATTCCCTATCG
revtr206720681.5	GACAATTTCCAACCGCACTGTG
revtrans206720682.3	GTCGGCAAATGGTGATTCCAAT
revtrans206720682.5	CCAGAGTAGCAGATGGCACTG
revtrans206820691.3	CATCCTGAAAGGTGTTGAACG
revtrans206820691.5	CTGTTCCATATCGTCTTCAGC
revtrans206820692.3	CTGCTACTCTGGCGGGTGATGCG
revtrans206820692.5	CTGATACGAACGCTCGACAGCTTGATG
revtrans206920701.3	CCGCAGGAGAATTTTCGAGACTG
revtrans206920701.5	GCATTGTCTGGGATCATATTCGCC
revtrans206920702.3	GAGCGTTCGTATCAGCGGTG
revtrans206920702.5	CCCACCGTCATGCCATCCTTG
revtrans207020711.3	CAGCAAGGATGGCATGACGGTG
revtrans207020711.5	CAAATCTTTATACGTGCATATTGCCCG
revtrans207020712.3	CGCTCCAGACGCTTATCGC
revtrans207020712.5	GTGCTCCAATCCAGGGCAATTC
revtrans207120721.3	CACTGATCTGCTACTCAAACGC
revtrans207120721.5	AGCGGCTGCGACTTGC

revtrans207120722.3	GAAAATCCGCTCCAGAACC
revtrans207120722.5a	GCACCCAGAACCTTCAGCGTC
revtrans207120722.5b	GTCCAGTATTCTTCAAGCGTCTC
revtrans20722073_1.3	AGGTGCTCGTCTTCATCTC
revtrans20722073_1.5	GATAGCCAGACCCCGTTTC
revtrans20722073_2.3	GTCCGTTCAAGTCGGAACAC
revtrans20722073_2.5	AAAAACGCACAACGCAGAC
revtrans20732074.3	GGCCGGTAACTGTTTGAAGT
revtrans20732074.5	CCTATGCTTGCCTTTCATGG
revtrans20742075_1.3	AGCTTCGTGGAACCTTCATGG
revtrans20742075_1.5	GGCTTCGAGAATCTTGATCG
revtrans20742075_2.3	GTCATTTGCCGCTTTCCAT
revtrans20742075_2.5	GCCGGAAAGGGTTATGAAAT
revtrans20752076_1.3	CCCGCTTATCTGCAACATCT
revtrans20752076_1.5	ATGGGACGCATACGCTTG
revtrans20752076_2.3	ACTCGGATTGATGCAGGAAG
revtrans20752076_2.5	TGCACATTGACGATTGCAC
revtrans20762077_1.3	TCAATTGCCATTTGATCAG
revtrans20762077_1.5	CCTCAATAAGGGCCTTTGC
revtrans20762077_2.3	GGAACACCGGAAGCCATC
revtrans20762077_2.5	ACATAGATCGTCGCGCTTG
revtrans20772078_1.3	TTCCGTGAAACCGACCTTAC
revtrans20772078_1.5	GGTCAGAACATGGGTCTTGC
revtrans20772078_2.3	CCGGAGAAGGGCTATCTTTC
revtrans20772078_2.5	CTGCGCATCGATGGTTTC
revtrans20782079.3	GCGCTGAAGGATACTCAAGG
revtrans20782079.5	TTTAACAGAATCGCCGGAAC
revtrans20792080_1.3	GAGCGGATAGAGCATTTTCG
revtrans20792080_1.5	CATTCTGCCAGAAATCCAC
revtrans20792080_2.3	TGGAAAATGCGACAAAACAA

revtrans20792080_2.5	GGAGCGATCGTCTTGCAT
revtrans20802081_1.3	CGACGCTTCTGATGTTCAAG
revtrans20802081_1.5	TTGGGATGCAACTGCATAAG
revtrans20802081_2.3	GAGCTTGCCGCCAATATG
revtrans20802081_2.5	GATTGCCGAGCTTTTCCAG
exFAM-omp25	CGTCGGCAGCAAAAGCGGTTCGCAGAGAACG
exFAM 2-omp25	CAGCTATACTGGGGAGCTACTTCAACC
exFAM2bvrR	CGCAGAAGCGCCGTTCGGTATAGGTTTCG
exFAM-omp25b	GCCTTTGCGCCAGTCGCAGCAACGAGAACG
exFAM-omp3b	GGTCCCTCCCATCATGTTCGGCTGCGAAAGC
exFAM-exoR	GGCAAGTGCCAAGGTAAGGACCAAGCCTAG
omp25392Xbal	GGGATCATTTCATCTAGACACACGGTAAACG
omp25.BamHI	ACTGGGGAGCGGATCCTACTTCAACC
omp25.262Xbal	CAGCTTCGCTTCTAGAGCATTGCT
omp25.151Xbal	TCTCGACAGATTCTAGATATCTCCACACA
omp25lacZF	ATCCAGGAACAGCCTCCG
omp25lacZR	CCCAGTCACGACGTTGTA
omp25.262	CAGCTTCGCTGCATTGCT
omp25152	AGATGGCAAAAATGCGATG
omp25.122	GCCCCATTGTGTGGAGATAA
193.153omp25-O	GCCATCTTCTCGACAGATTATCTCCACACAATGG GGCATT
193.153omp25-ORC	AATGCCCCATTGTGTGGAGATAATCTGTTCGAGAA GATGGC
173.133omp25-O	ATCTCCACACAATGGGGCATTTCGTGCCGCAATT ACCCTCG
173.133omp25-ORC	CGAGGGTAATTGCGGCACGAAATGCCCCATTGTG TGGAGAT
153.113omp25-O	TTCGTGCCGCAATTACCCTCGATATGTCACCCCT GTCAGCG

