

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Regulación de la homeostasis de hierro y hemo en bacterias: el sistema de señalización HemK-HemR de *Leptospira*

Mag. Juan Andrés Imelio

**Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural
Institut Pasteur Montevideo
PEDECIBA Biología – Universidad de la República**

Orientadores:

Dr. Alejandro Buschiazzo

Dr. Felipe Trajtenberg

Tribunal Evaluador:

Dra. Lucía Yim

Dr. Raúl Platero

Dr. Horacio Botti

Montevideo, Uruguay - 2024

*“Sólo hay dos clases de sabios, decía Alain:
los que aman las ideas y los que las aborrecen.
Estas dos actitudes de espíritu se oponen todavía en la ciencia;
y son una y otra, por su confrontación, necesarias para su progreso.”*

Jacques Monod, 1970
El azar y la necesidad

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Inés, a Julia, a mi madre Mónica, a mi padre Juan José, a mis hermanos María José y Santiago, a mi suegra Estela, por su apoyo diario e incondicional.

A mis orientadores Alejandro y Felipe, por abrirme las puertas del laboratorio, por las enseñanzas que me han brindado y por haber confiado en mí.

A todo el Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural por la compañía de todos estos años, tanto a quienes están hoy, como a quienes estuvieron y tomaron otros caminos. Quisiera agradecer muy especialmente a Fabiana, con quien compartí la totalidad de este viaje a través de pasantías de grado y posgrado.

A la Unidad Mixta Pasteur+INIA, a la Plataforma de Proteínas Recombinantes y al Laboratorio de Inmunovirología, por abrirme las puertas de sus lugares de trabajo y permitirme realizar experimentos cuando necesité usar de sus equipos o reactivos, siempre dispuestos a darme una mano con lo que he necesitado.

A la Comisión de Admisión y Seguimiento, los Dres. Horacio Botti y Martín Graña y la Dra. Vanessa Amarele, por acompañar mi trabajo de Doctorado con discusiones enriquecedoras. A los Dres. Botti, Raúl Platero y la Dra. Lucía Yim por aceptar formar parte del Tribunal Evaluador y tomarse el tiempo de corregir esta Tesis.

Al Dr. Mathieu Picardeau y a toda la Unidad de Biología de Espiroquetas del Institut Pasteur París, que en dos ocasiones me han recibido con los brazos abiertos y total disposición; y también en particular a la Dra. Nadia Benaroudj y el Dr. Samuel García-Huete por sus valiosos aportes a esta Tesis. A los servicios proporcionados por la Plataforma Tecnológica de Biómica, y a la Plataforma de Bioinformática y Bioestadística del Institut Pasteur París.

A todo el personal del Institut Pasteur de Montevideo que me ayudó a desarrollar esta Tesis, ya sea desde lo científico o lo administrativo. A la Cantina Cienfuegos. A los Galácticos bicampeones.

A mis amigos, muy especialmente a Vendedores De Humo, la mejor banda de rock'n'roll del país.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, al PEDECIBA Biología, a la Comisión Académica de Posgrado (UdelaR) y a la Unidad Mixta IMiZA por la financiación de este trabajo.

A Alexandra Elbakyan y su revolución.

Muchas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN.....	10
Señalización en bacterias: los sistemas de dos componentes.....	10
Arquitectura de un SDC clásico	11
Alostería y plasticidad en SDCs: mecanismos moleculares de regulación de actividad	15
Módulos y proteínas auxiliares	19
Homeostasis del hierro en bacterias	20
Adquisición.....	22
Detección de hierro y regulación homeostática de su concentración intracelular	26
Almacenamiento y desintoxicación	29
Metabolismo y homeostasis del hemo en bacterias	30
Biosíntesis	31
Adquisición.....	34
Detección de hemo y regulación homeostática de su concentración intracelular	37
Utilización y desintoxicación	40
Hierro y hemo en <i>Leptospira</i> spp.: el SDC HemKR.....	43
HIPÓTESIS.....	49
OBJETIVO GENERAL.....	49
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
ORGANISMO MODELO	50
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	51
Curvas de crecimiento y barridos de absorbancia.....	51
Extracción de ARN para PCR en tiempo real y ARN-seq	53
Clonado de construcciones reporteras, conjugación en <i>L. biflexa</i> y ensayos de fluorescencia	56
Clonado de plásmidos de complementación para conjugación en <i>L. biflexa</i> Δ HemKR.....	61
PhosTag-SDS-PAGE + <i>Western blot</i> anti-HemR.....	62
Mutagénesis, expresión y purificación de proteínas recombinantes	65
Variantes de HemK y HemR recombinantes.....	65
Variantes de HemX recombinantes	71
Análisis de termoestabilidad.....	76
Ensayos de actividad enzimática <i>in vitro</i>	76
Análisis bioinformáticos.....	77

RESULTADOS	80
<i>Objetivo Específico 1: dilucidación de la(s) señal(es) que regula(n) el estado funcional de HemK, y evaluación de la regulación dual ejercida por HemR en Leptospira spp.</i>	80
Caracterización del fenotipo de <i>L. biflexa</i> Δ HemKR.....	80
Análisis transcripcional empleando exceso/deficiencia de hierro y ácido 5-aminolevulínico como potenciales señales	86
Análisis transcripcional de genes implicados en la homeostasis de hemo.....	86
Análisis transcriptómico de la regulación global e identificación de genes adicionalmente regulados	90
Análisis mediante gen reportero empleando exceso de hierro como potencial señal	98
Análisis del estado de fosforilación <i>in vivo</i> de HemR empleando exceso/deficiencia de hierro y ácido 5-aminolevulínico como potenciales señales	101
<i>Objetivo Específico 2: producción, purificación y caracterización bioquímica de las proteínas recombinantes HemK, HemR y variantes.</i>	104
Producción y purificación de variantes de HemK recombinantes	104
Producción y purificación de variantes de HemR recombinantes	110
Análisis cualitativo <i>in vitro</i> de actividad de las variantes de HemK y HemR recombinantes	114
<i>Objetivo Específico 3: caracterización estructural preliminar de HemX, una proteína codificada en las proximidades del operón hemKR en L. biflexa.</i>	117
Análisis <i>in silico</i> de la estructura primaria de HemX.....	117
Producción y purificación de HemX recombinante	118
Estructura tridimensional de HemX predicha con AlphaFold2	122
Análisis de la estructura y plegamiento de HemX: inspección preliminar de posibles funciones.....	123
DISCUSIÓN	129
<i>L. biflexa</i> Δ HemKR crece en ausencia de hemo o ácido 5-aminolevulínico	129
El ácido 5-aminolevulínico gatilla el apagado de HemK	131
La respuesta de HemR contribuye a la regulación de la homeostasis de hierro/hemo	135
HemK _{Δ80} recombinante se encuentra “atrapada” en un estado funcional constitutivamente activo .	139
¿HemX está funcionalmente vinculada a la vía HemKR?.....	144
CONTRIBUCIONES A LA LITERATURA	148
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	149
ABREVIACIONES	155
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159

ANEXO: datos crudos de expresión génica diferencial obtenidos mediante ARN-Seq.

RESUMEN

Los sistemas de dos componentes (SDCs) son vías de señalización que regulan procesos biológicos importantes en bacterias. Trabajos previos sugieren que el SDC HemK-HemR (HemKR), presente en el género de bacterias espiroquetas *Leptospira*, juega un rol importante en la homeostasis del hemo. El regulador de respuesta HemR es un factor de transcripción que se une a promotores de genes que codifican para enzimas reguladoras del metabolismo de hemo. El estado de fosforilación de HemR es específicamente dictado por la histidín-quinasa HemK, determinante del encendido o apagado de la vía. Sin embargo, la señal que enciende o apaga a HemK era hasta ahora desconocida. En este trabajo, se emplearon aproximaciones microbiológicas, moleculares y bioquímicas para evaluar los mecanismos por los que HemKR regula el metabolismo de hemo en el organismo modelo *Leptospira biflexa*; en particular, se buscó dilucidar la señal que regula la actividad de HemK, y cómo HemR regula la transcripción de sus genes diana a partir de la detección de dicha señal. Los resultados obtenidos indicaron que el ácido 5-aminolevulínico (5ALA), un precursor metabólico clave para la biosíntesis de hemo, gatilla la inactivación de HemKR: se observó que el 5ALA induce la desfosforilación HemK-dependiente de HemR, resultando en la represión de la expresión de genes que codifican para las enzimas biosintéticas y de adquisición de hemo; y simultáneamente, la activación de la expresión del gen de la hemo-oxigenasa, que degrada hemo. La caracterización fenotípica de *L. biflexa knockout* para *hemKR* (aquí denominada $\Delta HemKR$) permitió profundizar en el análisis funcional. $\Delta HemKR$ es más tolerante a condiciones de deficiencia de hierro en cultivo, y también, secreta significativamente más metabolitos porfirínicos al medio extracelular comparado con la bacteria salvaje. Integrando todos los datos obtenidos, este trabajo propone un modelo mecanístico en el cual HemKR juega un rol importante en asegurar la homeostasis de hierro/hemo en *Leptospira*. Dado que la hemo-oxigenasa es un factor de virulencia en especies patógenas de *Leptospira*, HemKR emerge también como un sistema relevante en términos de regulación de la patogenicidad. Finalmente, se caracterizó bioquímicamente e *in silico* una tercera proteína, HemX, codificada en las proximidades de *hemKR* en *L. biflexa*; los resultados obtenidos sugieren fuertemente un rol de HemX en el combate al estrés oxidativo en *Leptospira*.

INTRODUCCIÓN

Señalización en bacterias: los sistemas de dos componentes

Desde su aparición en la Tierra hace casi 3500 millones de años, las bacterias han logrado colonizar prácticamente cada nicho ecológico del planeta. El éxito evolutivo de las bacterias es en gran parte debido a su capacidad de detectar y responder adaptativamente a fluctuaciones ambientales e intracelulares; este proceso es denominado *señalización* celular, y es compartido por todos los seres vivos. Cada bacteria cuenta con una colección de proteínas que actúan como “antenas moleculares”, capaces de detectar un amplio espectro de señales: temperatura, pH, péptidos, lípidos, azúcares, gases, luz, especies redox activas, etc.¹⁻⁴. La información es usualmente comunicada a otras biomoléculas, generalmente proteínas, dominios proteicos o ácidos nucleicos, resultando en la regulación de expresión génica o actividad enzimática que reestablece el balance fisiológico intracelular, u *homeostasis*⁵.

Entre los sistemas de señalización bacterianos se destacan los sistemas de dos componentes (SDCs), regulando procesos biológicos importantes como división celular, esporulación, formación de *biofilms*, patogénesis, virulencia, quimiotaxis, etc.¹. Clásicamente, los SDCs se componen de una histidín-quinasa (HQ) de transmembrana, y un regulador de respuesta (RR) citosólico. A pesar del alto grado de homología que hay entre las distintas HQs y RRs en una bacteria⁶, cada par HQ-RR presenta un alto grado de especificidad de reconocimiento entre ambos componentes^{7,8}. Asimismo, existen arquitecturas de SDCs más complejas, como los sistemas de fosforelevo, que involucran proteínas y/o dominios proteicos intermediarios adicionales, que pueden enriquecer o complejizar la regulación de la actividad de los componentes, la detección y/o la transmisión de la señal, o la respuesta fisiológica⁹⁻¹². La señalización por SDCs se basa en la transmisión en tándem de un grupo fosforilo ($P^{\sim}$) entre sus componentes. La presencia o ausencia de una señal ambiental o intracelular determinada es detectada por la HQ, regulando su actividad hacia el estado “encendido” o “apagado”; en caso de encenderse, la HQ es capaz de autofosforilarse (*i. e.*, actividad autoquinasa) a expensas de adenosina-trifosfato (ATP) en un residuo conservado de histidina (His, H), y transferir el $P^{\sim}$ (*i. e.*, actividad fosfotransferasa) a un residuo igualmente conservado de aspartato (Asp, D) en su RR

específico, activándose y efectuando la respuesta adaptativa. En caso de apagarse, existen HQs capaces de desfosforilar a su RR específico (*i. e.*, actividad fosfatasa), en un proceso que también es señal-dependiente¹³⁻¹⁵. Es importante agregar que los RRs pueden autofosforilarse, empleando dadores de fosfato de bajo peso molecular presentes en el citosol como acetil-fosfato (AcP), carbamoil-fosfato, fosfoimidazol y fosforamidato¹⁶, y también autodesfosforilarse; en cualquier caso, ambas actividades se encuentran reguladas principalmente por residuos del entorno del Asp fosforilable, que definen la cinética de autofosforilación/autodesfosforilación del RR¹⁷⁻²⁰. Adicionalmente, si bien los pares HQ-RR forman vías de señalización específicas y aisladas de otros pares, puede existir comunicación cruzada o “*cross-talk*” entre HQs y RRs no específicos, o, en otras palabras, que no constituyen un par propiamente dicho: esto puede ser fisiológicamente relevante^{21,22}, o bien, producto de interacciones inespecíficas²³⁻²⁵. De esta manera, las concentraciones celulares de RR fosforilado, activo (P~RR), relativo a RR desfosforilado, inactivo, determina el grado de la respuesta fisiológica.

Arquitectura de un SDC clásico

Típicamente, las HQs son proteínas homodiméricas de transmembrana, que presentan tres módulos (Figura 1):

Módulo sensor: variables en secuencia y estructura, y capaces de detectar estímulos ambientales o intracelulares específicos. En su mayoría, los dominios sensores son periplásmicos (en bacterias Gram-negativas) o extracelulares (en bacterias Gram-positivas) y se ubican entre dos segmentos transmembrana, aunque los hay de transmembrana e intracelulares. La gran variabilidad existente entre dominios sensores está correlacionada con la capacidad de las bacterias de detectar y responder ante un amplio espectro de señales ambientales e intracelulares^{15,26,27}.

Módulo de transmisión/transducción: conectan y son capaces de transmitir la señal desde el módulo sensor hacia el catalítico. Esta región puede contener uno o más dominios proteicos, entre los que se identifican HAMP (“*Histidine kinases, Adenylate cyclases, Methyl accepting proteins and Phosphatases*”), PAS (“*Periodic circadian proteins, Aryl hidrocarbon nuclear translocator proteins and Single-minded proteins*”), GAF (“*cGMP-specific phosphodiesterases,*

Adenyl cyclases and Formate hydrogenases”), entre otros²⁸. En algunos casos, estos mismos dominios pueden actuar como sensores ya que pueden disponer de sitios de unión a ligandos^{15,26,29}. Es importante destacar que muchas HQs no presentan dominios definidos en el módulo de transmisión, pero en estos casos el módulo sensor y el catalítico están conectados por α -hélices, que por su estructura pueden transmitir información de forma mecánica. Hacia el extremo C-terminal, el dominio de transmisión/transducción presenta un haz de dos α -hélices, denominado “hélice S”³⁰, que conecta físicamente los módulos sensores y/o transmisores con el módulo catalítico. Como se detallará más adelante, la hélice S es esencial para la regulación señal-dependiente de la actividad del módulo catalítico de las HQs.

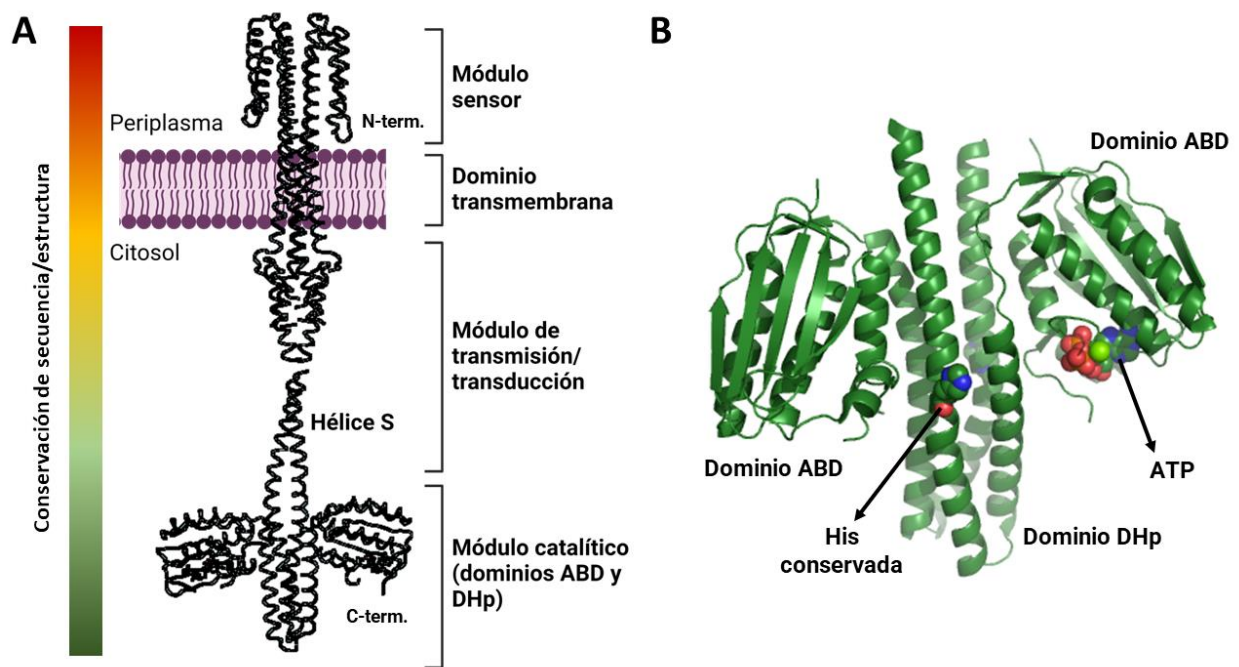


Figura 1. (A) Arquitectura de las HQs clásicas. A modo ilustrativo, se muestran los módulos sensores, transmembrana y de transmisión/traducción de señal de la HQ NarQ (PDB ID: 5JEQ) y parte del módulo de transmisión (*i. e.*, la hélice S) y módulo catalítico de DesK de *B. subtilis* (PDB ID: 5IUN). La conservación de secuencia/estructura de los distintos dominios entre HQs se representa en gradiente de color (verde = mayor conservación; rojo = menor conservación). (B) Módulo catalítico de HQs representado por CpxA de *E. coli* (PDB ID: 4BIX). Figura diseñada mediante los *softwares* PyMol y BioRender.

Módulo catalítico: conservados en secuencia y estructura, esta región se localiza en el citoplasma y participa de las diferentes actividades vinculadas a la señalización y reconocimiento del RR específico. Este módulo se compone de un dominio de dimerización y fosfotransferencia (DHp, por “*Dimerization and Histidine phosphotransfer*”) constituido por un haz de cuatro hélices, y hacia el extremo C-terminal un dominio de unión a ATP (ABD, por “*ATP-Binding Domain*”). Este último dominio presenta un plegamiento del tipo Bergerat³¹, con una topología “sándwich” α/β : de un lado 3 α -hélices, empaquetadas contra el otro lado del sándwich, constituido por una lámina β de 5 hebras mixtas (1 y 2 paralelas, el resto antiparalelas). Entre las tres hélices se forma el bolsillo donde se une el ATP. Cuando la HQ se enciende, el dominio ABD cargado con ATP -y empleando magnesio (Mg^{2+}) como cofactor- se acerca al residuo conservado de His del dominio DHp, y un grupo fosforilo es transferido desde la posición γ del ATP al nitrógeno ϵ de la cadena lateral de la His³².

Existen cuatro familias de HQs basado en la secuencia de sus dominios DHp: HisKA (familia Pfam PF00512), HisKA_3 (PF07730), HisKA_2 (PF07568) y HWE_HK (PF07536); la mayoría de las HQs, *i. e.* alrededor del 80%, pertenecen a la familia HisKA⁶. HisKA se caracteriza por la presencia de un motivo H-E/D-x-x-T/N (donde E = ácido glutámico ó Glu, y T = treonina ó Thr). El residuo de E/D es esencial para la actividad autoquinasa o de encendido; por otra parte, el residuo de T/N es esencial para la actividad fosfatasa de apagado (Figura 2): mutagénesis por alanina en esta posición resulta en HQs constitutivamente encendidas o con actividad fosfatasa significativamente reducida^{33–36}.

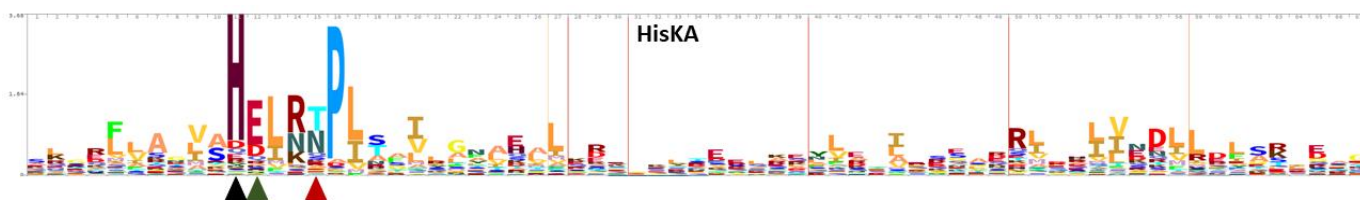


Figura 2. Logo de la secuencia del dominio DHp de HQs pertenecientes a la familia HisKA. Se resaltan el residuo de His (H) fosforilable (flecha negra), el residuo de Glu (E)/Asp (D) esencial para la actividad autoquinasa (flecha verde) y el residuo de Thr (T)/Asn (N) esencial para la actividad fosfatasa (flecha roja). Fuente: <http://pfam-legacy.xfam.org/>.

Los RRs son dominios REC (ver abajo) que pueden o no estar fusionados a otros dominios, incluyendo un dominio efector. Típicamente, los RRs son solubles, citosólicos, y presentan dos dominios (Figura 3):

Dominio receptor (REC): este dominio se ubica hacia el extremo N-terminal, y presenta el residuo conservado de Asp fosforilable. Los dominios REC adoptan un plegamiento de tipo Rossmann, con una topología $(\beta\alpha)_5$ en donde 3 α -hélices de un lado y 2 del otro, rodean a una lámina β central de cinco hebras paralelas³⁷.

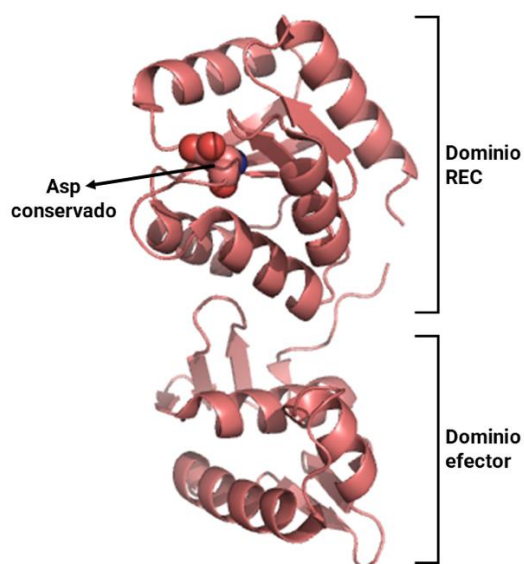


Figura 3. Arquitectura de los RRs clásicos, representada por VanR de *S. coelicolor* (PDB ID: 7LZA). Figura diseñada mediante el *software* PyMol.

Dominio efector: cuando presente, se encuentra ubicado hacia el extremo C-terminal. El dominio efector ejecuta la respuesta a partir de la fosforilación (activación) del dominio REC. La mayoría de los dominios efectores (~65%) son de unión al ADN y por tanto actúan como reguladores transcripcionales^{32,38-40}. Otros, sin embargo, establecen interacciones directas con proteínas⁴¹, ARN⁴², o bien, presentan por sí mismos actividad enzimática⁴³.

Se han descrito siete familias basadas en dominios REC; sin embargo, la familia Response_reg (PF00072) incluye la mayoría de secuencias conocidas de RRs⁶.

Alostería y plasticidad en SDCs: mecanismos moleculares de regulación de actividad

Al igual que el resto de los sistemas de transducción de señales, la regulación de encendido y apagado de los SDCs es alostérica: la señal es detectada en un sitio espacialmente distante (*i. e.*, alostérico) del sitio funcional (*i. e.*, ortostérico). Como se describió previamente, en el caso de HQs generalmente ocurre que el estímulo es detectado por un módulo sensor que transduce la información río abajo hacia el módulo catalítico, resultando en su autofosforilación; similarmente, en RRs, el sitio de fosforilación y el efector -ya sea un sitio catalítico o involucrado en interacciones con otras biomoléculas como proteínas o ácidos nucleicos- se encuentran en dominios distintos. En cualquier caso, la regulación alostérica es facilitada por la propia plasticidad de estas proteínas⁴⁴. Dado que las HQs suelen ser multifuncionales, la alostería en estas proteínas es extremadamente relevante para asegurar la transmisión de la información en SDCs de forma específica, eficiente y unidireccional.

La presencia/ausencia de una señal dada determina el encendido/apagado del SDC, a través de la detección de dicha señal por parte del módulo sensor de la HQ. La diversidad de dominios sensores de HQs es enorme, y cada uno de ellos presenta sus particularidades en función de la señal que detectan^{26,28}; no obstante, ocurre en todos los casos que la detección de una condición ambiental o la unión de un ligando al dominio sensor resulta en un cambio conformacional del mismo, que es transducido o transmitido de forma alostérica a dominios catalíticos río abajo. La hélice S de las HQs juega un rol central en la ruta alostérica que conecta módulo sensor con módulo catalítico, funcionando como interruptor⁴⁵ (Figura 4). En el contexto de una HQ apagada, la hélice S suele presentar una configuración más “rígida” o estable, del tipo “*coiled-coil*”. Esta configuración se transmite alostéricamente al módulo catalítico, que se comporta de la misma manera, aumentando la superficie de interacción entre dominios ABD y DHp generando una estructura en general más estable, simétrica y menos dinámica que aquella correspondiente a la HQ encendida^{46–48}. La estabilización de los dominios ABD es entonces un mecanismo estructural que minimiza la movilidad, de otro modo imprescindible para la autofosforilación del dominio DHp, pues en el dominio ABD rígido el ATP queda a gran distancia de la His fosforilable. En el

estado apagado de la HQ Desk de *Bacillus subtilis*, perteneciente a la familia HisKA_3, ocurre una rotación de las hélices S superenrolladas en forma de *coiled-coil* que es transmitida hacia el haz central de hélices del dominio DHP, provocando una rotación de la His conservada hacia el interior del haz y sugiriendo un mecanismo estructural para evitar la fosforilación de la His en el estado apagado de la vía^{47,49}.

La tasa de actividad fosfatasa de HQs por sus RRs específicos es órdenes de magnitud mayor que la tasa de autodesfosforilación del RR, siendo en general la HQ quien dicta el apagado de la vía^{50,51}. En este contexto es que las HQs clásicas son multifuncionales, catalizando actividades enzimáticas “paradójicas”, esto es, tanto quinasa como fosfatasa⁵². Asimismo, la actividad fosfatasa de la HQ sobre su RR específico evita la fosforilación fútil del RR mediante HQs inespecíficas y dadores moleculares citoplasmáticos de fosfato; las concentraciones de éstos últimos se encuentran en exceso en el citosol (aproximadamente en el orden de mM) en comparación a aquella de los RRs (en el orden de μM , con variaciones dependientes del RR)⁵³. En algunas HQs se ha visto *in vitro* que la unión de adenosina-difosfato (ADP) o análogos no hidrolizables de ATP al dominio ABD aumenta la tasa de actividad fosfatasa sobre su RR específico⁵⁴. El dominio ABD de las HQs presenta afinidades similares para ATP y ADP^{6,55,56}; sin embargo, cabe resaltar que la concentración citosólica de ADP es mucho menor a la concentración de ATP (ATP/ADP ~ 10), por lo que el equilibrio se desplaza hacia la unión de ATP, y el escenario observado *in vitro* puede ser diferente a lo que ocurre *in vivo* en donde la unión de ADP al dominio ABD parece poco probable. En algunos casos, el dominio efector del P~RR interactúa con la HQ en estado fosfatasa, a través de una superficie que se solapa con aquella del RR que participa de la unión a promotores génicos, lo que agrega un punto de control adicional al apagado de la vía^{48,57}.

Análogamente al apagado, el encendido de las HQs implica cambios conformacionales en el módulo sensor que son transmitidos mecánicamente hacia la hélice S, cuyo *coiled-coil* - previamente estabilizado en el estado apagado- se “desarma”, o desestabiliza. Esta desestabilización es a su vez transmitida mecánicamente hacia el módulo catalítico, otorgándole mayor movilidad y dinámica, claves para la actividad autoquinasa de las HQs^{47,58–60} (ver Figura 4). Estudios estructurales previos observaron que HQs activas presentan un *coiled-coil*

desestabilizado^{61–63} y asimetría conformacional dinámica^{64–66} que permite el movimiento del dominio ABD unido a ATP hacia el dominio DHp para la autofosforilación de la His: dicha autofosforilación puede ser tanto intramolecular o *cis* (*i. e.*, el dominio ABD de un monómero de la HQ fosforila al dominio DHp del mismo monómero), o intermolecular o *trans* (*i. e.*, el dominio ABD de un monómero de la HQ fosforila al dominio DHp del otro monómero)⁶⁷. La dinámica y movilidad del dominio ABD en HQs encendidas está dada por su baja superficie de interacción con el dominio DHp, otorgándole mayor libertad de movimiento al *linker* del dominio DHp y ABD y permitiendo la autofosforilación de la HQ^{47,64–66,68}. Esto contrasta con una mayor cantidad de interacciones observadas entre estos dos dominios en HQs apagadas, que estabilizan al dominio ABD disminuyendo su movilidad. Asimismo, en algunas HQs se ha visto que la rotación de la hélice S también es crucial para la determinación de la actividad autoquinasa, dado que al estar conectada con la hélice del dominio DHp, dictará el grado de exposición al solvente de la His fosforilable modulando el grado de autofosforilación^{69,70}.

Si bien los RRs son capaces de autofosforilarse inespecíficamente, ya sea mediante dadores moleculares de fosfato presentes en el citoplasma o mediante *cross-talk*, la tasa de fosfotransferencia de HQs por sus RRs específicos suele ser órdenes de magnitud mayor. En general, la fosforilación del RR mediada por la actividad autoquinasa/fosfotransferasa de su HQ específica es la que en definitiva dicta que la vía se encuentre encendida. No obstante, la mayor parte de residuos que conforman el centro de reacción de la fosfotransferencia es aportada por el RR, incluido el metal divalente, que es coordinado por residuos del RR como se mencionó previamente. A su vez, la activación mediante fosforilación del dominio REC del RR induce cambios conformacionales, alostéricos, que son transmitidos hacia el dominio efector, quien es el ejecutor de la respuesta fisiológica. Típicamente, los rearrreglos conformacionales del RR activado hacen accesibles superficies de contacto que permiten la oligomerización cooperativa del regulador, esencial para la función de respuesta. La oligomerización del RR es en sí mismo un punto de control en la activación del SDC, puesto que los RRs que actúan como factores de transcripción suelen asociarse a secuencias repetidas en promotores génicos, o bien ocurre que en RRs con actividad enzimática se requiere la asociación de más de un protómero para el ensamblado del sitio activo⁷¹.

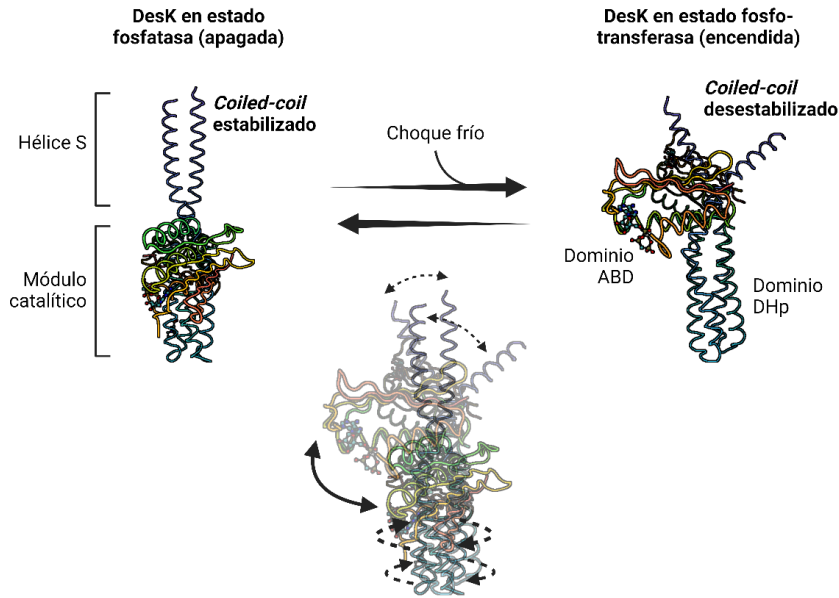


Figura 4. Cambios en la topología del *coiled-coil* de la hélice S de DesK son transmitidos hacia el módulo catalítico, regulando su apagado/encendido (PDB IDs: 5IUN, 5IUK). Figura diseñada mediante los *softwares* PyMol y BioRender.

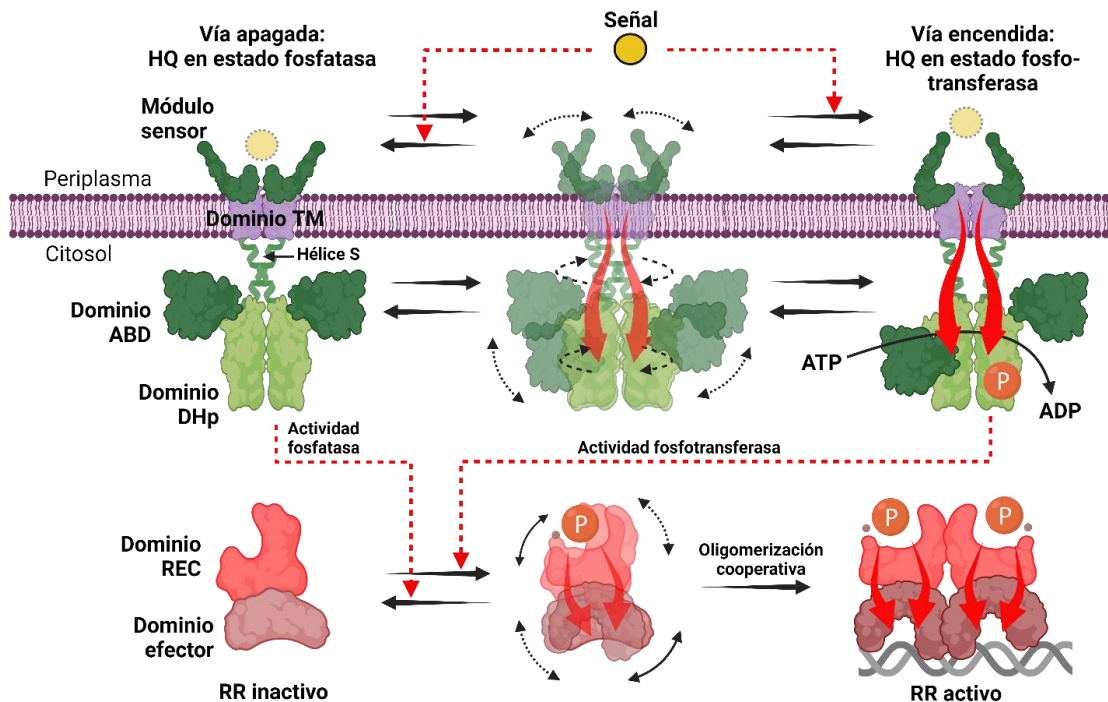


Figura 5. Regulación de la actividad de SDCs clásicos. La presencia (o ausencia) de una señal ambiental dada puede estabilizar el estado apagado (*i. e.*, fosfatasa) o encendido (*i. e.*, fosfotransferasa) de la vía. De esta manera la respuesta es señal-dependiente. Figura diseñada mediante el *software* BioRender.

En suma, para los distintos módulos que participan en la vía de SDCs, el encendido suele implicar fosforilaciones, transferencias de fosforilo en tándem y unión a promotores génicos; en contraste, en el estado apagado suelen ocurrir desfosforilaciones y disociación de promotores. En cualquier caso, los cambios conformacionales permitidos por la plasticidad de dichos módulos juegan un rol fundamental en la regulación del estado de actividad de la vía. La Figura 5 resume los procesos previamente descritos.

Módulos y proteínas auxiliares

La mayoría de los SDCs clásicos son vías de señalización independientes. Sin embargo, en algunos casos ocurre que la señal es detectada por un módulo o proteína auxiliar que interactúa con la HQ regulando su actividad. En general, estas proteínas se encuentran codificadas en regiones adyacentes o cercanas al operón que codifica para el SDC en cuestión^{72,73} y asisten a la detección de señales debido a la ausencia de módulos sensores en las HQs con las que interactúan, o bien, de modo de integrar señales adicionales a la vía^{74,75}. La interacción con la HQ de las proteínas auxiliares de detección de señal puede darse a nivel del dominio periplasmático^{76,77}, transmembrana⁷⁸ o el módulo catalítico⁷⁹. De esta manera, existe un punto de regulación adicional que también es alostérico, dado que dichos módulos sensores auxiliares cambian su conformación al unirse sus ligandos, permitiendo o inhibiendo la interacción con la HQ, la cual a su vez se apagará o encenderá: la unión del módulo sensor auxiliar a la HQ gatilla cambios conformacionales que se propagan al módulo catalítico, similar a lo que ocurre en HQs con módulos sensores verdaderos.

La regulación de encendido y apagado de SDCs a través de proteínas o módulos auxiliares también puede darse a nivel del RR. El apagado de P~RRs en SDCs con HQs que carecen de actividad fosfatasa necesariamente debe ser catalizado por una fosfatasa dedicada. Tal es el caso de algunos sistemas denominados “de dos componentes” pero que de hecho presentan dominios proteicos solubles adicionales que participan en la transmisión de fosfato desde HQ hacia RR y/o de la desfosforilación del P~RR; por ejemplo, sistemas bacterianos que regulan la quimiotaxis^{80–}

⁸² y esporulación⁹. Se ha reportado que la geometría del sitio activo ensamblado por dichas fosfatasa auxiliares y el P~RR, es muy similar al observado en muchos complejos HQ:RR capturados en el estado fosfatasa, aun cuando estas fosfatasa auxiliares presentan baja similitud de secuencia y estructura entre sí y relativo a HQs. Esto sugiere que los mecanismos catalíticos de apagado de RRs, ya sea mediante sus HQs específicas o sus fosfatasa dedicadas, han evolucionado de forma convergente⁸³⁻⁸⁵.

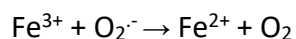
Homeostasis del hierro en bacterias

Al igual que todos los seres vivos, las bacterias requieren metales para cumplir con funciones vitales como la respiración, fotosíntesis, fijación del nitrógeno, entre muchas otras. En muchos casos los metales asisten al plegamiento nativo de las proteínas, o bien, ejercen funciones catalíticas coordinando/estabilizando cargas en el sitio activo de enzimas. En los organismos vivos el hierro ha sido adoptado como el principal metal de transición para llevar a cabo sus funciones esenciales, y esto se debe al variado espectro de coordinaciones químicas que pueden establecer en sus dos estados redox principales y reversibles: el ion ferroso -reducido- (Fe^{2+}) y férrico -oxidado- (Fe^{3+}). Además, presenta gran variabilidad en el potencial redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ que puede ser finamente modulado dependiendo de la naturaleza y entorno de las coordinaciones que establecen^{86,87}. El rango de potenciales redox puede ir desde $\sim +300$ mV como en algunos citocromos tipo α , hasta ~ -490 mV como en algunas proteínas ferrosulfuradas⁸⁸. Esto hace posible, por ejemplo, que en las cadenas respiratorias los electrones se transfieran “paso a paso” entre centros ferrosulfurados o moléculas de hemo, desde potenciales redox más bajos hacia más altos, dependiendo de la coordinación del hierro que recibe/dona el electrón. Asimismo, el hierro puede alcanzar estados de oxidación más altos, *i. e.*, Fe^{4+} y Fe^{5+} : estas especies son altamente inestables, reactivas y oxidantes, y son fundamentales para catalizar ciertas reacciones de decarboxilación, hidroxilación, entre otras, como por ejemplo reacciones catalizadas por enzimas mono- y di-oxigenasas⁸⁹⁻⁹¹. Cabe resaltar que algunas bacterias han logrado prescindir del hierro para su sobrevivencia, como es el caso de las espiroquetas *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum*, así como también bacterias del género *Lactobacillus* spp.; en cambio, éstas

emplean manganeso (Mn^{2+}) y/o cobalto (Co^{2+}), metales de transición con propiedades redox similares al hierro⁹²⁻⁹⁴.

La vida tuvo sus inicios en una atmósfera reductora, en donde el hierro se encontraba predominantemente en su forma reducida y soluble. Sin embargo, desde la “Gran Oxidación” de hace ~2300 millones de años, que resultó en la acumulación gradual de oxígeno (O_2) en la atmósfera y su difusión en mares y océanos, el hierro ambiental fue precipitando en forma de minerales de óxido férrico insoluble, mucho más inaccesibles para las bacterias que su forma soluble. Lejos de evolucionar hacia un metabolismo libre de hierro, emergieron en las bacterias de vida libre mecanismos de solubilización del hierro ambiental⁹⁵. Por otra parte, el secuestro de hierro en los eritrocitos del hospedero forma parte de su estrategia inmune para limitar el crecimiento y propagación de los patógenos, en un proceso denominado inmunidad nutricional^{96,97}. Las bacterias patógenas presentan mecanismos de hemólisis para acceder al hierro así secuestrado⁹⁸.

Paralelamente a la necesidad de hierro para su supervivencia, un exceso de hierro es tóxico para las bacterias, por lo que su adquisición debe ser estrictamente regulada. Asimismo, al incorporarse iones férricos al citoplasma, el Fe^{3+} mayoritariamente se reduce a Fe^{2+} y las concentraciones intracelulares de este último deben estar finamente controladas. El ion Fe^{2+} es inestable en solución acuosa y tiende a reaccionar rápidamente con moléculas de O_2 ; un exceso de iones Fe^{2+} en el citosol pueden catalizar la formación de radicales libres a través de la reacción de Fenton:



Los radicales libres superóxido (O_2^-) e hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$) son intermediarios del metabolismo del O_2 , altamente reactivos e inestables -sobre todo $\text{OH}^\cdot$, el de mayor reactividad-, que pueden ocasionar daños irreversibles en las biomoléculas de la maquinaria celular. Si bien una reacción descontrolada de Fe^{2+} con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es dañina para la bacteria^{95,99}, algunos mecanismos catalíticos de oxigenasas que emplean hierro como cofactor dependen de la reacción de hierro con H_2O_2 u O_2 para la formación de intermediarios Fe^{3+} -peroxo y Fe^{4+} -oxo

altamente energéticos, esenciales para la catálisis^{86,100,101}. La concentración de hierro intracelular libre -es decir, aquella fracción de hierro accesible para quelantes o sitios de unión proteicos con afinidad al hierro¹⁰²- debe estar comprendida en un rango fisiológico determinado, en donde exista suficiente hierro para poder cumplir con las funciones biológicas, pero no demasiado como para generar toxicidad debido al estrés ocasionado por especies reactivas del O₂. Es por esto que, además de mecanismos de tolerancia al estrés oxidativo, las bacterias también presentan mecanismos sofisticados de detección de hierro extracelular e intracelular para la estricta regulación transcripcional de genes involucrados en el tráfico de hierro a través de la membrana -ya sea para importar o exportar hierro-, de genes codificantes para proteínas que utilicen hierro como cofactor para ejecutar sus funciones, o bien, proteínas y biomoléculas involucradas en el almacenamiento de hierro que pueda estar en exceso en el citoplasma. Muchos de estos sistemas reguladores son SDCs, cuyos mecanismos de detección y regulación se describirán más adelante. Asimismo, también se mencionarán algunos reguladores globales, importantes en el mantenimiento de la homeostasis del hierro. Se describirán en todos los casos mecanismos generales y representativos, que no hacen justicia a la gran cantidad y variedad de sistemas involucrados en la homeostasis del hierro en el universo bacteriano.