153.113omp25-ORC	CGCTGACAGGGGTGACATATCGAGGGTAATTGCG GCACGAA
133.93omp25-O	GATATGTCACCCCTGTCAGCGCGGCATGGGCGG TTTACTCC
133.93omp25-ORC	GGAGTAAACCGCCCATGCCGCGCTGACAGGGGT GACATATC
113.73omp25-O	GCGGCATGGGCGGTTTACTCCCGATGCTGCCCG CCCGATAA
113.73omp25-ORC	GCGGCATGGGCGGTTTACTCCCGATGCTGCCCG CCCGATAA
93.53omp25-O	CCGATGCTGCCCGCCCGATAAGGGACCGCGCAA AACGTAAT
93.53omp25-ORC	ATTACGTTTTTGCGCGGTCCCTTATCGGGCGGGCA GCATCGG
73.33omp25-O	AGGGACCGCGCAAAACGTAATTTGTGTAAGGAGA ATGCCA
73.33omp25-ORC	TGGCATTCTCCTTACACAAATTACGTTTTGCGCGG TCCCT
53.13omp25-O	TTTGTGTAAGGAGAATGCCATGCGCACTCTTAAGT CTCTCG
53.13omp25-ORC	CGAGAGACTTAAGAGTGCGCATGGCATTCTCCTT ACACAAA
33.00omp25-O	ATGCGCACTCTTAAGTCTCTCGTAATCGTCTCGG
33.00omp25-ORC	CCGAGACGATTACGAGAGACTTAAGAGTGCGCAT
Oligo rpL-O	CCTTTCGGCCCTGACCGTTCTGGAAGCCGCTGAG CTGTCC
Oligo rpL-ORC	GGACAGCTCAGCGGCTTCCAGAACGGTCAGGGC CGAAAGG
bvrRS-Up-For	<u>GCGGATCC</u> AGCACGATCTTGCGGGTAAGA
bvrRS-Up-Rev	CTTCATGCGGACCTTCTCCTT

bvrRS-Dn-For	GCATGACCGTGAAAAGTGGATATC
bvrRS-Dn-Rev	GCCTGCAGCATCACGGAAATGGCCAGATT
bvrRS-Con-For	CGTTTAACCCGAGCGTTCTGG
bvrRS-Con-Rev	CATTTGCCGACAATGCCGG
bvrR_bv1-For	CATGGACGGTATGGAGCTTCTG
bvrR_bv1-Rev	GAGGAAGATGACCGGCAGATC
bvrRS-South-For	ACCACCCTGCAATTGCTGG
bvrRS-South-Rev	ATATCGCTCAGCCTCGTCGC
pckA-For	GCACGACATTTTCCAGAACC
pckA-Rev	TGTGGTGGGACAACAACAAG

Anexo 2. Número de accesoión de los genomas utilizados en esta Tesis para la reconstrucción filogenética del operón *bvrR/bvrS* en los miembros de la clase *Alphaproteobacteria*.

Cepa	Subgrupo taxonómico	Número de accesoión
GRUPO EXTERNO		
<i>Escherichia coli</i> K12	Gammaproteobacteria	NC_000913
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	Betaproteobacteria	NC_002939
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	Deltaproteobacteria	NC_003295
RHIZOBIALES		
<i>Brucella abortus</i> 2308 Wisconsin	Brucellaceae	GCA_900095085.1
<i>Brucella suis</i> str. 1330	Brucellaceae	GCA_000007505.1

<i>Ochrobactrum intermedium</i> LMG 3301	Brucellaceae	GCA_000182645.1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. Ach 5	Rhizobiaceae	NZ_CP011246.1
<i>Sinorhizobium meliloti</i> str. RU11/01	Rhizobiaceae	NZ_CP021219.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> str. J5	Bradyrhizobiaceae	NZ_CP017637.1
<i>Rodhospseudomonas palustris</i> TIE-1	Bradyrhizobiaceae	NC_011004.1
<i>Mesorhizobium loti</i> str. TONO	Phyllobacteriaceae	NZ_AP017605.1
<i>Bartonella quintana</i> str. Toulouse	Bartonellaceae	NC_005955.1
<i>Bartonella henselae</i> str. BM 1374165	Bartonellaceae	NZ_HG969191.1
CAULOBACTERALES		
<i>Caulobacter crescentus</i> NA1000	Caulobacteraceae	NC_011916.1
RICKETTSIALES		
<i>Rickettsia prowazeki</i> str. RpGvF24	Rickettsiaceae	NC_017057.1
<i>Rickettsia conorii</i> str. Malish 7	Rickettsiaceae	NC_003103.1
<i>Wolbachia pipientis</i> str. wPpe	Anaplasmataceae	GCA_001752665.1

Anexo 3. Resultados no publicados relacionados con el objetivo 2 de esta Tesis.