Adquisición

Las bacterias tanto de vida libre como patógenas cuentan con un gran número de mecanismos para adquirir hierro de su ambiente (ver Figura 6). Por ejemplo, la quelación mediante sideróforos o a partir de proteínas que secuestran hierro del hospedero son mecanismos bastante extendidos. También puede ser incorporado de forma activa por transportadores de la membrana interna. Un ejemplo es el complejo FeoAB, el cual incluye a una proteína citoplasmática de 8 kDa, FeoA, con estructura de barril β , que interacciona con la proteína transmembrana FeoB regulando su función^{103,104}; FeoB tiene un peso molecular de ~85 kDa con un dominio de proteína G que une e hidroliza GTP para aportar energía al transporte activo de Fe²⁺ hacia el citoplasma, un dominio GDI (de “*guanine dissociation inhibitor*”) y un dominio transmembrana^{105,106}. El mecanismo de adquisición de hierro por parte del sistema FeoAB ha

sido poco estudiado, pues el ion Fe^{2+} soluble es en general escaso; no obstante, el Fe^{2+} se encuentra particularmente disponible en anaerobiosis o condiciones de bajo pH¹⁰⁴. Asimismo, existen otros transportadores bacterianos que también están involucrados en la internalización de Fe^{2+} como MntH^{107,108}, ZupT¹⁰⁹, YfeABCD¹¹⁰, FutABC¹¹¹ y EfeUOB¹¹², quienes en algunos casos también pueden internalizar otros metales divalentes como Mn^{2+} , Co^{2+} y zinc (Zn^{2+}).

La mayoría de los sistemas de adquisición de hierro se dedican a internalizar Fe^{3+} , y las bacterias han desarrollado mecanismos para hacer accesible esta forma insoluble del hierro. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (generalmente menor a 1000 Da) sintetizadas por bacterias y hongos, que son capaces de hurgar y unir Fe^{3+} a partir de precipitados o proteínas del hospedero, facilitando su solubilización y adquisición por parte de bacterias^{113,114}. Luego, las bacterias son capaces de transportar estos complejos sideróforo: Fe^{3+} a través de la membrana mediante sistemas proteicos específicos, de forma regulada. Las estructuras de los sideróforos son muy variables, sin embargo, el grupo funcional para la coordinación del Fe^{3+} puede ser de tres tipos: α -hidroxicarboxilato, catecol o hidroxamato. El Fe^{3+} unido en este contexto establece una esfera octahédrica hexacoordinada con los oxígenos de estos grupos funcionales, con muy alta afinidad -con constantes de disociación (K_D) de hasta $\sim 10^{-49}$ M^{-115,116}, debido a que el Fe^{3+} actúa como un ácido fuerte con gran afinidad al átomo de oxígeno. Una vez que el sideróforo en complejo con Fe^{3+} es asimilado por la bacteria, proteínas citoplasmáticas reducen el hierro a Fe^{2+} , perdiendo afinidad por el sideróforo pues el ion ferroso actúa como un ácido suave, que prefiere átomos de nitrógeno y azufre como ligandos^{87,98}. Así, el hierro queda disponible en el citoplasma para su uso por la bacteria.

Hay bacterias que no presentan genes que codifiquen para enzimas biosintéticas de sideróforos; sin embargo, son capaces de asimilar y utilizar sideróforos de diversos orígenes biológicos, sintetizados por levaduras, hongos y plantas^{113,117}. En bacterias Gram-negativas, los complejos sideróforo: Fe^{3+} exceden en peso molecular lo permitido para el pasaje a través de porinas de la membrana externa (*cut-off* ~ 600 Da)^{118,119}, por tanto, la bacteria requiere de receptores específicos para su transporte hacia el espacio periplásmico. Existen varios tipos de receptores de sideróforos en bacterias, *e. g.*, FecA que une dicitrato férrico^{120,121}, FhuA que une ferricromo^{122,123}, FptA que une pioverdina¹²⁴, FepA¹²⁵, etc., con escasa homología de secuencia

entre ellos; esta diversidad se correlaciona con la gran variabilidad de tipos de sideróforos. Más allá de esto, todos los receptores son estructuralmente muy similares, siendo barriles β , y un dominio N-terminal globular denominado dominio “*cork*”, “*plug*” o “*hatch*”, que funciona como “válvula”⁹⁸.

El transporte de complejos sideróforo: Fe^{3+} desde el espacio extracelular hacia el periplasma de bacterias Gram-negativas requiere energía, y no hay un gradiente electroquímico a través de la membrana externa o nucleósidos trifosfato periplásmicos que puedan ser empleados como fuente de energía. La solución de la bacteria es conectar físicamente la membrana externa a la membrana citoplásmica interna mediante el complejo proteico ExbBD-TonB, embebido en la membrana interna, que permite transducir la fuerza protón motriz del gradiente electroquímico de ésta última, en energía para el transporte de sustratos de los receptores de la membrana externa¹²⁶. ExbD y ExbB son proteínas de transmembrana de ~17 y ~26 kDa, respectivamente, y el complejo se constituye por un pentámero de ExbB y un dímero de ExbD¹²⁷, donde cada monómero atraviesa la membrana interna mediante tres y una α -hélice, respectivamente¹²⁸; asimismo, ExbD presenta un dominio C-terminal soluble que reside en el periplasma¹²⁹. TonB es una proteína de ~26 kDa, monomérica, con una única α -hélice de transmembrana N-terminal, que conecta con su dominio C-terminal soluble periplásmico mediante un *linker* flexible de ~100 residuos; este *linker* otorga la conexión física entre membrana interna y receptores de la membrana externa. En este contexto, la fuerza protón motriz transducida por ExbBD, induce cambios conformacionales en TonB que dicta la interacción con dichos receptores a través de su dominio C-terminal, activando el transporte de complejos sideróforo: Fe^{3+} y otros^{130–134}.

Una vez en el periplasma, el complejo sideróforo: Fe^{3+} se une a proteínas de unión periplasmáticas (o PUPs; en la literatura se denominan *PBP*, por “*Periplasmic Binding Proteins*”) que escoltarán dichos complejos a transportadores de la membrana citoplasmática interna para su internalización al citoplasma. Cada tipo de sideróforo se une a su PUP asociada específica^{98,135}. La energía para el transporte a través de la membrana interna es otorgada por proteínas de transmembrana con un *cassette* de unión a ATP (o ABC, de “*ATP-Binding Cassette*”), que a partir de la hidrólisis de ATP inducen cambios conformacionales que permiten la internalización del complejo sideróforo: Fe^{3+} ^{98,114}. Ya en el citoplasma, el Fe^{3+} puede disociarse del sideróforo

mediante su degradación¹³⁶, pero mayormente, es mediante la reducción de Fe^{3+} hacia Fe^{2+} que ocurre la liberación al citosol¹¹⁵. Por su parte, las proteínas de utilización y almacenamiento de hierro en el citoplasma bacteriano presentan alta afinidad por el Fe^{2+} .

Muchas bacterias Gram-negativas patógenas presentan receptores de la membrana externa que se unen a transferrinas y lactoferrinas del hospedero. Estas proteínas, de peso molecular ~80 kDa, son muy grandes para su paso a través de la membrana externa, por lo que el Fe^{3+} es removido en la superficie externa bacteriana para su adquisición. Las proteínas de la membrana externa TbpB/TbpA y LbpB/LbpA cumplen esta función, uniéndose a transferrinas y lactoferrinas y forzando la separación de los dominios que rodean los sitios de unión a hierro, induciendo la disociación del hierro para su internalización¹³⁷⁻¹³⁹. Similar a lo que ocurre con complejos sideróforo: Fe^{3+} , una vez dentro del periplasma el Fe^{3+} se une a la PUP FbpA la cual luego interaccionará con las proteínas de la membrana citoplasmática interna FpbB/FbpC, quienes internalizan el Fe^{3+} empleando energía a expensas de ATP, dado que se asocian con proteínas con ABCs^{98,140}.

La Figura 6 esquematiza los sistemas mencionados, involucrados en adquisición de hierro en bacterias Gram-negativas. Las bacterias Gram-positivas no tienen membrana externa; en estas bacterias los mecanismos de adquisición de hierro están menos estudiados. Sin embargo, una proteína anclada a la membrana similar a las PUPs de bacterias Gram-negativas está involucrada en la unión de hierro extracelular, así como un ABC asociado que aporta energía a expensas de ATP para la internalización del hierro⁹⁸. También se ha descrito la presencia de receptores específicos para transferrinas, sideróforos y hemo en su membrana celular¹⁴¹. Hasta ahora no se ha demostrado la existencia de sistemas ExbBD-TonB en bacterias Gram-positivas¹⁰⁴. Ya en el citosol, un ambiente netamente reductor, la mayor parte del hierro libre se encuentra en forma de Fe^{2+} ¹⁴². Se ha documentado que las bacterias *E. coli* y *Bacillus subtilis* contienen ~0.5-1 mM de hierro intracelular, la mayoría como cofactor de proteínas que emplean centros ferro-sulfurados, hemoproteínas y enzimas dependientes de hierro^{95,102,143}; aproximadamente una centésima parte de la concentración total de hierro citosólico forma parte del *pool* intracelular de hierro lábil o libre¹⁰².

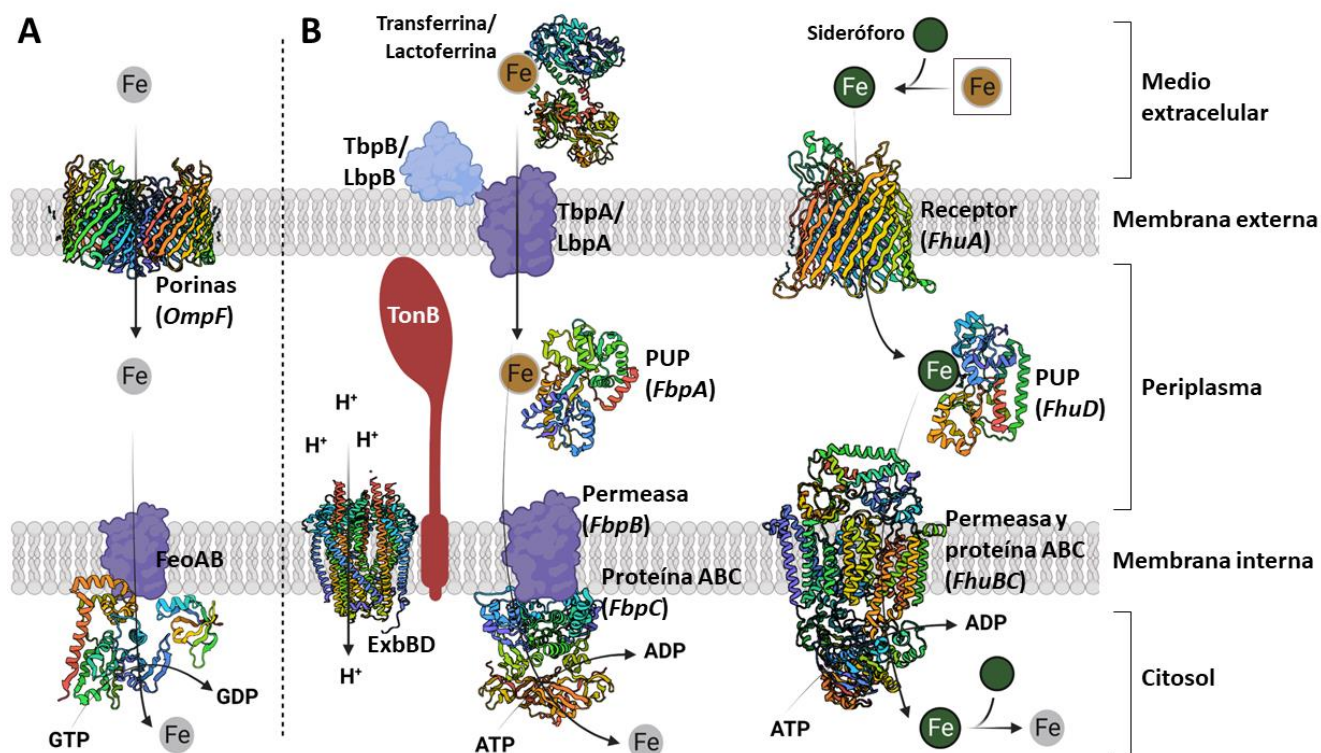


Figura 6. Esquema representativo de sistemas de adquisición de hierro en bacterias Gram-negativas. (A) Sistemas TonB-independientes. PDB IDs: *OmpF* = 2OMF, *NFeoB* = 5FH9, *FeoA* = 6E55. (B) Sistemas TonB-dependientes. PDB IDs: *ExbBD* = S5V0; *Transferrina* = 3V83; *FbpA* = 2O69; *FbpC* = 3FVQ, *FhuA* = 1BY5, *FhuD* = 1K2V, *FhuBCD* = 7LB8. Iones ferrosos libres están representados por esferas grises; iones férricos libres están representados por esferas naranjas; iones férricos asociados a óxidos o proteínas están representados por esferas naranjas recuadradas; iones férricos asociados a un sideróforo están representados por esferas verdes; iones de hidrógeno libres están representados como H^+ . Figura diseñada mediante el *software* BioRender.

Detección de hierro y regulación homeostática de su concentración intracelular

En los sistemas de detección, la unión de un ligando específico dispara cambios conformacionales que son transducidos o transmitidos alostéricamente a módulos efectores río abajo, dando lugar a una respuesta fisiológica. Un mecanismo general que presentan las bacterias para detectar y regular las concentraciones intracelulares de hierro es mediante el regulador maestro Fur: una metaloproteína dimérica de unión al ADN que requiere la unión de cationes divalentes para su

asociación a diversos promotores génicos, regulando así la transcripción de genes involucrados principalmente en la utilización y tráfico del hierro^{144,145}. Fur presenta un dominio N-terminal de unión al ADN unido por un *linker* flexible al dominio C-terminal de dimerización; esta flexibilidad impide la unión de Fur a los promotores génicos en el contexto de su forma apo, sin Fe²⁺ unido. Al incrementar la concentración de Fe²⁺ intracelular, el equilibrio se desplaza hacia la forma holo de Fur, unida a Fe²⁺, que reconfigura los dominios de unión al ADN en una conformación competente para la unión al ADN^{146–148}. Holo-Fur actúa sobre un regulón de ~100 genes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del hierro, por ejemplo, reprimiendo la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la adquisición de hierro extracelular, en el transporte de electrones a través de la membrana interna, en el combate al estrés oxidativo y en el almacenamiento de hierro¹⁴⁵. El mecanismo de holo-Fur es impedir el reclutamiento de la ARN polimerasa a los promotores génicos, aunque también se ha documentado su rol como activador transcripcional¹⁴⁹. En otras bacterias existen reguladores maestros alternativos -variables en secuencia pero similares en estructura respecto a Fur-, como por ejemplo DtxR en la bacteria Gram-positiva *Corynebacterium diphtheriae*, que ejerce un rol funcional similar como sensor de hierro intracelular y regulador global de la transcripción de genes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del hierro^{150,151}. Cabe agregar que, en esta bacteria, DtxR regula la transcripción del gen codificante para la toxina causante de la difteria^{152,153}.

Las bacterias patógenas detectan la depleción de hierro como una señal indicadora de que se encuentran dentro de un hospedero. Existen sistemas de señalización bacterianos que detectan los niveles de hierro extracelular y, a partir de ello, regulan la expresión de genes involucrados en el tráfico de hierro a través de la membrana, así como también en mecanismos de patogenicidad y virulencia. Los SDCs sensores de hierro y de otros metales presentan en su módulo sensor motivos conservados que están involucrados en la coordinación del metal; tal es el caso de PmrBA de *Escherichia coli*, el primer SDC documentado que se activa específicamente en presencia de Fe³⁺ extracelular, pero no de Fe²⁺¹⁵⁴. El dominio sensor de la HQ PmrB consiste en un bucle periplásmico de ~30 residuos, que presenta dos motivos conservados que consisten en dos residuos de Glu espaciados por dos residuos (“motivo ExxE”). Este bucle ha sido descrito

como un dominio putativo de unión a hierro^{155,156}. Al activarse, PmrB fosforila a su RR específico PmrA, que actúa como factor transcripcional regulando la expresión de genes involucrados en la resistencia al antibiótico polimixina B^{157–159}. PmrA también puede ser activado mediante la interacción con PmrD: la expresión del gen codificante de PmrD es a su vez inducida por la activación de un segundo SDC, PhoQP, involucrado en la detección de Mg^{2+} extracelular¹⁶⁰. El SDC ColRS de *Pseudomonas putida* también se ha documentado como un sistema que detecta Fe^{3+} , a través de los motivos conservados ExxE del dominio sensor periplásmico de la HQ ColS. Asimismo, se observó que esta vía también responde a Zn^{2+} , Mn^{2+} y cadmio (Cd^{2+}), pero no a Fe^{2+} . Al activarse, el RR ColR regula la expresión de genes involucrados en la homeostasis y tolerancia a metales¹⁶¹. Otros ejemplos de SDCs involucrados en la respuesta a hierro también forman redes de señalización más complejas como NtrXY de *Paracoccus denitrificans*: la HQ NtrY responde a la depleción de hierro extracelular y activa al RR NtrX, el cual es un regulador global de la expresión de genes vinculados en la homeostasis de hierro, incluyendo la expresión del gen codificante para Fur; pero también, NtrX regula la expresión de genes codificantes para proteínas involucradas en la biología redox del nitrógeno, y la cadena de transporte de electrones¹⁶². Si bien el periplasma bacteriano es de naturaleza oxidante, existen SDCs involucrados en la detección de Fe^{2+} extracelular, como el caso de FirRS de *Haemophilus influenzae*. Al igual que PmrB, la HQ FirS presenta en su dominio sensor periplásmico un motivo putativo “DYRED” de unión a hierro formado por cinco residuos: Asp, tirosina (Tyr, Y), arginina (Arg, R), Glu y Asp; sin embargo, contrariamente a lo que ocurre con PmrB, FirS es capaz de detectar la presencia de Fe^{2+} y Zn^{2+} pero no de Fe^{3+} . Al activarse ante la presencia de Fe^{2+} extracelular, FirS fosforila a su RR específico FirR, el cual en este contexto se une al promotor de su propio operón *ygiW-firRS* induciendo su expresión; asimismo, el *knockout* del operón *ygiW-firRS* resulta en cepas de *H. influenzae* menos virulentas¹⁶³. Cabe agregar que *ygiW*, el gen adyacente a *firRS*, codifica para una tercera proteína predicha como periplásmica y de función desconocida, aunque se hipotetiza que está funcionalmente vinculada a FirRS¹⁶³.

Si bien los dominios sensores de hierro presentan motivos específicos para la detección de este metal, y dado que el medio intracelular contiene otros metales similares, estos sitios también pueden unir otros metales de forma inespecífica. Por ejemplo, los sitios de unión a hierro suelen

unir Zn^{2+} con mayor afinidad que el hierro; la clave está en que la concentración de Zn^{2+} libre intracelular es mucho menor que la concentración de Fe^{2+} libre intracelular, de $\sim 10^{-13}$ vs. $\sim 10^{-5}$ M, respectivamente, por lo que el equilibrio se desplaza hacia la unión de Fe^{2+} ¹⁴³. Asimismo, los sitios de unión a metales en proteínas involucradas en su detección, ya sea ambiental o intracelular, deben presentar una afinidad al metal lo suficientemente grande para ser capaz de captarlo y activar la vía de regulación, pero no tanto como para que la unión del metal sea (o tienda a ser) irreversible, dificultando el apagado de la vía.

Almacenamiento y desintoxicación

El hierro intracelular en exceso también es un problema que la bacteria suele enfrentar, sobre todo por la reactividad de éste con (especies reactivas del) O_2 que, en caso de no existir mecanismos de protección y regulación celular, resultaría en la formación de radicales libres muy reactivos y dañinos. En condiciones de exceso de hierro, las bacterias (y también arqueas y eucariotas) almacenan hierro en proteínas citoplasmáticas denominadas ferritinas, para su uso cuando el hierro escasea, por ejemplo, cuando bacterias patógenas infectan y colonizan al hospedero¹⁶⁴. En el sitio activo de la ferritina, el Fe^{2+} citoplasmático es oxidado a Fe^{3+} , y de esta manera es el hierro en estado férrico el que es almacenado; las ferritinas se disponen formando una “cáscara” esférica que rodea el Fe^{3+} , pudiéndose almacenar en cada esfera unos ~ 4500 átomos de hierro¹⁶⁵. Cuando la bacteria requiere de acceder a este almacén de hierro, existen mecanismos de regulación que involucran proteínas que realizan modificaciones postraduccionales sobre las ferritinas induciendo su degradación. Esto desestabiliza la esfera de almacenamiento de hierro provocando la liberación del metal al citoplasma¹⁶⁶.

Un sistema accesorio para la desintoxicación del hierro consiste en eflujo del metal hacia el medio extracelular. Existen cuatro clases de exportadores de hierro: ATPasas de tipo P, facilitadores de difusión de cationes (CDF, por “*cation diffusion facilitator*”), proteínas MFS (por ser del tipo “*major facilitator superfamily*”), y ferritinas de transmembrana^{136,148}. Así como los sistemas de influjo de hierro son regulados principalmente a nivel transcripcional por la proteína Fur, existen proteínas que detectan, por ejemplo, daño ocasionado por estrés oxidativo, y actúan también

como reguladores transcripcionales. YaaA de *E. coli*, una proteína citoplasmática de ~30 kDa que pertenece a una familia de proteínas con dominios DUF328, y cuya función es prevenir el daño oxidativo a ADN y proteínas disminuyendo los niveles de hierro libre intracelular. Se postuló que el mecanismo más probable de desintoxicación de hierro mediada por YaaA es regulando el tráfico de hierro a través de la membrana, tanto inhibiendo su importación como estimulando su exportación¹⁶⁷, pero no se encontraron evidencias concluyentes que apoyen esta hipótesis. En general los mecanismos de eflujo de hierro y su regulación están poco estudiados, debido a que la intoxicación por hierro no es un desafío tan prevalente para bacterias como lo es la privación del hierro, sobre todo en el contexto hospedero-patógeno.

Finalmente, también existen biomoléculas denominadas porfirinas, *e. g.*, hemo, sirohemo, clorofila, cobalamina, entre otras, que emplean metales como cofactor para ejercer sus funciones, por lo que también funcionan como sitios de almacenamiento reduciendo la concentración intracelular de metal libre. De las porfirinas, el hemo es la principal fuente de almacenamiento de hierro en la célula. En la siguiente sección, se profundizará sobre la biología del hemo y cómo se vincula con la biología del hierro.

Metabolismo y homeostasis del hemo en bacterias

Las porfirinas (del griego “*porphyra*”, que significa “púrpura”) son moléculas orgánicas heterocíclicas esenciales para la vida. Presentes en todos los seres vivos sobre la Tierra, cumplen numerosas funciones. La estructura básica de las porfirinas consiste en un macrociclo de cuatro anillos pirrólicos -*i. e.* un tetrapirrol- unidos por cuatro enlaces metileno. La propiedad biológica más importante del tetrapirrol es su capacidad de unir metales. El hemo, una porfirina que une hierro, es central en la biología, debido a su capacidad no sólo de unir y transportar O₂ en animales vertebrados -quizás su función más conocida-, sino para detectar otros gases, y también, llevar a cabo las reacciones de óxido-reducción necesarias, por ejemplo, para el transporte de electrones a través de la membrana citoplasmática bacteriana y las membranas mitocondriales internas de organismos eucariotas¹⁶⁸. Existen distintos tipos de hemo, cuyas variaciones químicas permiten que éstos se unan a distintos complejos citocromo de la

membrana, estableciendo geometrías de coordinación diferenciales que resultan en potenciales redox variables¹⁶⁹. Esta variabilidad contribuye a generar una “rampa” para el transporte de electrones en la respiración celular, desde potenciales redox menores hacia aceptores finales de electrones con potenciales redox mayores. Asimismo, el hemo actúa como reserva intracelular de hierro en exceso y es el cofactor de enzimas esenciales como catalasas y algunas mono- y di-oxigenasas que catalizan reacciones de decarboxilación, hidroxilación, entre otras.

Biosíntesis

La habilidad de las bacterias de sintetizar tetrapirroles modificados enriquece sus capacidades metabólicas, otorgándoles ventajas ecológicas y permitiéndoles cambiar rápidamente entre condiciones ambientales y adaptarse. La mayoría de las bacterias presentan la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar hemo, y si bien existen variaciones, esta maquinaria está altamente conservada a lo ancho de todos los Dominios de la vida. Sin embargo, algunas bacterias como *Enterococcus faecalis* y bacterias de lactato, presentan genes que codifican apohemoproteínas pero no pueden sintetizar su propio hemo. En cambio, están equipadas para adquirir hemo exógeno e incorporarlo para formar sus propias holohemoproteínas^{170,171}.

El precursor inicial en la biosíntesis de hemo es el ácido 5-aminolevulínico (5ALA). En la naturaleza los organismos sintetizan 5ALA mediante una de dos vías: en la vía C₄ (también denominada vía Shemin), empleada por metazoos, hongos y algunas bacterias (*i. e.*, α -proteobacterias), se convierte succinil-CoA y glicina en 5ALA a través de la condensación catalizada por la enzima 5ALA sintasa (AlaS)¹⁷²; en la vía C₅, empleada por plantas, arqueas y la mayoría de bacterias, se convierte glutamil-ARNt en 5ALA a través de la catálisis de dos enzimas que actúan en tándem: la glutamil-ARNt-reductasa (HemA) en primer lugar convierte al glutamil-ARNt en glutamato-1-semialdehído (GSA) en una reacción de óxido-reducción dependiente de NADPH. Dado que el GSA es altamente reactivo y puede dañar componentes citoplasmáticos, el GSA es rápidamente convertido a 5ALA a través de la segunda enzima, la glutamato-1-semialdehído-2,1-aminomutasa (HemL)¹⁷³. Los distintos microorganismos cuentan con la maquinaria proteica para sintetizar

5ALA mediante una u otra vía, de forma excluyente; sólo en muy pocos casos se ha visto que un organismo cuente con la maquinaria proteica de ambas vías¹⁷⁴.

Las enzimas involucradas en la producción de uroporfirinógeno III (URO) a partir de 5ALA están altamente conservadas en todos los seres vivos. En primer lugar, dos moléculas de 5ALA son condensadas a porfobilinógeno (PBG) a través de la PBG-sintasa (HemB, también denominada 5ALA dehidratasa) generando un monopirrol; luego, cuatro moléculas de PBG son utilizadas como sustrato de la PBG-deaminasa (HemC) para convertirlas en el tetrapirrol hidroximetilbilano. Éste último es a su vez convertido en el primer intermediario tetrapirrónico macrocíclico de la vía, URO, a través de la URO-sintasa (HemD)¹⁷⁵. Es a partir de URO en la que se ramifican las vías de biosíntesis de hemo y del resto de los tetrapirroles (cobalamina, sirohemo, F₄₃₀ y clorofilas) que a partir de ese punto requieren de enzimas diferentes¹⁷⁴.

Al igual que el 5ALA, el URO es un intermediario soluble. Las siguientes enzimas que convierten el URO a hemo, que es liposoluble, son decarboxilasas y oxidasas que hacen que los siguientes intermediarios vayan perdiendo progresivamente solubilidad. El primer paso hacia la síntesis de hemo es la decarboxilación del URO mediante la enzima URO-decarboxilasa (HemE) para producir coproporfirinógeno III (CPO). A partir de este punto, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas siguen distintos pasos enzimáticos de biosíntesis de hemo¹⁷⁴. Las bacterias Gram-negativas siguen la “vía clásica”: primero decarboxilan el CPO a protoporfirinógeno IX (PPGIX) a través de la CPO-decarboxilasa (HemN), y luego oxidan éste a protoporfirina IX (PPIX) empleando la PPGIX-oxidasa (HemG). La inserción del Fe²⁺ en el anillo porfirínico de la PPIX es catalizada por la PPIX-ferroquelatasa (HemH)^{176,177}. Las bacterias Gram-positivas siguen la “vía alternativa”: oxidan el CPO a coproporfirina III mediante la CPO-oxidasa, luego la enzima coproporfirina ferroquelatasa cataliza la inserción de Fe²⁺ en el anillo porfirínico para producir coprohemo, y finalmente, la coprohemo-decarboxilasa decarboxila el coprohemo para producir hemo.

El hemo producto de la vía de biosíntesis es denominado hemo *b*; es a partir de éste que se sintetizan los otros tipos principales de hemo (*a*, *c*, *d* y *o*) con modificaciones químicas diferenciales en los grupos funcionales de la parte externa del anillo de pirroles. Los tipos de hemo que se unen a sus citocromos les asignan el nombre a éstos últimos (*e. g.*, la citocromo-*bd*-

oxidasa una hemo *b* y *d*)^{178,179}. En la Figura 7 se resume la vía de biosíntesis de hemo en bacterias Gram-negativas. Como se mencionó anteriormente, el hemo es una molécula liposoluble, por lo que el *pool* de hemo libre intracelular es prácticamente nulo, estando mayormente asociado a hemoproteínas para cumplir sus funciones biológicas. Además de su rol como cofactor, el hemo puede ser catabolizado por hemo-oxigenasas que lo degradan para dar lugar a biliverdina, monóxido de carbono (CO) y hierro libre -es así como el hemo funciona como almacén de hierro para la célula-; o bien, ser exportado para reducir la toxicidad generada por un posible exceso de hemo intracelular. Más adelante se describirán dichos procesos.

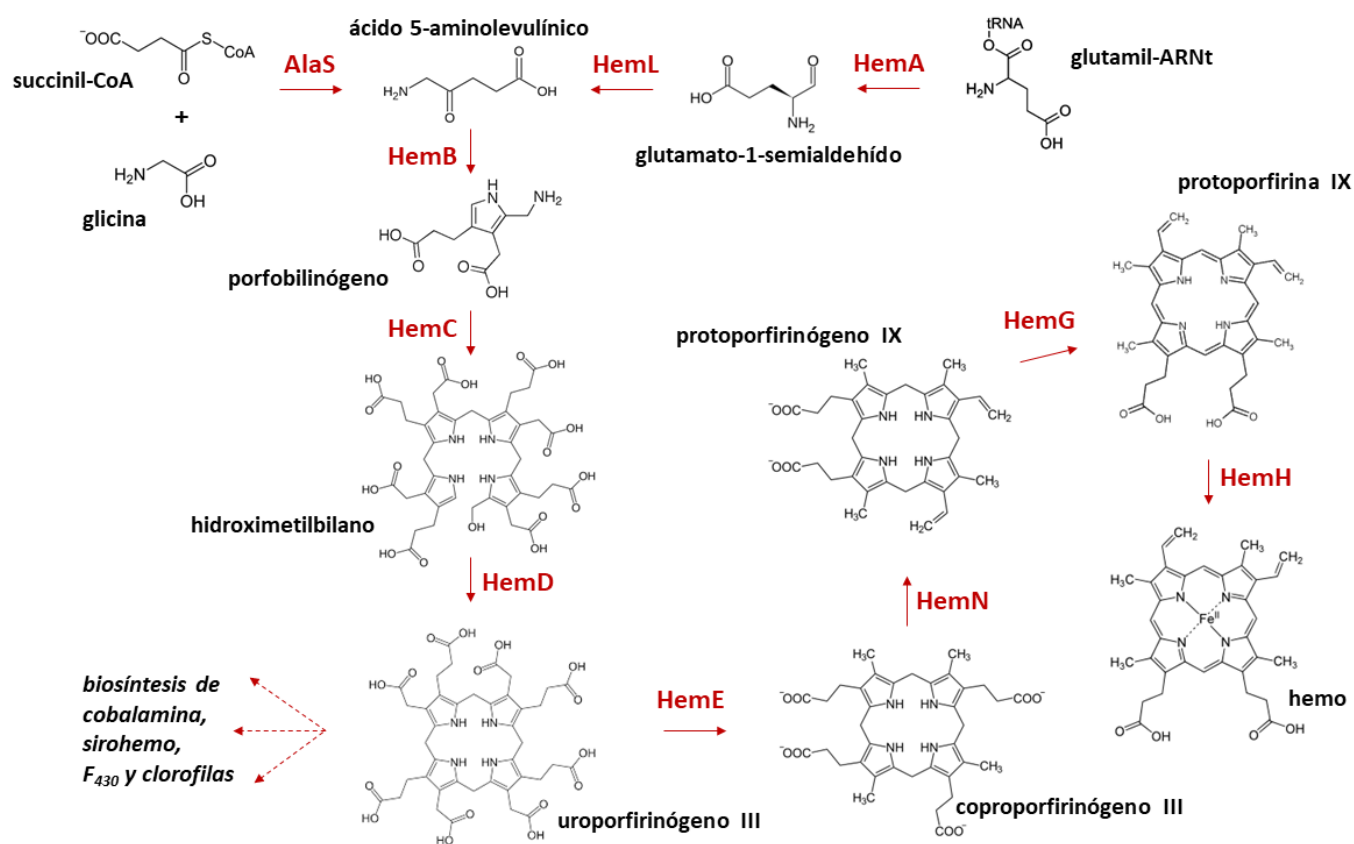


Figura 7. Resumen de la biosíntesis de hemo en bacterias Gram-negativas.

Adquisición

En el hospedero, el hemo es la principal fuente de hierro para las bacterias patógenas. Para acceder al hemo, las bacterias secretan exotoxinas (*i. e.*, hemolisinas, citolisinas, proteasas) que poseen la función de lisar eritrocitos circulantes del torrente sanguíneo, y con ello, liberar las hemoglobinas que residen en su interior, y que unen hemo como cofactor⁹⁸; cabe resaltar que la hemoglobina libre en el torrente sanguíneo es rápidamente secuestrada por haptoglobinas en un mecanismo propio del hospedero. Las hemopexinas y albúminas del torrente sanguíneo también son fuente de hemo para las bacterias patógenas¹⁸⁰. El hemo tiene una masa molecular de ~600 Da; similar a lo que ocurre con el hierro asociado a transferrinas o los complejos sideróforo:Fe, el hemo es adquirido de las hemoproteínas del hospedero y asimilado a través de receptores de la membrana externa para ser transportado activamente al periplasma. En bacterias Gram-negativas, dichos receptores emplean el sistema ExbBD-TonB para asimilar el hemo desde el medio extracelular. Si bien el hemo es una molécula liposoluble, su pasaje a través de las membranas lipídicas de forma pasiva se encuentra limitado por su tamaño¹⁸¹. Existen dos grandes tipos de receptores de hemo: aquellos que unen hemo o hemoproteínas directamente, o bien, aquellos que dependen de la secreción de hemóforos (*i. e.*, hemoproteínas bacterianas extracelulares) que interactúan con las hemoproteínas del hospedero en el medio extracelular¹⁸².

Los sistemas de adquisición que unen hemo o hemoproteínas de forma directa han sido bien descritos en la literatura; ejemplos conocidos son HmuRSTUV de *Yersinia pestis*¹⁸³, ShuASTUV de *Shigella dysenteriae*^{184,185}, PhuRSTUVW de *Pseudomonas aeruginosa*^{186–188}, entre otros. Estos sistemas consisten en un receptor anclado a la membrana externa (*e. g.*, HmuR, ShuA, PhuR), de peso molecular de entre 70 y 120 kDa y estructura del tipo barril β con un dominio soluble adicional que funciona como válvula (similar a los receptores que internalizan complejos sideróforo:Fe). Una vez que el hemo es obtenido a partir de hemoproteínas, es asimilado e internalizado por dichos receptores hacia el periplasma bacteriano, en donde se une a PUPs (*e. g.*, HmuT, PhuT, ShuT; proteínas de ~30 kDa, estructuralmente similares a aquellas que unen hierro, descritas anteriormente) que transportan el hemo hacia permeasas de la membrana citoplasmática interna, las cuales presentan dominios del tipo ABC y permiten el transporte activo de hemo a expensas de ATP hacia el citosol (*e. g.*, HmuUV, ShuUV, PhuUVW). En el citosol,

el hemo puede incorporarse a proteínas citoplasmáticas que pertenecen a estos sistemas, en algunos casos actuando como proteínas de almacenamiento y en otros como hemo-oxigenasas, catalizando la degradación de hemo y la consecuente liberación de hierro (*e. g.*, HmuS, ShuS, PhuS)^{98,180,189,190}.

Los sistemas de adquisición que unen hemóforos han sido descritos sólo en algunas especies de bacterias. Estos consisten en una proteína (hemóforo) que es secretada desde el citoplasma bacteriano hacia el medio extracelular, y compete con las hemoproteínas del torrente sanguíneo por la unión a hemo debido a la alta afinidad que presentan por el hemo, con $K_D \sim 10^{-8} \text{ M}$ ¹⁹¹. Una vez que el hemóforo incorporó el hemo, éste se une a receptores específicos para su internalización; los mecanismos involucrados se desconocen hasta ahora, pero se cree que involucra permeasas con dominios tipo ABC tal como los sistemas de adquisición directa^{98,180,189}. Un ejemplo bien estudiado es HasAR, identificado en *P. aeruginosa* y *Y. pestis*, entre otras^{192,193}. HasA es una proteína de ~19 kDa con un plegamiento tipo α/β , y el hemo se une entre dos bucles en la interfaz del pliegue α y el β ¹⁹⁴. Al unirse al hemo, HasA interactúa con su receptor específico HasR -estructuralmente similar a los receptores de unión directa a hemo o hemoproteínas del hospedero- para la internalización del hemo.

Asimismo, existen sistemas que permiten asimilar precursores solubles de hemo, como por ejemplo 5ALA. Un sistema bien descrito es el de la dipeptidil permeasa de *E. coli*, Dpp. Dado que la masa molecular del 5ALA es de ~130 Da, puede ser incorporado pasivamente a través de porinas de la membrana externa¹¹⁹. La proteína periplásmica DppA luego la envía a permeasas específicas con dominio tipo ABC, *i. e.* DppBCDF, que internaliza el 5ALA al citoplasma^{195,196}. Ortólogos de este sistema también fueron descritos en otras bacterias como *Salmonella typhimurium*¹⁹⁷. Además de internalizar 5ALA, el sistema Dpp también puede internalizar dipéptidos de diversa naturaleza¹⁹⁸. El hecho de que las bacterias cuenten con mecanismos de adquisición de hemo e intermediarios de hemo es importante para ahorrar la energía celular que demanda la biosíntesis de estas moléculas en aquellas bacterias capaces de sintetizar hemo *de novo*. La Figura 8 resume ejemplos de sistemas de adquisición de hemo y 5ALA en bacterias Gram-negativas.

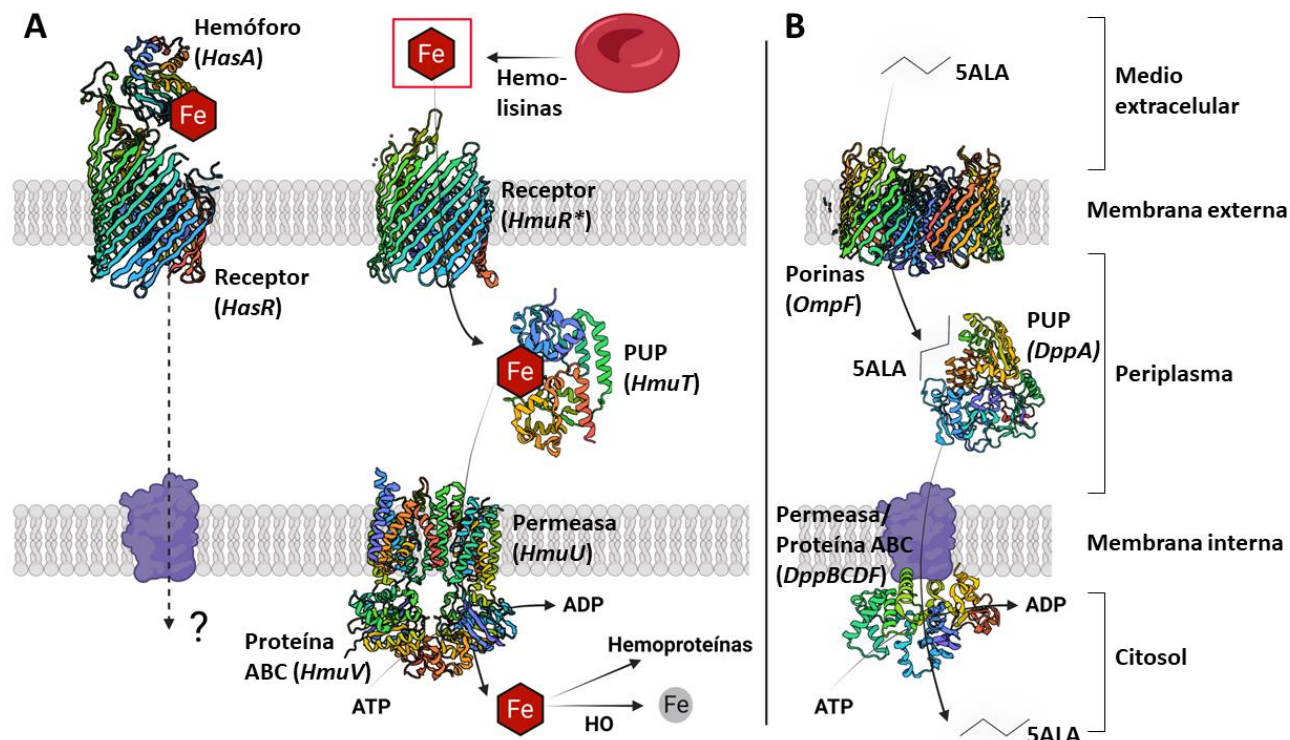


Figura 8. Esquema representativo de sistemas de adquisición de (A) hemo, TonB-dependientes, y (B) ácido 5-aminolevulínico (5ALA) en bacterias Gram-negativas. Moléculas de hemo -protoporfirina IX con hierro (Fe) unido están representadas por hexágonos rojos; hemoglobinas están representadas por la molécula de hemo recuadrada; el ion ferroso está representado por esferas grises. (*: dado que no se ha determinado la estructura tridimensional de HmuR, en cambio se muestra al homólogo estructuralmente similar ShuA). PDB IDs: HasAR = 5C58; ShuA (representativo de HmuR) = 3FHH; HmuT = 3NU1; HmuUV = 4G1U; OmpF = 2OMF; DppA = 6E3D; Dpp (dominio ABC) = 4FWI. Figura diseñada mediante el *software* BioRender.

Los mecanismos de adquisición de hemo en bacterias Gram-positivas están menos estudiados; sin embargo, en general éstos se componen de receptores de superficie acoplados a un transportador ABC para la internalización del hemo al citosol, mediado por proteínas capaces de enviar el hemo desde el receptor hacia el transportador a través de la compleja pared celular de este tipo de bacterias^{180,199}. Por ejemplo, se ha caracterizado un sistema de adquisición de hemo en *Staphylococcus aureus* que consiste, en primer lugar, en los receptores de superficie IsdB e IsdH (por “*iron-regulated surface determinants*”) que unen hemoglobina o complejos hemoglobina-haptoglobina; en segundo lugar, el hemo es dissociado de las hemoproteínas del

hospedero gracias a la acción de IsdA e IsdB, para luego ser transferido a la proteína de la pared celular IsdC. Finalmente, el hemo pasa a través de la membrana citoplasmática con la ayuda de los factores de traslocación IsdD, IsdE e IsdF. Una vez en el citosol, el hemo se une a IsdG e IsdI, proteínas que se cree que presentan actividad hemo-oxigenasa, para la degradación del hemo y liberación de hierro al citosol^{189,200}.

Detección de hemo y regulación homeostática de su concentración intracelular

Los sitios de unión de hemo en hemoproteínas involucran un gran número de residuos; la mayoría de éstos estableciendo interacciones hidrofóbicas, a excepción de algunos residuos hidrofílicos que interaccionan con los grupos propionato del hemo mediante puentes salinos. En muchos casos el grupo imidazol de un residuo de His, denominada His axial, coordina el hierro tetracoordinado al anillo porfirínico²⁰¹, aunque en otros, este rol lo ejerce el grupo hidroxilo de un residuo de Tyr¹⁸⁴ o el grupo tiolato de un residuo de cisteína (Cys, C)²⁰². El sitio de coordinación restante puede quedar vacante para que la hemoproteína actúe como sensor, dar lugar a las propiedades catalíticas del hemo, o en caso de que el hemo sea el sustrato catalizar su degradación; o bien, puede ser coordinado por la cadena lateral de otro residuo axial, como en el caso de moléculas de hemo que participan de la cadena de transporte de electrones^{87,203}.

Al igual de lo que ocurre con el hierro, las bacterias patógenas pueden detectar hemo como una señal indicadora de que se encuentran dentro de un hospedero, desencadenando la regulación de sistemas involucrados en virulencia y patogénesis. Adicionalmente, las concentraciones de hemo intracelular deben estar estrictamente reguladas, ya que el hemo es necesario para la sobrevivencia de la bacteria; sin embargo, un exceso de hemo resulta en toxicidad. PefR (de "*porphyrin-regulated efflux regulator*") de *Streptococcus agalactiae* es una proteína citoplasmática homodimérica de 6 α -hélices y 2 láminas β que contienen un dominio de unión a ADN con un motivo hélice-vuelta-hélice para la asociación al ADN. La función fisiológica de PefR es análoga a la del regulador Fur: la forma apo de PefR es competente para asociarse al ADN, más precisamente, a promotores de genes que regulan la homeostasis y tolerancia de hemo, reprimiendo su expresión. Al aumentar la concentración de hemo intracelular, éste se une a los

sitios de unión de PefR gatillando cambios conformacionales que involucran una reorientación de los dominios de unión a ADN –opuesto a lo que ocurre con Fur, en donde la forma holo se asocia al ADN– e inducen la disociación de los promotores génicos, permitiendo la expresión de estos genes²⁰⁴. Mientras que Fur regula la expresión de genes involucrados en la adquisición de hierro, PefR regula la expresión de genes involucrados en el eflujo de hemo, como se describirá más adelante.

Las homeostasis del hierro y del hemo están estrechamente vinculadas; por ejemplo, la proteína citoplasmática Irr (de “*iron response regulator*”), presente en α -proteobacterias, es un regulador transcripcional homólogo a Fur que interacciona directamente con la PPIX-ferroquelatasa, y responde a hierro intracelular detectando el estado del hemo/PPIX, es decir, la porfirina unida a hierro o no. En presencia de hierro, la ferroquelatasa inactiva a Irr y ésta última es degradada de forma hemo-dependiente; en ausencia de hierro, la PPIX induce la disociación de la ferroquelatasa de Irr, permitiendo la regulación de la expresión génica mediada por ésta última^{205–207}. En este contexto Irr activa la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en adquisición de hierro, utilización de hemo y ciclo de Krebs, simultáneamente reprimiendo la expresión de genes codificantes para proteínas involucradas en biosíntesis de hemo, y utilización, almacenamiento y exportación de hierro¹⁰².

Por otro lado, existen sistemas de señalización bacterianos que detectan hemo extracelular. En la bacteria Gram-positiva *Corynebacterium* spp. se identificaron dos SDCs, ChrSA y HrrSA, que a partir de la detección de hemo extracelular por parte de las HQs ChrS y HrrS, sus RRs específicos ChrA y HrrA respectivamente son activados mediante fosforilación y en este contexto capaces de regular la expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de hemo. HrrA es un regulador global y dual que, al encenderse, estimula la expresión de genes codificantes para la hemo-oxigenasa (*hmuO*) y hemoproteínas, como citocromos; simultáneamente, HrrA activo reprime la expresión de genes codificantes para las enzimas biosintéticas de hemo^{151,208}. Por su parte, ChrA activado estimula la expresión de *hmuO* y sistemas de eflujo (*i. e.*, desintoxicación) de hemo (*hrt*, de “*heme-regulated transporter*”)²⁰⁹. En *C. diptheriae*, el sitio promotor de *hmuO* al que se une P~ChrA se solapa con el sitio al que se une DtxR, por lo que P~ChrA impide estéricamente la unión de DtxR al promotor²¹⁰. El SDC ChrSA se comunica de forma cruzada con

HrrSA estableciendo una red regulatoria de la homeostasis de hemo: se ha demostrado que ChrS y HrrS son capaces de fosforilar inespecíficamente a HrrA y ChrA, respectivamente, y que este *cross-talk* es esencial para la regulación de la cinética de la respuesta de utilización y desintoxicación de hemo intracelular^{209,211}. En contraste, la actividad fosfatasa de ChrS y HrrS es altamente específica para sus RRs específicos, por tanto, dicha actividad es importante para el control de la respuesta adaptativa²¹. En otras bacterias Gram-positivas como *S. aureus* y *Bacillus anthracis* se identificó el SDC HssSR, involucrado en el mantenimiento de la homeostasis de hemo intracelular: HssS es una HQ que es activada al detectar hemo, y subsecuentemente activa por fosforilación a su RR específico HssR, para estimular la expresión de genes codificantes del sistema de eflujo de hemo *hrtBA*^{212,213}. Similar a lo que ocurre con ChrSA y HrrSA en *Corynebacterium* spp., en *B. anthracis* se documentó que HssSR se comunica de forma cruzada con el SDC HitSR, involucrado en la detección y regulación de la respuesta al estrés sobre la envoltura celular; mediante esta red, *B. anthracis* es capaz de detectar el daño que ocasiona hemo sobre la envoltura celular²¹⁴. En la Gram-negativa *Porphyromonas gingivalis*, el SDC HaeSR es un sistema de señalización esencial que juega un rol importante en la homeostasis de hierro y hemo: la HQ HaeS es activada por hemo, subsecuentemente fosforilando al RR HaeR, quien de esta manera regula la expresión de genes asociados a la homeostasis de hierro y hemo, así como también algunos genes codificantes para factores de virulencia. P~HaeR puede actuar como activador o represor de la expresión génica, dependiendo del gen y de la concentración de hemo detectada²¹⁵.

Existen SDCs bacterianos que presentan dominios sensores capaces de unir hemo como cofactor para detección de gases diatómicos o para actuar como sensores redox. Por ejemplo, el sistema DosSTR de la bacteria Gram-positiva *Mycobacterium tuberculosis* es importante en la transformación de *M. tuberculosis* a su forma quiescente y no replicativa en su hospedero: las HQs DosS y DosT presentan un sitio de unión a hemo que es utilizado para actuar como sensores redox y de hipoxia, respectivamente, y sinérgicamente regulan la activación por fosforilación del RR DosR. Asimismo, la actividad de DosS y DosT puede ser modulada a través de los ligandos O₂, CO y óxido nítrico (NO)²¹⁶. DosS presenta actividad basal cuando su cofactor hemo se encuentra oxidado (*i. e.* Fe³⁺-hemo), es decir, en condiciones de abundancia de O₂, y presenta máxima

actividad al reducirse (*i. e.* Fe^{2+} -hemo), en condiciones de baja tensión de O_2 , pudiendo unir CO y NO para mantener a la HQ en su estado activo²¹⁷; por otra parte, DosT es un sensor de O_2 que se encuentra inactivo cuando su cofactor hemo se encuentra oxidado. Al disminuir las concentraciones de O_2 en el ambiente, el hemo es reducido y se pierde la interacción con O_2 , activando la HQ. La activación por fosforilación de DosR promueve la unión a promotores génicos que regulan la expresión de genes involucrados en dormancia^{216,218,219}. Otro ejemplo descrito recientemente es el de Aer2 de *Leptospira interrogans*, un quimiorreceptor no canónico de transmembrana que presenta un dominio periplásmico y tres dominios PAS citoplásmicos que unen hemo como cofactor, funcionando como sensores de O_2 ²²⁰.

Utilización y desintoxicación

El hemo solubiliza el hierro e incrementa sus propiedades catalíticas de 5 a 10 órdenes de magnitud, lo cual es aprovechado por proteínas de la maquinaria celular bacteriana que emplean hemo como cofactor para efectuar sus funciones enzimáticas^{221,222}. El hemo es cofactor de los citocromos, participando directamente de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria. Existen distintos complejos citocromo en la membrana citoplasmática bacteriana que unen distintos tipos de hemo, y éstos últimos a su vez forman parte de sitios de coordinación diferenciales que establecen una “rampa” redox a lo largo de la cadena, de modo que los electrones sean transferidos secuencialmente hasta el aceptor final. Esta transferencia secuencial está acoplada a un bombeo ortogonal de protones hacia el periplasma por parte de dichos complejos proteicos, estableciendo así un gradiente quimiosmótico que almacena energía potencial capaz de ser utilizada por ATP sintasas de la membrana bacteriana¹⁶⁹. Asimismo, hay enzimas denominadas mono-oxigenasas o di-oxigenasas, que emplean el hemo como cofactor para la catálisis de reacciones energéticamente costosas; por ejemplo, la enzima citosólica citocromo P450, que no forma parte de la cadena respiratoria sino de diversos procesos citoplasmáticos esenciales. Para ello, las enzimas citocromo P450 son capaces de generar un intermediario del hemo altamente reactivo denominado “compuesto I” (CpdI), en el cual el hierro es oxidado a un estado de valencia Fe^{4+} -oxo que actúa como potente oxidante para la catálisis de

decarboxilación, dealquilación, epoxidación e hidroxilación en el metabolismo de ácidos grasos^{223,224}. El hemo también es cofactor de enzimas encargadas de combatir el estrés oxidativo como catalasas y peroxidasas, que dependen de la formación del intermediario CpdI para la catálisis: las catalasas de hemo dismutan el H₂O₂ potencialmente dañino para la maquinaria bacteriana en H₂O y O₂; por su parte, las peroxidasas reducen el H₂O₂ a H₂O²²⁵.

Previamente se mencionó que el hemo es una fuente de almacenamiento de exceso de hierro intracelular. Efectivamente, las bacterias cuentan con enzimas denominadas hemo-oxigenasas, encargadas de catalizar la degradación o catabolismo de hemo para liberar Fe²⁺ al citosol. Las hemo-oxigenasas están conservadas a lo ancho de todos los Dominios de la vida con una alta conservación estructural²²⁶. Las hemo-oxigenasas juegan un rol protagónico en organismos aerobios, dado que su funcionamiento requiere de O₂. De cualquier manera, en organismos anaerobios también existen proteínas que catalizan la degradación de hemo²²⁷. Asimismo, para la degradación de hemo, la hemo-oxigenasa requiere de poder reductor, que generalmente lo obtienen del NADPH. A diferencia de lo que ocurre en mono-oxigenasas de hemo en donde el O₂ activa al hierro del hemo para la formación de un intermediario Fe⁴⁺-oxo, en hemo-oxigenasas el O₂ activa al hierro del hemo para la formación de un intermediario Fe³⁺-hidroperoxo para la auto-hidroxilación del α -meso-carbono del anillo porfirínico^{100,228–230}; *i. e.*, el oxígeno terminal del Fe³⁺-hidroperoxo ataca al α -meso-carbono. La diferencia radica en que en hemo-oxigenasas no hay un residuo con cadena lateral polar que estabiliza el O₂ en el sitio distal de coordinación del hemo, algo que sí ocurre en mono-oxigenasas²³¹. Por tanto, en hemo-oxigenasas el hemo es sustrato, mientras que en mono-oxigenasas el hemo es cofactor. Las sucesivas reacciones de oxidoreducción que ocurren en el sitio catalítico de la hemo-oxigenasa conllevan a la ruptura del hemo y la generación de los productos biliverdina, CO y Fe²⁺ libre (Figura 9). Éste último, queda disponible para la maquinaria bacteriana en el contexto de escasez de hierro. En algunos organismos, como cianobacterias, algas y plantas, la actividad hemo-oxigenasa es esencial para la biosíntesis de fitobilinas a partir de biliverdina²³². Por otro lado, en *Deinococcus radiodurans*, una bacteria extremófila, la biliverdina cumple el rol de cromóforo de fotorreceptores de fitocromos que pertenecen a SDCs²³³. Sin embargo, en la mayoría de las bacterias, la biliverdina no puede ser metabolizada por la ausencia de la enzima biliverdina-reductasa, y su rol no está

del todo claro; se cree que puede ser un producto de excreción, o bien, funcionar como molécula señalizadora o presentar un rol antioxidante¹⁸⁰.

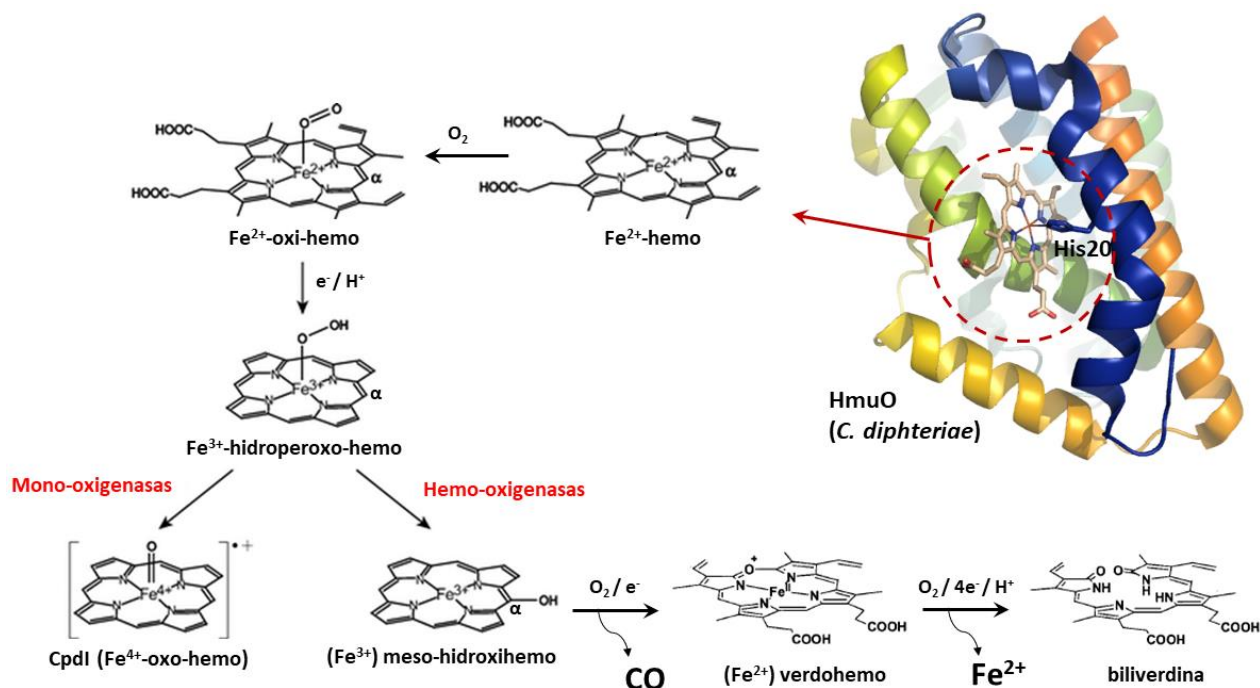


Figura 9. Resumen del catabolismo de hemo catalizado por hemo-oxigenasas. A fines comparativos, se muestra CpdI, intermediario formado por monooxigenasas de hemo con propiedades catalíticas de decarboxilación, hidroxilación, desaturación, entre otras. Adaptado de ^{228,234}. PDB ID: 1IW1. Figura diseñada mediante el *software* PyMol.

Al igual de lo que ocurre con el hierro, un exceso de hemo intracelular es tóxico para la bacteria. Los mecanismos por los cuales el hemo causa citotoxicidad no están del todo claros, aunque se cree que se vincula al estrés oxidativo¹⁸⁰; no obstante, tal como se mencionó previamente se han identificado sistemas de exportación de hemo en bacterias, cuya expresión génica es regulada en función de la detección de hemo extracelular o intracelular mediada por SDCs que forman redes complejas de transmisión de información. Estos sistemas se presentan como un mecanismo de tolerancia dado que exportan el hemo intracelular en exceso. En *Corynebacterium* spp., *B. anthracis*, *S. agalactiae* y *S. aureus* se identificaron ortólogos del sistema HrtAB, un complejo transportador que cuenta con un dominio ABC (HrtA) y una permeasa (HrtB) encargada de exportar hemo al medio extracelular a expensas de ATP^{180,209,213,235}. Por otra parte, en *S.*

agalactiae se identificó también un sistema de eflujo dual, PefAB/PefCD, controlado por el regulador PefR: mientras que el sistema PefAB está involucrada en la exportación de hemo, PefCD se encarga del eflujo de PPIX²³⁶.

Hierro y hemo en *Leptospira* spp.: el SDC HemKR

El género *Leptospira* (Figura 10; *lepto* = fino, *spira* = espiral) pertenece a un Filo de bacterias Gram-negativas denominado Espiroquetas. Las espiroquetas son bacterias alargadas y espiraladas, con características moleculares distintivas, tales como una delgada capa de peptidoglicanos en proximidad a la membrana citoplasmática²³⁷, y flagelos endoperiplásmicos^{238,239}. El rasgo más distintivo de las leptospiros respecto a las otras espiroquetas es la presencia de lipopolisacáridos y de una abundante riqueza de proteínas/lipoproteínas en la membrana celular externa²⁴⁰. Las leptospiros comprenden especies quimioorganótrofas aeróbicas con estilos de vida libre, denominadas saprófitas (*e. g.*, *Leptospira biflexa*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, etc.), y también patógenas (*e. g.*, *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. wolffii*, *L. licerasiae*, etc.)^{241–243}. Éstas últimas son agentes etiológicos de la leptospirosis, enfermedad que a nivel mundial afecta a 1 millón de personas y causa 60 mil muertes por año²⁴⁴. Las leptospiros patógenas suelen colonizar el hígado y los túbulo renales proximales de sus hospederos mamíferos (más comúnmente roedores) y son transmitidos a través de la orina excretada; la infección suele darse cuando el suelo o agua contaminada entra en contacto con mucosas o piel lastimada. Asimismo, las leptospiros patógenas pueden sobrevivir en el agua o suelo por varios meses²⁴⁵.

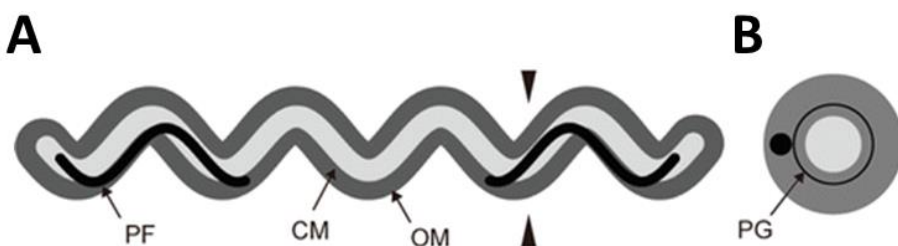


Figura 10. Representación (A) longitudinal y (B) transversal de la estructura de *Leptospira* spp. Las flechas negras indican el sitio esquematizado en (B). PF: flagelo periplásmico; CM: membrana citoplasmática; OM: membrana externa; PG: capa de peptidoglicano. Adaptado de ²⁴⁶.

Tanto leptospiras saprófitas como patógenas requieren de hierro y hemo para sobrevivir. A diferencia de las espiroquetas *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum*, agentes etiológicos de la enfermedad de Lyme y de la sífilis, respectivamente, las leptospiras cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para la biosíntesis de hemo, codificada en sus genomas²⁴⁷. También son capaces de adquirir hemo exógeno²⁴⁷, y se demostró que la enzima hemo-oxigenasa (de aquí en más, HmuO) es clave para la capacidad de la patógena *L. interrogans* para utilizar hemoglobina como fuente de hierro²⁴⁸. HmuO es un factor de virulencia de leptospiras patógenas, dado que cepas de *L. interrogans* con una mutación en el gen *hmuO* que interrumpe su actividad son menos virulentas que las cepas salvajes, en el modelo de infección en hámsters²⁴⁹. Recientemente se resolvió la estructura cristalográfica de HmuO de *L. interrogans*, contribuyendo a entender los mecanismos estructurales y moleculares de su función en estas bacterias²⁵⁰; previamente, se había comprobado que una ferredoxina-NADP⁺-reductasa provee el poder reductor necesario para la actividad enzimática catalizada por HmuO²⁵¹.

En estos últimos años se han realizado estudios microbiológicos y de transcriptómica que han contribuido a entender cómo las leptospiras adquieren y utilizan el hierro ambiental, ya sea a partir de hemo o de otras fuentes. Realizando mutagénesis al azar gracias al uso del transposón *Himar1* en la saprófita *L. biflexa*, se lograron identificar mutantes auxótrofos para hemina (*i. e.*, Fe³⁺-hemo), es decir, las bacterias mutantes no crecían a menos que el medio de cultivo fuera suplementado con hemina. En ese mismo estudio, se comprobó que *L. biflexa* es capaz de adquirir hierro ambiental a través del complejo transportador TonB-independiente FeoAB, y por otra parte, adquirir hierro a partir de citrato férrico a través del transportador TonB-dependiente FecA o del sideróforo deferroxamina¹⁰⁵. Cabe destacar que en el genoma de *Leptospira* no se han identificado genes que codifiquen enzimas para la biosíntesis de sideróforos, por lo que dependería de la adquisición exógena de los mismos^{252,253}. Estos estudios de transcriptómica contribuyeron a dilucidar los genes codificantes para sistemas de adquisición de diversas fuentes de hierro (Figura 11): *L. biflexa* y *L. interrogans* contienen 8 y 12 genes, respectivamente, cuyos productos presentan homología con receptores TonB-dependientes capaces de internalizar distintas fuentes de hierro como sales de hierro, complejos sideróforo:Fe, entre otras; asimismo,

tanto en *L. biflexa* como en *L. interrogans* se encontraron cinco genes codificantes para ExbB y ExbD putativas, y tres genes codificantes para TonB putativas, con organizaciones genéticas similares. Se identificaron también sistemas de adquisición de hemo con homología al sistema HmuSTUV, y sorprendentemente, se encontró un gen codificante para hemolisina incluso en leptospiros saprófitas, aunque éstas no codifican para enzimas que degraden tejidos, como sí lo hacen las esfingomielinasas que juegan un papel importante en la virulencia de leptospiros patógenas²⁵⁴. Finalmente, *Leptospira* presenta reguladores globales homólogos a Fur, Zur y PerR, involucrados en la homeostasis del hierro, estrés oxidativo y otros metales^{252–258}.

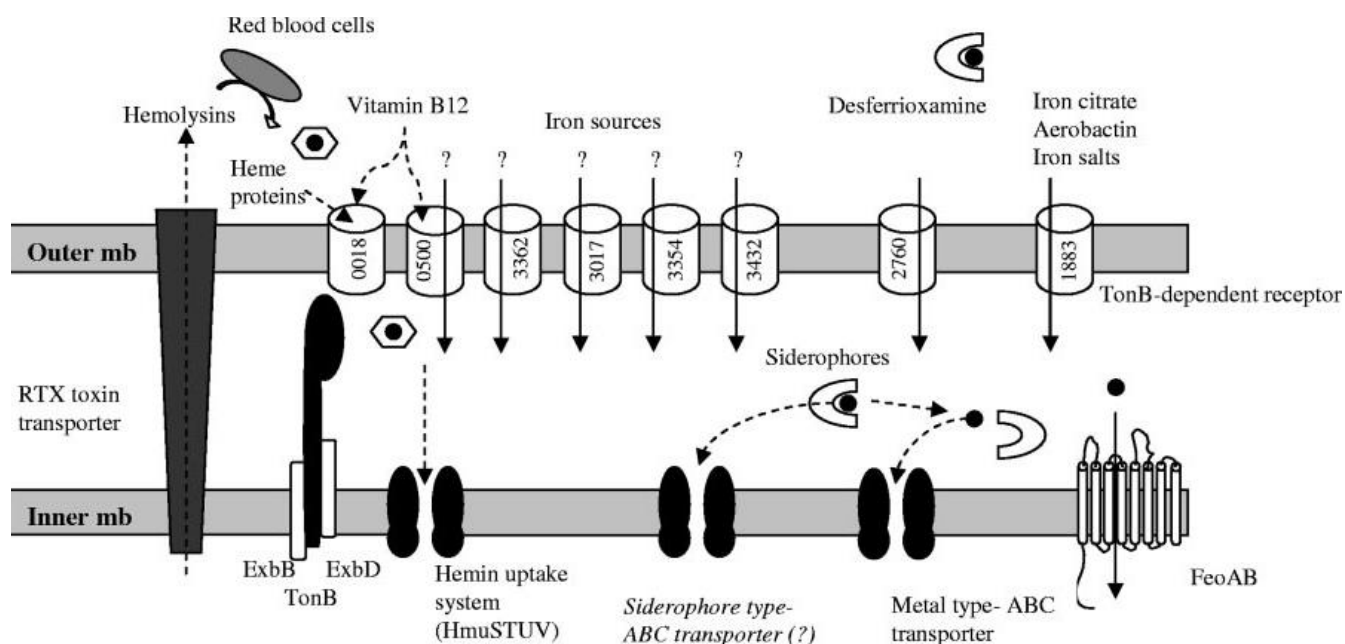


Figura 11. Resumen de sistemas de adquisición de hierro en *L. biflexa*. Se indica en el esquema el número de acceso de cada gen codificante (https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/mage/viewer.php?O_id=81). Fuente: ²⁵².

Como se mencionó anteriormente, estudios previos resultaron en la obtención de mutantes de *L. biflexa* auxótrofos para hemo. El análisis de uno de estos mutantes resultó en la identificación de una mutación que interrumpía el marco abierto de lectura de un SDC previamente denominado *hklep-rrlep*, actualmente denominado *hemK-hemR*, o *hemKR*, que conforman un par HQ-RR²⁵⁹. Louvel y colaboradores realizaron mutagénesis al azar de *L. biflexa* empleando el

elemento transponible *Himar1*, incluido en un plásmido suicida¹⁰⁵. Este transposón se inserta al azar en regiones genómicas con la secuencia dinucleotídica TA. Mediante este procedimiento fue posible identificar mutantes auxótrofos para 5ALA y hemina. El análisis del sitio de inserción de *Himar1* en el genoma indicó la interrupción de los marcos abiertos de lectura de los genes *hemK* y *hemR*; esto llevó a la hipótesis que el SDC HemKR juega un rol importante en la regulación del metabolismo de hemo. Es así que se decidió realizar mutagénesis dirigida para interrumpir el operón *hemKR*, insertando un *cassette* de resistencia a kanamicina en su lugar, generando el doble mutante *knockout*, *hemKR*⁻ (de aquí en más, denominado Δ *HemKR*)^{105,259,260}.

Más adelante, estudios realizados por nuestro laboratorio demostraron que HemR, un RR de ~26 kDa perteneciente a la familia OmpR/PhoB, se une a través de su dominio efector del tipo DBD (de “**DNA-Binding Domain**”) a los sitios promotores de los operones de biosíntesis de hemo (*hemACBLENG*) y de degradación de hemo (*hmuO*) tanto en *L. biflexa* como en la patógena *L. interrogans*²⁶¹. De hecho, en *L. interrogans*, el operón *hemKR* se encuentra codificado entre los genes *hemL* y *hemE*, por lo que en esta leptospira patógena *hemKR* es autorregulada. Esto no ocurre en la saprófita *L. biflexa*, donde *hemKR* pertenecen a un operón independiente, en donde también se encuentra un tercer gen de función desconocido, el cual hemos denominado *hemX*, ya que por cercanía (pudiendo conformar un operon) podría codificar para una proteína funcionalmente vinculada a HemKR²⁵⁹. Cabe recordar que HmuO es un factor de virulencia en *L. interrogans*, por lo que HemKR es en este contexto un sistema de señalización relevante y candidato al estudio de mecanismos moleculares de patogenicidad y virulencia. Tanto el operón *hemA* como el gen *hmuO* incluyen la secuencia consenso TGACA-N₆-TGACA en sus promotores, secuencia a la que se une HemR (aquí denominada “caja HemR”). Los resultados de regulación génica monitoreados experimentalmente²⁵⁸, así como la posición de la caja HemR en relación a los sitios -35 y -10 de los promotores de *hemA* y *hmuO*, llevó a proponer un modelo mecanístico en el cual HemR es un regulador dual de la expresión génica: esto quiere decir que P~HemR es un activador la expresión de genes codificantes para la biosíntesis de hemo, reclutando la ARN-polimerasa, y simultáneamente es un represor de la expresión de *hmuO*, la cual degrada hemo, impidiendo estéricamente la unión de la ARN-polimerasa al promotor. Asimismo, identificación

bioinformática de una caja HemR en el promotor del operón que codifica para ExbB1 y ExbD1, sugieren fuertemente que HemR podría tener un rol activador de dichos genes²⁶¹ (Figura 12).

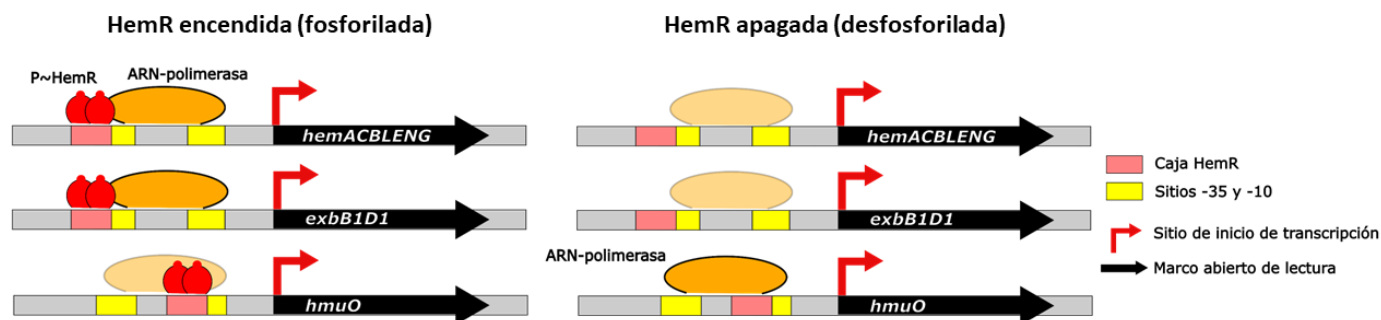


Figura 12. Modelo mecanístico de la regulación dual de la expresión génica ejercida por HemR. La posición de la "caja HemR" relativo a los sitios -35 y -10 de unión de la holo-ARN-polimerasa, parece determinar si P~HemR funciona como activador transcripcional (de *hemACBLENG* y *exbB1D1*) o represor transcripcional (de *hmuO*). El apagado de HemR induce su disociación de la caja HemR, permitiendo transcripción de *hmuO*. Figura diseñada mediante el *software* InkScape.

El nivel de fosforilación del RR HemR está determinado por la actividad de su par específico HemK, perteneciente a la familia HisKA de HQs. HemK es una HQ dimérica en donde cada monómero, de ~34 kDa, presenta dos α -hélices de transmembrana que se conectan por un corto bucle periplásmico de ~30 aminoácidos. En total, la región N-terminal que comprende dominios transmembrana y periplásmico contiene aproximadamente, 80 residuos. Hacia el C-terminal, HemK presenta un dominio DHp y un dominio ABD (Figura 13A). Previamente se demostró que P~HemK es capaz de transferir su grupo fosforilo desde su His conservada, His98, hacia el Asp conservado, Asp53, de HemR (Figura 13B). Si bien todos los ortólogos de HemK del género *Leptospira* spp. cuentan con la Thr conservada del motivo HxxxT encontrado en las HQs de la familia HisKA, importante para la actividad fosfatasa, hasta ahora no se había evaluado experimentalmente si HemK es una HQ bifuncional, es decir si es capaz, además de mantener la vía encendida a través de sus actividades autoquinasa/fosfotransferasa, de mantener la vía apagada a través de su actividad fosfatasa. Tampoco se conoce cuál es la señal (ambiental o

intracelular) detectada por HemK, que no tiene dominios sensores o de transmisión/transducción típicos. El corto bucle periplásmico y/o la propia región de transmembrana de HemK podrían actuar como sensor, o bien la detección podría involucrar a una tercera proteína que, mediante interacciones proteína:proteína, module la actividad de HemK. Un potencial candidato para actuar como sensor directo en este último escenario es HemX, quien alternativamente, podría ejercer también funciones no vinculadas a HemKR. Otro punto de interés que aún no se conoce tiene que ver con el mecanismo molecular que determinan la transmisión de la información entre HemK y su RR específico, HemR. Y, finalmente, se desconoce también cómo HemR efectúa la respuesta adaptativa a partir de dicha señal desconocida. La identificación de la señal, así como el estudio transcripcional y microbiológico utilizando $\Delta HemKR$, una cepa *knockout* de *hemKR*, contribuirá a dilucidar cómo HemKR regula el metabolismo de hemo y la homeostasis de hierro en *Leptospira*.

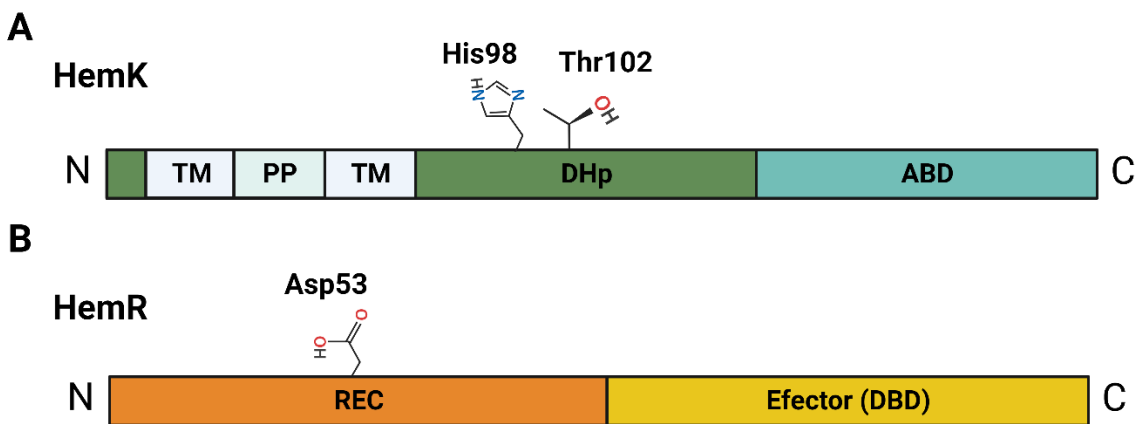


Figura 13. (A) Esquema de la estructura primaria de HemK. Se indican los dominios predichos como transmembrana (TM), periplásmico (PP), DHp -con la histidina conservada (His98) esencial para la actividad autoquinasa/fosfotransferasa y la treonina conservada (Thr102) importante para la actividad fosfatasa en la familia HisKA- y ABD. (B) Esquema de la estructura primaria de HemR. Se indican los dominios predichos como receptor (REC), con el aspartato conservado que recibe el grupo fosforilo, y dominio efector o DBD (de “DNA Binding Domain”). N: extremo N-terminal. C: extremo C-terminal.

HIPÓTESIS

El SDC HemKR es un regulador global del metabolismo de hemo, íntimamente ligado a la homeostasis del hierro. Hipotetizamos que candidatos a señal son:

- (1) Hierro libre: el hierro, un metal esencial para la supervivencia de *Leptospira*, en su estado libre es detectado -ya sea directa o indirectamente- por HemK: concentraciones elevadas de hierro resulta en el encendido de HemK (mediante su actividad autoquinasa) y subsecuente fosforilación de su RR específico HemR. Así, P~HemR activa la expresión de genes codificantes de enzimas biosintéticas de hemo para el almacenamiento de hierro en exceso; simultáneamente, P~HemR reprime la expresión del gen codificante para la hemo-oxigenasa, que degrada hemo. En contraste, la escasez de hierro resulta en el apagado del sistema HemKR, es decir, HemK desfosforila a HemR mediante su actividad fosfatasa, permitiendo la desrepresión y expresión génica de la hemo-oxigenasa, que degradará hemo para aumentar la cantidad de hierro libre intracelular disponible.
- (2) Hemo o intermediarios de hemo: a diferencia de lo que ocurre con hierro, la señal en este caso apaga la vía HemKR, ya que, si estos metabolitos se encuentran en abundancia, la inhibición de la biosíntesis evitaría mayor acumulación de hemo y permitiría conservar energía y glutamyl-ARNt celular. Al mismo tiempo, el sistema apagado induciría una mayor expresión de la hemo-oxigenasa para balancear la homeostasis del hemo. Si el hemo o intermediarios se encuentran en escasez, el encendido de la vía HemKR, podría activar la expresión génica de la vía biosintética de hemo, simultáneamente reprimiendo al gen de la hemo-oxigenasa.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la dilucidación de mecanismos moleculares de transducción de señales y transmisión de la información en bacterias, empleando como modelo de estudio el sistema de señalización HemKR de *Leptospira*. HemKR es un SDC importante en la regulación del metabolismo de hemo, e involucrado en la modulación de la virulencia en especies patógenas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Dilucidación de la(s) señal(es) que regula(n) el estado funcional de HemK, y evaluación de la regulación dual ejercida por HemR en *Leptospira* spp.
2. Producción, purificación y caracterización bioquímica de las proteínas recombinantes HemK, HemR y variantes.
3. Caracterización estructural preliminar de HemX, una proteína codificada en las proximidades del operón *hemKR* en *L. biflexa*.

ORGANISMO MODELO

Para responder a las interrogantes planteadas emplearemos el organismo modelo *L. biflexa*, una leptospira saprófita. Las razones por la cual elegimos este modelo son varias:

- 1) *L. biflexa* crece más rápidamente que leptospiros patógenos como *L. interrogans* (una semana vs. un mes de crecimiento de colonias en medio semi-sólido).
- 2) Si bien se han realizado estudios transcripcionales de la respuesta de una leptospira patógena a la escasez de hierro²⁵³, nuestro objetivo es analizar la relevancia de HemKR en la regulación de la homeostasis de hierro y hemo.
- 3) En nuestro laboratorio ya contamos con el *knockout* de *hemKR* en *L. biflexa*.
- 4) Las herramientas de genética y biología moleculares desarrolladas hasta la actualidad para *Leptospira* son más eficientes para su uso en las bacterias saprófitas que en las patógenas²⁶⁰.
- 5) La secuencia y organización genómica de la caja HemR en promotores génicos, son similares en leptospiros saprófitas y patógenos²⁶¹.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Curvas de crecimiento y barridos de absorbancia

Los cultivos a partir de *stocks* de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ congelados en DMSO 0,025 %, se largaron descongelando rápidamente éstos e inoculando 1 mL en 36 mL de medio de cultivo EMJH²⁶². Los subsiguientes pasajes en cultivos líquidos se crecieron en medio EMJH, inoculando 1/100 de un cultivo anterior. El medio EMJH se suplementó con 300 μ M 5ALA cuando se indica, y para cultivos *L. biflexa* $\Delta HemKR$, se agregó 50 μ g/mL kanamicina cuando se indica. En cualquier caso, se realizaron tres pasajes de cultivos de *L. biflexa* salvaje y de $\Delta HemKR$ previo al análisis de crecimiento. Para la determinación de curvas de crecimiento, se crecieron cultivos de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ en 30 mL de medio EMJH suplementado o no con 300 μ M 5ALA y, para $\Delta HemKR$, suplementado con 50 μ g/mL kanamicina cuando se indica. Todos los cultivos se crecieron a 30 °C sin agitación, y se midió densidad óptica a 420 nm (DO_{420}) en un espectrofotómetro Jenway 6320D tomando 1 mL de cultivo cada 24 h. Para la observación de las bacterias, contamos con un microscopio de campo oscuro Axioimager A2 (Carl Zeiss) en la Unidad Mixta Pasteur-INIA, con quien colaboramos a lo largo de todo este trabajo de Doctorado. Para los barridos de absorbancia de los sobrenadantes de cultivos de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ suplementados o no con 5ALA y crecidos sin agitación, se cosecharon las células a 3220 x g por 20 min al tercer (fase exponencial media), séptimo (fase exponencial tardía) y décimo (fase estacionaria) día de crecimiento. Es importante resaltar que, para los cultivos crecidos en agitación a 100 rpm, la fase estacionaria se alcanzó al tercer día. Luego de la cosecha, se tomó el sobrenadante de los cultivos, el cual se centrifugó a 18000 x g por 30 min. Finalmente, se transfirieron 200 μ L de los sobrenadantes así tratados a placas de 96 pocillos de fondo negro para realizar barridos de absorbancia abarcando longitudes de onda de 230 a 800 nm, y empleando un espectrofotómetro.

Para confirmar los genotipos de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$, se realizó extracción de ADN de los cultivos crecidos: para ello, se tomó 1 mL de los cultivos y se realizó extracción rápida de ADN mediante el siguiente protocolo: en primer lugar, se centrifugaron los cultivos a 21000 x g por 5 min a temperatura ambiente. Luego se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los

pellets bacterianos en 200 µL de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Las muestras así resuspendidas se congelaron a -20 °C por 10 min, para luego descongelar rápidamente e incubar dichas muestras a 99 °C por 3 min. Las muestras así tratadas se volvieron a congelar a -20 °C por 10 min, para luego volver a descongelar rápidamente. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 21000 x g por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de las muestras así tratadas contiene el ADN total de *L. biflexa*. Posteriormente, se realizó PCR de las muestras de ADN de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ empleando los oligonucleótidos F1, R1, F2, R2, F3, R3, F4 y R4 cuyas secuencias se detallan en la Tabla Suplementaria 1. Los reactivos y condiciones de la PCR se describen en las Tablas 1 y 2. Para confirmar los genotipos, los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1 % con el agente intercalante bromuro de etidio, y los amplicones se revelaron mediante transiluminación ultravioleta.

Tabla 1. Concentraciones de reactivos para PCR de confirmación de genotipos.

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final	Concentración stock
Agua	c.s.p. 50	-	-
Buffer HF	10	1x	5x
dNTP	1	200 µM	10 mM
Oligo Fw	1,25	0,5 µM	20 µM
Oligo Rev	1,25	0,5 µM	20 µM
ADN genómico	1	20 ng/50 µL PCR	variable
Phusion Pol	0,5	1 U/50 µL PCR	2 U/µL
TOTAL:	50		

Tabla 2. Condiciones de amplificación para PCR de confirmación de genotipos.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización cíclica	98	20 s	35
Hibridación	60	30 s	35
Elongación	72	20 s	35
Elongación final	72	5 min	1
Espera	4	infinito	1

Extracción de ARN para PCR en tiempo real y ARN-seq

Apuntando a identificar señales fisiológicas detectadas por HemKR mediante PCR en tiempo real, se utilizó el siguiente criterio: se analizó comparativamente la expresión génica de *hemA* y *hmuO* de *L. biflexa* salvaje vs Δ HemKR. Esperábamos que luego de los tratamientos con los candidatos a señal, la expresión génica de *hemA* y *hmuO* en *L. biflexa* salvaje cambiara relativo a los cultivos sin tratar. Paralelamente, de no observarse cambios en la expresión génica de *hemA* y *hmuO* en cultivos de *L. biflexa* Δ HemKR tratados, comparada a aquella de cultivos sin tratar en Δ HemKR, sugeriría que la señal es detectada -y la respuesta transcripcional es regulada- por HemKR.

Se crecieron cultivos de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR en 30 mL de medio EMJH, a 30 °C sin agitación hasta fase exponencial media de crecimiento (*i. e.*, $DO_{420} \sim 0,2 - 0,3$). En este punto, se incubó con las distintas candidatas a señales: 300 μ L 5ALA, 2 mM sulfato de hierro ($FeSO_4$) o 70 μ M 2,2'-dipiridilo (DIP). La incubación se llevó a cabo durante 3 h a 30 °C sin agitación. Luego, se cosecharon las bacterias a 5000 x g por 20 min a 4 °C. Los pellets bacterianos se resuspendieron en 1 mL de Trizol (Invitrogen), se vortexearon e incubaron a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se procedió a la extracción de ARN de los cultivos siguiendo el protocolo descrito anteriormente²⁶³. La extracción de ARN se realizó empleando agua destilada ultrapura libre de ARNasas y ADNasas (Invitrogen), tips con filtro, y limpiando rigurosamente pipetas y mesada con el surfactante *RNAse Away*® (Sigma-Aldrich). En todos los casos se analizó la calidad de la extracción de ARN mediante gel de agarosa, verificando la presencia e integridad de dos bandas correspondientes a las subunidades ribosómicas 16S y 23S. Para los extractos de ARN que fueron enviadas a la Plataforma de Biómica del Institut Pasteur París para la realización de ARN-Seq, la calidad de las muestras se analizó utilizando el equipo BioAnalyzer (Agilent). La concentración final de los extractos de ARN se determinó en el equipo *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific), y la síntesis de ADN copia (ADNc) se realizó con 0.5 – 1 μ g del ARN obtenido, y utilizando el kit “*iScript Reverse Transcriptase*” (BioRad), que incluye una mezcla de *random primers* y transcriptasa reversa, siguiendo el protocolo del fabricante. Para el cálculo de eficiencias de amplificación y el experimento de PCR en tiempo real, se utilizaron los oligonucleótidos *hemA_Fw*, *hemA_Rev*,

hmuO_Fw, hmuO_Rev, rpoB_Fw y rpoB_Rev cuyas secuencias nucleotídicas se detallan en la Tabla Suplementaria 1. El análisis de los Cq (*i. e.*, número de ciclo de PCR en el cual la curva de reacción de la muestra intersecta con una línea umbral arbitrariamente asignada) fue posible gracias al uso de la sonda fluorescente SYBR Green (FastStart Universal SYBR Green Master ROX, Roche). Los reactivos y condiciones empleados para la PCR en tiempo real se describen en las Tablas 3 y 4.