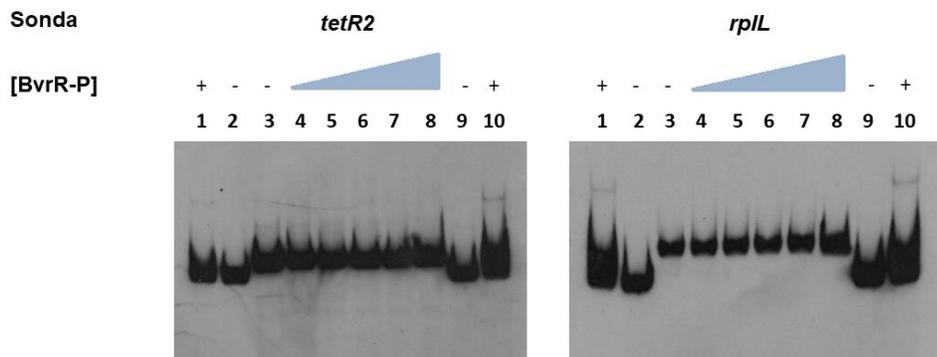


Figura 5. Resultado de EMSA entre BvrR fosforilada con carbamoil fosfato (BvrR-P) y una sonda de ADN que corresponde a la región corriente arriba de los genes *tetR2* y *rplL* (control negativo). Carriles 1 y 10: sonda control positivo (*omp25*) + 200 ng BvrR; 2 y 9: sonda control positivo (*omp25*) sin proteína, 3: sonda sin proteína, 4: sonda + 1000 ng BvrR-P, 5: sonda + 1100 ng BvrR-P, 6: sonda + 1200 ng BvrR-P, 7: sonda + 1300 ng BvrR-P, 8: sonda + 1400 ng BvrR-P.

Cuadro 3. Genes blanco en común entre los reguladores transcripcionales BvrR, VjbR, CtrA y MucR.

Reguladores	# de genes blanco	Locus tag
BvrR-VjbR-CtrA	3	BAB2_0071 BAB1_0589 BAB2_0072
BvrR-VjbR-MucR	3	BAB1_0087 BAB2_1072 BAB1_0326
BvrR-VjbR	29	BAB2_0065 BAB2_0505 BAB2_0585 BAB1_0728 BAB2_0068 BAB1_0606 BAB1_0372 BAB1_0325 BAB2_0893 BAB1_0756 BAB1_0464 BAB1_0463 BAB1_0400 BAB1_0467 BAB1_1882 BAB2_0077 BAB1_0462 BAB1_0037 BAB1_0607 BAB1_1798 BAB1_0371 BAB1_1628 BAB2_0988 BAB1_1797

		BAB2_0067 BAB1_1799 BAB2_0064 BAB2_1016 BAB1_1796
BvrR-CtrA	22	BAB1_0045 BAB2_0069 BAB1_1712 BAB2_0884 BAB1_0722 BAB1_0601 BAB1_1460 BAB1_1623 BAB1_2147 BAB1_0138 BAB1_1895 BAB1_1707 BAB1_0137 BAB2_0070 BAB1_1823 BAB2_0042 BAB2_0043 BAB1_0220 BAB1_2137 BAB1_0721 BAB1_1702 BAB1_1198
BvrR-MucR	11	BAB1_2138 BAB1_1511 BAB1_1975 BAB2_0866 BAB1_0070 BAB2_0613 BAB1_2012 BAB1_2001 BAB2_0867 BAB1_0069 BAB1_2000
VjbR-CtrA	22	BAB2_0314 BAB1_0729 BAB1_1939 BAB2_0170 BAB2_0179 BAB1_1052 BAB1_0665 BAB2_0697 BAB1_1495 BAB1_1775 BAB2_0653 BAB1_0977 BAB2_1099 BAB2_0652 BAB2_0741 BAB2_0742 BAB2_0178 BAB1_0978 BAB1_0660 BAB2_0171 BAB2_1083 BAB1_1302
VjbR-MucR	10	BAB2_0806 BAB1_1465 BAB1_0324 BAB1_0655 BAB2_0807 BAB1_1489 BAB1_1035 BAB2_0846 BAB1_1535 BAB1_1536
CtrA-MucR	2	BAB2_1107 BAB2_0450