Tanto el cálculo de eficiencias de amplificación como los experimentos mediante PCR en tiempo real se realizaron incubando triplicados de 20 µL de las mezclas de ADNc de las distintas condiciones experimentales en placas de 96 pocillos de 0,1 mL (Applied Biosystems, Life Technologies). La reacción de PCR en tiempo real se realizó en un termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Thermo Scientific). La cuantificación relativa de la expresión génica de *hema* y *hmuO* se realizó empleando el método “Delta-Delta-Cq”, normalizando contra el gen *rpoB* elegido gen *housekeeping* de acuerdo con lo realizado por estudios anteriores²⁶¹. Los valores de expresión relativa se obtuvieron a partir de los datos obtenidos de Cq de *hema*, *hmuO* y *rpoB*, usando los softwares Microsoft Excel y GraphPad Prism.

Tabla 3. Concentraciones de reactivos para los experimentos de PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final	Concentración stock
Agua	7.5	-	-
SYBR Green Mix	10	1X	2X
Oligo Fw	0,25	0,1 µM	20 µM
Oligo Rev	0,25	0,1 µM	20 µM
ADNc	2	~1 µg/20 mL	~0,5 µg/mL
TOTAL:	20		

Tabla 4. Condiciones de amplificación de los experimentos de PCR en tiempo real.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos	Rampa (°C/s)
Desnaturalización inicial	95	15 min	1	1,6
Desnaturalización cíclica	95	15 s	40	1,6
Hibridación	60	1 min	40	1,6
Curva <i>melting</i> – paso 1	95	15 s	1	1,6
Curva <i>melting</i> – paso 2	60	1 min	1	1,6
Curva <i>melting</i> – disociación	95	15 s	1	0,1

Las curvas de *melting* obtenidas durante el paso final del experimento de PCR en tiempo real se utilizaron para verificar la amplificación de un único producto génico, lo cual fue acompañado por análisis mediante geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio, en donde se corrieron 5 µL de las mezclas de ADNc obtenidas al finalizar el experimento. Adicionalmente, se verificó que el promedio de los valores Cq de *rpoB* de todas las condiciones estudiadas presentaran un desvío estándar inferior a 1, indicativo de que el gen no presentara variaciones entre las condiciones tratadas con candidatos a señal, y los cultivos sin tratar. El procesamiento estadístico de los datos se realizó aplicando tests t no pareados mediante el *software* GraphPad Prism, y las diferencias estadísticamente significativas se asignaron a aquellas que presentaron p-valores menores a 0.05.

El experimento de ARN-seq realizado sobre las muestras de ARN extraídas como se describió arriba, y el posterior procesamiento de datos transcriptómicos, fue realizado por las Plataformas Tecnológica de Biómica y de Bioinformática y Bioestadística del Institut Pasteur París, y la estrategia se resume a continuación: los análisis bioinformáticos de transcriptomas y expresión génica diferencial se realizaron con el *software* Sequana²⁶⁴; específicamente, con el “RNA-seq pipeline” (v0.15.1) disponible en https://github.com/sequana/sequana_rnaseq, construido sobre el *framework* Snakemake²⁶⁵. Para preparar los datos, los *reads* se recortaron para secuencias adaptadoras y bases de baja calidad usando fastp v0.20.1²⁶⁶ y subsecuentemente se mapearon sobre el genoma de *Leptospira* empleando bowtie2²⁶⁷. La secuencia nucleotídica y la anotación fue descargada desde la plataforma MicroScope²⁶⁸ utilizando la entrada *Leptospira biflexa serovar Patoc* Patoc 1. La matriz de conteo fue generada mediante el *software* FeatureCounts 2.0.0²⁶⁹, que asignó *reads* a elementos relevantes basado en la anotación previamente mencionada. Para identificar genes diferencialmente regulados, el análisis estadístico se realizó mediante la librería DESeq2 1.30.0²⁷⁰, y los reportes HTML se generaron usando Sequana RNA-seq pipeline.

Las librerías de ARN-Seq se prepararon con 3 réplicas de cada condición, que satisficieron los estándares de calidad planteados (ver Figuras 31 y 32, y Tabla Suplementaria 3). Dichas librerías

se secuenciaron en una plataforma Illumina NextSeq2000, generando *single-end reads* con una lectura promedio de 107 pb. El número de *reads* fue de entre 12-20 M *reads* por muestra, con un promedio de *phred score* de 33. Los parámetros clave para el análisis estadístico abarcaron significancia, medida por p-valores ajustados de Benjamini-Hochberg con un umbral de *false discovery rate* (FDR) de menos de 0,05; así como también la amplitud de la respuesta, cuantificada en términos de *fold-change* (FC) para cada comparación: cabe resaltar aquí que, para el análisis de expresión génica diferencial, no sólo se tomó en cuenta aquellos genes con $\log_2FC \geq |1|$, sino también aquellos genes que no necesariamente cumplen con lo anterior pero sí presentaron diferencia significativa de p-valor ajustado²⁷¹; se sabe que cambios sutiles (*i. e.*, con $\log_2FC > 0$ y $< |1|$) pero significativos, pueden ser biológicamente relevantes²⁷².

Clonado de construcciones reporteras, conjugación en *L. biflexa* y ensayos de fluorescencia

El uso de genes reporteros ha sido una técnica extensivamente utilizada para analizar la actividad de promotores en *Leptospira*^{273–276}. Una de las herramientas más utilizadas ha sido el plásmido pRAT724²⁷⁷ (Figura 14), ingenierizado a partir de plásmidos capaces de ser transformados y de replicar en *Leptospira* spp.²⁷⁸. pRAT724 cuenta con el marco abierto de lectura de GFP (de “*Green Fluorescent Protein*”) insertado río abajo de una secuencia Shine-Dalgarno (SD), un sitio ingenierizado para incrementar su tasa de traducción (sitio ENH, de “*enhancer*”) de forma de incrementar la señal de fluorescencia a 528 nm a medir en los experimentos, y dos terminadores transcripcionales, rrnDt y T7t, flanqueando el extremo 5’ del sitio de inserción y el extremo 3’ del marco abierto de lectura de GFP, respectivamente. Río arriba del sitio ENH, se insertó mediante la técnica de clonado sin enzimas de restricción la región genómica de *L. biflexa* correspondiente al sitio promotor de *hemA*, o bien, al sitio promotor de *hmuO*, abarcando 200 pb río abajo y 3 pb río arriba de sus sitios de inicio de transcripción (teniendo en cuenta los resultados previamente obtenidos por Morero y colaboradores²⁶¹). Para el primer paso de amplificación exponencial de los *megaprimers*, se utilizaron los oligonucleótidos “rrnDt_PhemA_Fw” y “PhemA_GFPenh_Rev” para amplificar el sitio promotor de *hemA*, y los oligonucleótidos “rrnDt_PhmuO_Fw” y “PhmuO_GFPenh_Rev” para amplificar el sitio promotor de *hmuO*, utilizando como molde el ADN

genómico de *L. biflexa*. Las secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos se detallan en la Tabla Suplementaria 1. Las concentraciones de reactivos y condiciones del primer paso de amplificación exponencial se resumen en las Tablas 5 y 6. El producto de estas amplificaciones se corrió en gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio, y las bandas de los tamaños esperados se cortaron empleando un transiluminador ultravioleta. Los *megaprimers* así aislados se purificaron empleando el kit *Nucleospin® Gel and PCR Clean Up* (Macherey-Nagel) siguiendo el protocolo del fabricante. Los *megaprimers* purificados se insertaron en plásmidos pRAT724 en un segundo paso de hibridación y amplificación lineal (*primer extension*). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Veriti 96 Well* (Applied Biosystems). Las concentraciones de reactivos y condiciones del segundo paso de amplificación lineal se resumen en las Tablas 7 y 8. El plásmido parental sin la mutación se eliminó mediante el agregado de 1 μ L de DpnI (stock 20 U) e incubando a 37 °C por 1 h, seguido de un paso de inactivación de DpnI a 80 °C por 15 min. El producto de esta segunda amplificación se transformó en bacterias competentes *E. coli* $\pi 1^{279}$, junto con un control negativo que consistió en producto de PCR sin *megaprimer* incluido. Cabe agregar que esta cepa de *E. coli* es auxótrofa de timidina, por lo que los medios de cultivo líquidos y sólidos deben ser suplementados con 0,3 mM timidina. Dado que pRAT724 codifica para un *cassette* de resistencia a espectinomicina, se agregó 50 μ g/mL espectinomicina a los medios de cultivo para seleccionar los transformantes. Finalmente se realizó *miniprep* de las colonias transformantes crecidas en medio Luria-Bertani suplementado con timidina 0,3 mM y espectinomicina 50 μ g/mL, empleando el kit *Nucleospin® Plasmid* (Macherey-Nagel), y la presencia de ADN plasmídico fue verificada y cuantificada mediante el equipo *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific). La presencia de los insertos correspondientes a los sitios promotores de *hemA* o *hmuO* fue confirmada verificando digestión por las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (New England Biolabs): se incubaron 500 ng de plásmido con 1 U de las enzimas de restricción en buffer CutSmart 1X (New England Biolabs) durante 1 h a 37 °C. La reacción se detuvo incubando las muestras con buffer de sembrado, y se analizaron los perfiles de digestión a través de un gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio. Esperamos que el perfil de digestión observado coincidiera con el perfil esperado para las distintas construcciones. Aquellos vectores que cumplieran con esta condición se secuenciaron mediante secuenciación capilar (Unidad de

Biología Molecular, Institut Pasteur Montevideo) para efectivamente confirmar el clonado. De este modo, se confirmó la mutagénesis y se obtuvieron los plásmidos pRAT724_pHemA y pRAT724_pHmuO, que codifican el sitio promotor de *hemA* y *hmuO*, respectivamente, insertado río arriba del marco abierto de lectura de GFP (ver Figura 14).

Para su transformación en *L. biflexa* mediante conjugación, se siguió el protocolo descrito anteriormente²⁸⁰: en primer lugar se transformaron los plásmidos pRAT724, pRAT724_pHemA y pRAT724_pHmuO en la cepa ingenierizada de *E. coli* β 2163²⁷⁹ mediante electroporación. *E. coli* β 2163 es auxótrofa para ácido diaminopimélico (DAP), por lo que el crecimiento de las colonias transformadas se realizó en 4 mL de medio de cultivo Luria-Bertani suplementado con 50 μ g/mL

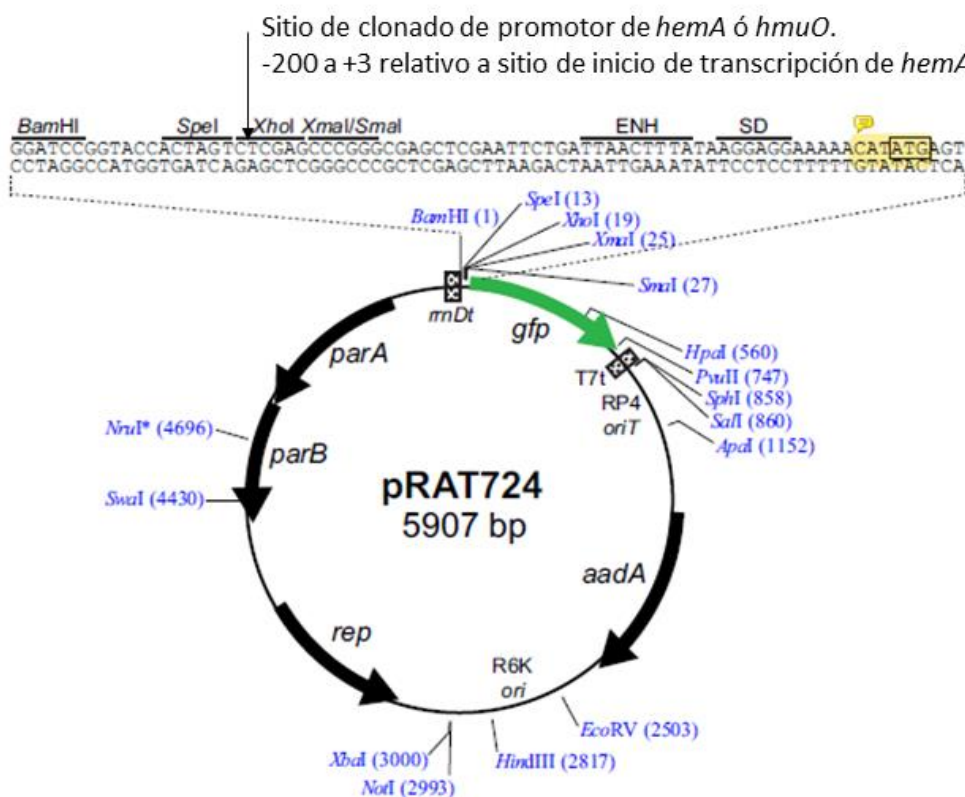


Figura 14. Representación esquemática del vector plasmídico pRAT724. En azul se indican algunos sitios de restricción. La flecha verde indica el marco abierto de lectura del reportero GFP, río arriba de un sitio de inserción ingenierizado para la optimización de la expresión génica en *Leptospira*. *aadA*: *cassette* de resistencia a espectinomicina; *rep*: gen codificante de proteína para iniciación de replicación del plásmido; *parA*, *parB*: genes codificantes de proteínas para partición del plásmido durante la replicación celular; *rrnDt*, *T7t*: terminadores de transcripción; *RP4 oriT*: origen de transferencia para conjugación; *R6K ori*: origen de replicación. Adaptado de ²⁷⁷.

Tabla 5. Concentraciones de reactivos para el primer paso de amplificación exponencial del *megaprimer*.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final	Concentración stock
Agua	c.s.p. 50	-	-
Buffer HF	10	1x	5x
dNTP	1	200 μM	10 mM
Oligo Fw	1,25	0,5 μM	20 μM
Oligo Rev	1,25	0,5 μM	20 μM
ADN genómico	variable	20 ng/50 μL PCR	variable
Phusion Pol	0,5	1 U/50 μL PCR	2 U/μL
TOTAL:	50		

Tabla 6. Condiciones de amplificación exponencial del *megaprimer*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización cíclica	98	20 s	35
Hibridación	58	30 s	35
Elongación	72	20 s	35
Elongación final	72	5 min	1
Espera	4	infinito	1

Tabla 7. Concentraciones de reactivos para el segundo paso de “*primer extension*”.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final	Concentración stock
Agua	c.s.p. 50	-	-
Buffer HF	10	1x	5x
dNTP	1	200 μM	10 mM
<i>Megaprimer</i>	variable	200 ng/50 μL PCR	variable
pRAT724	variable	40 ng/50 μL PCR	variable
Phusion Pol	0,5	1 U/50 μL PCR	2 U/μL
TOTAL:	50		

Tabla 8. Condiciones de amplificación lineal o “*primer extension*”.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización cíclica	98	20 s	30
Hibridación	54	30 s	30
Elongación	72	5 min	30
Elongación final	72	10 min	1
Espera	4	infinite	1

espectinomicina y 0,3 mM DAP por 14 h a 37 °C con agitación. Luego, se inocularon 1/50 de estos precultivos en medio EMJH suplementado con 0,3 mM DAP, sin antibiótico, y se crecieron a 37 °C hasta fase exponencial media de crecimiento. Paralelamente, se crecieron cultivos de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ en medio EMJH a 30 °C sin agitación, hasta fase exponencial media de crecimiento. La conjugación se indujo inoculando 1 volumen de cultivo de transformantes de *E. coli* $\beta 2163$ (bacteria dadora) con 9 volúmenes de cultivo de *L. biflexa* salvaje o $\Delta HemKR$ (bacteria aceptora) sobre un filtro de 0,1 μm , aplicando vacío para concentrar las bacterias sobre el filtro (Figura 15).

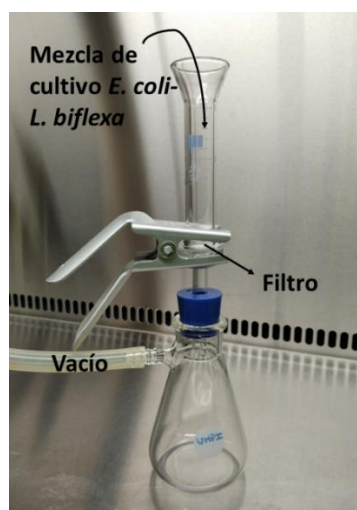


Figura 15. Dispositivo para la conjugación bacteriana. La conjugación ocurre sobre el filtro de 0,1 μm al cual se le aplica vacío para circular el medio de cultivo hacia el matraz y concentrar las bacterias dadoras yceptoras sobre el filtro.

Los filtros se colocaron boca arriba sobre una placa de Petri con medio EMJH-agar suplementada con 0,3 mM DAP, sin antibiótico, y se incubaron a 30 °C por 14 h. Posteriormente, los filtros se depositaron y rasparon con un *tip* en tubos Falcon con 1 mL de medio EMJH; en este punto es posible observar *ipso facto* la conjugación entre *E. coli* $\beta 2163$ y *L. biflexa* al microscopio de campo oscuro (magnificación 40X). Finalmente se plaquearon 100 μL de medio con conjugantes en placas de Petri con medio EMJH-agar con 50 $\mu g/mL$ espectinomicina (para seleccionar conjugantes de *L. biflexa*) y sin DAP (para contraseleccionar transformantes de *E. coli* $\beta 2163$), y

se incubaron a 30 °C durante 7-14 días. Las colonias obtenidas fueron posteriormente crecidas en 9 mL de medio EMJH con 50 µg/mL espectinomicina a 30 °C con agitación; luego, se realizó extracción de ADN empleando el equipo *Automated nucleic acid extraction system Maxwell® 16* (Promega) y se confirmó la presencia del plásmido pRAT724, pRAT724_pHemA o pRAT724_pHmuO mediante PCR, empleando los oligonucleótidos pRAT_Fw y pRAT_Rev, que flanquean el sitio de inserción y el marco abierto de lectura de GFP en pRAT724, y cuyas secuencias se detallan en la Tabla Suplementaria 1. Los reactivos y condiciones de la PCR se describen en las Tablas 5 y 6.

Los análisis de fluorescencia emitida por GFP se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente²⁷⁷: los conjugantes de *L. biflexa* salvaje o $\Delta HemKR$ con pRAT724, pRAT724_pHemA o pRAT724_pHmuO se crecieron en medio EMJH con 50 µg/mL espectinomicina a 30 °C, sin agitación, hasta fase exponencial media de crecimiento. En este punto, alícuotas de 800 µL de los cultivos se sometieron a centrifugación a 9000g por 5 min a 4 °C para cosechar las bacterias. Se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 1 mL de buffer fosfato salino (PBS). Los cultivos remanentes se trataron con 2 mM FeSO₄ a 30 °C, y se tomaron alícuotas a tiempos 0.5, 1, 2 y 3 h al igual que las alícuotas de cultivos sin tratar con FeSO₄. Luego, se transfirieron 200 µL de las bacterias resuspendidas en PBS a una placa oscura *Costar* de 96 pocillos (Thermo Scientific), y se midió la fluorescencia emitida a 528 nm (excitación a 485 nm) en un espectrofluorímetro *Mithras LB940 Microplate Reader* (Berthold Technologies). La señal de fluorescencia obtenida para los conjugantes con pRAT724_pHemA y pRAT724_pHmuO se substrajo a la señal de fluorescencia obtenida para los conjugantes con pRAT724. Los datos obtenidos se procesaron mediante los *softwares* Microsoft Excel y GraphPad Prism.

Clonado de plásmidos de complementación para conjugación en *L. biflexa* $\Delta HemKR$

Para complementar el mutante *hemKR*⁻ de *L. biflexa*, se amplificó el alelo salvaje *hemKR* junto a su región promotora (*i. e.*, 349 pb río arriba del codón de inicio de *hemK*) a partir de ADN genómico de *L. biflexa* salvaje, empleando los oligos HemR_pMAORI_Fw, HemR_pMAORI_Rev, HemK_pMAORI_Fw, HemK_pMAORI_Rev P_{hemKR}_pMAORI_Fw y P_{hemKR}_pMAORI_Rev (ver Tabla

Suplementaria 1). Asimismo, se realizó mutagénesis sitio-dirigida para generar un mutante *hemKThr102Ala* (T102A) empleando los oligos HemK_{T102A}_Fw y HemK1_Rev (ver Tabla Suplementaria 1) e insertados en el vector pMAORI²⁷⁸ mediante clonado sin enzimas de restricción²⁸¹. Los constructos de pMAORI positivos (pMAORI-*hemKR* y pMAORI-*hemK_{T102A}R*) fueron confirmados por perfiles de digestión empleando las enzimas BamHI/EcoRI, y posteriormente mediante secuenciación capilar (Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur Montevideo). Finalmente, pMAORI-*hemKR* y pMAORI-*hemK_{T102A}R* se transformaron en *E. coli* π 1 y β 2163, para el mantenimiento del vector y los subsecuentes experimentos de conjugación en *L. biflexa* Δ HemKR, respectivamente.

PhosTag-SDS-PAGE + Western blot anti-HemR

Para el análisis directo del estado de fosforilación de HemR en cultivos de *L. biflexa* salvaje, se empleó la técnica PhosTag-SDS-PAGE + Western blot anti-HemR: la técnica consiste en sembrar la fracción soluble de extractos de *L. biflexa* en geles PhosTag-SDS-PAGE, para luego realizar transferencia a membrana de nitrocelulosa, e incubar con anticuerpos policlonales específicos para HemR (α HemR) que permitirán la observación de tanto la fracción fosforilada como no fosforilada de HemR. Contamos con un antisuero policlonal anti-HemR (α HemR) de conejo, gracias al servicio del Polo Tecnológico de Pando (a quien nuestro laboratorio proveyó de HemR recombinante purificada para usar como antígeno inmunógeno, siguiendo un protocolo estándar de inmunización intramuscular de conejos²⁸², con adyuvante de Freund completo en la primera inmunización, e incompleto en los dos *boosters* subsecuentes). El PhosTag-SDS-PAGE consiste en una variante del SDS-PAGE convencional que permite observar la fracción fosforilada de las proteínas agregando en la preparación del gel el compuesto PhosTag²⁸³ (Wako) que en presencia de un metal divalente, *e. g.*, Zn²⁺ o Mn²⁺, se une al grupo fosforilo de la proteína desnaturalizada. El PhosTag copolimerizado produce un retardo en la migración de la proteína fosforilada respecto a la fracción no fosforilada, lo cual permite identificar la fosforilación de una proteína dada y analizar el porcentaje de proteína fosforilada en un ensayo de fosforilación (Figura 16).

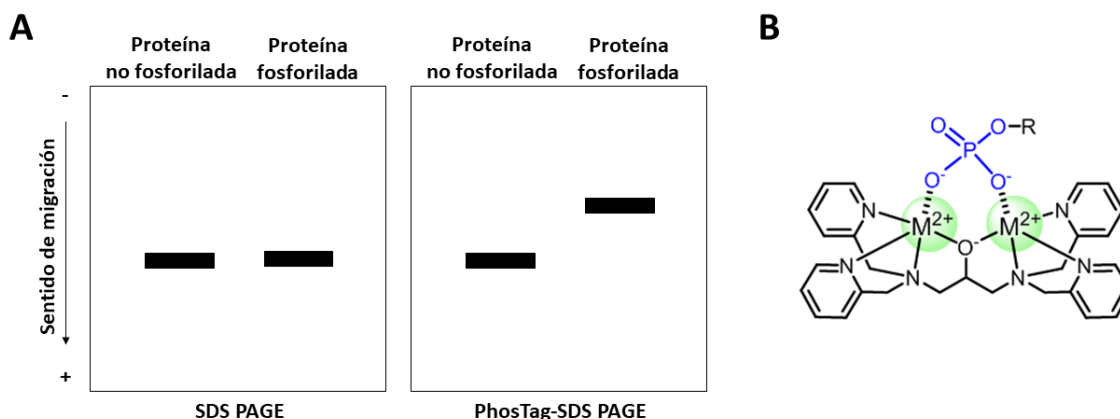


Figura 16. (A) Fundamento de la técnica PhosTag-SDS-PAGE. La adición de PhosTag al gel de poliacrilamida permite distinguir la fracción de proteína fosforilada respecto a no fosforilada, debido a que los grupos fosforilos interaccionan con el PhosTag retardando su migración en el gel. (B) Esquema de la estructura de la molécula PhosTag. En verde se indican los metales divalentes; en azul se indica el grupo fosforilo.

Para la evaluación mediante PhosTag-SDS-PAGE + Western blot α HemR se largaron cultivos de *L. biflexa* salvaje en 30 mL de medio EMJH sin hierro, crecidos a 30 °C sin agitación hasta fase exponencial media de crecimiento. En este punto se estableció el tiempo $t = 0$, tomando alícuotas de 6 mL de cultivos, representativo de la muestra sin tratar. Luego, se incubaron los cultivos con 2 mM FeSO_4 preparado en el momento y en oscuridad, y se tomaron alícuotas de 6 mL de los cultivos a tiempos $t = 1, 2$ y 3 h. Las alícuotas se centrifugaron a 10000 x g por 10 min a 4 °C, y se procedió a realizar la lisis mediante el kit *BugBuster plus Lysonase* (Milipore) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Dicho kit es de gran utilidad para el análisis de fosforilación de RR^{s284}: este tratamiento permite una lisis celular muy rápida, minimizando la desfosforilación espontánea del RR durante el procedimiento. Los extractos solubles de cultivos de *L. biflexa* así obtenidos, se resuspendieron en buffer de sembrado 1X (*stock* 5x compuesto por dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%, glicerol 50%, Tris.HCl 0,3 M y azul de bromofenol 0.05%) con 25 mM DTT, y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Luego, las muestras se incubaron con 50 mM iodoacetamida (IAA) por 10 min adicionales, también a temperatura ambiente. Finalmente se sembraron 15 μL de cada muestra en un SDS-PAGE (12% acrilamida) con 100 μM PhosTag y 200 μM ZnCl_2 . En todos los geles se incluyó un marcador preteñido de peso molecular (Thermo

Scientific), para verificar posteriormente que las transferencias a membrana fueran exitosas. Los geles se corrieron en frío ($< 10^{\circ}\text{C}$) a 180 V por 2 h 15 min. Al finalizar la corrida, se eliminó el PhosTag y ZnCl_2 de los geles realizando un lavado con 2 mM EDTA en solución de transferencia compuesto de 10% buffer de transferencia (250 mM Tris, 1,9 M glicina, 1% SDS) y 10% etanol, por 10 minutos con agitación leve, seguido de un segundo lavado en solución de transferencia por 10 minutos adicionales con agitación leve.

La transferencia a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en inglés, Amersham Hybond™-P, GE Healthcare) se realizó en una cuba *Mighty Small Transphor* (Amersham Biosciences) a 50 mA, a 4°C por 14 h, en solución de transferencia. Las membranas de PVDF se bloquearon empleando una solución de PBS-Tween 0,1 % con albúmina bovina sérica (Merck Milipore) 3% m/v, con agitación leve durante 3,5 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron las membranas con diluciones 1/100 del anticuerpo primario, αHemR , con agitación leve durante 2 h a temperatura ambiente. Para eliminar los anticuerpos no unidos a las membranas, se realizó un posterior lavado en PBS-Tween 0,1 % durante 15 minutos con agitación fuerte (330 rpm). Este paso se repitió tres veces. El anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (*i. e.*, reconociendo la región Fc de αHemR ; Santa Cruz Biotechnology) se incubó en una dilución de 1/20000 en PBS-Tween 0,1 %, con agitación leve durante 1,5 h a temperatura ambiente. Para eliminar los anticuerpos secundarios no unidos, se realizó un posterior lavado en PBS-Tween 0,1 % durante 15 min con agitación fuerte (330 rpm). Los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados a la peroxidasa HRP; para revelar la presencia de anticuerpo unido a la membrana mediante quimioluminiscencia, se incubaron las mismas con una solución de peróxido y luminol (*SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate*, Thermo Scientific) por 5 min a temperatura ambiente. El revelado se realizó mediante el equipo ImageQuant800 (GE Healthcare), exponiendo quimioluminiscencia por 30 s – 1 min. Para la cuantificación del porcentaje de HemR fosforilada relativo al total, las imágenes así obtenidas se procesaron mediante densitometría, empleando el software ImageJ Fiji. Los datos de cuantificación se procesaron mediante los *softwares* Microsoft Excel y GraphPad Prism.

Mutagénesis, expresión y purificación de proteínas recombinantes

Variantes de HemK y HemR recombinantes

Contamos con el marco abierto de lectura codificante de HemK Δ_{80} , un mutante de HemK que consiste en su región soluble citoplásmica, sin su dominio periplásmico y transmembrana, clonado en un vector de expresión pQE80L (Qiagen, pQE80L_HemK Δ_{80}) bajo el control transcripcional de un promotor *T5lac* inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). El inserto codifica una etiqueta de histidinas N-terminal (6xHisTag) para realizar purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ni²⁺) inmovilizado (IMAC, “*Immobilized Metal Affinity Chromatography*”), seguido de una secuencia de corte con proteasa TEV para el clivaje del 6xHisTag posterior al primer paso cromatográfico (Figura 17).

**MRGSHHHHHGSGSENLYFQSGSRDHKRSKLIADFFSTVTHEMKTPIASLQLQIEVLLEATTNPELKRKLE
KIWKENQRIESQMGNAFYLASLMQGESLYLETLSLQELKESYSHHEPDLIWDVSIPLQKKVHLDRKAFFAM
LKNLTDNAKRHGKANQIKLSIFQVKNQICFLEDNGSGFQGNKKHLTLPFLRHSKTSGSGIGLYIVKKLMEK
MKGKLEFPNSSYGFQVKLSLNEVT**

Peso molecular teórico* = 25,0 kDa

Punto isoeléctrico teórico* = 9,5

Coefficiente de extinción teórico* = 18450 M⁻¹ cm⁻¹

Figura 17. Secuencia aminoacídica de HemK Δ_{80} recombinante. Se muestra en violeta el 6xHisTag y en rojo la secuencia de corte con TEV. *: parámetros sin considerar 6xHisTag ni secuencia de corte con TEV.

Apuntando a obtener una variante de HemK constitutivamente activa, es decir, sin actividad fosfatasa, se realizó mutagénesis del residuo de Thr102 (ó T102). Para sustituir la Thr102 se realizó mutagénesis sitio-dirigida por alanina (Ala, A) sobre HemK Δ_{80} (apuntando a generar la construcción HemK Δ_{80} ,T102A) mediante la técnica de clonado sin enzimas de restricción (*Restriction-Free Cloning*)^{281,285}. Para el primer paso de amplificación exponencial del “*megaprimer*” se utilizaron los cebadores “HemK_T102A_Fw” y “HemK_Rev”, descritos en la Tabla Suplementaria 1. Las concentraciones de reactivos y condiciones de amplificación

exponencial del *megaprimer* se resumen en las Tablas 9 y 10. El producto de esta amplificación se corrió en gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio, y la banda de tamaño esperado se cortó empleando un transiluminador ultravioleta. El *megaprimer* así aislado se purificó a partir del gel de agarosa empleando el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up* (Macherey-Nagel) siguiendo el protocolo del fabricante. De esta forma, el *megaprimer* obtenido incluye la mutación T102A, lo que permitió obtener el plásmido pQE80L_HemK_{Δ80,T102A}, por “*primer extension*” en un segundo paso de hibridación y amplificación lineal. Todas las PCRs se realizaron en un termociclador *Veriti 96 Well* (Applied Biosystems). Las concentraciones de reactivos y condiciones de amplificación lineal se resumen en las Tablas 11 y 12.

El plásmido parental sin la mutación se eliminó mediante el agregado de 1 µL de DpnI (New England Biolabs; stock 20 U) e incubación a 37 °C por 1 h, seguido de un paso de inactivación de DpnI a 80 °C por 15 min. El producto de esta segunda amplificación se transformó en bacterias competentes *E. coli* DH5α, junto con un control negativo que consistió en producto de PCR sin *megaprimer* incluido. Finalmente se realizó *miniprep* (*i. e.*, extracción del ADN plasmídico) de las colonias transformantes empleando el kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel), y la presencia de ADN plasmídico fue verificada y cuantificada mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific). La mutagénesis fue confirmada por secuenciación capilar (Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur Montevideo). La secuencia aminoacídica de HemK_{Δ80,T102A} recombinante se muestra en la Figura 18.

**MRGSHHHHHHSGSGENLYFQSGSRDHKRSKLIADFFSTVTHEMKAPIASLQLQIEVLLEATTNPELKRKL
EKIWKENQRIESQMGNAYLASLMQGESLYLETLSLQELKESYSHHEPDLIWDVSIPLQKKVHLDRKAFFA
MLKNLTDNAKRHGKANQIKLSIFQVKNQICFLEDNGSGFQGNKKHLTLPFLRHSKTSGSGIGLYIVKKLME
KMKGKLEFPNSSYGFQVKLSLNEVT**

Peso molecular teórico* = 25,0 kDa

Punto isoeléctrico teórico* = 9,5

Coeficiente de extinción teórico* = 18450 M⁻¹ cm⁻¹

Figura 18. Marco abierto de lectura de HemK_{Δ80,T102A} recombinante. Se indica en verde subrayado el residuo de alanina que sustituye a la treonina conservada, importante para la actividad fosfatasa; en violeta el 6xHisTag, y en rojo la secuencia de corte con TEV. *: parámetros sin considerar 6xHisTag ni secuencia de corte con TEV.

Tabla 9. Concentraciones de reactivos para el primer paso de amplificación exponencial del *megaprimer*.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final	Concentración stock
Agua	c.s.p. 50	-	-
Buffer HF	10	1x	5x
dNTP	1	200 μM	10 mM
Oligo Fw	1,25	0,5 μM	20 μM
Oligo Rev	1,25	0,5 μM	20 μM
pQE80L_HemK _{Δ80}	variable	20 ng/50 μL PCR	variable
Phusion Pol	0,5	1 U/50 μL PCR	2 U/μL
TOTAL:	50		

Tabla 10. Condiciones de amplificación exponencial del *megaprimer*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización cíclica	98	10 s	35
Hibridación	61	30 s	35
Elongación	72	20 s	35
Elongación final	72	5 min	1
Espera	4	infinito	1

Tabla 11. Concentraciones de reactivos para el segundo paso de “*primer extension*”.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final	Concentración stock
Agua	c.s.p. 50	-	-
Buffer HF	10	1x	5x
dNTP	1	200 μM	10 mM
<i>Megaprimer</i>	variable	200 ng/50 μL PCR	variable
pQE80L_HemK _{Δ80}	variable	40 ng/50 μL PCR	variable
Phusion Pol	0,5	1 U/50 μL PCR	2 U/μL
TOTAL:	50		

Tabla 12. Condiciones de amplificación lineal o “*primer extension*”.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	95	30 s	1
Desnaturalización cíclica	95	30 s	35
Hibridación	54	1 min	35
Elongación	72	5 min	35
Elongación final	72	8 min	1
Espera	4	infinite	1

Por otra parte, contamos con el marco abierto de lectura codificante de HemR clonado en un vector de expresión pQE80L (pQE80L_HemR) (Figura 19), y el marco abierto de lectura codificante de una variante de HemR que consta únicamente de su dominio REC clonado en un vector de expresión pQE80L (pQE80L_HemR_{REC}) (Figura 20). Las secuencias codifican un 6xHisTag N-terminal para realizar purificación mediante IMAC, seguidos de una secuencia de corte con proteasa TEV para el clivaje del 6xHisTag posterior a la purificación.

**MRGSHHHHHHGSSEENLYFQGS GSMKPRILLVEDDEGLGETLKERLEQDKYRVEWAKTISEAENLYRPNA
FDLVVLDLRLPDGNGFDLAEMIVKKEKDLPFLFLTAQAGAQRRLRGFELGAAEFIPKPFHLKEFLIRLERSISL
TRPHYGQKWKMDTKEIHLDSFLIKNEDGTSTLLSKRDCSLLALLTDPKVF SRSEILDFIVGEDSFPTERTID
NAIVRLRDALGEGSIRNVRGVGYQWIGPLQPLV**

Peso molecular teórico* = 26,2 kDa

Punto isoeléctrico teórico* = 5,3

Coeficiente de extinción teórico* = 22460 M⁻¹ cm⁻¹

Figura 19. Marco abierto de lectura de HemR recombinante. Se muestra en violeta el 6xHisTag y en rojo la secuencia de corte con TEV. *: parámetros sin considerar 6xHisTag ni secuencia de corte con TEV.

**MRGSHHHHHHGSSEENLYFQGS GSMKPRILLVEDDEGLGETLKERLEQDKYRVEWAKTISEAENLYRPNA
FDLVVLDLRLPDGNGFDLAEMIVKKEKDLPFLFLTAQAGAQRRLRGFELGAAEFIPKPFHLKEFLIRLERSISL
TRPHY**

Peso molecular teórico* = 14,8 kDa

Punto isoeléctrico teórico* = 5,3

Coeficiente de extinción teórico* = 9970 M⁻¹ cm⁻¹

Figura 20. Marco abierto de lectura de HemR_{REC} recombinante. Se muestra en violeta el 6xHisTag y en rojo la secuencia de corte con TEV. *: parámetros sin considerar 6xHisTag ni secuencia de corte con TEV.

Se realizó la expresión de HemK_{Δ80} y HemK_{Δ80,T102A} de forma recombinante empleando la cepa RossettaGammi (DE3) de *E. coli* previamente transformada con el plásmido pQE80L_HemK_{Δ80} o

pQE80L_HemK Δ 80_T102A. Los transformantes de pQE80L_HemK Δ 80 o pQE80L_HemK Δ 80,T102A se seleccionaron con 100 μ g/mL ampicilina. Se crecieron 2-4 L de cultivo inoculados 1/100 con pre-cultivos de transformantes y en fase exponencial media ($DO_{600} \sim 0,6$) se inoculó 1 mM IPTG, para realizar la inducción de la expresión de HemK Δ 80 o HemK Δ 80,T102A recombinantes a 30 °C por 6 h, con agitación. La expresión de HemR o HemR_{REC} se realizó utilizando la cepa TOP10F' de *E. coli* previamente transformada con el plásmido pQE80L_HemR o pQE80L_HemR_{REC}. Los transformantes se seleccionaron con 100 μ g/mL ampicilina. Se crecieron 2-4 L de cultivo inoculados 1/100 con pre-cultivos de transformantes y en fase exponencial media ($DO_{600} \sim 0,6$) se inoculó 1 mM IPTG, para realizar la inducción de la expresión de HemR o HemR_{REC} recombinantes a 37 °C por 3 h, con agitación. Posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000 x g por 20 min a 4 °C, y se resuspendieron en buffer 50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl con un cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA (Roche) a razón de 5 mL de buffer cada 1 g de pellet seco. Para el paso de lisis celular se incubaron las bacterias así resuspendidas con 1 mg/mL lisozima por 30 min a temperatura ambiente, y se congelaron a -80 °C hasta su uso. Al día siguiente las bacterias se descongelaron lentamente y se chequeó la viscosidad de las muestras debido a la presencia de ácidos nucleicos bacterianos, indicativo de que la lisis fue exitosa. Luego, se trataron los extractos en un *Emulsiflex* realizando 3 ciclos de homogeneización a 1000 bar a 4 °C cada uno, y se incubó con 10 μ g/mL ADNasa por 1 h a temperatura ambiente. Para el paso de fraccionamiento, los extractos se centrifugaron a 30000 x g por 30 min a 4 °C, y el sobrenadante (*i. e.*, fracción soluble) fue tratado con 20, 40 ó 120 mM imidazol, dependiendo de la composición del buffer de lavado usado para cada proteína recombinante en la posterior cromatografía de afinidad.

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó en dos pasos sucesivos: el primer paso consistió en una IMAC usando columnas *HisTrap* (GE Healthcare). Cada fracción soluble de los extractos bacterianos se pasó por una columna IMAC de Ni²⁺ de 1 ó 5 mL en el equipo *AKTA Express* (GE Healthcare) empleando buffer de lavado 50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl y 20 mM imidazol (para HemR y HemR_{REC}; las condiciones de purificación de estas proteínas se basaron en las descritas previamente para la producción y purificación del dominio REC de HemR²⁶¹, con la excepción de que se empleó Tris pH 8 para la cromatografía de afinidad a níquel inmovilizado (en

lugar de buffer fosfato salino pH 7,5.); asimismo, en dicho buffer se empleó 40 mM imidazol para HemK_{Δ80} y, alternativamente, 120 mM imidazol para HemK_{Δ80} y HemK_{Δ80,T102A}. La purificación se siguió en tiempo real por absorbancia a 280 nm (Abs₂₈₀). La elución se realizó sobre una placa de 96 pocillos de 2 mL cada uno (Costar®), mediante un gradiente de elución empleando un buffer (*i. e.*, buffer de elución) compuesto por 50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl y 500 mM imidazol (para HemK_{Δ80}, HemR y HemR_{REC}) o 750 mM (para HemK_{Δ80}, y HemK_{Δ80,T102A}) en 30 minutos, con un flujo de 1 ó 5 mL/min para columnas de 1 ó 5 mL, respectivamente. Para deshacernos del 6xHisTag N-terminal, las proteínas eluidas se incubaron con la proteasa TEV a razón de 1 mg de proteasa cada 40 mg de proteína eluida. La proteólisis se realizó con agitación leve a 4 °C por 14 h en bolsas de diálisis *Snakeskin* de *cut-off* de peso molecular 3,5 kDa (Thermo Scientific), contra ~300 volúmenes de buffer de diálisis 50 mM Tris pH 8 y 500 mM NaCl (excepto para HemR y HemR_{REC} con las cuales se empleó buffer de diálisis 20 mM Tris pH 8, 200 mM NaCl y 0,5 mM ditiotritol (DTT), según lo descrito previamente²⁶¹). Las muestras se recuperaron y se sometieron a un segundo paso de IMAC, en donde se equilibró la columna con buffer de lavado y se colectó el *flow-through* con las proteínas de interés (en este punto, el 6xHisTag fue clivado por TEV, proteasa que asimismo contiene dicha etiqueta N-terminal y se une a la columna).

El paso final de purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular (o gel filtración) en una columna *Superdex 75 HiLoad 16/60* (GE Healthcare) en un *AKTA Purifier* (GE Healthcare) y lavado con buffer 25 mM Tris pH 8 y 500 mM NaCl (excepto para HemR_{REC} y el primer intento de gel filtración de HemR con las cuales se empleó buffer 20 mM Tris pH 8 y 100 mM NaCl según lo descrito previamente²⁶¹). Las proteínas luego fueron concentradas mediante dispositivos de ultrafiltración *Vivaspin* (GE Healthcare) mediante centrifugación a 8000 x g por 10 min a 4 °C hasta llegar a concentraciones finales superiores a 10 mg/mL. Todas las proteínas concentradas se guardaron a -80 °C. La concentración final de proteína se determinó midiendo Abs₂₈₀ utilizando un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian). Cabe agregar que, en los pasos intermedios del procedimiento de purificación descrito, así como también en el paso final, se tomaron alícuotas de las muestras y se trataron con buffer de sembrado y 25 mM DTT finales, y se calentaron a 99 °C por 3 min. Las muestras así tratadas fueron sometidas a SDS-PAGE con acrilamida 12%, para verificar pureza y rendimiento de las proteínas recombinantes purificadas.

Variantes de HemX recombinantes

Para la producción y purificación recombinante de HemX contamos con el marco abierto de lectura codificante de HemX_{Δ21} (Figura 21), un mutante de HemX sin su péptido señal N-terminal, y HemX_{Δ54} (Figura 22), una variante que carece de una región N-terminal predicha como desordenada (para *rationale* de las mutagénesis ver más adelante), clonados en el vector de expresión pQE80L (Qiagen, pQE80L_HemX_{Δ21} y pQE80L_HemX_{Δ54}) bajo el control transcripcional de un promotor *T5/lac* inducible por IPTG. El inserto codifica una etiqueta de histidinas N-terminal (6xHisTag) para realizar purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel inmovilizado, seguido de una secuencia de corte con proteasa TEV para el clivaje del 6xHisTag posterior a la purificación.

Los clonados de HemX_{Δ21} y HemX_{Δ54} se realizaron empleando la técnica de clonado sin enzimas de restricción. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Veriti 96 Well* (Applied Biosystems). Para el primer paso de amplificación exponencial del *megaprimer* (Tablas 13 y 14) se utilizaron los oligonucleótidos “HemX_Δ21_Fw” o “HemX_Δ54_Fw” y “HemX_Rev”, cuyas secuencias se detallan en la Tabla Suplementaria 1. El producto de la amplificación se corrió en gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio, y la banda de tamaño esperado se cortó empleando un transiluminador ultravioleta. Los *megaprimers* así aislados se purificaron empleando el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up* (Macherey-Nagel) siguiendo el protocolo del fabricante.

El segundo paso de hibridación y amplificación lineal (Tablas 15 y 16) permitió obtener los plásmidos pQE80L_HemX_{Δ21} y pQE80L_HemX_{Δ54} por “*primer extension*”. Los plásmidos parentales sin inserto se eliminaron mediante el agregado de 1 µL de DpnI (stock 20 U) e incubando a 37 °C por 1 h, seguido de un paso de inactivación de DpnI a 80 °C por 15 min. El producto de esta segunda amplificación se transformó en bacterias competentes *E. coli* DH5α, junto con un control negativo que consistió en producto de PCR sin *megaprimer* incluido. Finalmente se realizó *miniprep* de las colonias transformantes empleando el kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel).

**MRGSHHHHHHGSSEENLYFQSGSAWETDIDYNYEYEKNGPYTKFSDWVPYKLHKWEPKYLEDYELY
NLKQHYNDNELRKNIYWLKIALNKRFRHPKHALCETKTEQEYYKYRNLMMHINIQIMRSYMRIASKFDK
RHVYFYNLDFAHELKESFGVAESFYKEAIPYWEKAKKEYADKANEVVDLDLGTIETERYQIVTGKLDGFGQIE
THLDRLDGKKKIVSEYLAKYPEADAKALDLIDR**

Peso molecular teórico* = 27,1 kDa

Punto isoeléctrico teórico* = 6,3

Coefficiente de extinción teórico* = 60280 M⁻¹ cm⁻¹

Figura 21. Marco abierto de lectura de HemX_{Δ21} recombinante. Se muestra en violeta el 6xHisTag y en rojo la secuencia de corte con TEV. *: parámetros sin considerar 6xHisTag ni secuencia de corte con TEV.

**MRGSHHHHHHGSSEENLYFQSGSPKYLEDYELYNLKQHYNDNELRKNIYWLKIALNKRFRHPKHALCE
TKTEQEYYKYRNLMMHINIQIMRSYMRIASKFDKRHVYFYNLDFAHELKESFGVAESFYKEAIPYWEKAK
EYADKANEVVDLDLGTIETERYQIVTGKLDGFGQIETHLDRLDGKKKIVSEYLAKYPEADAKALDLIDR**

Peso molecular teórico* = 23,0 kDa

Punto isoeléctrico teórico* = 7,2

Coefficiente de extinción teórico* = 36330 M⁻¹ cm⁻¹

Figura 22. Marco abierto de lectura de HemX_{Δ54} recombinante. Se muestra en violeta el 6xHisTag y en rojo la secuencia de corte con TEV. *: parámetros sin considerar 6xHisTag ni secuencia de corte con TEV.

La presencia de ADN plasmídico fue verificada y cuantificada mediante el equipo *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific). La presencia de los insertos codificantes de HemX_{Δ21} y HemX_{Δ54} en cada plásmido se verificó mediante digestión por las enzimas de restricción EcoRI y KpnI (New England Biolabs): se incubaron 500 ng de plásmido con 1 U de las enzimas de restricción en buffer CutSmart 1X (New England Biolabs) durante 1 h a 37 °C. La reacción se detuvo incubando las muestras con buffer de sembrado, y se analizaron los perfiles de digestión a través de un gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio. Esperamos que el perfil de digestión observado coincidiera con el perfil esperado para las distintas construcciones. La mutagénesis fue confirmada por secuenciación capilar (Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur Montevideo).

Tabla 13. Concentraciones de reactivos para el primer paso de amplificación exponencial del *megaprimer*.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final	Concentración stock
Agua	c.s.p. 50	-	-
Buffer HF	10	1x	5x
dNTP	1	200 μM	10 mM
Oligo Fw	0,75	0,3 μM	20 μM
Oligo Rev	0,75	0,3 μM	20 μM
ADN genómico	variable	20 ng/50 μL PCR	variable
Phusion Pol	0,5	1 U/50 μL PCR	2 U/μL
TOTAL:	50		

Tabla 14. Condiciones de amplificación exponencial del *megaprimer*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización cíclica	98	20 s	35
Hibridación	56	30 s	35
Elongación	72	30 s	35
Elongación final	72	5 min	1
Espera	4	infinito	1

Tabla 15. Concentraciones de reactivos para el segundo paso de “*primer extension*”.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final	Concentración stock
Agua	c.s.p. 50	-	-
Buffer HF	10	1x	5x
dNTP	1	200 μM	10 mM
<i>Megaprimer</i>	variable	200 ng/50 μL PCR	variable
pQE80L_HemK _{Δ80}	variable	40 ng/50 μL PCR	variable
Phusion Pol	0,5	1 U/50 μL PCR	2 U/μL
TOTAL:	50		

Tabla 16. Condiciones de amplificación lineal o “*primer extension*”.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	95	30 s	1
Desnaturalización cíclica	95	10 s	15
Hibridación	56	30 s	15
Elongación	72	2,5 min	15
Elongación final	72	5 min	1
Espera	4	infinite	1

Para los ensayos de expresión a pequeña escala, se sobreexpresó HemK Δ_{21} o HemX Δ_{54} recombinantes empleando la cepa TOP10F' de *E. coli* previamente transformada con el plásmido pQE80L_HemX Δ_{21} o pQE80L_HemX Δ_{54} . Los transformantes se seleccionaron con 100 μ g/mL ampicilina. Se crecieron 10 mL de cultivo inoculados 1/100 con pre-cultivos de transformantes hasta fase exponencial media (DO₆₀₀ ~ 0,6). En ese momento, para los transformantes de pQE80L_HemX Δ_{21} se inoculó 0,1 ó 1 mM IPTG, para realizar la inducción de la expresión de HemX Δ_{21} a 30°C por 6 horas, con agitación; para los transformantes de pQE80L_HemX Δ_{54} se inoculó IPTG 1 mM, para realizar la inducción de la expresión de HemX Δ_{54} a 20, 30 ó 37 °C por 14, 6 y 3 horas, respectivamente, con agitación. Posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000 x g por 20 min a 4 °C, y se resuspendieron en buffer 50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl con un cóctel inhibidor de proteasas libre de EDTA (Roche). Para el paso de lisis celular se incubaron las bacterias así resuspendidas con lisozima 1 mg/mL por 30 min a temperatura ambiente, y se congelaron a -80 °C *overnight*. Al día siguiente las bacterias se descongelaron lentamente y se chequeó la viscosidad de las muestras debido a la presencia de ácidos nucleicos bacterianos, indicativo de que la lisis fue exitosa. Luego, se trataron los extractos en el sonicador *Digital Sonifier* (Branson) realizando pulsos de sonicado de 1 s (amplitud 10%) e intervalos de descanso de 3 s, completando tiempos totales de sonicado de 4 min. El sonicado se realizó en frío (4 °C). Posteriormente, se incubó con 10 μ g/mL ADNasa por 1 h a temperatura ambiente. Para el paso de fraccionamiento, los extractos se centrifugaron a 30000 x g por 30 min a 4°C, y alícuotas de los extractos totales y solubles inducidos, así como de extractos de cultivos sin inducir con IPTG, se incubaron en buffer de sembrado con 25 mM DTT. Las muestras así tratadas se calentaron a 99°C por 3 min y se sembraron en un gel de poliacrilamida 12% para el análisis de los extractos por SDS-PAGE. Para la expresión de HemX Δ_{54} recombinante a gran escala, se procedió con el protocolo descrito arriba pero empleando 2 – 4 L de cultivo y la condición de inducción a 37 °C por 3 h, sustituyendo el sonicador por el homogenizador Emulsiflex en el paso de lisis bacteriana, y tratando los extractos solubles con 40 mM imidazol previo al primer paso de cromatografía de afinidad a Ni²⁺.

La purificación de HemX Δ_{54} recombinante se realizó en dos pasos sucesivos: el primer paso consistió en una cromatografía de afinidad a níquel inmovilizado (*HisTrap*, GE Healthcare). Cada

fracción soluble de los extractos bacterianos se pasó por una columna de níquel de 1 ó 5 mL en el equipo *AKTA Express* (GE Healthcare) empleando buffer de lavado Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM e imidazol 40 mM. La purificación se siguió en tiempo real por absorbancia a 280 nm (Abs_{280}). La elución se realizó sobre una placa de 96 pocillos, empleando el buffer de lavado con el agregado de un gradiente lineal de imidazol hasta 750 mM finales en 30 minutos, con un flujo de 1 ó 5 mL/min para columnas de 1 ó 5 mL, respectivamente. El seguimiento de la purificación permitió identificar aquellos pocillos en donde la proteína se encontraba presente (*i. e.*, picos de elución identificados a partir de la señal obtenida de Abs_{280}), y cada pico de elución se alicuotó en tubos Falcon de 50 mL. Para deshacernos del 6xHisTag N-terminal, HemX_{Δ54} así eluida se incubó con la proteasa TEV a razón de 1 mg de proteasa cada 40 mg de proteína eluida. La proteólisis se realizó con agitación leve a 4 °C por 14 h en bolsas de diálisis *Snakeskin MWCO 3.5 kDa* (Thermo Scientific), contra ~300 volúmenes de buffer de diálisis 50 mM Tris pH 8 y 500 mM NaCl. Las muestras se recuperaron y se sometieron a un segundo paso de cromatografía por afinidad, en donde se equilibró la columna con buffer de lavado y se colectó el *flow-through* con las proteínas de interés (en este punto, el 6xHisTag fue clivado por TEV, proteasa que asimismo contiene dicha etiqueta N-terminal y se une a la columna).

El paso final de purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular (o gel filtración) en una columna *Superdex 75 HiLoad 16/60* (GE Healthcare) conectada al equipo *AKTA Purifier* (GE Healthcare) y lavado con buffer 25 mM Tris pH 8 y 500 mM NaCl. La elución se realizó sobre placas de 96 pocillos, y el seguimiento de la purificación permitió identificar aquellos pocillos en donde la proteína se encontraba presente (*i. e.*, picos de elución identificados a partir de la señal obtenida de Abs_{280}). El pico de elución mayoritario se alicuotó en un dispositivo de centrifugación *Vivaspin* (GE Healthcare) de *cut-off* de peso molecular de 15 kDa. La concentración de las muestras se realizó a 8000 x g por 10 min a 4 °C hasta llegar a concentraciones finales superiores a 10 mg/mL, en lo posible, para afrontar posteriores ensayos de cristalogénesis. Todas las proteínas concentradas se guardaron a -80 °C. La concentración final de proteína se determinó descongelando las muestras y midiendo Abs_{280} utilizando un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian). Cabe agregar que, en los pasos intermedios del procedimiento de purificación descrito, así como también en el paso final, se tomaron alícuotas de las muestras y se trataron

con buffer de sembrado y 25 mM DTT, y se calentaron a 99 °C por 3 min. Las muestras así tratadas fueron sometidas a SDS-PAGE con acrilamida 12%, a modo de verificar el estado y pureza de éstas.

Análisis de termoestabilidad

Con el fin de analizar la termoestabilidad de HemK Δ 80 y HemK Δ 80,T102A recombinante, profundizar en la optimización de su purificación, y evaluar su capacidad de unión de ligandos, se realizaron curvas de temperatura en el equipo *Prometheus NanoDSF* (por *Differential Scanning Fluorimetry*; Nanotemper). La señal observada mediante esta técnica se basa en la fluorescencia intrínseca de los residuos aromáticos (principalmente triptófanos) de la proteína a evaluar. Mediante esta técnica es posible obtener parámetros indicadores de termoestabilidad como la temperatura de *onset* (T_{onset} , *i. e.*, la temperatura a la cual la proteína comienza a desnaturalizarse) y la temperatura de *melting* (T_M , *i. e.*, la temperatura a la cual el 50% de la proteína se encuentra desnaturalizada).

Se realizaron curvas de temperatura de 20 a 95 °C, realizando un incremento de 1 °C/s, con 1 mg/mL HemK Δ 80 en ausencia o presencia de 5 mM de los ligandos ATP, ADP o el análogo no hidrolizable de ATP adenosín-5'-[(β,γ)-metileno]trifosfato (AMPPCP), a diferentes concentraciones de Tris pH 8 (25 y 50 mM) y NaCl (100, 250 y 500 mM), y en presencia de 10 mM MgCl₂ en todos los casos. Para el análisis de termoestabilidad de HemK Δ 80,T102A se utilizó 1 mg/mL de proteína, en ausencia o presencia de 5 mM ATP, en buffer 50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl y 10 mM MgCl₂. Para el análisis de termoestabilidad de HemR, se utilizó 1 mg/mL de proteína en buffer 25 o 50 mM Tris a pH 7,5, 8 u 8,5; y 100, 250, 500 ó 1000 mM NaCl.

Ensayos de actividad enzimática *in vitro*

Para las reacciones de autofosforilación (*i. e.*, actividad autoquinasa) de las variantes de HemK se emplearon 20 μ M HemK Δ 80 o HemK Δ 80,T102A en presencia de 5 mM ATP con 10 mM MgCl₂, y se tomaron alícuotas a tiempos 0, 5, 10, 20 y 60 min para los ensayos de actividad autoquinasa, y a

tiempos 0, 0.25, 0.5, 1, 5, 10 y 30 min para los ensayos de actividad fosfotransferasa. Dichas alícuotas se incubaron en buffer de sembrado y 25 mM DTT para reducir cisteínas (Cys, C), y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se incubó con 50 mM IAA por 10 minutos adicionales a temperatura ambiente. Para los análisis de autofosforilación de HemR, se realizaron incubaciones de 20 μ M de proteína en presencia de AcP 5 mM y 10 mM $MgCl_2$, y se tomaron alícuotas a tiempos 0, 5, 10, 20 y 60 min. Dichas alícuotas se incubaron en buffer de sembrado con 25 mM DTT, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se incubó con 50 mM IAA por 10 minutos adicionales a temperatura ambiente. Para la reacción de desfosforilación de HemR o HemR_{REC} a través de variantes de HemK (*i. e.*, actividad fosfatasa), en primer lugar se autofosforilaron 600 μ M de HemR o HemR_{REC} empleando AcP 25 mM en buffer Tris 25 mM, NaCl 500 mM y $MgCl_2$ 10 mM por 1 h a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron añadiendo el quelante de metales divalentes ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 50 mM. Posteriormente, la fracción fosforilada de HemR o HemR_{REC} se purificó inyectando la muestra en una columna de gel filtración Superdex 75 pg 10/300 (GE Healthcare): debido a que P~HemR se comporta como dímero, los picos correspondientes a la fracción fosforilada de HemR o HemR_{REC} fueron fácilmente identificados ya que eluyen con anterioridad al pico correspondiente a HemR no fosforilada, que se comporta como monómero. P~HemR o P~HemR_{REC} así obtenidas fueron concentradas en dispositivos de centrifugación *Vivaspin* (GE Healthcare) como se describió anteriormente.

Las muestras ya en buffer de sembrado fueron corridas en gel usando la técnica PhosTag-SDS-PAGE como se describió arriba. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, escaneados con un escáner *CanoScan Lide 110* (Canon), y las bandas cuantificadas por densitometría utilizando el *software ImageJ*²⁸⁶.

Análisis bioinformáticos

Las secuencias nucleotídica y aminoacídica de HemX se obtuvieron a través del *software* Genoscope²⁶⁸ (<https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/mage/index.php?>). El gen *hemX* se encuentra anotado en el genoma de *L. biflexa* con el nombre “*LEPBIa1421*”. En primer lugar, se

analizó *in silico* la secuencia aminoacídica de HemX mediante el *software* XtalPred²⁸⁷ (<https://xtalpred.godziklab.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>): este servidor es utilizado para predecir la cristalizabilidad de una proteína dada, a partir de la comparación de sus características biofísicas y bioquímicas predichas con distribuciones de probabilidad de cristalización calculadas a partir de información en la base de datos de casos fallidos y exitosos de cristalización. Para obtener las características biofísicas y bioquímicas de la proteína de interés, XtalPred emplea *softwares* adicionales como PSIPRED²⁸⁸ para predicciones de su estructura secundaria, DISOPRED2²⁸⁹ para predicciones de regiones intrínsecamente desordenadas y SignalP²⁹⁰ (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) para la predicción de péptidos señal.

En el transcurso de este trabajo de Doctorado, más precisamente a mediados del año 2021, se abrió el uso público del *software* bioinformático Alphafold2^{291,292} (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>). El desarrollo de esta técnica permitió la predicción con alta fidelidad de la estructura tridimensional de muchas proteínas, a partir únicamente del *input* de sus secuencias aminoacídicas, e independientemente de la existencia de proteínas cercanas en grado de homología que puedan ser utilizadas como templado para la predicción estructural. Mediante el uso de Alphafold2, se utilizó la secuencia aminoacídica de HemX para predecir su estructura tridimensional, obteniéndose así modelos en forma de archivo .pdb. A modo de evaluar la calidad de la predicción Alphafold2 calcula el índice pLDDT ("*predicted local distance difference test*") por aminoácido: un número de 0 a 100 en donde a mayor pLDDT, mayor confiabilidad del modelo estructural predicho (se consideran confiables las regiones con pLDDTs >70). El algoritmo predictivo produce un segundo índice de fiabilidad llamado pAE ("*predicted aligned error*") que ayuda a cuantificar la confianza en la predicción de posiciones relativas de dominios/regiones diferentes en una misma proteína (y entre proteínas en complejos). Inversamente que con el pLDDT, cuanto mayor es el error pAE en Ångstroms, menos confiable es la estructura predicha, y se obtienen valores de pAE <10 Å cuando la predicción es más exacta (*accurate*). El análisis estructural de los modelos de HemX predichos con Alphafold2 se realizó utilizando el *software* PyMOL (Schrödinger, LLC; <https://pymol.org/>). El alineamiento y análisis filogenético de las

secuencias aminoacídicas de ortólogos de HemX en *Leptospira* spp. fue realizado por el Dr. Samuel García-Huete (Unidad de Biología de Espiroquetas, Institut Pasteur París, Francia, samuel.garcia-huete@pasteur.fr) mediante la herramienta MAFFT v7.467 utilizando el algoritmo L-INS-i, y la inferencia del árbol filogenético se realizó mediante el *software* FastTree v2.1.1²⁹³. Las secuencias aminoacídicas de los ortólogos de HemX se obtuvieron ingresando a la base de datos del NIH (*National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para evaluar qué tipo de dominios o plegamiento presenta HemX empleamos el servidor DALI²⁹⁴ (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>). Este software realiza una búsqueda de dominios y plegamientos proteicos depositados en la base de datos PDB, a partir de similitudes estructurales encontradas tras alinear y superponer la estructura terciaria de nuestra proteína de interés contra toda la PDB -análogo a lo que ocurre con el alineamiento de estructuras primarias (*i. e.*, secuencias aminoacídicas).

Para la predicción de una posible función de HemX en la canalización de electrones (ver más adelante, Sección Resultados) se utilizó el servidor eMAP²⁹⁵ (<https://emap.bu.edu>). eMAP es un software que permite la identificación automática y visualización de posibles canales de transferencia de electrones en una proteína dada, basado en un archivo .pdb con la información de su estructura tridimensional. eMAP predice rutas que permiten la canalización de electrones en proteínas, identificando por ejemplo residuos aromáticos con electrones π deslocalizados que se encuentren cerca entre sí, siendo capaz de establecer rutas de “entrada” y de “salida” de electrones.

RESULTADOS

Objetivo Específico 1: dilucidación de la(s) señal(es) que regula(n) el estado funcional de HemK, y evaluación de la regulación dual ejercida por HemR en *Leptospira* spp.

Caracterización del fenotipo de *L. biflexa* Δ HemKR

Los genotipos de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR fueron confirmados por PCR empleando oligonucleótidos específicos para el operón *hemKR* (Figura 23 y Tabla Suplementaria 1). Se observó amplificación para todos los pares de oligonucleótidos diseñados, excepto para los oligonucleótidos específicos para la región cercana al extremo 3' de *hemK* (*i. e.*, F2) y al extremo 5' de *hemR* (*i. e.*, R2), que fallaron en amplificar sus productos usando ADN genómico extraído de *L. biflexa* Δ HemKR debido al truncado del marco abierto de lectura de *hemKR*. El hecho de que F2 y R2 lograron amplificar producto cuando se utilizó ADN genómico extraído de *L. biflexa* salvaje, sumado a la confirmación de la presencia del *cassette* de resistencia a kanamicina en Δ HemKR (ausente en bacterias salvajes) utilizando oligonucleótidos específicos para el mismo (*i. e.*, KanaR) confirmó que éste se encuentra interrumpiendo el operón *hemKR* en las mutantes.

Para confirmar lo documentado previamente por Louvel et al. 2008, se evaluó el crecimiento de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR, en medio EMJH estándar, tanto en ausencia como en presencia de 300 μ M 5ALA. Para Δ HemKR se agregó 50 μ g/mL kanamicina al cultivo, de forma de seleccionar los mutantes que presentan el *cassette* de resistencia y evitar posibles contaminaciones con bacterias salvajes. El crecimiento de las bacterias se realizó sin agitación a 30 °C, y las medidas se realizaron analizando la DO₄₂₀ cada 24 h. Las curvas de crecimiento obtenidas (Figura 24) mostraron que *L. biflexa* salvaje presenta un similar crecimiento en presencia o ausencia de 5ALA en el cultivo; no obstante, se observó mayor DO₄₂₀ final (*i. e.*, máxima DO₄₂₀ observada en fase estacionaria) en presencia del compuesto. Asimismo, se observó que *L. biflexa* salvaje alcanza la fase exponencial media, es decir, la fase de mayor tasa de crecimiento (a densidades ópticas de entre 0,2 y 0,4) entre los 2 y los 4 días de crecimiento a 30 °C sin agitación. Por otra parte, se observó un comportamiento inesperado para Δ HemKR: estos mutantes fueron capaces de crecer en ausencia de 5ALA (en contraste con reportes previos²⁵⁶), aunque con una fase *lag* más

extendida y menor DO₄₂₀ final. $\Delta HemKR$ suplementada con 5ALA presentó una fase *lag* retardada aproximadamente 1 día comparado a lo observado para *L. biflexa* salvaje, y alcanzando una DO₄₂₀ final similar a los obtenidos para estas últimas. Adicionalmente, en los cultivos de $\Delta HemKR$ tratados con kanamicina, se observó lisis celular en el fondo de las botellas de cultivo, lo cual puede introducir sesgo en las medidas de densidad óptica debido al arrastre de detritos celulares al tomar alícuotas para las medidas de DO₄₂₀. Por esta razón, así como también para no introducir una variable adicional entre cultivos en los posteriores análisis transcripcionales (que se describirán más adelante), es que se decidió evitar el uso de kanamicina, y la confirmación de los genotipos de los cultivos se realizaría mediante PCR empleando los oligonucleótidos descritos previamente (ver Figura 23).

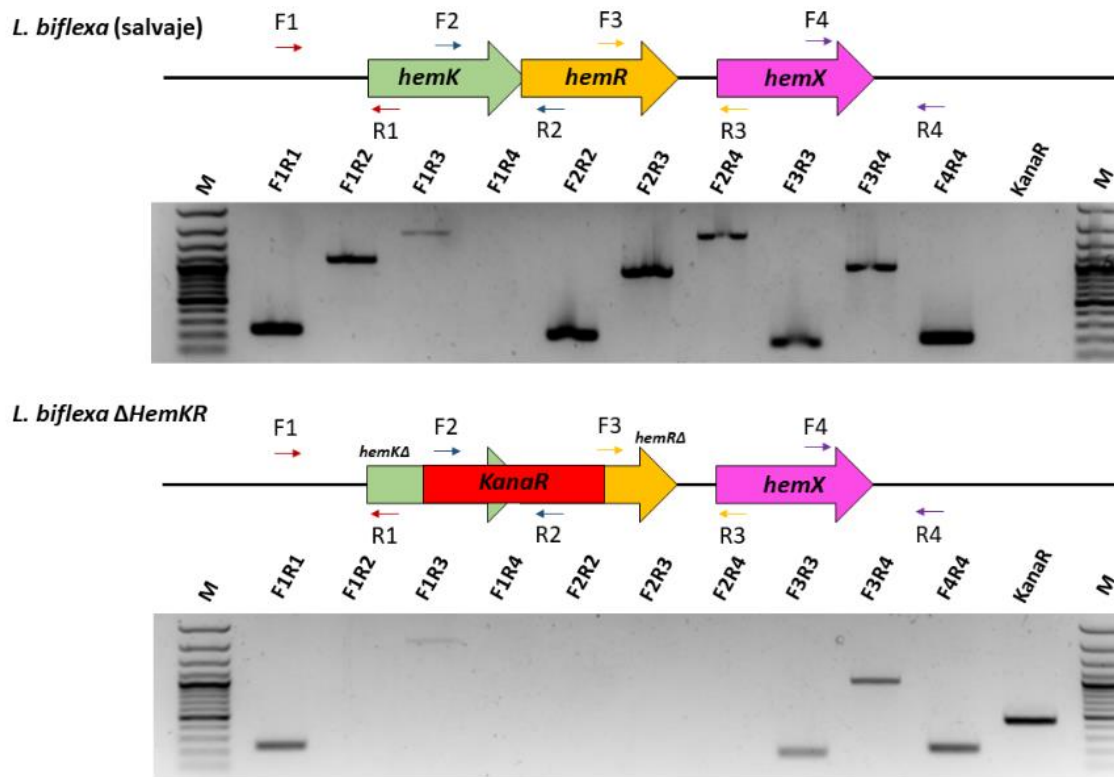


Figura 23. Análisis de los genotipos de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ mediante PCR empleando los pares de oligos indicados. KanaR indica el cassette de resistencia a kanamicina, interrumpiendo los marcos abiertos de lectura de *hemK* y *hemR* en $\Delta HemKR$. Los productos de PCR se analizaron mediante gel de agarosa 1%. M = *ladder* de ADN (GeneRuler 100 bp Plus, Thermo Scientific).

Como se mencionó antes, la presencia de 5ALA en los medios de cultivo tiene un rol importante en la regulación de la expresión génica tanto de *hemA* como de *hmuO*. Entonces, para evaluar el efecto del 5ALA sobre la expresión génica de *hemA* y *hmuO*, se crecieron cultivos de $\Delta HemKR$ en medio EMJH sin suplementar con 5ALA, ya que si bien $\Delta HemKR$ en estas condiciones no creció a tasas óptimas (ver Figura 24), se observó que efectivamente muestran crecimiento. Sorprendentemente, al poner a punto este ensayo en ausencia de kanamicina, se observó crecimiento de $\Delta HemKR$ en ausencia de 5ALA con tasas idénticas al crecimiento de *L. biflexa* salvaje (Figura 25). Este comportamiento se observó incluso después de realizar varios pasajes en ausencia de 5ALA, y de cosechar y lavar cuatro veces los pellets bacterianos de mutantes con medio EMJH sin 5ALA, indicando que de hecho $\Delta HemKR$ no es auxótrofa para 5ALA ni para hemina como había sido reportado previamente²⁵⁹. Entonces, se razonó que en condiciones de crecimiento sin 5ALA, se podrían observar comportamientos transcripcionales previamente omitidos, puesto que en trabajos anteriores^{259,261} los análisis de expresión génica se realizaron suplementando los medios de cultivo con 5ALA o hemina, lo cual podría haber enmascarado el rol de HemKR en la regulación transcripcional de *L. biflexa*. Asimismo, se concluyó que el *lag* observado para $\Delta HemKR$ (ver Figura 24) es producto de la acción de la kanamicina agregada y no de la ausencia de 5ALA.

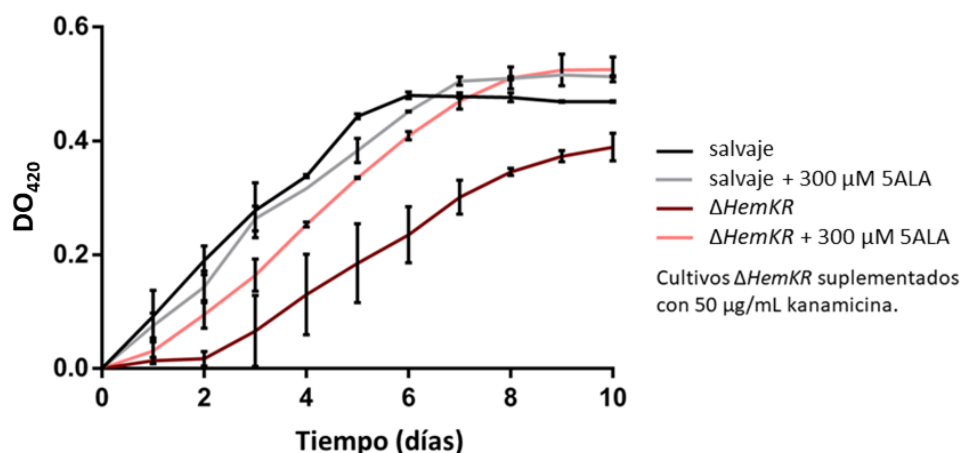


Figura 24. Curvas de crecimiento de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$, midiendo densidad óptica a 420 nm (DO_{420}) en ausencia o presencia de 300 μM ácido 5-aminolevulínico (5ALA). Los cultivos de $\Delta HemKR$ fueron suplementados con 50 $\mu g/mL$ kanamicina. Los experimentos se realizaron por duplicado.

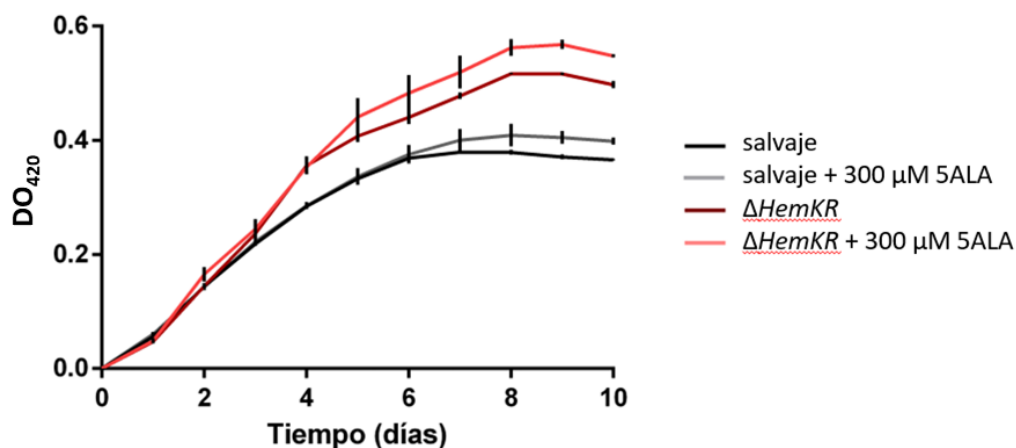


Figura 25. Curvas de crecimiento de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR, midiendo densidad óptica a 420 nm (DO₄₂₀) en ausencia o presencia de 300 μM ácido 5-aminolevulínico (5ALA). No se suplementó con kanamicina. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Macroscópicamente, los cultivos de *L. biflexa* Δ HemKR evidenciaron una tonalidad de color diferente a aquella de los cultivos de *L. biflexa* salvaje (ver Figura 27A). Dado que HemKR es un sistema potencialmente involucrado en la homeostasis de hierro/hemo, y que muchas porfirinas en solución -incluido el hemo- presentan coloración a simple vista²⁹⁶, es que se decidió realizar barridos de absorbancias en los sobrenadantes de dichos cultivos, con el fin de rastrear espectros característicos de porfirinas que puedan estar presentes. El análisis comparativo de los sobrenadantes de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR crecidos sin agitación hasta fase exponencial y estacionaria reveló un pico de absorción a 405 nm, significativamente aumentado (*i. e.*, entre 2 y 3 veces mayor) en Δ HemKR relativo a bacterias salvajes (Figura 26A, B). El perfil del barrido de absorbancia es consistente con un espectro de absorción de hemo y/o PPIX, con una banda de Soret alrededor de 405 nm y bandas Q en la región de 500-600 nm^{296–298}. Este resultado sugiere que el mutante exporta hemo y/o PPIX al medio extracelular en mayor medida que *L. biflexa* salvaje. Asimismo, estos picos se correlacionaron con un aumento concomitante en la absorción a ~280 nm, sugiriendo que la porfirina se exporta unida a proteína²⁹⁹. La viabilidad de Δ HemKR se confirmó mediante visualización por microscopía de campo oscuro, descartando lisis celular como la fuente de estas porfirinas. En cultivos suplementados con 5ALA, se observó un aumento en el enriquecimiento de porfirinas extracelulares tanto en bacterias salvajes como Δ HemKR (ver

Figura 26A, B), sugiriendo que el 5ALA está siendo internalizado y metabolizado por las bacterias para la biosíntesis de porfirinas.

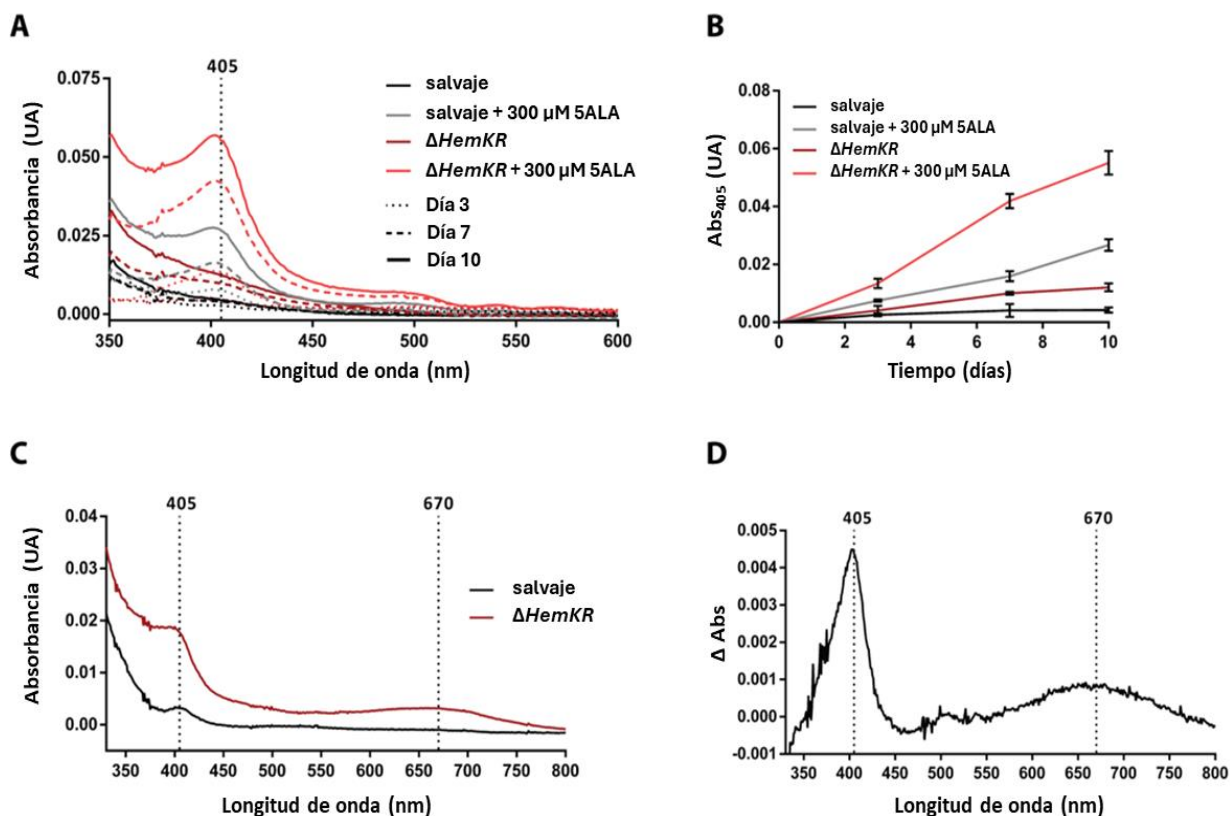


Figura 26. (A) Barrido de absorbancia de sobrenadantes de cultivos de *L. biflexa* *salvaje* y Δ *HemKR*, suplementados o no con 300 μ M ácido 5-aminolevulínico (5ALA). Los cultivos se crecieron a 30 °C sin agitación, y se analizaron los sobrenadantes de éstos a los días 3, 7 y 10 de crecimiento (en condiciones sin agitación esto corresponde a fase exponencial media, fase exponencial tardía y fase estacionaria de crecimiento, respectivamente). Se indica a 405 nm la banda de Soret. (B) Resumen de los datos de absorbancia a 405 nm (Abs_{405}) mostrados en el panel (A). (C) Barrido de absorbancia de sobrenadantes de cultivos de *L. biflexa* *salvaje* y Δ *HemKR* (3 días de crecimiento a 30 °C, con agitación a 100 rpm, correspondiente a fase estacionaria de crecimiento). Se indica a 670 nm el pico de absorción característico de biliverdina. (D) Espectro derivado de la sustracción de los espectros obtenidos en el panel (C), " Δ *HemKR* - *salvaje*" (Δ Abs).

Finalmente, se realizó el mismo experimento descrito arriba, pero esta vez creciendo las bacterias con agitación hasta fase estacionaria: la agitación permite oxigenar más eficientemente

al cultivo bacteriano. De esta manera, en el barrido de absorbancia de sobrenadantes de cultivos $\Delta HemKR$ en estas condiciones se reveló un pico de absorbancia adicional, alrededor de ~ 670 nm, consistente con el espectro de absorción de biliverdina²⁵⁰ (Figura 26C, D). Teniendo en cuenta que $\Delta HemKR$ sobreexpresa el gen *hmuO*²⁶¹, y la biliverdina es el producto de la reacción catalizada por la HmuO, este resultado sugiere fuertemente que en $\Delta HemKR$ la biliverdina es un producto que es exportado al medio extracelular, y que existe mayor actividad hemo-oxigenasa relativo a *L. biflexa* salvaje.

Como se mencionó previamente, HemR es un represor transcripcional de *hmuO*^{259,261}. Un incremento en la actividad hemo-oxigenasa celular puede resultar en un aumento en las concentraciones intracelulares de hierro libre. Los resultados mostrados arriba sugieren que éste es un posible escenario en la fisiología de bacterias $\Delta HemKR$. Para evaluar la respuesta de *L. biflexa* $\Delta HemKR$ a condiciones de hierro limitante, se realizaron análisis comparativos de crecimiento de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ en medio EMJH sin FeSO₄ suplementado, en ausencia o presencia del quelante de hierro DIP. Los resultados mostraron que en medio EMJH sin FeSO₄ (en ausencia de DIP), tanto bacterias salvajes como $\Delta HemKR$ crecen, aunque las primeras con un *lag* de crecimiento mayor que las mutantes. Por otra parte, en presencia de 70 μ M DIP, se observó un considerable *lag* de crecimiento en bacterias salvajes en comparación a $\Delta HemKR$ (Figura 27A, B). Cabe destacar que a concentraciones de >170 μ M DIP no se observó crecimiento de *L. biflexa* salvaje o $\Delta HemKR$; en este caso fue posible revertir el crecimiento con el sideróforo DFO. Estos resultados indican que *L. biflexa* $\Delta HemKR$ es más tolerante a condiciones de deficiencia de hierro extracelular. Asimismo, y en línea con los resultados descritos anteriormente, $\Delta HemKR$ secretó mayor cantidad de porfirinas al medio extracelular comparado a bacterias salvajes; este efecto es aún mayor en cultivos $\Delta HemKR$ en presencia de DIP, algo que no se observó en bacterias salvajes tratadas con el quelante (Figura 27C). En suma, los resultados observados tras la caracterización fenotípica de cultivos sugieren un rol importante de HemKR en la regulación de la homeostasis de hierro y hemo en *L. biflexa*.

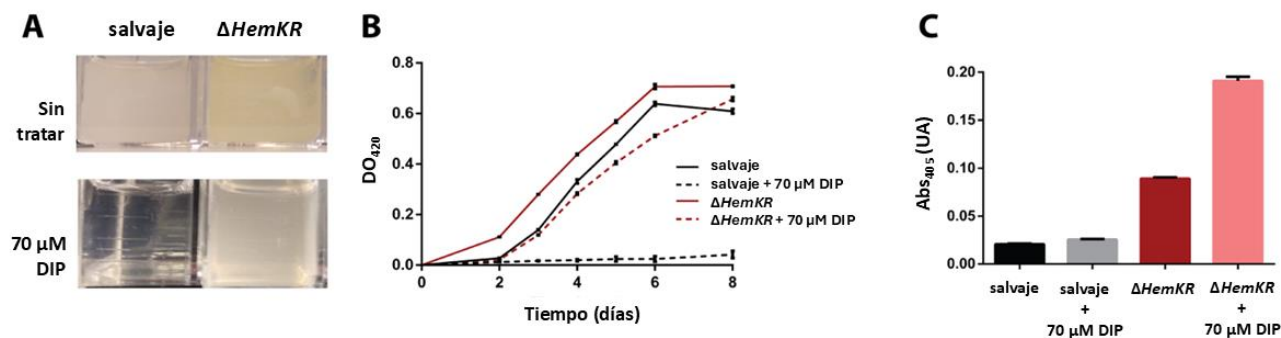


Figura 27. (A) Cultivos representativos de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ crecidos en medio EMJH sin $FeSO_4$ suplementado, sin tratar o tratados con 70 μM 2,2'-dipiridilo (DIP). (B) Curvas de crecimiento de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ en medio de cultivo EMJH sin $FeSO_4$, sin tratar (líneas sólidas) o tratados con 70 μM DIP (líneas punteadas), obtenidas midiendo densidad óptica a 420 nm (DO_{420}). Los experimentos se realizaron por duplicado. Nótese que los cultivos de *L. biflexa* salvaje tratados con 70 μM DIP crecieron hasta un máximo de $0,384 \pm 0,003$ UA luego de 15 días. (C) Absorbancia a 405 (Abs₄₀₅) de sobrenadantes de cultivos de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ en fase estacionaria de crecimiento (día 8, excepto para "salvaje + 70 μM DIP", que alcanzó fase estacionaria en el día 15).

Análisis transcripcional empleando exceso/deficiencia de hierro y ácido 5-aminolevulínico como potenciales señales

Análisis transcripcional de genes implicados en la homeostasis de hemo

Este nuevo escenario, en el cual $\Delta HemKR$ es capaz de crecer similarmente a *L. biflexa* salvaje en ausencia de suplemento de hemo o sus precursores, permitió hipotetizar que el 5ALA sea una señal detectada por HemKR. En primer lugar, se empleó la técnica de PCR en tiempo real apuntando a identificar la(s) señal(es) fisiológica(s) que detecta HemK, y cómo se efectúa la respuesta transcripcional controlada por HemR. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos para analizar la expresión génica relativa de los genes *hemA* y *hmuO* a través del método "Delta-Delta-Cq", utilizando el gen *rpoB* como *housekeeping*²⁶¹ (Tabla Suplementaria 1). Para el diseño de oligonucleótidos y optimización del experimento de PCR en tiempo real, se siguieron criterios descritos anteriormente³⁰⁰, necesarios para validar los resultados obtenidos mediante el método de análisis previamente mencionado: se verificó que los productos de PCR presentaran alrededor de 100 pb; que presentaran un único pico en el gráfico de derivada de fluorescencia en función de temperatura de las curvas de *melting* representando un único

producto de amplificación; que las eficiencias de amplificación se encontraran entre 80 y 110 %, y que las mismas fueran similares entre pares de oligonucleótidos. Se probaron distintos oligonucleótidos diseñados para este fin, hasta obtener un set con las mejores eficiencias observadas. Empleando diluciones seriadas (1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000) de un extracto de ARN de *L. biflexa*, se realizó PCR en tiempo real con los oligonucleótidos que amplifican los genes *hemA*, *hmuO* y *rpoB*. Previo al análisis, se verificó por gel de agarosa que las extracciones de ARN fueron exitosas, analizando la presencia e integridad del ARN. El gel mostró dos bandas, correspondientes a las subunidades ribosomales 16S y 23S, características de una fracción enriquecida en ARN; asimismo, no se observó *smear* (*i. e.*, degradación) de dichas bandas (Figura 28A), indicando que se trata de muestras de ARN de calidad suficiente para los experimentos de PCR en tiempo real. Los valores de C_q obtenidos tras realizar PCR en tiempo real de las diluciones seriadas se graficaron en función del logaritmo decimal de cada dilución, y se obtuvieron las pendientes de cada gráfico como parámetro indicador de eficiencia (Figura 28B; Tabla 17). Se observó que las eficiencias se encuentran dentro del rango aceptable, y que presentan una diferencia máxima de 3,3% entre el par de menor eficiencia y el de mayor eficiencia. Además, se chequeó la presencia del amplicón de tamaño esperado por gel de agarosa (Figura 28C), mostrando un único producto de ~100 pb para todos los pares de oligonucleótidos utilizados. Consistente con esto último las curvas de *melting* mostraron un pico único, mostrando T_{MS} de 74,6 °C para *hemA*, 73,8 °C para *hmuO* y 77,7 °C para *rpoB* (Figura 28D). De acuerdo con los datos obtenidos de este control de calidad, se decidió utilizar este set de oligonucleótidos para los experimentos de PCR en tiempo real.

Se realizó PCR en tiempo real de muestras de ARN de cultivos de *L. biflexa* salvaje y Δ *HemKR* crecidos en medio EMJH estándar (sin suplementar con 5ALA), e incubados con 300 μ M 5ALA y 70 μ M DIP en fase exponencial media como candidatos a señal (Figura 29; a modo de simplificar la Figura, los p-valores obtenidos tras el análisis estadístico se detallan en la Tabla Suplementaria 2). Los resultados obtenidos en estas condiciones mostraron que en el contexto de cultivos crecidos en medio EMJH sin suplementar con 5ALA, la expresión génica de *hmuO* aumentó 13 veces en cultivos de Δ *HemKR* relativo a cultivos de *L. biflexa* salvaje; por otra parte, la expresión génica de *hemA* no mostró diferencias significativas. Al incubar los cultivos con 5ALA, la expresión

génica de *hemA* y *hmuO* en *L. biflexa* salvaje disminuyó en 0,4 veces y aumentó 3 veces, respectivamente, relativo a la muestra sin tratar. Por otra parte, no se observaron cambios significativos en la expresión relativa de estos genes cuando se tratan cultivos de $\Delta HemKR$ con 5ALA, relativo a $\Delta HemKR$ sin tratar. Este resultado sugiere fuertemente que el 5ALA es una señal que es detectada, directa o indirectamente, por HemKR, induciendo el apagado de la vía. Es importante resaltar que el descubrimiento fortuito de que $\Delta HemKR$ no es auxótrofa para hemo o sus precursores permitió desenmascarar el rol del 5ALA como señal de apagado de HemKR.

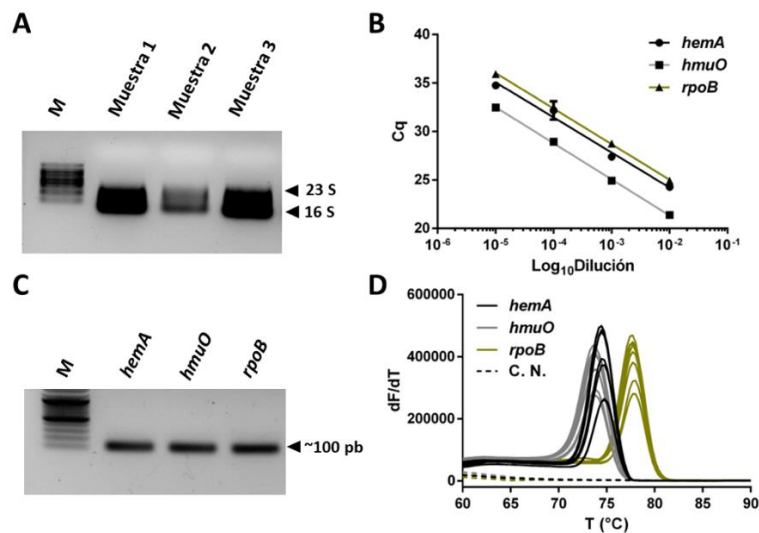


Figura 28. Control de calidad de los experimentos de PCR en tiempo real. (A) Gel de agarosa representativo de la extracción de ARN de tres cultivos de *L. biflexa*. Se indican con flechas negras la migración esperada para las subunidades 23 S y 16 S de ARN ribosomal. (B) Gráfico de Cq en función del logaritmo decimal de diluciones de ADN copia (ADNc). Las medidas se realizaron por duplicado. (C) Análisis de los productos finales de PCR en tiempo real mediante gel de agarosa. La flecha negra indica la migración esperada para los amplicones de *hemA*, *hmuO* y *rpoB* (~100 pb). (D) Gráfico representativo de las curvas de *melting* obtenidas para los experimentos de PCR en tiempo real. M: *ladder* de ADN (GeneRuler 100 bp Plus, Thermo Scientific). C. N.: control negativo sin transcriptasa reversa.

Tabla 17. Parámetros obtenidos para los pares de oligonucleótidos *hemA*, *hmuO* y *rpoB* en el control de calidad de los experimentos de PCR en tiempo real.

	<i>hemA</i>	<i>hmuO</i>	<i>rpoB</i>
Pendiente	-3,62 (+/- 0,20)	-3,73 (+/- 0,06)	-3.67 (+/- 0,06)
R²	0,9878	0,9993	0,9992
Eficiencia (%)	88,8	85,5	87,1
T_M (°C)	74,6 (+/- 0,15)	73,8 (+/- 0,07)	77,7 (+/- 0,12)

Como alternativa al 5ALA, se evaluó si la ausencia o depleción de hierro actúa como señal específica de HemKR. Para ello, se trataron cultivos de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR con el quelante de hierro DIP (ver Figura 29): los cultivos mostraron una disminución en la expresión génica de *hemA* de 0,4 veces, y un aumento de 67 veces en la expresión de *hmuO* relativo a los cultivos sin tratar; por otro lado, los cultivos Δ HemKR tratados de esta manera mostraron un comportamiento inesperado, observándose un aumento de 4 veces en la expresión génica de *hemA* y un aumento de 20 veces en la expresión de *hmuO*, relativo a cultivos Δ HemKR sin tratar. Si comparamos la expresión de *hmuO* en “ Δ HemKR + DIP” contra la expresión de *hmuO* de *L. biflexa* salvaje sin tratar, el aumento en expresión génica relativa asciende a 250 veces. Estos resultados, en donde se observa un aumento en la expresión génica de *hmuO* de 3,4 veces mayor en el cultivo “salvaje + DIP” que en “ Δ HemKR + DIP”, y un inesperado aumento en la expresión génica de *hemA* en bacterias mutantes, sugieren que la depleción de hierro depende parcialmente de HemKR, pero también, de mecanismos sinérgicos de regulación transcripcional, independientes de HemKR.

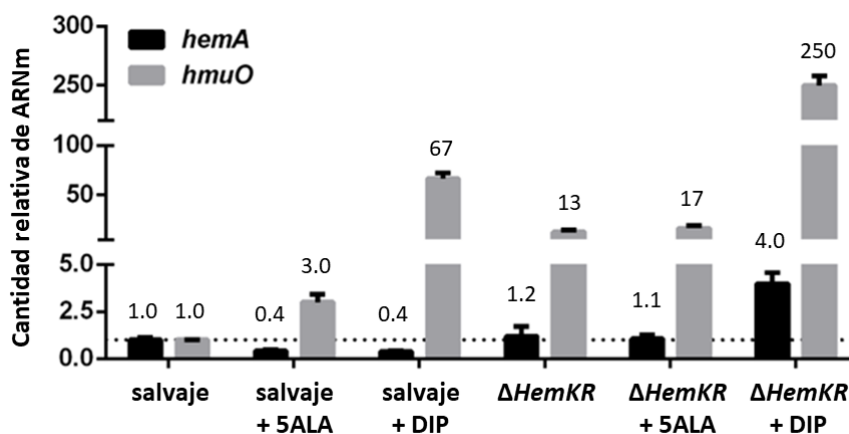


Figura 29. Expresión génica relativa de *hemA* (barras negras) y *hmuO* (barras grises) de cultivos de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR, incubados con 300 μ M ácido 5-aminolevulínico (5ALA) o 70 μ M 2,2'-dipiridilo (DIP) por 3 h en fase exponencial media, cuando se indica. Los valores observados arriba de las barras indican el *fold-change* en la expresión génica de *hemA* o *hmuO* relativo a los cultivos sin tratar (“salvaje”). Los experimentos se realizaron por triplicado. A modo de simplificar la Figura, los p-valores obtenidos tras el análisis estadístico se detallan en la Tabla Suplementaria 2.

Análisis transcriptómico de la regulación global e identificación de genes adicionalmente regulados

Dado que las respuestas a 5ALA, y sobre todo a la depleción de hierro, podrían involucrar una red regulatoria más amplia, es que se decidió realizar ARN-Seq de las mismas extracciones de ARN de cultivos de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ con las cuales se obtuvieron los resultados de expresión génica en la Figura 29. Previo al experimento de ARN-Seq, se analizó la calidad del ARN extraído (cada extracción de ARN realizada en cuadruplicado para cada condición) usando el equipo BioAnalyzer; para confirmar que se obtuvo ARN de buena calidad, se hizo un análisis cualitativo de los electroferogramas y un análisis cuantitativo del RIN (i. e., *RNA Integrity Number*) de las muestras de ARN. Los resultados mostraron que, en todos los casos, a excepción de una única muestra, se obtuvo ARN de calidad suficiente para los ensayos de ARN-Seq, con RINs mayores a 7³⁰¹. En la Figura 30 se observan los geles virtuales obtenidos para todas las muestras de ARN analizadas. A modo ilustrativo, en la Figura 31A se puede observar el electroferograma de una muestra de ARN de buena calidad y en la Figura 31B una de mala calidad, o degradado. Los RINs obtenidos para cada muestra se detallan en la Tabla Suplementaria 3.

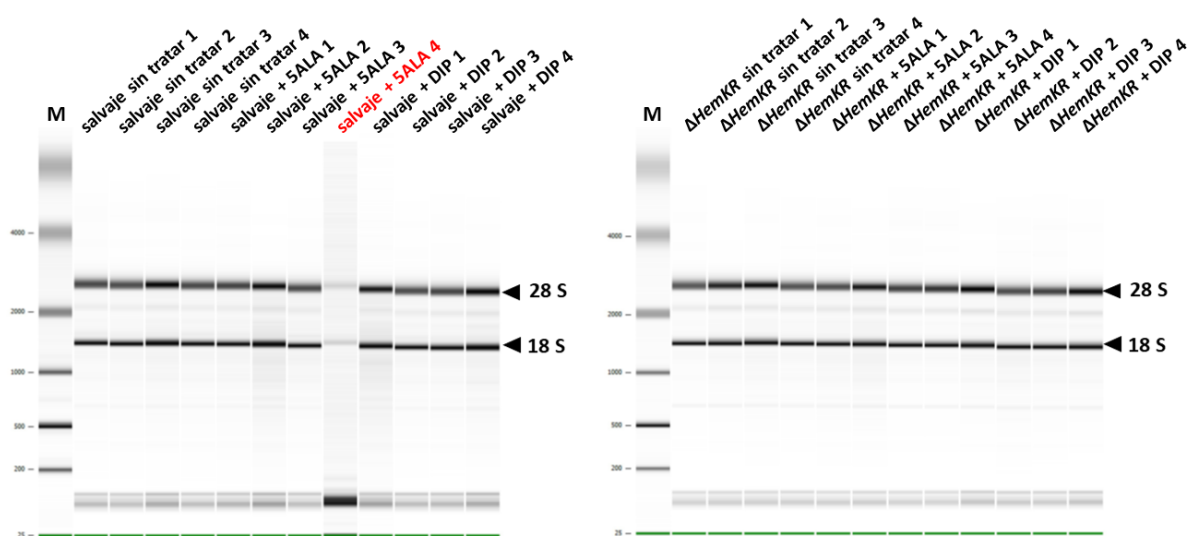


Figura 30. Geles virtuales obtenidos tras análisis de calidad de las extracciones de ARN en el equipo BioAnalyzer. Las flechas negras indican las bandas correspondientes a los fragmentos 28S y 18S de ARN ribosómico, utilizados para el cálculo del RIN. En rojo se indica una muestra de ARN de mala calidad (“salvaje + 5ALA 4”). M: *ladder* de ARN.

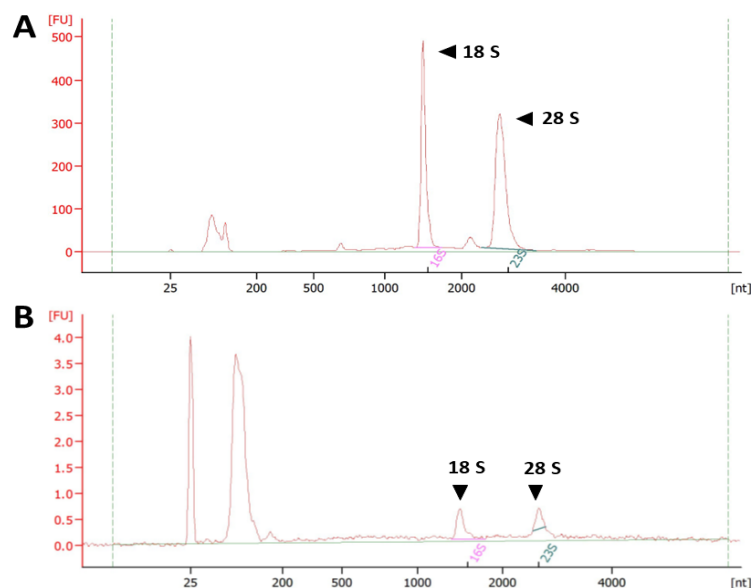


Figura 31. Electroferogramas representativos de (A) una muestra de ARN de buena calidad y (B) una muestra de ARN de mala calidad, o degradado. Las flechas negras indican las bandas correspondientes a los fragmentos 28S y 18S de ARN ribosómico, utilizados para el cálculo del RIN.

*Los datos de expresión génica diferencial de todos los genes de *L. biflexa* obtenidos por ARN-Seq para las distintas condiciones se encuentran en el Anexo. A continuación, e intentando sintetizar la enorme cantidad de información obtenida a partir de dicho experimento, se priorizará el análisis de (i) aquellos genes con cajas HemR en sus sitios promotores; es decir, genes potencialmente regulados por HemKR, y (ii) genes seleccionados involucrados en el metabolismo de hierro/hemo.*

En primer lugar, se analizó comparativamente el transcriptoma de cultivos de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR en ausencia de señal; es decir, en medio EMJH estándar (Figura 32). Los resultados de ARN-seq mostraron la regulación hacia abajo de 202 genes, y regulación hacia arriba de 123 genes, considerando FC mayores a 2 y diferencias significativas de expresión génica diferencial (*i. e.*, p -valor ajustado $< 0,05$). Poniendo foco en aquellos genes que presentan cajas HemR en sus promotores, se observó mediante esta técnica un perfil de expresión génica diferencial muy similar a aquel observado por PCR en tiempo real (ver Figura 29, “salvaje” y “ Δ HemKR”): en Δ HemKR, *hmuO* aumenta en expresión 4,6 veces relativo a bacterias salvajes. Asimismo, no se

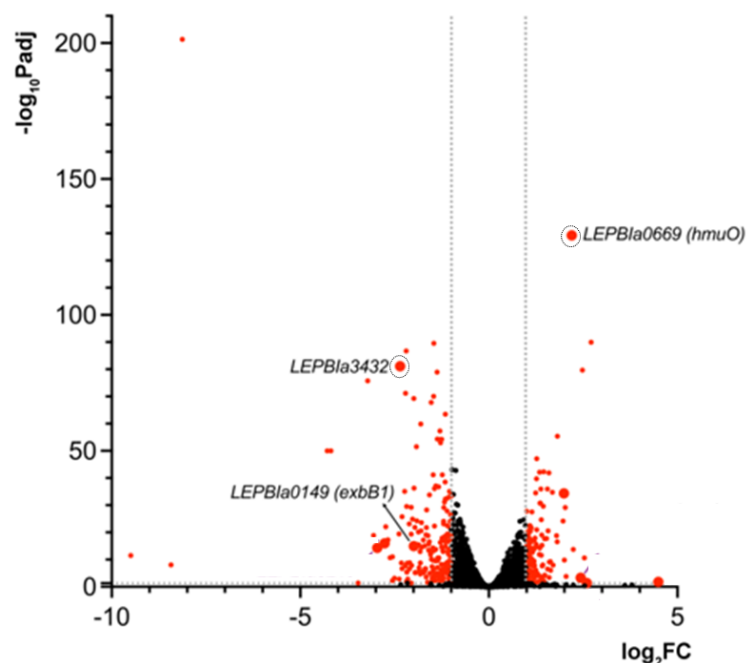


Figura 32. Análisis transcriptómico de expresión génica diferencial entre cultivos de *L. biflexa* Δ HemKR vs *L. biflexa* salvaje, crecidos en medio EMJH estándar. Se muestra en el eje de abscisas el logaritmo en base 2 del *fold-change* ($\log_2FC$) de la expresión de los genes de *L. biflexa* en bacterias Δ HemKR relativo a salvajes; y en el eje de ordenadas el logaritmo negativo en base 10 de los p-valores ajustados ($-\log_{10}Padj$: a mayor el valor, más significativas son las diferencias). Los puntos en negro indican genes con $\log_2FC < |1|$ y $0 < -\log_{10}Padj \leq 1$, mientras que los puntos rojos indican genes con $\log_2FC \geq |1|$ y $-\log_{10}Padj > 1$. Genes de interés con cajas HemR identificadas en sus sitios promotores se indican con una flecha negra sólida o un círculo negro punteado.

observaron diferencias significativas en la expresión de *hemA*. El gen *exbB1*, por otra parte, mostró una regulación a la baja de ~ 4 veces ($FC = 0,25$) relativo a la bacteria salvaje; en línea con la caracterización de HemR como un regulador transcripcional dual²⁶¹, este resultado sugiere fuertemente que HemR es un activador de la expresión de *exbB1*. El análisis permitió identificar un gen, *LEPBla3432*, el cual es expresado diferencialmente mostrando una regulación a la baja de ~ 5 veces ($FC = 0,2$) relativo a la bacteria salvaje, y que además está contenido dentro de un operón controlado por un promotor que presenta la caja HemR (coordenadas genómicas 3550754-3550769 río arriba de *LEPBla3430/LEPBla3431*). Esto sugiere que este operón forma parte del regulón HemR, y que el RR actúa como activador transcripcional de este gen, que no había sido identificado en análisis anteriores²⁵⁸.

Para evaluar al hierro como posible señal detectada por HemKR, se incubaron cultivos de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR con un exceso de hierro, más específicamente un pulso de 2 mM FeSO₄, en fase exponencial media de crecimiento. Sin embargo, esta condición resultó en un comportamiento aberrante durante la extracción de ARN de bacterias salvajes: se observó la formación de un precipitado de color amarillo durante el paso de incubación con isopropanol, que impidió recuperar el ARN de las muestras. Notoriamente, esto no se observó para bacterias Δ HemKR (Figura 33).

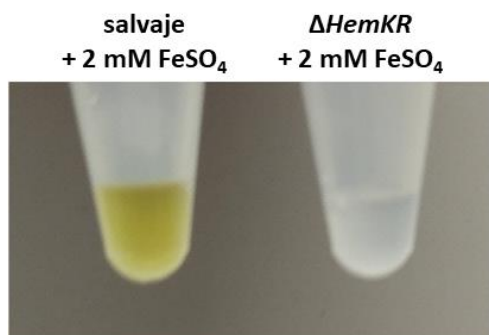


Figura 33. Resultado del paso de incubación con isopropanol durante el protocolo de extracción de ARN de muestras de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR en presencia de 2 mM FeSO₄. Las muestras de bacterias salvajes, y no aquellas Δ HemKR, mostraron un comportamiento aberrante que impidió la extracción de ARN en cantidad y calidad suficiente.

Para evaluar condiciones de deficiencia de hierro como posible señal detectada por HemKR, se incubó un pulso del quelante DIP (70 μ M) en las condiciones de crecimiento de cultivos previamente descritas (Figura 34A). La deficiencia de hierro gatilló una respuesta regulatoria global fuerte, consistente con lo previamente reportado en *L. interrogans*²⁵³. Para *L. biflexa* salvaje, este tratamiento resultó (considerando genes con $\log_2$ FC > |1|) en la regulación hacia abajo de 151 genes y la regulación hacia arriba de 105. Para *L. biflexa* Δ HemKR, una menor cantidad de genes se vio afectada (43 y 72 genes regulados hacia abajo y hacia arriba, respectivamente); sin embargo, el perfil global de la respuesta transcriptómica es similar tanto en salvajes como en Δ HemKR. Esto se pone de manifiesto analizando la pendiente del gráfico que conforman los datos de expresión génica diferencial para los genes de *L. biflexa*, poniendo en cada eje los FC observados para cada gen tanto en bacterias salvajes (en el eje de abscisas) como

$\Delta HemKR$ (en el eje de ordenadas) (ver Figura 34A). La pendiente ($= 0,5349 \pm 0,009$), con valor cercano a 1, sugiere una respuesta global a deficiencia de hierro que es mayormente similar entre *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$.

Un análisis más riguroso y enfocado hacia aquellos genes cuya expresión es regulada ante deficiencia de hierro, y que están anotados funcionalmente o con homología cercana a ortólogos funcionalmente caracterizados como involucrados en la homeostasis y metabolismo de hierro/hemo, permitió dilucidar respuestas HemKR-dependientes (Figura 35). Para los genes que forman parte del regulón de HemR, y en línea con lo observado mediante PCR en tiempo real (ver Figura 29, “salvaje + DIP” y “ $\Delta HemKR$ vs DIP”), se observó que *hemA* es regulado hacia abajo ($FC = 0,35$) en bacterias salvajes, en contraste con una regulación hacia arriba ($FC = 2,6$) en $\Delta HemKR$. Este perfil de expresión fue similar para todos los genes que conforman el operón de biosíntesis de hemo (*hemCBLENG*), excepto *hemH*, que se encuentra codificado río abajo y en dirección contraria al operón antes mencionado. Curiosamente, el gen *LEPBIa3432* se expresó 16,9 veces más en cultivos $\Delta HemKR$ tratados con DIP, y 4 veces más en cultivos salvajes con el mismo tratamiento. En cuanto a *hmuO*, se observó regulación hacia abajo tanto en bacterias salvajes como en $\Delta HemKR$, siendo mayor el efecto en las primeras ($FCs = 20,9$ y $11,5$, respectivamente). Por otra parte, *exbB1* presentó un $FC = 0,49$ en salvajes y diferencias no significativas en expresión en $\Delta HemKR$. Extendiendo el análisis a otros genes seleccionados, diferencialmente expresados y sin cajas HemR en sus sitios promotores, se destacaron, regulados hacia arriba:

- *LEPBIa2760*, codificante de un receptor/transportador TonB-dependiente putativo con homología a PhuR, quien forma parte de un sistema importador de hemo.
- *hemT* (*pLEPBI0015*), codificante de una PUP transportadora de hemo y en el contexto del operón *hemTUVS*, similarmente sobreexpresado, y homólogo al sistema TonB-dependiente de importe de hemo.
- *fecA* (*LEPBIa1883*), codificante de un receptor/transportador homólogo a un importador de citrato férrico TonB-dependiente.

Por otra parte, se destacó como gen regulado hacia abajo:

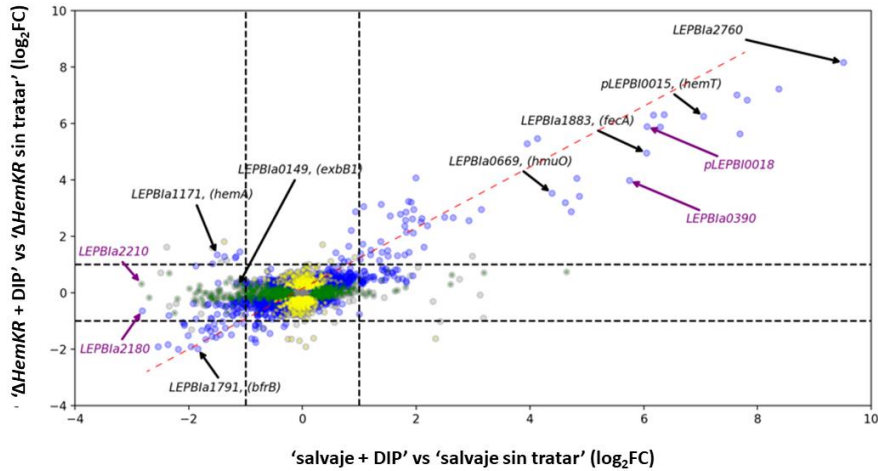
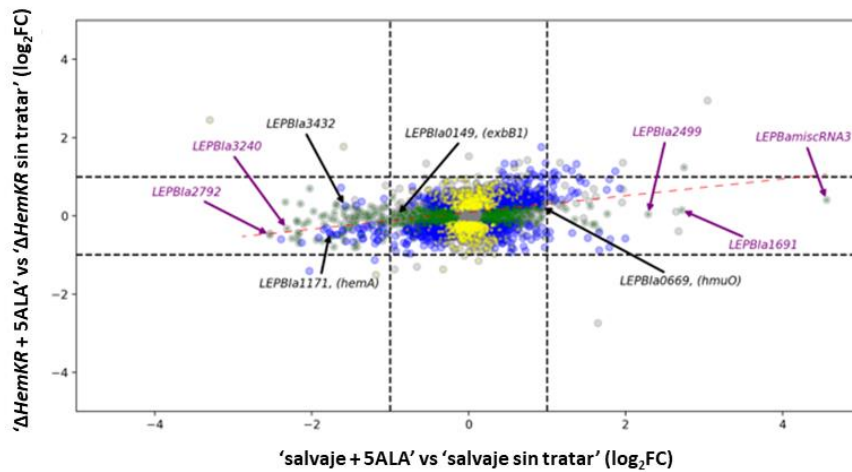
A**B**

Figura 34. (A) Ploteo dual de $\log_2FC$ comparando valores de expresión génica diferencial para genes de *L. biflexa* salvaje (eje de abscisas) y $\Delta HemKR$ (eje de ordenadas), tratados vs sin tratar con 70 μM 2,2'-dipiridilo (DIP). Nótese la tendencia global similar en expresión diferencial génica entre *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ (patrón diagonal de distribución de $\log_2FC$ s; la línea punteada roja es la curva de regresión de mínimos cuadrados con valor de pendiente $0,5349 \pm 0,009$ y coeficiente de determinación $R^2=0,456$). (B) Ploteo dual de $\log_2FC$ comparando valores de expresión génica diferencial para genes de *L. biflexa* salvaje (eje de abscisas) y $\Delta HemKR$ (eje de ordenadas), tratados vs sin tratar con 300 μM ácido 5-aminolevulínico (5ALA). Nótese la tendencia global HemKR-dependiente en expresión diferencial génica entre *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ (patrón horizontal de distribución de $\log_2FC$ s; la línea punteada roja es la curva de regresión de mínimos cuadrados con valor de pendiente $0,1954 \pm 0,011$ y coeficiente de determinación $R^2=0,084$). Puntos azules representan genes con p-valores ajustados (P_{adj}) $\leq 0,05$ tanto en bacterias salvajes como $\Delta HemKR$; puntos verdes y amarillos, genes con $P_{adj} \leq 0,05$ sólo en bacterias salvajes y $\Delta HemKR$, respectivamente; puntos grises, genes con $P_{adj} > 0,05$. Flechas negras indican genes seleccionados con anotación de función u homología cercana con ortólogos funcionalmente caracterizados como involucrados en metabolismo de hierro/hemo; flechas violetas indican genes hipotéticos y ARNs no codificantes.

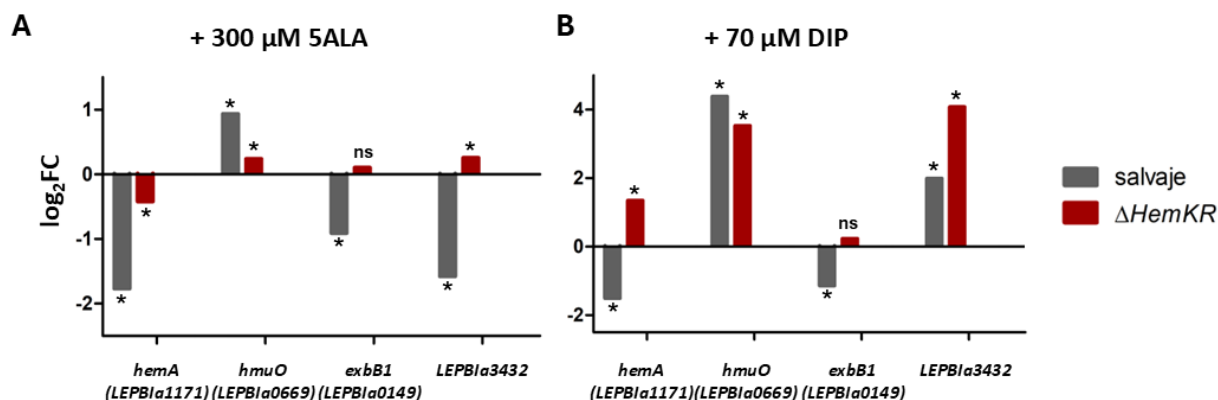


Figura 35. Gráfico de datos de ARN-Seq obtenidos para los genes identificados como parte del regulón de HemR. Se observa el $\log_2FC$ de genes de *L. biflexa* salvaje o $\Delta HemKR$ tratadas con (A) 300 μM ácido 5-aminolevulínico (5ALA) o (B) 70 μM 2,2'-dipiridilo (DIP), relativo a bacterias salvajes o $\Delta HemKR$ sin tratar, respectivamente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con p-valor ajustado $< 0,05$. ns: diferencia no significativa.

Tabla 18. Resumen de datos de ARN-Seq obtenidos para los genes identificados como parte del regulón de HemR. Se considera estadísticamente significativa diferencias con p-valor ajustado (P_{adj}) $< 0,05$. # reads: número de reads; $\log_2FC$: logaritmo en base 2 del *fold-change* de los genes, relativo a bacterias sin tratar.

salvaje + 300 μM 5ALA	# reads	$\log_2FC$	P_{adj}
<i>hemaA</i> (LEPBla1171)	9657	-1,768	1,83E-60
<i>hmuO</i> (LEPBla0669)	8297	0,9326	4,22E-32
<i>exbB1</i> (LEPBla0149)	484,4	-0,9085	0,0002075
LEPBla3432	22730	-1,578	8,72E-30
$\Delta HemKR$ + 300 μM 5ALA			
<i>hemaA</i> (LEPBla1171)	32060	-0,4191	2,76E-08
<i>hmuO</i> (LEPBla0669)	25640	0,2387	0,001137
<i>exbB1</i> (LEPBla0149)	227,9	0,1014	0,3764
LEPBla3432	18680	0,2553	0,0113
salvaje + 70 μM DIP			
<i>hemaA</i> (LEPBla1171)	9657	-1,504	1,08E-44
<i>hmuO</i> (LEPBla0669)	8297	4,382	1,00E-50
<i>exbB1</i> (LEPBla0149)	484,4	-1,135	0,00000237
LEPBla3432	22730	1,988	1,18E-48
$\Delta HemKR$ + 70 μM DIP			
<i>hemaA</i> (LEPBla1171)	32060	1,35	1,135E-83
<i>hmuO</i> (LEPBla0669)	25640	3,528	1E-50
<i>exbB1</i> (LEPBla0149)	227,9	0,2373	0,1591
LEPBla3432	18680	4,08	1E-50

- *bfrB* (*LEPBIa1791*), codificante de una proteína con homología a la bacterioferritina, un almacenador intracelular de hierro.

Los perfiles de expresión de estos genes descritos arriba fueron similares tanto en bacterias salvajes como $\Delta HemKR$ tratadas con DIP, relativo a aquellas sin tratar.

Para la evaluación de 5ALA como potencial señal detectada por HemKR, se incubó con un pulso de 5ALA (300 μ M) en las condiciones de crecimiento de cultivos previamente descritas (Figura 34B). A diferencia de lo observado en el experimento de deficiencia de hierro, el 5ALA gatilló una respuesta más dirigida y menos amplia, que involucró una menor cantidad del total de genes diferencialmente regulados (considerando genes con $\log_2FC > |1|$): 128 genes regulados hacia abajo y 51 hacia arriba en *L. biflexa* salvaje, y 6 genes regulados hacia abajo y 24 hacia arriba en *L. biflexa* $\Delta HemKR$. Adicionalmente, el perfil global de la respuesta transcriptómica ante 5ALA presentó mayores diferencias en expresión génica en bacterias salvajes que en $\Delta HemKR$; esto se observó analizando la pendiente del gráfico que conforman los datos de expresión génica diferencial para los genes de *L. biflexa* ahora en esta condición, en donde los puntos se distribuyen “horizontalmente” con una pendiente ($= 0,1954 \pm 0,011$) de valor cercano a 0 (ver Figura 34B), sugiriendo que la respuesta transcriptómica global a la presencia de 5ALA es mayormente dependiente de HemKR.

El análisis transcripcional de genes con caja HemR en sus promotores mostró un perfil de regulación similar a lo observado previamente por PCR en tiempo real (ver Figura 29). *hemA* mostró una regulación a la baja en su expresión en *L. biflexa* salvaje ($FC = 0,29$; $\sim 3,5$ veces menor) y de $FC = 0,75$ ($\sim 1,3$ veces menor) en la expresión en bacterias $\Delta HemKR$. Cabe mencionar que, analizando el resto de los genes que conforman el operón de biosíntesis de hemo en bacterias $\Delta HemKR$, sólo *hemA* y *hemC* presentan diferencias de expresión estadísticamente significativas, en contraste con lo que ocurre en bacterias salvajes en donde todos los genes del operón son significativamente regulados hacia abajo en presencia de 5ALA. Este es un resultado importante, pues sugiere fuertemente que en ausencia de 5ALA, HemR actúa como activador transcripcional del operón de biosíntesis de hemo. El gen *hmuO* mostró una regulación hacia arriba ($FC = 1,9$) en bacterias salvajes, contrastando con lo que ocurre en bacterias $\Delta HemKR$ en donde el cambio fue de $FC = 1,2$. Los genes *exbB1* y *LEPBIa3432* mostraron en bacterias salvajes cambios de expresión

a la baja de FC = 0,53 (~1,9 veces menos) y 0,34 (~2,9 veces menos), mientras que los cambios en expresión génica diferencial de *exbB1* en $\Delta HemKR$ no fueron estadísticamente significativos, y *LEPBl α 3432* mostró una regulación hacia arriba de FC = 1,2. Resumiendo, en aquellos genes con cajas HemR en sus sitios promotores, se observó una respuesta transcripcional HemKR-dependiente en presencia de 5ALA. La Figura 35 y la Tabla 18 muestran el resumen de los datos obtenidos por ARN-Seq para los genes identificados como regulón de HemR luego de tratar los cultivos salvajes y $\Delta HemKR$ con 5ALA o DIP.

Análisis mediante gen reportero empleando exceso de hierro como potencial señal

Los plásmidos pRAT724 (*i. e.*, sin el sitio promotor de *hemA* o *hmuO* insertado), pRAT724_pHemA y pRAT724_pHmuO (pHemA y pHmuO refieren al sitio promotor de *hemA* o *hmuO* insertado, respectivamente) se transformaron en células de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ mediante conjugación. La transformación de los plásmidos fue parcialmente exitosa, obteniéndose conjugantes positivos para pRAT724 y pRAT724_pHemA en *L. biflexa* salvaje, y para las tres construcciones en *L. biflexa* $\Delta HemKR$ (Figura 36A). La conjugación de pRAT724_pHmuO en *L. biflexa* salvaje falló, debido a la emergencia de resistencia espontánea a espectinomicina que complicó el rastreo de conjugantes positivos (Figura 36B). La emergencia de este tipo de resistencia ya ha sido previamente documentada en *Leptospira*³⁰². La confirmación de los conjugantes positivos se realizó mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para pRAT724 que amplifican las regiones flanqueantes de pHemA-GFP ó pHmuO-GFP: el análisis por gel de los productos de PCR mostró amplicones de los tamaños esperados, de ~1000 pb para el amplicón de pRAT724 sin inserto, y de ~1200 pb para el amplicón de pRAT724 con el inserto pHemA o pHmuO. Se observó en algunos conjugantes la amplificación de una tercera banda, inespecífica, de mayor tamaño.

En primer lugar, se realizó un análisis preliminar de la expresión de GFP empleando los conjugantes $\Delta HemKR$ -pRAT724_pHemA y $\Delta HemKR$ -pRAT724_pHmuO. Para sustraer el ruido de fondo, se utilizó el conjugante $\Delta HemKR$ -pRAT724. Se esperaba observar que la señal para $\Delta HemKR$ -pRAT724_pHmuO sea al menos un orden de magnitud mayor que la señal obtenida para

$\Delta HemKR$ -pRAT724_pHemA. En la misma línea que los resultados obtenidos anteriormente, los datos de fluorescencia mostraron que la señal obtenida para $\Delta HemKR$ -pRAT724_pHmuO fue ~51

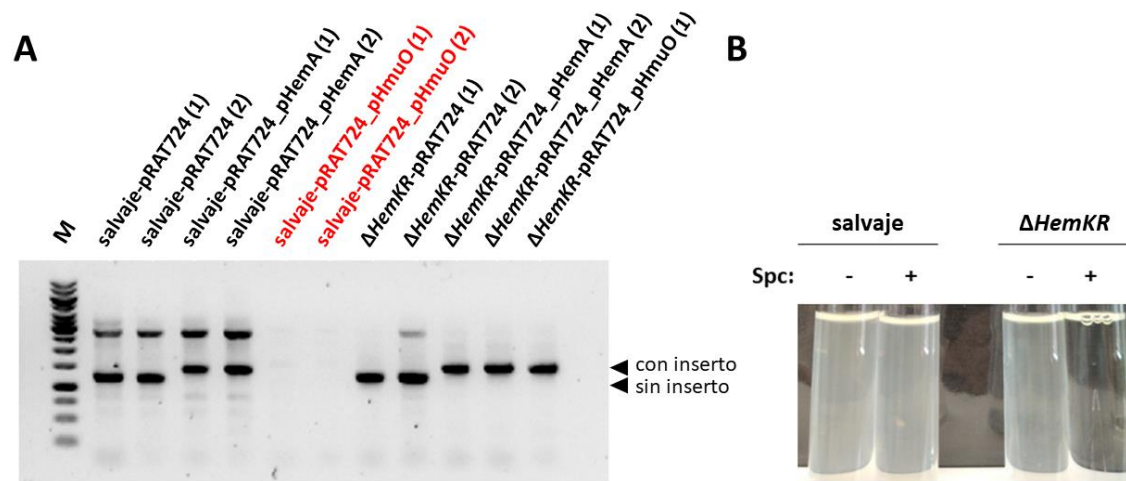


Figura 36. (A) Verificación de la presencia de inserto correspondiente al promotor de *hemA* o *hmuO* en el plásmido pRAT724 por PCR. Los plásmidos fueron purificados a partir de colonias seleccionadas de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$. Los productos de la PCR se corrieron en gel de agarosa 1%. En rojo se indican los conjugantes que fallaron. M: *ladder* de ADN (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Thermo Scientific). (B) Resistencia espontánea a espectinomicina (Spc) observada en cultivos de *L. biflexa* salvaje.

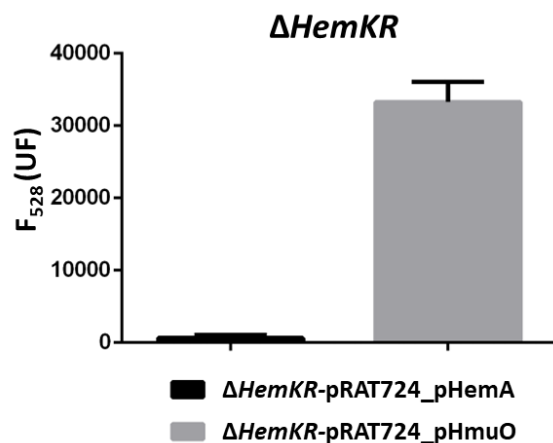


Figura 37. Análisis comparativo de la expresión génica de GFP bajo el control del promotor de *hemA* (barra negra) y *hmuO* (barra gris) de cultivos de *L. biflexa* $\Delta HemKR$ en fase exponencial media conjugados con los plásmidos pRAT724+pHemA y pRAT724+pHmuO, respectivamente, midiendo fluorescencia emitida a 528 nm (F_{528}). UF: unidades arbitrarias de fluorescencia.

veces mayor que la señal obtenida para $\Delta HemKR$ -pRAT724_pHemA (Figura 37), comparado al resultado de PCR en tiempo real en donde se observó que la expresión de *hmuO* fue ~11 veces mayor que la de *hemA* en $\Delta HemKR$ (ver Figura 29).

Con el fin de dilucidar la señal de encendido de HemKR, se crecieron cultivos de los conjugantes obtenidos salvaje-pRAT724_pHemA y $\Delta HemKR$ -pRAT724_pHemA (también salvaje-pRAT724 y $\Delta HemKR$ -pRAT724 para la sustracción del ruido de fondo) en medio EMJH sin hierro hasta fase exponencial media de crecimiento, y en este punto se incubaron los cultivos con 2 mM FeSO₄. P previo a la incubación, los análisis de expresión de GFP mostraron que, si bien la señal obtenida para salvaje-pRAT724_pHemA fue 2.3 veces mayor que la señal obtenida para $\Delta HemKR$ -pRAT724_pHemA, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 38A). No obstante, es posible que haya una dilución de la señal obtenida para los cultivos de *L. biflexa* salvaje-pRAT724_pHemA debido a la presencia de bacterias sin conjugar con resistencia a espectinomycin en dichos cultivos, que fueron seleccionadas junto a las conjugantes.

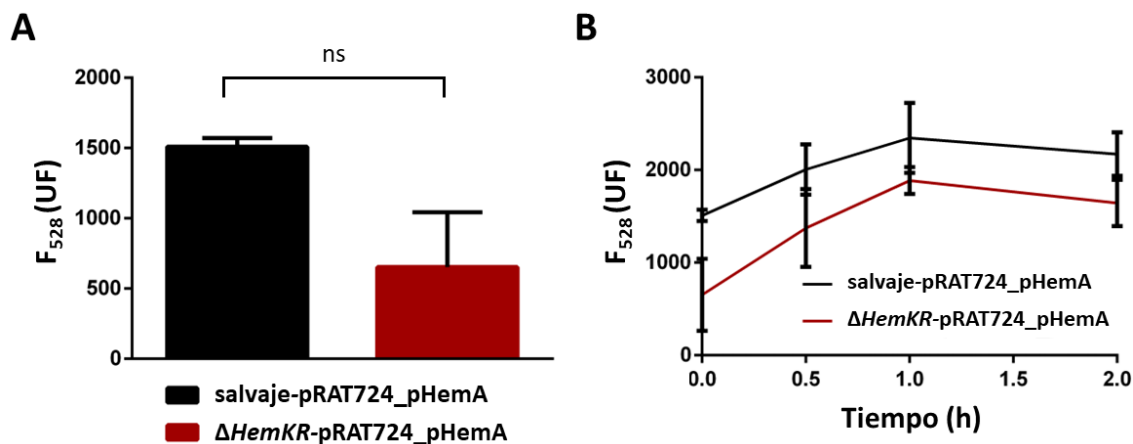


Figura 38. Análisis comparativo de la expresión génica de GFP bajo el control del promotor de *hemA* de cultivos de *L. biflexa* salvaje (barra negra) y $\Delta HemKR$ (barra roja) en fase exponencial media conjugados con el plásmido pRAT724_pHemA, midiendo fluorescencia emitida a 528 nm (F₅₂₈). UF: unidades arbitrarias de fluorescencia; ns: diferencia estadísticamente no significativa (test t no pareado). (A) Expresión de GFP previo a la incubación con 2 mM FeSO₄ (ver tiempo = 0 h en (B)). (B) Expresión de GFP a 0.5, 1 y 2 h posterior a la incubación con 2 mM FeSO₄.

Tras incubar con FeSO_4 , se observó un aumento similar en la señal de fluorescencia tanto para el conjugante salvaje-pRAT724_pHemA como para ΔHemKR -pRAT724_pHemA, entre 0.5 y 1 h posterior a la incubación, y las diferencias entre ambas no fueron estadísticamente significativas (Figura 38B). En suma, estos resultados sugieren que el hierro no es una señal detectada por HemKR. Cabe destacar que la relación señal/ruido al evaluar el promotor de *hemA* fue baja, en contraste con lo observado para el promotor de *hmuO*, con una relación señal/ruido alta (ver Figura 37). Este resultado es consistente con lo obtenido mediante PCR en tiempo real, y sugiere que la fuerza del promotor de *hmuO* es considerablemente más alta que la del promotor de *hemA*.

Análisis del estado de fosforilación *in vivo* de HemR empleando exceso/deficiencia de hierro y ácido 5-aminolevulínico como potenciales señales

Finalmente, se optimizó la técnica PhosTag-SDS-PAGE + *Western blot* anti-HemR: un método directo de evaluación, para analizar el estado de fosforilación de HemR en cultivos de *L. biflexa* salvaje en presencia de las distintas posibles señales. Como se describió previamente, el PhosTag permite la discriminación de las fracciones fosforiladas vs no fosforiladas en proteínas separadas por SDS-PAGE: si se siembran extractos de proteínas totales de *L. biflexa*, los anticuerpos αHemR se unirán tanto a la fracción no fosforilada como a la fosforilada de HemR, permitiendo así evaluar semicuantitativamente el estado de fosforilación de HemR en cultivos. Considerando que concentraciones variables de hierro y 5ALA gatillaron respuestas transcripcionales HemKR-dependientes sobre sus genes diana, se evaluó el estado de fosforilación *in vivo* de HemR realizando un pulso de 300 μM 5ALA, 70 μM DIP o 2 mM FeSO_4 en cultivos de *L. biflexa* salvaje crecidos hasta fase exponencial media (Figura 39). En cultivos sin tratar, $\text{P}^{\sim}\text{HemR}$ representó el ~12-25% del *pool* total de HemR celular en fase exponencial media (Figura 39B). Esta proporción se vio incambiada durante la curva temporal realizada (total 3 h) en las condiciones experimentales empleadas. Las incubaciones con exceso de hierro (2 mM FeSO_4) o con déficit del metal (70 μM DIP), no resultaron en cambios detectables del estado de fosforilación de HemR (Figuras 39A, B), indicando que el hierro no es una señal detectada por el sistema HemKR. En

contraste, la incubación con 5ALA resultó en la desfosforilación casi total de HemR durante el curso temporal experimental (Figuras 39A, B).

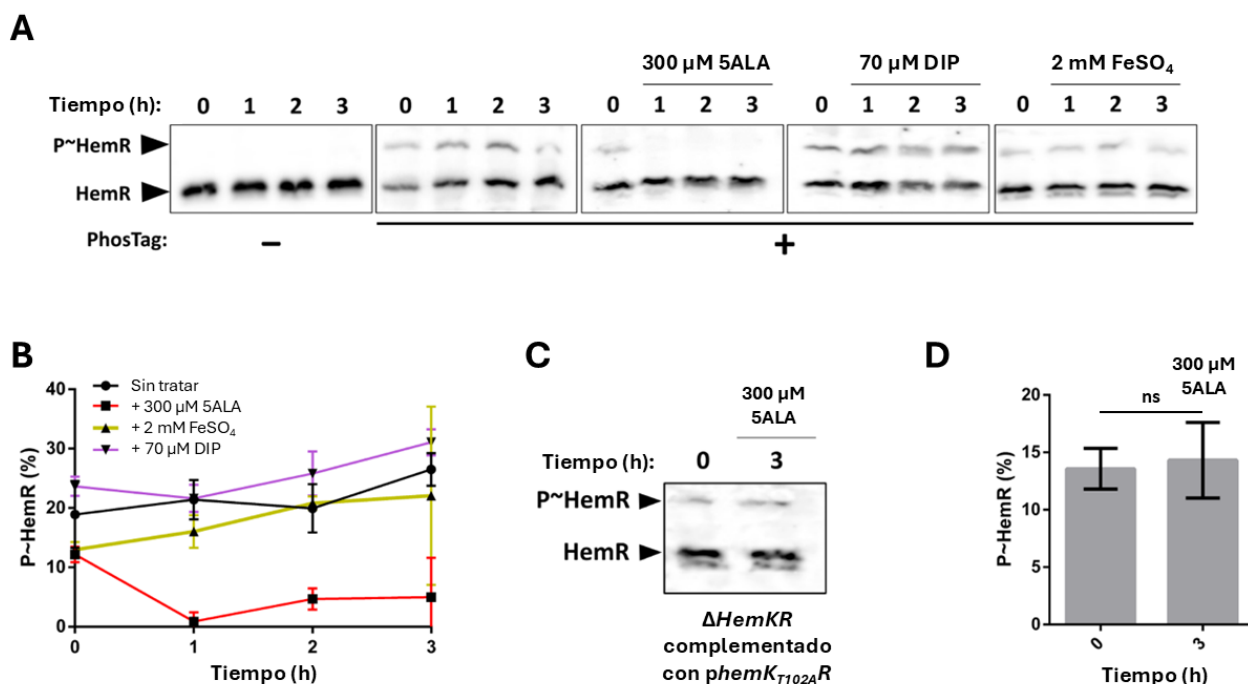


Figura 39. (A) PhosTag-SDS-PAGE de extractos proteicos totales de cultivos de *L. biflexa*, sin tratar o tratados con ácido 5-aminolevulínico (5ALA), 2,2'-dipiridilo (DIP) o un exceso de sulfato ferroso (FeSO₄) cuando se indica. Los geles fueron sometidos a *Western blot* empleando anticuerpos policlonales anti-HemR. Las flechas indican la movilidad electroforética de la población de HemR fosforilada (P~HemR) y no fosforilada (HemR). (B) Porcentaje de P~HemR cuantificadas del panel (A). (C) PhosTag-SDS-PAGE + *Western blot* anti-HemR de extractos proteicos totales de cultivos de *L. biflexa* Δ HemKR complementados mediante conjugación con un plásmido replicativo *phemK_{Thr102Ala}/hemR*. (D) Porcentaje de P~HemR cuantificada del panel (C). Todos los experimentos fueron realizados empleando tres réplicas biológicas y las imágenes de los geles revelados derivan de una de estas réplicas y son representativos.

Para profundizar el análisis del mecanismo molecular de HemKR, se utilizaron bacterias *L. biflexa* Δ HemKR complementadas con un plásmido pMAORI portando el operón *hemKR* bajo regulación de su promotor nativo (*phemKR*), o bien, una variante portando un mutante puntual de HemK en donde se sustituyó el codón codificante para la Thr102 por una alanina (*phemK_{T102A}R*); éste último carece de la cadena lateral del residuo clave para la actividad fosfatasa de HQs de la familia

HisKA sobre su RR específico^{6,36}. De este modo, y confirmando el mecanismo HemKR-dependiente gatillado por 5ALA, la variante del sistema -sin actividad fosfatasa- HemK_{T102A}R exhibió niveles de P~HemR comparable al observado para *L. biflexa* salvaje, pero no mostró actividad fosfatasa en presencia de 5ALA (Figura 39C, D). En suma, estos resultados indican que el 5ALA gatilla el apagado de HemK, quien a su vez desfosforila a través de su actividad fosfatasa y de manera señal-dependiente al regulador transcripcional HemR.

Objetivo Específico 2: producción, purificación y caracterización bioquímica de las proteínas recombinantes HemK, HemR y variantes.

Producción y purificación de variantes de HemK recombinantes

Intentos preliminares de purificación de HemK_{Δ80} recombinante mediante IMAC determinaron que la proteína requiere de concentraciones finales de imidazol mayores a (los convencionales) 500 mM en el buffer de elución, debido a que a estas concentraciones, aún permanece una fracción de proteína adherida a la columna. Entonces, con el fin de aumentar los rendimientos de HemK_{Δ80} se realizó un gradiente de 120 a 750 mM de imidazol. La concentración inicial elevada de imidazol, de 120 mM, apuntó a obtener mayor pureza y homogeneidad en la purificación. En estas condiciones, se obtuvo la mejor pureza, homogeneidad y rendimiento (~8 mg por litro de cultivo) en la purificación de HemK_{Δ80}: el análisis por SDS-PAGE del único pico de elución obtenido mostró una banda mayoritaria, del peso molecular esperado para HemK_{Δ80} (Figura 40).

Con el fin de clivar el 6xHisTag N-terminal de HemK_{Δ80} y de reducir la concentración de imidazol presente en la muestra, se procedió a hacer diálisis en buffer 50 mM Tris pH 8 y 500 mM NaCl, en presencia de proteasa TEV. Se constató que el corte con TEV evita la precipitación de HemK_{Δ80}, dado que en la muestra sin TEV se observó un precipitado de color blanco, algo que se había observado también para otras HQs. Posteriormente, HemK_{Δ80} se sometió a un segundo paso de purificación por afinidad, con el fin de adherir TEV mediante su 6xHisTag N-terminal a la columna de Ni²⁺, y obtener una muestra homogénea de HemK_{Δ80}. La segunda purificación fue problemática, dado que HemK_{Δ80} se adhirió a la columna aún sin el 6xHisTag y empleando buffer de lavado 50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl y 120 mM imidazol, por lo que se repitió el primer paso de purificación por afinidad evitando el segundo paso, es decir, realizando directamente el paso final de cromatografía de exclusión molecular luego de la diálisis.

La cromatografía de exclusión molecular se realizó empleando un buffer con 25 mM Tris pH 8 y 500 mM NaCl. El cromatograma mostró la elución de tres picos (Figura 41): el pico “A” correspondió al volumen de exclusión, el pico “B” (la proteasa TEV), y el pico “C” correspondió a HemK_{Δ80}, con trazas de la proteasa TEV, con un peso molecular aparente de 41 kDa según la

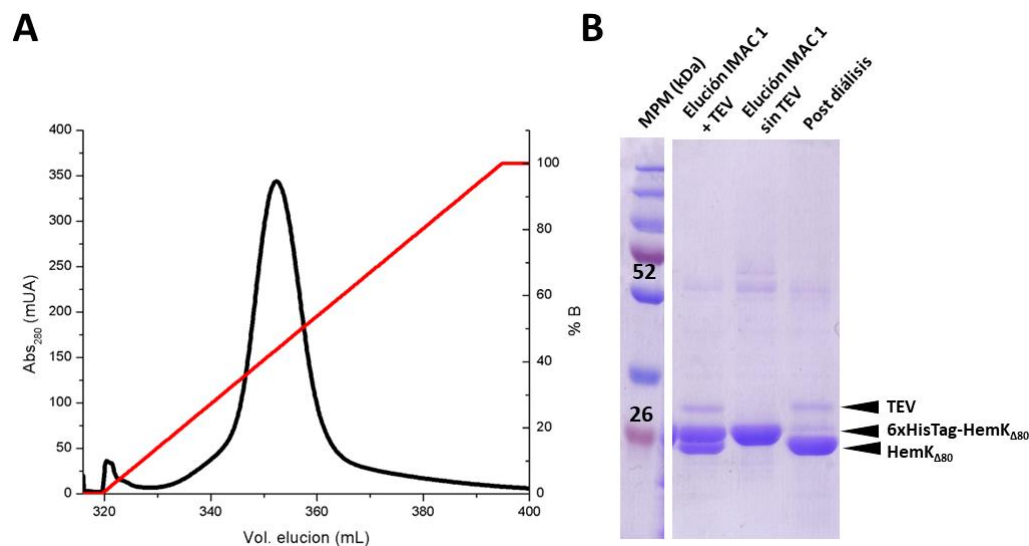


Figura 40. (A) Cromatograma de afinidad a níquel (IMAC) del extracto soluble de *E. coli* con HemK $_{\Delta 80}$ recombinante sobreexpresada. En negro se muestra la absorbancia a 280 nm (Abs_{280}) y en rojo el gradiente de buffer de elución empleado (%B). (B) Análisis por SDS-PAGE 12% del tratamiento posterior a la cromatografía de afinidad. MPM: marcador de peso molecular en kDa.

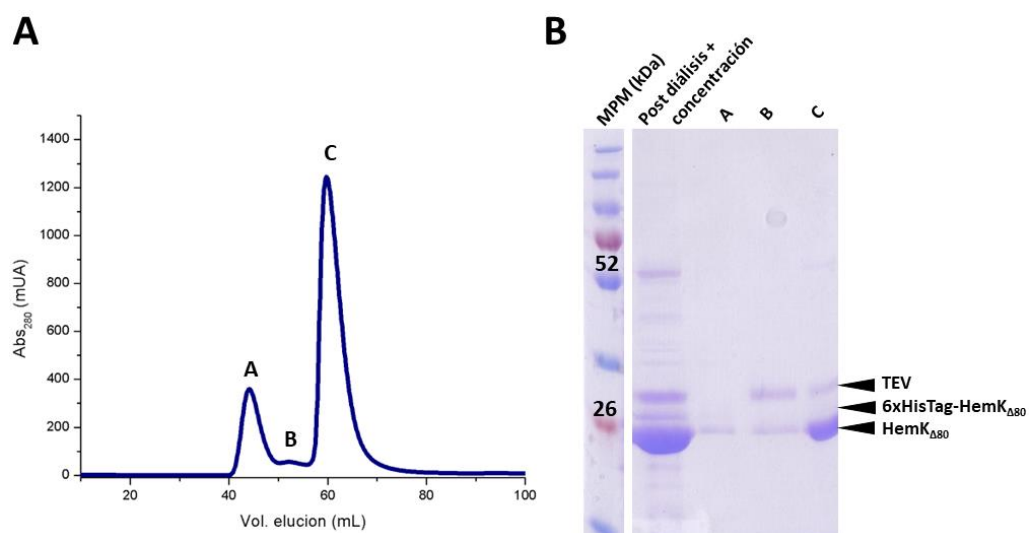


Figura 41. (A) Cromatograma de exclusión molecular de HemK $_{\Delta 80}$ recombinante posterior a la cromatografía de afinidad, corte de 6xHisTag con proteasa TEV y diálisis. (B) Análisis por SDS-PAGE 12% de los pasos de purificación y diálisis, y de los picos A, B y C obtenidos en (A). MPM: marcador de peso molecular en kDa.

calibración de la columna, sugiriendo que HemK_{Δ80} eluye como dímero. A continuación, se concentró mediante ultrafiltración; lamentablemente, en este paso, una fracción de HemK_{Δ80} precipitó, lográndose obtener una cantidad final de ~3 mg de HemK_{Δ80} por litro de cultivo, y una concentración final de 2,6 mg/mL.

Con el objetivo de continuar con la optimización, se procedió a analizar la termoestabilidad de HemK_{Δ80}. Las curvas de temperatura obtenidas para HemK_{Δ80} se muestran en la Figura 42. Las T_{onset} y T_M obtenidas tras el análisis de termoestabilidad de HemK_{Δ80} se muestran en la Tabla 19. En ausencia de ligandos, no se observaron diferencias claras en la termoestabilidad de HemK_{Δ80} entre las condiciones analizadas. Por otro lado, al realizar las curvas de temperatura en presencia de los ligandos, se observaron diferencias importantes que dependen mayormente de la concentración utilizada de Tris. En presencia de ATP, se observó que al emplear 50 mM Tris se observó mayor termoestabilidad de HemK_{Δ80} relativo a la condición con 25 mM Tris, y también relativo a HemK_{Δ80} sin ligando. Teniendo en cuenta que HemK_{Δ80} utiliza ATP como sustrato para su autofosforilación, estos resultados sugieren que P~HemK_{Δ80} es termodinámicamente más estable que el estado desfosforilado. Adicionalmente, a mayor concentración de amortiguador, la estabilidad térmica de P~HemK_{Δ80} es mayor.

En presencia de AMPPCP -un análogo no hidrolizable de ATP- se observó mayor termoestabilidad de HemK_{Δ80} empleando 50 mM Tris en comparación con la condición de 25 mM Tris, indicando una vez más que la concentración de amortiguador es un factor importante para la termoestabilidad de HemK_{Δ80} en presencia de ligando. No obstante, en la condición de 50 mM Tris se observó termoestabilidad similar entre HemK_{Δ80} incubada con AMPPCP y HemK_{Δ80} sin ligando. En suma, y comparando las condiciones de mayor concentración de amortiguador, la unión de AMPPCP no tiene un efecto significativo sobre la termoestabilidad de la proteína. Los resultados sugieren que es necesaria la hidrólisis de ATP y transferencia de su grupo fosforilo y a la His98, para una mayor termoestabilidad de HemK_{Δ80}.

En presencia de ADP, una vez más la condición de mayor termoestabilidad se observó al emplear una concentración de Tris 50 mM. En este contexto, los resultados indican que la unión de ADP estabiliza a HemK_{Δ80} a nivel de la T_{onset} de modo similar a lo que ocurre con la unión a ATP (aunque

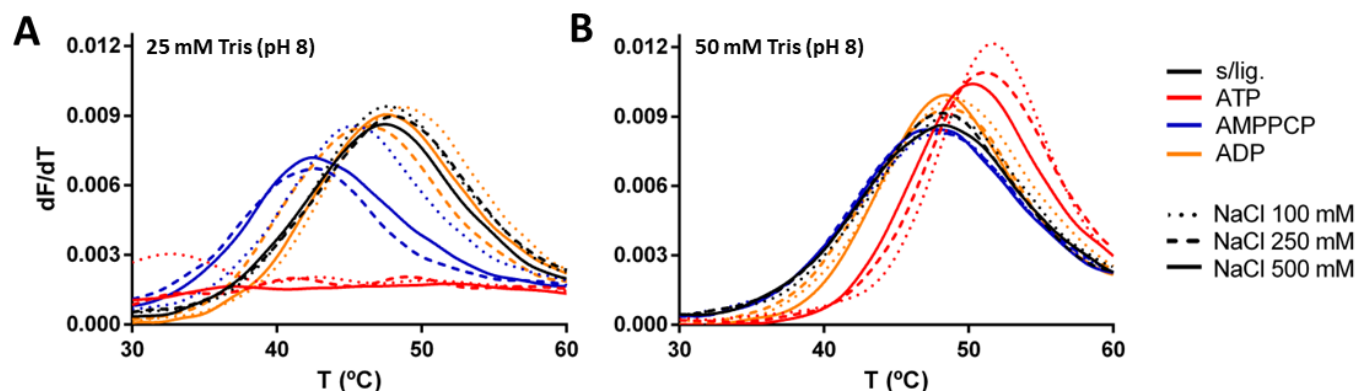


Figura 42. Curvas de fluorimetría diferencial de barrido de HemK Δ 80 recombinante en (A) 25 mM y (B) 50 mM Tris. A excepción de la muestra sin ligando, se incubó en todos los casos 5 mM ATP, AMPPCP o ADP, y 10 mM MgCl $_2$.

Tabla 19. Valores de T_{onset} y T_M obtenidos para HemK Δ 80 recombinante en diferentes condiciones.

Condición (en todos los casos con MgCl $_2$ 10 mM)	T_{onset} (°C)	T_M (°C)
Tris 25 mM pH 8, NaCl 100 mM	37,5	47,7
Tris 25 mM pH 8, NaCl 250 mM	36,7	48,1
Tris 25 mM pH 8, NaCl 500 mM	36,8	47,5
Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM	37,5	48,7
Tris 50 mM pH 8, NaCl 250 mM	36,7	48,2
Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM	37,0	48,3
Tris 25 mM pH 8, NaCl 100 mM, ATP 5 mM	N/D	N/D
Tris 25 mM pH 8, NaCl 250 mM, ATP 5 mM	N/D	N/D
Tris 25 mM pH 8, NaCl 500 mM, ATP 5 mM	N/D	N/D
Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, ATP 5 mM	44,2	51,7
Tris 50 mM pH 8, NaCl 250 mM, ATP 5 mM	42,3	51,2
Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, ATP 5 mM	41,6	50,3
Tris 25 mM pH 8, NaCl 100 mM, AMPPCP 5 mM	36,0	45,3
Tris 25 mM pH 8, NaCl 250 mM, AMPPCP 5 mM	33,4	42,4
Tris 25 mM pH 8, NaCl 500 mM, AMPPCP 5 mM	34,4	42,6
Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, AMPPCP 5 mM	36,6	48,1
Tris 50 mM pH 8, NaCl 250 mM, AMPPCP 5 mM	37,1	47,5
Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, AMPPCP 5 mM	37,0	47,6
Tris 25 mM pH 8, NaCl 100 mM, ADP 5 mM	38,4	48,8
Tris 25 mM pH 8, NaCl 250 mM, ADP 5 mM	36,3	46,2
Tris 25 mM pH 8, NaCl 500 mM, ADP 5 mM	37,2	47,6
Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, ADP 5 mM	38,8	49,0
Tris 50 mM pH 8, NaCl 250 mM, ADP 5 mM	37,5	48,6
Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, ADP 5 mM	39,3	48,3

en menor medida), pero no a nivel de la T_M . Cabe destacar que en el caso de $P\sim\text{HemK}_{\Delta 80}$, el producto formado tras la hidrólisis del ATP es precisamente ADP, quien presenta similar afinidad por el sitio de unión del dominio ABD que el ATP^{6,55,56}. Esto sugiere (i) que tanto ATP como ADP son importantes en la estabilidad termodinámica de $\text{HemK}_{\Delta 80}$, y (ii) que la autofosforilación en la His98 de $\text{HemK}_{\Delta 80}$ mediada por ATP, generando adicionalmente ADP como producto, otorga mayor estabilidad a esta variante. Finalmente, el uso de AMPPCP, un análogo no hidrolizable de ATP, no contribuye significativamente a la termoestabilidad de $\text{HemK}_{\Delta 80}$.

Se procedió a la producción y purificación de $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$ recombinante en el sistema de expresión *E. coli*. A diferencia de lo que ocurrió con $\text{HemK}_{\Delta 80}$, luego de la incubación con la proteasa TEV en diálisis, en este caso fue posible realizar una segunda cromatografía de afinidad previa a la exclusión molecular, con el fin de separar la proteasa de $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$. Se obtuvieron rendimientos similares de $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$ comparado a los rendimientos obtenidos para la purificación de $\text{HemK}_{\Delta 80}$ (Figura 43). Asimismo, el cromatograma obtenido indicó que $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$ eluye como dímero, al igual que $\text{HemK}_{\Delta 80}$, aunque con una menor proporción de proteínas que eluyeron en el volumen de exclusión (ver Figura 43, pico “A”). Al concentrar $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$ por ultrafiltración se observó que el rendimiento y concentración finales eran mayores a los obtenidos para $\text{HemK}_{\Delta 80}$, sugiriendo que la variante $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$ es más estable que $\text{HemK}_{\Delta 80}$. De esta manera se logró concentrar $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$ a una concentración final de 14,3 mg/mL.

Para profundizar con el análisis comparativo de estabilidad de $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$ relativo a $\text{HemK}_{\Delta 80}$, se realizó el análisis de termoestabilidad empleando 1 mg/mL de proteína (Figura 44, Tabla 20). Las curvas de temperatura obtenidas mostraron que $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$ es más termoestable que $\text{HemK}_{\Delta 80}$ en buffer con 50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl y 10 mM MgCl_2 , observándose una diferencia de +1,3 °C en la T_{onset} y de +0,4 °C en la T_M de $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$ relativo a $\text{HemK}_{\Delta 80}$. Además, en presencia de ATP 5 mM, se observó una diferencia de +0,7 °C en la T_{onset} y de +0,9 °C en la T_M de $\text{HemK}_{\Delta 80, T102A}$ relativo a $\text{HemK}_{\Delta 80}$ igualmente tratada.

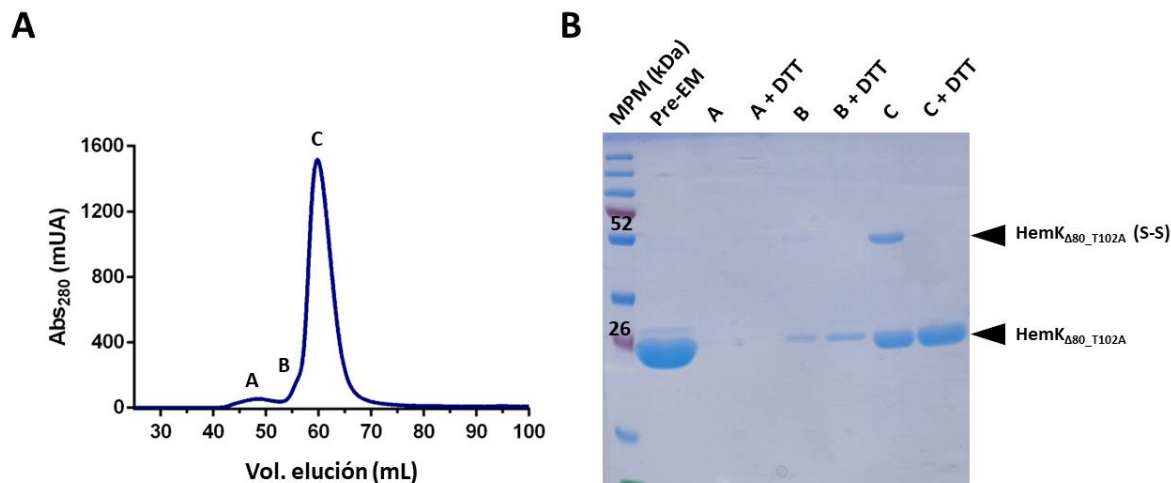


Figura 43. (A) Cromatograma de exclusión molecular de HemK $\Delta_{80,T102A}$ recombinante posterior a la cromatografía de afinidad y corte de 6xHisTag con proteasa TEV. (B) Análisis por SDS-PAGE 12% de los pasos de purificación y diálisis previos a la cromatografía de exclusión molecular (Pre-EM), y de los picos A, B y C obtenidos en (A). Se indican las bandas correspondientes a los monómeros de HemK $\Delta_{80,T102A}$, y dímeros artefactuales de HemK $\Delta_{80,T102A}$ formados por enlaces disulfuro (S-S) no reducidos en ausencia de DTT. MPM: marcador de peso molecular en kDa.

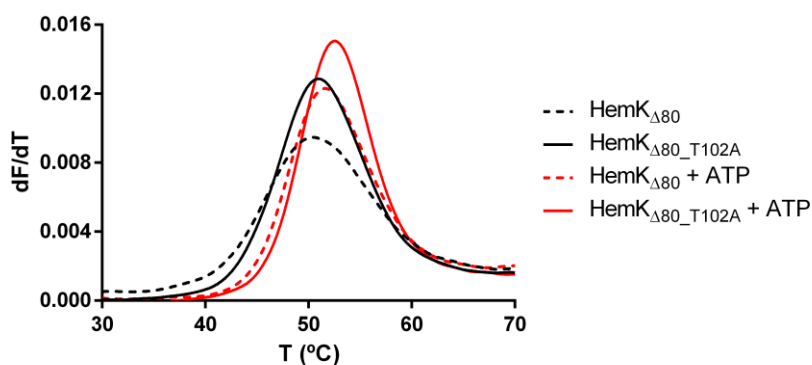


Figura 44. Curvas de fluorimetría diferencial de barrido de HemK Δ_{80} y HemK $\Delta_{80,T102A}$ recombinantes en presencia de 50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, sin o con 5 mM ATP según se indica en la Figura.

Tabla 20. Valores de T_{onset} y T_M obtenidos para HemK Δ_{80} y HemK $\Delta_{80,T102A}$ recombinantes en ausencia o presencia de 5 mM ATP. *: incubación en 50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl y 10 mM MgCl₂.

Variante*	T_{onset} (°C)	T_M (°C)
HemK Δ_{80}	41,6	50,6
HemK $\Delta_{80,T102A}$	42,9	51,0
HemK Δ_{80} + ATP 5 mM	45,3	51,7
HemK $\Delta_{80,T102A}$ + ATP 5 mM	46,0	52,6

Producción y purificación de variantes de HemR recombinantes

El espectro obtenido para la cromatografía de afinidad a Ni^{2+} de extractos solubles de *E. coli* con HemR recombinante sobreexpresada mostró dos picos, y el análisis por SDS-PAGE mostró que ambos correspondían a HemR (Figura 45). Los picos se alicuotaron en una sola muestra, obteniéndose aproximadamente 120 mg totales de proteína. Posteriormente, se incubó esta muestra con 3 mg de la proteasa TEV y se realizó diálisis *overnight*, seguido del segundo paso de purificación por afinidad a níquel que nos permitió separar HemR de la proteasa TEV. El análisis por SDS-PAGE confirmó que el corte del 6xHisTag fue exitoso (ver Figura 45B). Finalmente, la muestra se sometió a cromatografía de exclusión molecular en buffer 20 mM Tris pH 8 y 100 mM NaCl. El cromatograma mostró tres picos solapados, los cuales corresponden a HemR en diferentes estados oligoméricos, de acuerdo a la asignación de pesos moleculares aparentes según la calibración de la columna y el análisis por SDS-PAGE: los picos “A” y “B” corresponden a una población heterogénea de HemR, de estado oligomérico indefinido; el pico “C” corresponde a HemR monomérica, del cual se obtuvo muy buen rendimiento total; el pico “D”, mostró dos bandas de entre 10 y 15 kDa cada uno que corresponden a un clivaje inespecífico de HemR (Figura 46).

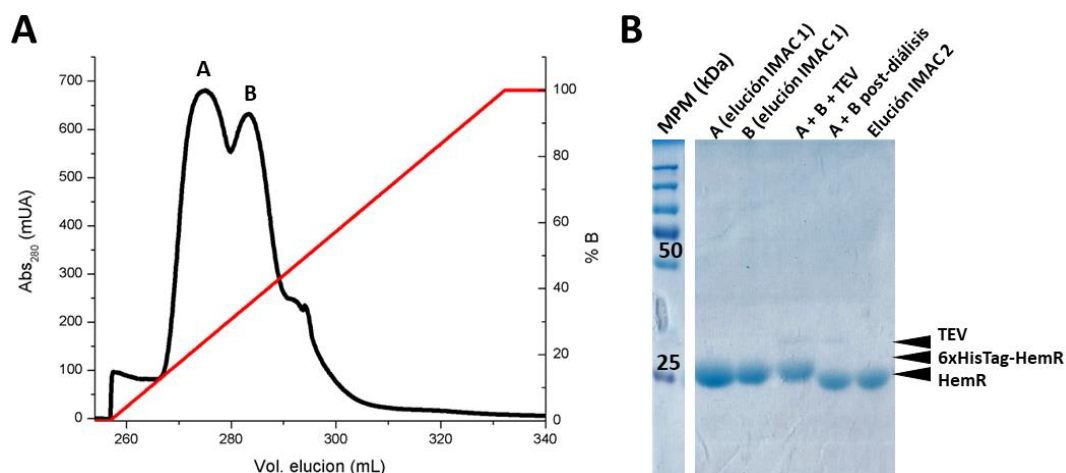


Figura 45. (A) Cromatograma de afinidad a níquel (IMAC) del extracto soluble de *E. coli* con HemR recombinante sobreexpresada. En negro se muestra absorbancia a 280 nm (Abs_{280}) y en rojo el gradiente de buffer de elución empleado (%B). (B) Análisis por SDS-PAGE 12% del tratamiento posterior a la cromatografía de afinidad. MPM: marcador de peso molecular en kDa.

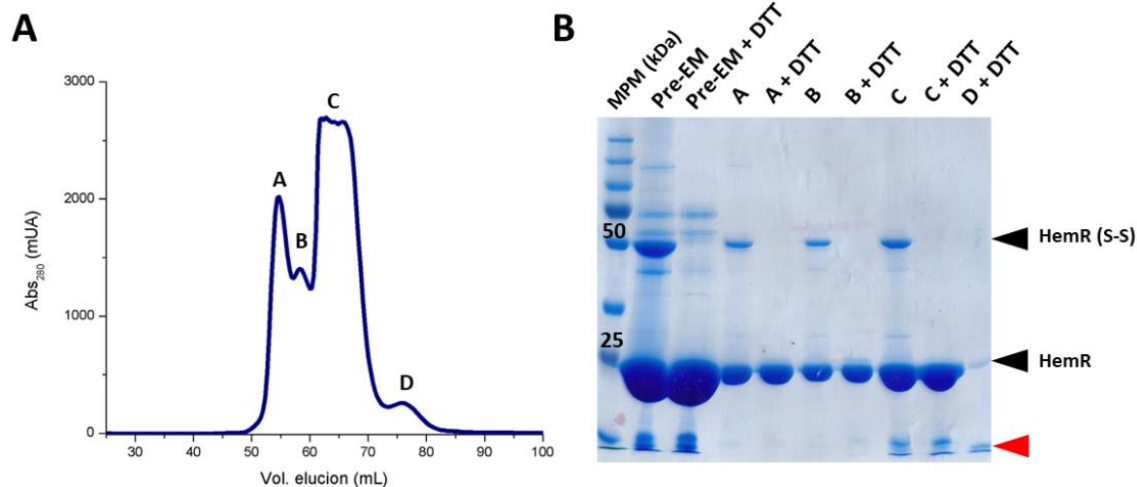


Figura 46. (A) Cromatograma correspondiente a la cromatografía de exclusión molecular de HemR recombinante posterior a la cromatografía de afinidad, corte de 6xHisTag con proteasa TEV, diálisis y segundo paso por columna de afinidad. (B) Análisis por SDS-PAGE 12% de los pasos de purificación y diálisis previos a la cromatografía de exclusión molecular (Pre-EM), y de los picos A, B, C y D obtenidos en (A). Se indican con flechas negras las bandas correspondientes a los monómeros de HemR, y dímeros artefactuales de HemR formados por enlaces disulfuro (S-S) no reducidos en ausencia de DTT; la banda correspondiente al clivaje inespecífico de HemR se indica con la flecha roja. MPM: marcador de peso molecular en kDa.

Con el fin de optimizar la purificación de HemR recombinante en el paso final de cromatografía por exclusión molecular, sobre todo para evitar su clivaje, se procedió a realizar un análisis de termoestabilidad de HemR en diferentes condiciones: en esta oportunidad se evaluó concentración de Tris, concentración de NaCl y diferentes pHs (Figura 47, Tabla 21). Para este análisis se utilizó el pico “C” de elución mayoritaria de HemR. Las curvas de termoestabilidad mostraron que la concentración de Tris (ver Figura 47A) y el pH de trabajo (ver Figura 47B) no contribuyeron significativamente a la termoestabilidad de HemR; a excepción de la condición de 25 mM Tris en donde se observó que a baja fuerza iónica, el pH afecta la termoestabilidad de la proteína (ver Figura 47B). No obstante, sí se observó que, a mayor fuerza iónica, mayor es la termoestabilidad de HemR. Esto sugiere que, para la purificación de HemR recombinante, es preferible emplear una concentración más elevada de NaCl, lo que podría resultar en la obtención de proteína recombinante más estable evitando su clivaje. Basados en estos datos,

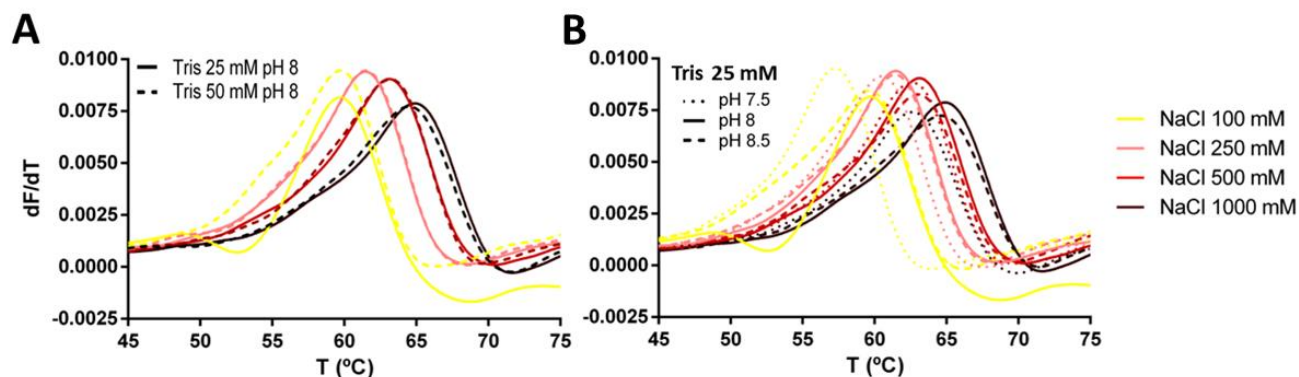


Figura 47. Curvas de fluorimetría diferencial de barrido de HemR recombinante con (A) diferentes concentraciones del amortiguador Tris y (B) diferentes pH de trabajo a 25 mM Tris.

Tabla 21. Valores de T_{onset} y T_M obtenidos para HemR recombinante en diferentes condiciones.

Condición	T_{onset} (°C)	T_M (°C)
Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 100 mM	46,7	57,2
Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 250 mM	49,9	60,4
Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 500 mM	51,8	62,5
Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 1000 mM	52,2	62,5
Tris 25 mM pH 8, NaCl 100 mM	N/D	59,6
Tris 25 mM pH 8, NaCl 250 mM	50,9	61,3
Tris 25 mM pH 8, NaCl 500 mM	48,4	63,0
Tris 25 mM pH 8, NaCl 1000 mM	52,1	64,8
Tris 25 mM pH 8,5, NaCl 100 mM	46,0	59,4
Tris 25 mM pH 8,5, NaCl 250 mM	45,6	61,3
Tris 25 mM pH 8,5, NaCl 500 mM	51,0	62,9
Tris 25 mM pH 8,5, NaCl 1000 mM	53,4	64,4
Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM	46,3	58,8
Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 250 mM	49,6	60,4
Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM	53,9	62,6
Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 1000 mM	53,7	63,7
Tris 50 mM pH 8, NaCl 100 mM	50,1	59,6
Tris 50 mM pH 8, NaCl 250 mM	51,2	61,4
Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM	52,3	63,0
Tris 50 mM pH 8, NaCl 1000 mM	53,8	64,3
Tris 50 mM pH 8,5, NaCl 100 mM	46,5	59,3
Tris 50 mM pH 8,5, NaCl 250 mM	49,3	61,2
Tris 50 mM pH 8,5, NaCl 500 mM	52,4	62,7
Tris 50 mM pH 8,5, NaCl 1000 mM	53,3	64,1

se decidió repetir el proceso de purificación de HemR recombinante, esta vez empleando un buffer con 25 mM Tris pH 8 y 500 mM NaCl en el paso de purificación por gel filtración. El cromatograma obtenido tras diálisis y gel filtración en las condiciones descritas anteriormente mostró una mejora considerable en la obtención de HemR pura, homogénea y con buenos rendimientos: se obtuvieron tres picos no solapados, que fueron analizados por SDS-PAGE (Figura 48). El pico “A” correspondió a contaminantes que eluyeron en el volumen de exclusión; el pico “B” correspondió a HemR dimérica, de acuerdo con el peso molecular asignado según la curva de calibración de la columna. El pico “C” correspondió a HemR monomérica, de la cual se obtuvieron ~50 mg totales de proteína recombinante, que fueron concentradas por centrifugación a una concentración final de 73 mg/mL. Se observó que las muestras presentan menor grado de contaminantes, y que HemR no se cliva en estas condiciones de purificación.

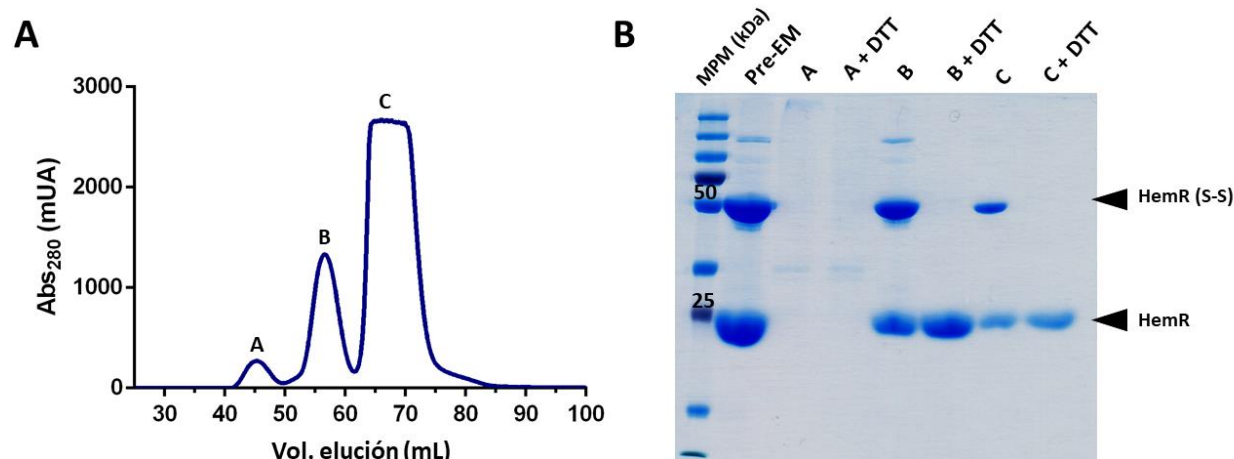


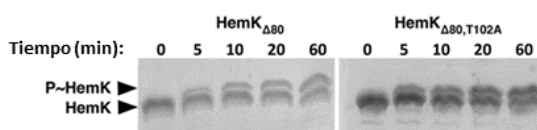
Figura 48. (A) Cromatograma correspondiente a la cromatografía de exclusión molecular de HemR recombinante en condiciones de purificación optimizadas; posterior a la cromatografía de afinidad, corte de 6xHisTag con proteasa TEV, diálisis y segundo paso por columna de afinidad. (B) Análisis por SDS-PAGE 12% de los pasos de purificación y diálisis previos a la cromatografía de exclusión molecular (Pre-EM), y de los picos A, B y C obtenidos en (A). Se indican con flechas negras las bandas correspondientes a los monómeros de HemR, y dímeros artefactuales de HemR formados por enlaces disulfuro (S-S) no reducidos en ausencia de DTT. MPM: marcador de peso molecular en kDa.

Para la producción y purificación de una variante de HemR que consta únicamente de su dominio receptor (HemR_{REC}), se empleó el protocolo que resultó en la obtención de la estructura cristalográfica de HemR_{REC} a 1,4 Å, descrito por Morero y colaboradores²⁶¹, con la excepción de que se empleó Tris pH 8 para la cromatografía de afinidad a níquel inmovilizado en lugar de buffer fosfato salino pH 7,5. Siguiendo este protocolo, se logró obtener 11 mg finales de proteína pura, soluble y homogénea por litro de cultivo, que se concentraron hasta obtener 28 mg/mL finales de proteína para utilizar en ensayos de actividad enzimática.

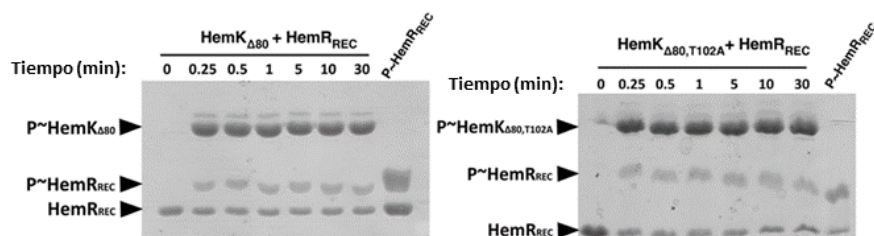
Análisis cualitativo *in vitro* de actividad de las variantes de HemK y HemR recombinantes

Para continuar profundizando en el mecanismo molecular de transmisión de información en el SDC HemKR, se evaluó mediante PhosTag-SDS-PAGE la actividad de las variantes de HemK sobre HemR_{REC} o HemR *full-length* (HemR_{FL}) recombinantes (Figura 49). En primer lugar, se analizaron las actividades autoquinasa de las variantes HemK_{Δ80} y HemK_{Δ80,T102A} (Figura 49A). Tras incubar dichas variantes con ATP, en ambos casos se observó la aparición de una banda de mayor peso molecular aparente, correspondiente a P~HemK, al cabo de 5 min de experimento; asimismo, no se observaron diferencias cualitativas importantes en la actividad autoquinasa de HemK_{Δ80} en comparación con HemK_{Δ80,T102A}. Posteriormente, se analizó la actividad fosfotransferasa de HemK_{Δ80} y HemK_{Δ80,T102A} hacia HemR_{REC} en presencia de un exceso de ATP (Figura 49B); en ambos casos se observó una rápida fosfotransferencia desde P~HemK hacia HemR_{REC} (*i. e.*, al cabo de 15 s de experimento). Finalmente, se analizó la actividad fosfatasa HemK_{Δ80} y HemK_{Δ80,T102A} sobre P~HemR_{REC} (Figura 49C). No se observó desfosforilación de P~HemR_{REC} mediada por HemK_{Δ80,T102A} en línea con el rol esencial de la Thr102 en la actividad fosfatasa de esta HQ; sin embargo, tampoco se detectó desfosforilación de P~HemR_{REC} mediada por HemK_{Δ80} en estas condiciones experimentales. Según estudios previos, el DBD del RR⁴⁸, o bien, de ADP⁵⁴, puede asistir a la actividad fosfatasa de HQs de la familia HiskA; no obstante, no se observó actividad fosfatasa de HemK_{Δ80} sobre P~HemR_{FL}, tanto en ausencia como presencia (ver Figura 49C) de ADP. Consistente con lo observado para otras HQs³⁰³, no se detectó actividad fosfotransferasa reversa desde P~HemR hacia HemK en ningún caso.

A Actividad autoquinasa de HemK:



B Actividad fosfotransferasa de P~HemK hacia HemR:



C Actividad fosfatasa de HemK sobre P~HemR:

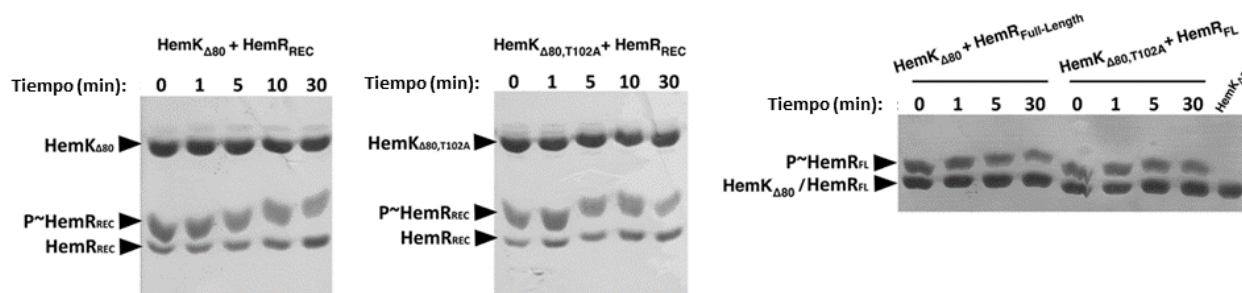


Figura 49. (A) Autofosforilación de HemK_{Δ80} (panel izquierdo) y la variante sin actividad fosfatasa HemK_{Δ80,T102A} (panel derecho), incubados con 5 mM ATP y 10 mM MgCl₂ en los tiempos indicados. (B) Fosfotransferencia de P~HemK_{Δ80} (panel izquierdo) y P~HemK_{Δ80,T102A} (panel derecho) hacia HemR_{REC} en presencia de 5 mM ATP y 10 mM MgCl₂. En ambos geles se sembró P~HemR_{REC} como referencia de migración. (C) Desfosforilación de P~HemR_{REC} (paneles izquierdo y central) y P~HemR *full length* (P~HemR_{FL}; panel derecho) mediada por HemK_{Δ80} o HemK_{Δ80,T102A} cuando se indica. En el gel correspondiente al panel izquierdo se sembró HemK_{Δ80} como referencia de migración; nótese que HemR_{FL} y HemK_{Δ80} migran a la misma altura del gel. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, y se muestran en la Figura geles representativos de cada experimento.

En suma, los resultados obtenidos mediante PhosTag-SDS-PAGE sugieren fuertemente que HemK_{Δ80}, una variante de HemK que consta únicamente de su módulo catalítico (es decir, sin sus dominios periplásmico y transmembrana), se encuentra “atrapada” en el estado quinasa (*i. e.*, autoquinasa y fosfotransferasa), constitutivamente activo. Integrando estos datos con lo

observado en cultivos de *L. biflexa* mediante PhosTag-SDS-PAGE + *Western blot*, en donde se observó actividad fosfatasa de HemK sobre HemR en presencia de 5ALA (ver Figura 39), es posible anticipar un rol importante del dominio periplásmico y/o transmembrana de HemK para la transición hacia el estado apagado, es decir, su actividad fosfatasa, gatillado por la presencia de 5ALA.

En este Objetivo Específico, estaba previsto obtener las estructuras cristalográficas de HemK recombinante en complejo con HemR. Sin embargo, luego de un extenso esfuerzo de rastreo de condiciones de cristalogénesis, no se lograron obtener cristales de HemK_{Δ80} sola, ni en complejo con HemR o HemR_{REC}. Para estos ensayos se utilizaron las proteínas recombinantes puras, lanzando rastreos con >500 condiciones (kits comerciales NeXtal DWBlock JCSG Core I-IV Suites® y PEG Suite® (Qiagen), y Crystal Screens 1-2® (Hampton Research), en el formato de difusión de vapor en gota sentada. Los ensayos se condujeron en placas CrystalQuick® (Greiner) de 96 pocillos con asistencia de una plataforma robótica Honeybee963® (Digilab) para el dispensado (300 nL proteína + 300 nL reservorio en la gota, con 90μL de cada licor madre en el reservorio). Las placas se incubaron a 20 °C y 4 °C, con visualización periódica utilizando un sistema semi-automático de toma de fotos (CrysCam®, Art Robbins).

Objetivo Específico 3: caracterización estructural preliminar de HemX, una proteína codificada en las proximidades del operón hemKR en *L. biflexa*.

Análisis *in silico* de la estructura primaria de HemX

El análisis de características bioquímicas y biofísicas predichas a partir de la secuencia aminoacídica de HemX (Figura 50), empleando el *software* XtalPred, reveló la presencia de un péptido señal N-terminal; dichos motivos son importantes para determinar la localización subcelular, traslocación al periplasma o exportación de las proteínas. Un análisis más profundo utilizando el *software* SignalP indicó que la maquinaria más probablemente involucrada en el procesamiento del péptido señal es la del tipo Sec, y el sitio de corte más probable del péptido señal es la Gly21 (Figura 51). Teniendo en cuenta estas predicciones, es que decidimos subclonar el marco abierto de lectura codificante de HemX en el vector de expresión pQE80L truncando los 21 aminoácidos del extremo N-terminal, y generando el plásmido pQE80L_HemX_{Δ21}. Además, se subclonó otra variante de HemX, truncando 54 aminoácidos del extremo N-terminal, apuntando a evitar posibles regiones que, si bien no están predichas como desordenadas, tampoco se predice una estructura secundaria clara. Así, se generó el plásmido pQE80L_HemX_{Δ54}.

```
1...*...10...*...20...*...30...*...40...*...50...*...60...*...70...*...80...*...90...*...100
MKQGILYSLFLGSLFSVSLGANETDIDYNYEYKNGPYTKFSDWVPYKLHKWEPKYLEDFYELYNLKQHYNDNELRKNIYWLKIALNKRFRHPKHALCE
....*...110...*...120...*...130...*...140...*...150...*...160...*...170...*...180...*...190...*...200
TKTEQEYYKYRNLMFMHINIQIMRSYMRIASKFDKRHVYFYNLDFAHELKESFGVAESFYKEAIPYWEKAKEYADKANEVPVDLDLGTIETERYQIVTGK
....*...210...*...220...*...230...*...240.
LDFGQIIETHLDRLDGKKKIVSEYLAKEYPEADAKALDLIDR
```

Figura 50. Predicción de estructuras secundarias de HemX mediante el *software* XtalPred. En naranja se resalta el péptido señal predicho por SignalP. Se indica en subrayado regiones desordenadas, en rojo regiones predichas como α -hélices, y en azul regiones predichas como láminas β .

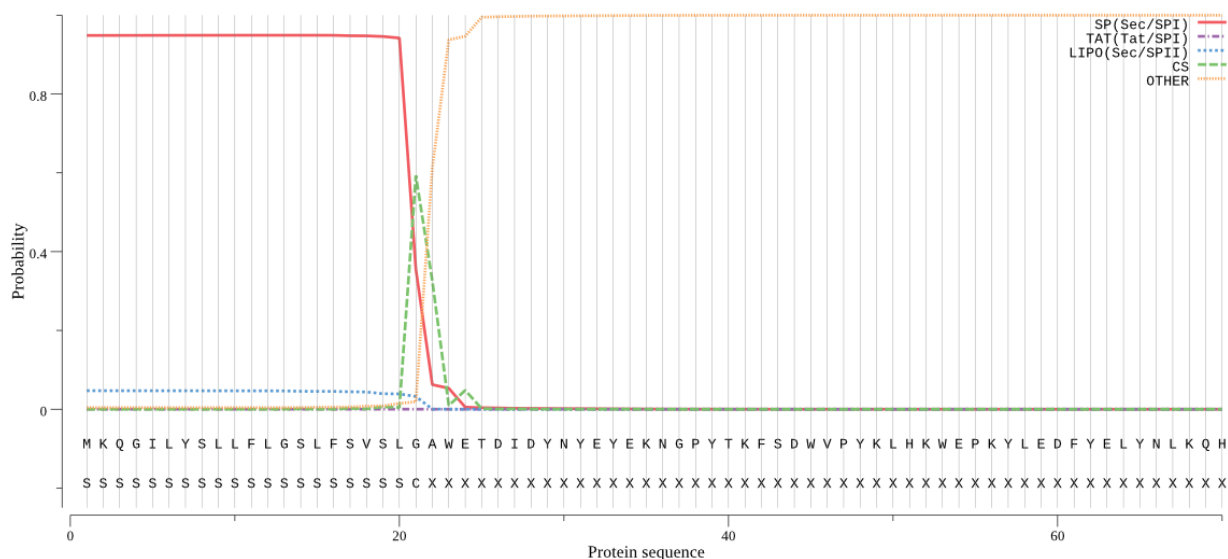


Figura 51. Detalle de la predicción del péptido señal mediante el *software* SignalP. El eje de ordenadas indica la probabilidad de que un residuo de la secuencia proteica forme parte de un péptido señal. Los códigos de colores de las líneas corresponden a los distintos tipos de sistemas de secreción (esquina superior derecha) que más probablemente participen en el procesamiento (traslocación y clivaje) del péptido señal (líneas sólidas) y el sitio de clivaje (línea punteada).

Producción y purificación de HemX recombinante

En primer lugar, se expresó HemX Δ_{21} recombinante usando la cepa de *E. coli* TOP10F', e induciendo con 0,1 ó 1 mM IPTG a 30 °C por 6 h. Los extractos totales y solubles de las bacterias inducidas y no inducidas se analizaron por SDS-PAGE (Figura 52A). El análisis mostró que HemX Δ_{21} se expresa mayoritariamente de forma insoluble, indistintamente de la concentración empleada del inductor, dado que no se observó la banda correspondiente a HemX Δ_{21} en los extractos solubles. No obstante, se observó fortuitamente la aparición de una banda de menor masa molecular aparente en los extractos solubles, que no está presente en el extracto de bacterias no inducidas con IPTG: esto sugirió fuertemente que la banda corresponde a una forma clivada de HemX. Es por esto que se realizó espectrometría de masa de dicha banda, y se confirmó que efectivamente se trata de HemX clivada en su extremo N-terminal (Figura 52B).

Teniendo en cuenta estos resultados, y apuntando a tener mayor rendimiento soluble de proteína recombinante, se procedió a hacer un ensayo de expresión de la construcción HemX Δ_{54}

en la cepa de *E. coli* TOP10F', induciendo con 1 mM IPTG a 20, 30 y 37 °C por 14, 6 y 3 h, respectivamente. Los extractos totales y solubles de las bacterias inducidas y no inducidas se analizaron por SDS-PAGE (Figura 53). El análisis mostró que HemX_{Δ54} se expresó de forma soluble en todas las condiciones testeadas. Sin embargo, en estos casos también se observó la aparición de una banda de menor peso molecular aparente, correspondiente a HemX clivada. Es así que, para la producción y purificación a gran escala de HemX_{Δ54} recombinante, se eligió la condición en donde se observó la menor proporción de proteína recombinante inespecíficamente clivada respecto a no clivada, es decir, induciendo con 1 mM IPTG a 37 °C por 3 h.

En el primer paso de purificación, el extracto soluble de bacterias inducidas se sometió a cromatografía de afinidad a níquel inmovilizado. Notablemente, luego de pasar la muestra por la columna, se observó que ésta última tornó a un color violeta (Figura 54A). La coloración violeta desapareció luego de eluir la proteína adsorbida a la columna. El espectro obtenido tras la cromatografía de afinidad a níquel de extractos solubles de *E. coli* con HemX_{Δ54} recombinante sobreexpresada mostró dos picos: un pico de elución temprana (1) y otro de elución tardía (2),

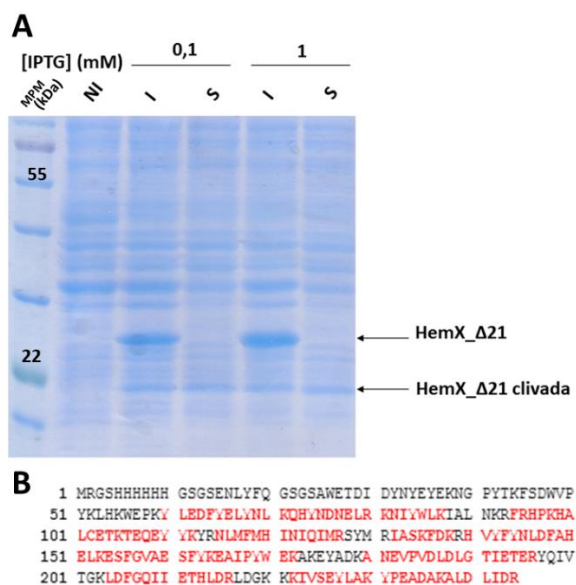


Figura 52. (A) Análisis por SDS-PAGE 12% de la expresión de HemX_{Δ21} recombinante. Se indican los carriles correspondientes a muestras de las bacterias no inducidas (NI), inducidas (I) con 0,1 ó 1 mM IPTG, y la fracción soluble (S) de las muestras inducidas. MPM: marcador de peso molecular en kDa. (B) Identificación y confirmación por espectrometría de masa de la identidad de HemX_{Δ21} clivada inespecíficamente hacia el extremo N-terminal. Los péptidos identificados mediante la técnica se indican en rojo.

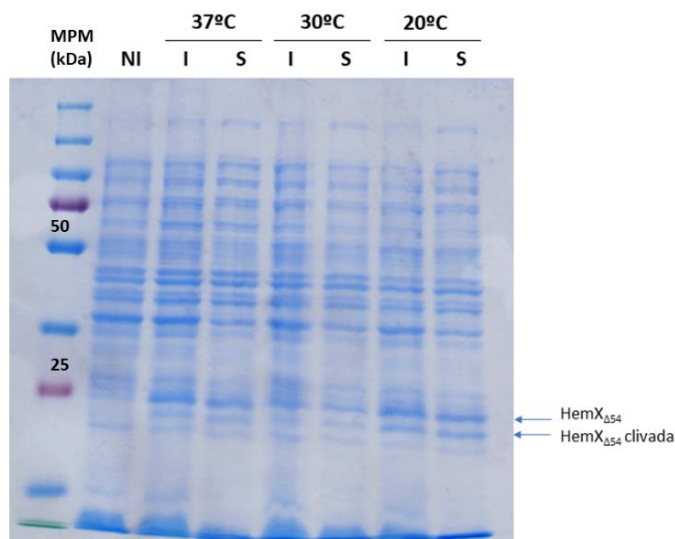


Figura 53. Análisis por SDS-PAGE 12% de la expresión de HemX_{Δ54} recombinante. Se indican los carriles correspondientes a muestras de las bacterias no inducidas (NI), inducidas (I) con IPTG 0,1 ó 1 mM, y la fracción soluble (S) de las muestras inducidas, a diferentes temperaturas de inducción. MPM: marcador de peso molecular en kDa.

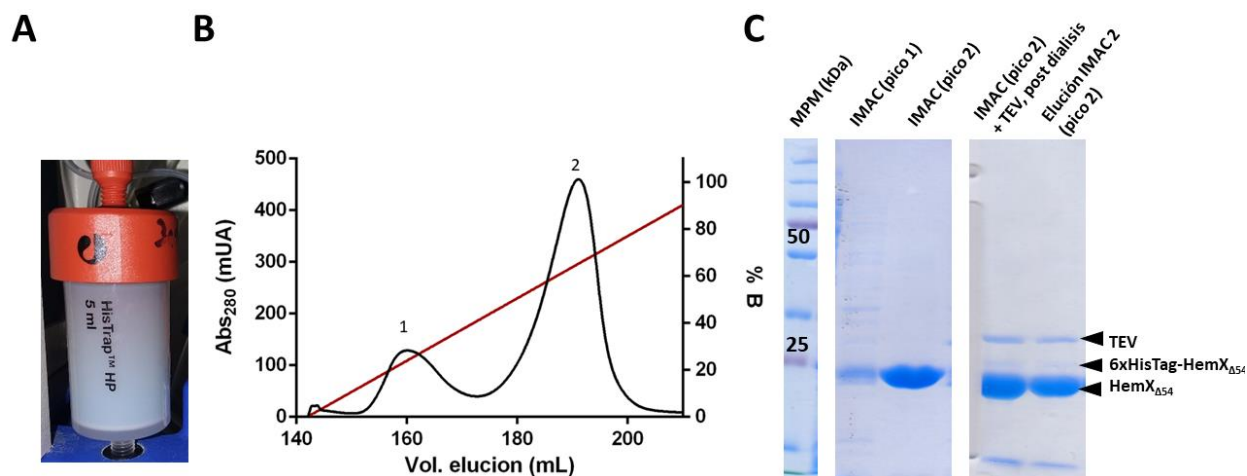


Figura 54. (A) Coloración violeta en la columna de níquel luego de pasar el extracto soluble de *E. coli* con HemX_{Δ54} recombinante sobreexpresada. (B) Cromatograma obtenido para la cromatografía de afinidad a níquel del extracto soluble de *E. coli* con HemX_{Δ54} recombinante sobreexpresada. En negro se muestra el espectro de absorción a 280 nm (Abs₂₈₀) y en rojo el gradiente de buffer de elución empleado (%B). (C) Análisis por SDS-PAGE 12% de los pasos de purificación, corte del 6xHisTag con proteasa TEV y diálisis de los picos 1 y 2 obtenidos en (B). MPM: marcador de peso molecular en kDa.

en los cuales se obtuvieron 4 y 14 mg de proteína por litro de cultivo, respectivamente (Figura 54B). Las eluciones correspondientes a los picos obtenidos se sometieron a diálisis en presencia de la proteasa TEV. El análisis por SDS-PAGE de alícuotas tomadas en cada paso experimental (Figura 54C) mostró que el pico 1, correspondiente a la elución temprana de HemX_{Δ54}, eluyó con impurezas y en bajas cantidades. Por otra parte, HemX_{Δ54} presente en el pico 2, de elución tardía, presentó mayor cantidad y grado de pureza de proteína recombinante comparado a lo observado en el pico 1. El análisis por gel mostró que se clivó exitosamente el 6xHisTag N-terminal de HemX_{Δ54}, y la segunda cromatografía de afinidad, posterior a la diálisis y clivado, resultó en la elución de HemX_{Δ54} soluble y en cantidad suficiente para afrontar el paso final de cromatografía por exclusión molecular. Cabe destacar que la elución de la segunda cromatografía por afinidad presentó trazas de la proteasa TEV, que coeluyó con HemX_{Δ54} sin el 6xHisTag.

El espectro obtenido tras el paso final de purificación por gel filtración mostró dos picos de elución temprana minoritarios, y un tercer pico de elución tardía mayoritario (Figura 55A). El análisis por SDS-PAGE de los picos obtenidos mostró que el pico 1 consistió en una especie oligomérica de HemX_{Δ54}; el pico 2 correspondió a trazas de la proteasa TEV que coeluyeron; y el pico 3 mayoritario al monómero de HemX_{Δ54} (Figura 55B). El rendimiento final obtenido de HemX_{Δ54} fue muy bajo, puesto que una fracción importante de la proteína precipitó durante el paso final de concentración.

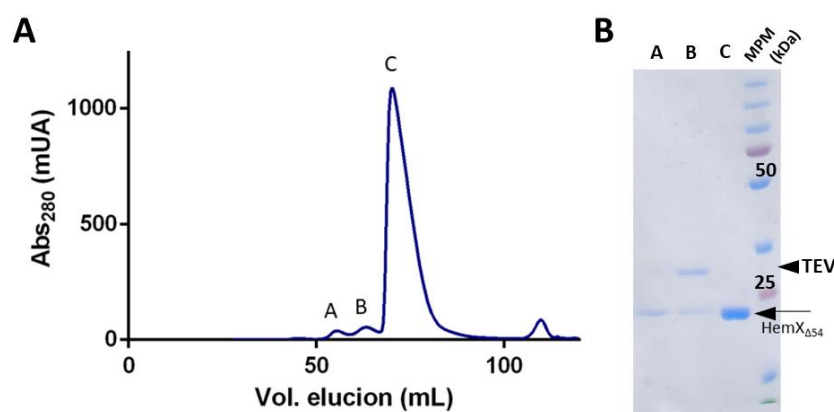


Figura 55. Cromatograma correspondiente a la cromatografía de exclusión molecular de HemK_{Δ54} recombinante posterior a la cromatografía de afinidad, corte de 6xHisTag con proteasa TEV y diálisis. (B) Análisis por SDS-PAGE 12% de los pasos de purificación y diálisis, y de los picos A, B y C obtenidos en (A). MPM: marcador de peso molecular en kDa.

Estructura tridimensional de HemX predicha con Alphafold2

Empleando el *software* PyMOL, se analizó la estructura tridimensional predicha por Alphafold2 (Figura 56A). En primer lugar, se observó una región N-terminal correspondiente al péptido señal de 21 AAs, seguido por una región desordenada de 33 AAs aproximadamente, consistente con el *rationale* de las construcciones HemX Δ 21 y HemX Δ 54. Esta región intrínsecamente desordenada (RID), que se extiende hasta el residuo Asn72 (a excepción de dos estructuras secundarias en forma de α -hélice que se predicen entre los residuos Phe42 y Trp45, y los residuos Leu57 y Leu64), presentó niveles bajos de profundidad de secuencias en los alineamientos múltiples de secuencia, así como de *scores* pLDDT, parámetro importante para estimar la confiabilidad de la predicción estructural (Figura 56B). No obstante, las RIDs son difíciles de modelar estructuralmente debido a su propia naturaleza desordenada, por lo que podría tratarse de una auténtica RID, para las que es esperable que los niveles de pLDDT sean bajos. Por otra parte, hacia el C-terminal de la Asn72, la estructura predicha para HemX presentó altos valores de cobertura de secuencia y de pLDDT, indicando que el modelo obtenido por Alphafold2 es fiable, y probablemente represente fielmente la estructura nativa de HemX. El hecho de haber observado clivaje inespecífico del extremo N-terminal de HemX recombinante al sobreexpresarla, contribuye a la noción de que efectivamente se trata de una RID, que son motivos más propensos a la proteólisis³⁰⁴. Notablemente, al realizar un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de ortólogos de HemX en *Leptospira* spp., se observó que esta RID se encuentra altamente conservada (Figuras Suplementarias 1 y 2), sugiriendo una importancia funcional de esta región en HemX.

HemX poseería 5 α -hélices (ver Figura 52): las α -hélices 1 (de Asp73 a Asn88), 2 (Glu104-Phe133), 3 (Ala146-Glu179) y 5 (Phe203-Lys227) se disponen en forma de haz, mientras que la α -hélice 4 (Thr188-Thr198), de menor longitud, se dispone de modo aproximadamente perpendicular a dicho haz. Asimismo, existirían 2 bucles relativamente largos conectando las α -hélices 1 y 2 (bucle 1, de Lys89 a Thr103), y las α -hélices 2 y 3 (bucle 2, Asp134-Phe145), y 2 bucles de menor longitud entre las α -hélices 3 y 4 (bucle 3, Val180-Gly187), y 4 y 5 (bucle 4, Gly199-Asp202). En el extremo

C-terminal de HemX, entre los residuos Tyr228 y Arg241, habría una región parcialmente desestructurada, en donde se predice la formación de estructuras secundarias en α -hélice entre los residuos Phe229 y Ala231, y los residuos Ala235 y Asp240.

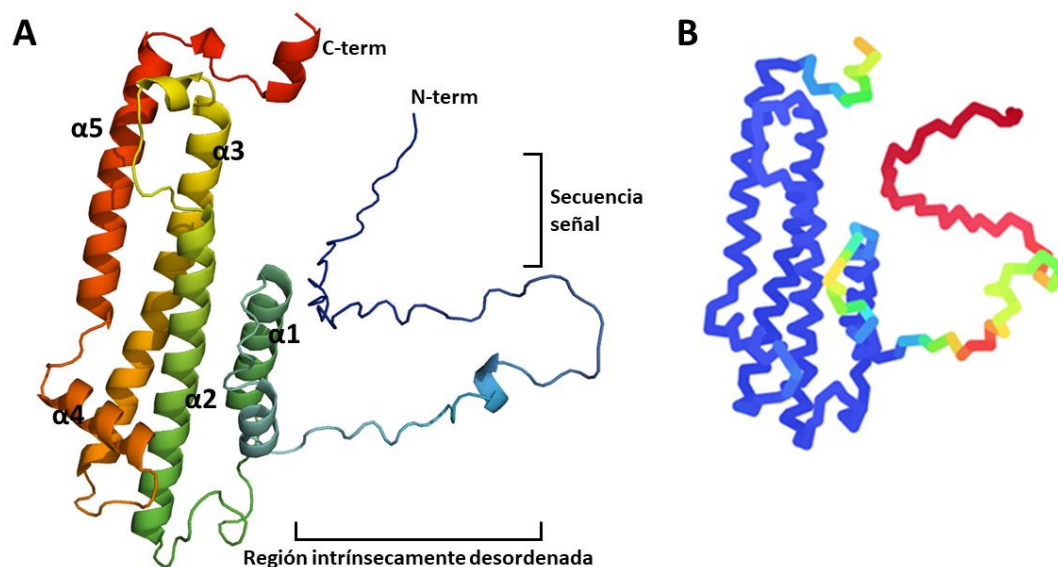


Figura 56. (A) Estructura de HemX predicha por el *software* AlphaFold2. El gradiente de colores indica extremo N-terminal (azul) y C-terminal (rojo). Se indican los nombres de las α -hélices (" α "), el péptido señal N-terminal (PS, coloreado en blanco) y la región intrínsecamente desordenada (RID). (B) Fidelidad de la predicción estructural de HemX coloreada de acuerdo con el índice pLDDT. El gradiente de colores va de mayor fiabilidad (azul) a menor fiabilidad de predicción (rojo).

Análisis de la estructura y plegamiento de HemX: inspección preliminar de posibles funciones

HemX se encuentra codificada en la proximidad del operón *hemKR* en *L. biflexa*, y como se mencionó previamente, es posible que HemX se encuentre funcionalmente vinculada a HemKR. Es por esto que se analizaron propiedades fisicoquímicas de HemX como la densidad neta de cargas electrostáticas en la superficie accesible al solvente, y la presencia de cavidades o huecos que puedan estar vinculadas a interacciones con otras moléculas (Figura 57). El análisis mostró la presencia de dos concavidades claramente distinguibles, una formada por la disposición de las α -hélices 1, 2 y 3, y la región C-terminal parcialmente desestructurada (ver Figura 57, concavidad

1), y otra formada por la disposición de las α -hélices 2, 4 y 5 (ver Figura 57, concavidad 2). La superficie de la concavidad 1 se encuentra rodeada de cargas electrostáticas positivas derivadas de residuos de lisina y arginina de las α -hélices 1, 2 y 3; y cargas negativas derivadas de residuos de glutamato y aspartato correspondientes a la región C-terminal. La superficie de la concavidad 2 presenta mayoritariamente carga neutra, sin embargo, se rodea de cargas electrostáticas positivas derivadas de lisinas y argininas de las α -hélices 1, 2 y 3 (al igual que la concavidad 1), y de cargas negativas derivadas de residuos de glutamato y aspartato de los bucles 1 y 3, y del extremo N-terminal de la α -hélice 2.

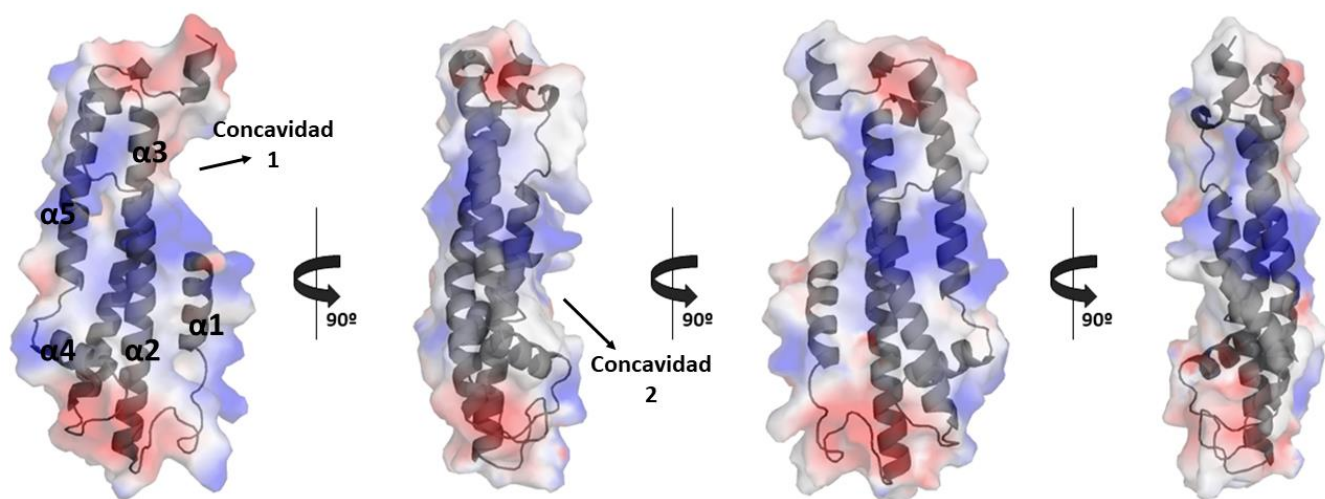


Figura 57. Densidad neta de cargas electrostáticas en la superficie de HemX accesible al solvente. En rojo y azul se indican parches con carga negativa y positiva, respectivamente.

Para analizar el tipo de plegamiento que presenta HemX, se utilizó el *software* DALI, que a partir de la información estructural del archivo .pdb generado por Alphafold, realiza una búsqueda en la base de datos de proteínas con plegamiento similar. Una vez obtenida la lista de *hits*, observamos que había dos proteínas depositadas en la base de datos que cumplían con un criterio arbitrariamente establecido para identificar aquellas con plegamientos similares a HemX (Tabla 22): ambas proteínas presentan estructuras compuestas por α -hélices y un plegamiento del tipo 14-3-3 (PDB: 2V0P y 2BTP)^{305,306}, que suelen cumplir funciones de interacción proteína:proteína o péptido:proteína. Es importante destacar que en ambos casos la identidad

de secuencia con HemX fue muy baja; sin embargo, la identidad estructural indicada por el parámetro *rmsd*, de 3.6 y 3.0 Å respectivamente, indicó que HemX es estructuralmente similar al menos a una región de estas proteínas. La existencia de plegamientos similares entre proteínas de secuencias aminoacídicas muy distintas ha sido reportada exhaustivamente³⁰⁷.

Tabla 22. Primeros 15 *hits* obtenidos para el tipo de plegamiento de HemX mediante el servidor DALI En negrita se indican las proteínas depositadas en la base de datos PDB que cumplieron con los criterios designados arbitrariamente (Z-score mayor a 7, rmsd menor a 4 Å). En itálica se indican proteínas que si bien no cumplieron con la totalidad de estos criterios, presentaron rmsd ligeramente mayor (entre 4 y 6 Å) y/o se cubrió un porcentaje de alineamiento de secuencia (%align) mayor a 50 %. %align es resultado de la división entre longitud de alineamiento (lali) y número total de residuos de la cadena (nres). %id: porcentaje de identidad de secuencia.

Descripción (PDB)	Rank	PDB ID-Cadena	Z-score	<i>rmsd</i> (Å)	<i>lali</i>	<i>nres</i>	%align	%id
NUCLEAR IMPORT ADAPTOR, NRO1	1	3msv-A	9	4.2	115	352	32.7	12
HYPOTHETICAL PROTEIN	2	4i17-A	8.4	9.8	129	224	57.6	9
BRO1 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN BROX	3	3zxp-A	8	15.8	156	394	39.6	10
TYPE 2A PHOSPHATASE-ASSOCIATED PROTEIN 42	4	2v0p-A	7.8	3	127	219	58.0	6
AF4/FMR2 FAMILY MEMBER 4	5	6kn5-A	7.7	5.1	119	225	52.9	7
IMMUNOGLOBULIN-BINDING PROTEIN 1	6	4iyp-A	7.6	4.6	130	205	63.4	10
SEC72	7	5l0w-B	7.4	9.9	111	209	53.1	11
MITOCHONDRIAL IMPORT RECEPTOR SUBUNIT TOM70	8	7dhg-C	7.3	8.8	105	470	22.3	15
PUTATIVE PEPTIDYLPROLYL ISOMERASE	9	3rkv-A	7.3	5.5	107	147	72.8	12
14-3-3 PROTEIN TAU	10	2btp-A	7.3	3.6	112	248	45.2	5
G-PROTEIN-SIGNALING MODULATOR 2, AFADIN	11	5a6c-B	7.2	9.9	117	369	31.7	8
HYPOTHETICAL PROTEIN	12	2hr2-B	7.2	4.8	105	157	66.9	11
DNA-DEPENDENT PROT KINASE CATALYTIC SUBUNIT	13	7k10-A	7.2	19.2	145	1259	11.5	6
COP9 SIGNALOSOME COMPLEX SUBUNIT 2,ENDOLYSIN;	14	6a73-A	7.2	10.2	111	290	38.3	8
HSP70/HSP90 CO-CHAPERONE CNS1;	15	6hft-A	7.1	7.9	113	312	36.2	11

Cabe destacar que hubo cinco *hits* adicionales (PDB IDs: 3MSV³⁰⁸; 6KN5³⁰⁹; 4IYP³¹⁰; 3RKV, Osipiuk *et al.* a ser publicado; 2HR2, JCSG, a ser publicado) que no cumplieron con este criterio establecido, sin embargo presentaron un *rmsd* sólo ligeramente mayor a 4 Å, y el análisis cubrió un porcentaje de secuencia mayor al 50%. Asimismo, estos cinco *hits* presentaron los porcentajes de identidad de secuencia más altos relativos a los otros hits cuyos *rmsd* fueron menores a 6 Å. Estas proteínas presentan todas ellas un plegamiento conformado únicamente por α -hélices, y al menos tres de éstas establecen interacciones proteína:proteína. Es importante notar que en proteínas relativamente pequeñas conformadas exclusivamente por α -hélices, las búsquedas de similitud estructural son más desafiantes, pues hay mayor probabilidad de encontrar falsos positivos en cualquier estructura análoga con dominios α -helicoidales.

Analizando la secuencia aminoacídica de HemX, una característica notable es la gran cantidad de residuos aromáticos (*i. e.*, tirosinas, triptofanos y fenilalaninas) presentes, que componen el ~17% del total de AAs. Como referencia, la frecuencia esperada para Tyr+Trp+Phe es de ~8.2% analizando miles de secuencias proteicas al azar (https://proteopedia.org/wiki/index.php/Amino_acid_composition). Asimismo, el alineamiento de secuencias indicó que estos residuos aromáticos están muy conservados entre los ortólogos de HemX en *Leptospira* spp. (Figura Suplementaria 1). Hipotetizamos que dichos residuos aromáticos cumplen un rol importante en HemX, ya sea funcional o estructural. Se ha propuesto que el apilamiento de residuos aromáticos puede ser importante para transferir o canalizar electrones en el interior de proteínas (*i. e.*, *electron hopping* o *hole hopping*)^{223,311}. El análisis estructural mediante PyMOL mostró que la gran mayoría de los residuos aromáticos de HemX se encuentran en las α -hélices 1, 2 y 3, e interesantemente, apilados entre sí. Utilizando el *software* eMAP, se logró identificar posibles rutas de transferencia electrónica mediada por tirosinas, triptófanos, fenilalaninas y/o histidinas que se encuentran cercanas entre sí. Más específicamente, el software identificó un canal de electrones cuyo origen o fuente (*i. e.* “*source*”) es la Tyr238, con destino o blanco (*i. e.* “*target*”) la Tyr81; asimismo, ambos residuos se predicen como expuestos al solvente (Figura 58). La Tyr238 se encuentra en el entorno de la concavidad 1, al C-terminal de la α -hélice 5, rodeado de una región de carga electrostática de superficie

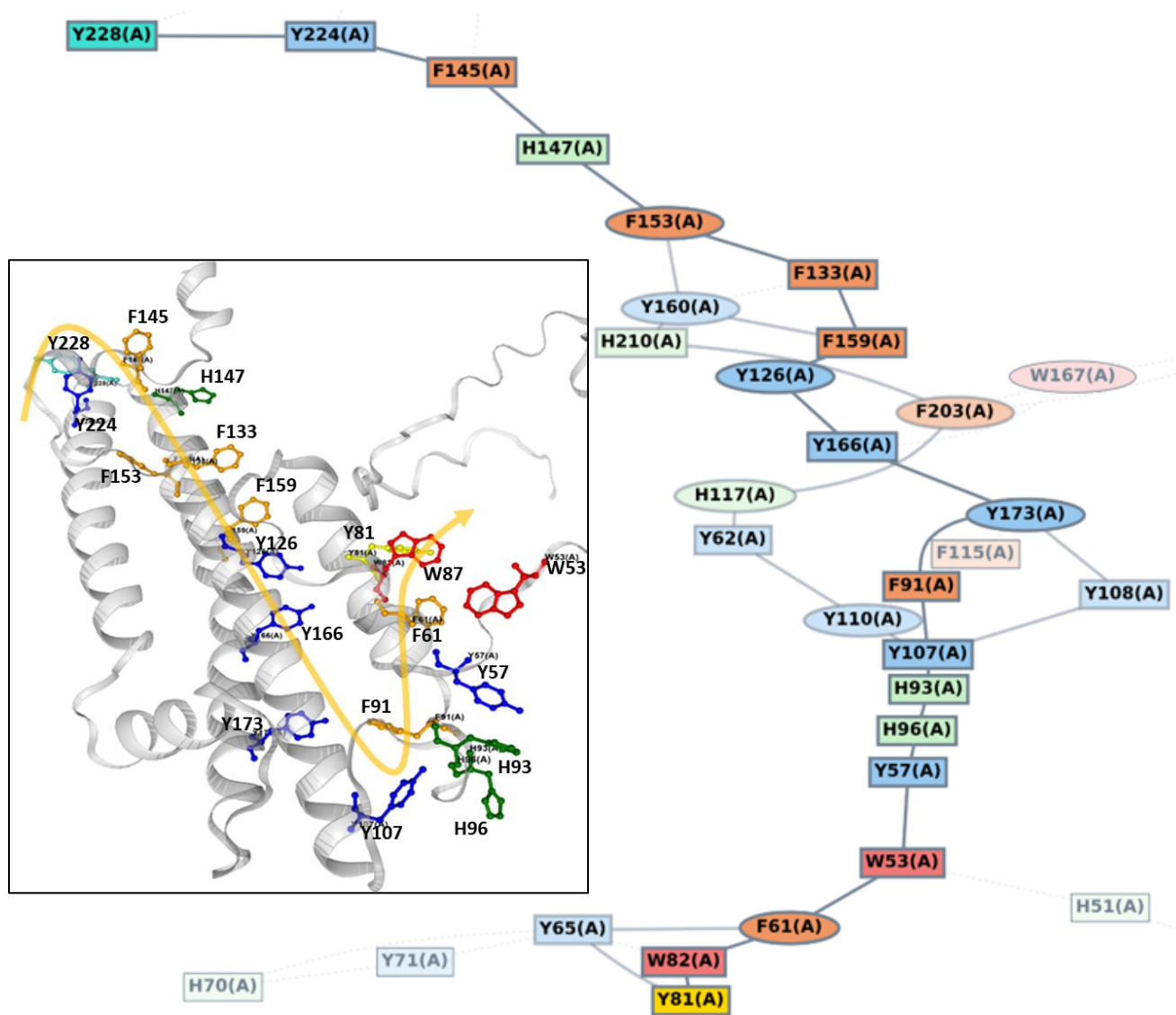


Figura 58. Ruta de electrones predicha por el *software* eMap. En cian se indica el residuo “source” (Y228), donde se origina la ruta de electrones, mientras que en amarillo el residuo “target” (Y81), al cual se canalizan los electrones. Los residuos en recuadro corresponden a residuos expuestos al solvente, mientras que los residuos en elipse corresponden a residuos del núcleo hidrofóbico. El *inset* muestra la ubicación de los residuos aromáticos que forman parte del túnel de electrones en HemX. La flecha amarilla indica la ruta de electrones predicha.

mayoritariamente negativa; la Tyr81 se encuentra en la α -hélice 2, cerca de la RID N-terminal. La ruta identificada para la canalización de los electrones entre “source” y “target” se compone de los AAs aromáticos conservados identificados anteriormente formando un túnel central, que

canalizan electrones desde la Tyr228 hacia la Tyr81. Dado que hipotetizamos que HemX tiene un rol estructural o funcional vinculado al de HemKR, un sistema que participa en la regulación del metabolismo de hemo y la homeostasis de hierro -íntimamente ligados al metabolismo redox y control del estrés oxidativo-, la presencia de un “canal” de electrones en HemX es intrigante a propósito de la(s) funcion(es) que cumple esta proteína en *Leptospira* spp.

DISCUSIÓN

***L. biflexa* Δ HemKR crece en ausencia de hemo o ácido 5-aminolevulínico**

El análisis comparativo del crecimiento de *L. biflexa* salvaje y Δ HemKR realizado en este trabajo, mostró resultados que no coinciden con datos previamente reportados por colaboradores nuestros²⁵⁹. A la luz de los resultados obtenidos aquí, podemos concluir que Δ HemKR no es auxótrofa para 5ALA o hemo: el crecimiento de Δ HemKR comparado al de las bacterias salvajes fue muy similar, indistintamente de la presencia de 5ALA o hemo en el medio de cultivo EMJH. Entendemos que las diferencias fenotípicas observadas inicialmente en este trabajo se deben al uso de kanamicina en los cultivos de Δ HemKR. Si bien esta posibilidad no se consideró en un principio, puesto que atribuíamos ese comportamiento al requerimiento de Δ HemKR de incorporar 5ALA exógeno en fases tempranas de crecimiento, los nuevos resultados indican que el retardo en la fase de *lag* de crecimiento se debe probablemente a la necesidad de Δ HemKR de expresar el *cassette* de resistencia a kanamicina en fases tempranas de crecimiento, para poder crecer en presencia de este compuesto. En este contexto de presencia de antibiótico, no queda claro por qué se observa un retardo mayor en la fase *lag* del crecimiento de cultivos de Δ HemKR en ausencia de 5ALA, comparado a los cultivos de Δ HemKR suplementados con este compuesto: especulamos que esto puede deberse a las propiedades antioxidantes del 5ALA, que contrarrestaría un posible efecto oxidativo de la kanamicina (Dr. Samuel García Huete y Dra. Nadia Benaroudj, Unidad de Biología de Espiroquetas, IP París, comunicación personal). Asimismo, se observó que en aquellos cultivos suplementados con 5ALA, la DO₄₂₀ máxima alcanzada es mayor que en cultivos sin suplementar con 5ALA. Esto es debido a la acumulación extracelular de metabolitos relacionados con hemo, que presentan un máximo de absorbancia a 405 nm (*i. e.*, banda de Soret), solapándose parcialmente con aquel empleado para medir el crecimiento de *Leptospira*²⁵⁶. Esta sobreestimación artefactual de la densidad óptica podría evitarse midiendo crecimiento de cultivos a través de conteo de bacterias en cámara de Neubauer; no obstante, la motilidad de estas bacterias dificulta el conteo celular, haciéndolo poco preciso. Estudios previos han analizado crecimiento de especies patógenas de *Leptospira*

spp. mediante una combinación de conteo de bacterias y medida de absorbancia a 260 nm, una longitud de onda no solapante con la banda de Soret³¹².

Con el fin de intentar explicar la discrepancia entre los resultados obtenidos previamente, en donde se observó que las bacterias $\Delta HemKR$ no crecen en ausencia de 5ALA o hemina²⁵⁹, es posible especular con que las bacterias mutantes se adaptaron a la ausencia de estos suplementos mediante mecanismos moleculares que aún no conocemos. Se puede plantear un paralelismo con lo que ocurre con *L. biflexa* en presencia de espectinomicina, en donde ciertas mutaciones permiten que las bacterias se adapten a la presencia del antibiótico en el cultivo y puedan eventualmente crecer de forma exponencial en presencia de éste³⁰². Los sistemas de señalización en todos los organismos, incluidos las bacterias, establecen redes complejas y sinérgicas; en este contexto, la ausencia de crecimiento ocasionada por la pérdida de funcionalidad del sistema HemKR podría haber sido rescatado por mutaciones pleiotrópicas, que les permitan a las bacterias alcanzar la homeostasis a través del establecimiento de nuevas redes fisiológicas y moleculares. Recientemente nuestro colaborador de la Unidad de Biología de Espiroquetas (Institut Pasteur París), el Dr. Mathieu Picardeau, obtuvo la secuencia completa de los genomas de las bacterias $\Delta HemKR$ originalmente empleadas por Louvel y colaboradores, así como aquellas empleadas en este trabajo. Los resultados comparativos mostraron sólo 7 polimorfismos de un solo nucleótido entre salvaje y mutante. Resta por hacer una evaluación detallada de dichas mutaciones, para analizar si éstas se encuentran afectando genes con funciones anotadas ligadas al metabolismo de hemo, o bien, en regiones regulatorias de dichos genes. Otro aspecto que no podemos aún descartar como potencial base de explicación para el fenotipo auxótrofo/protótrofo, deriva del hecho que en el reporte anterior²⁵⁶ sólo se contaba con los mutantes *knockout* simples (afectando a la quinasa *hemK*, o independientemente al regulador de respuesta *hemR*), mientras que ahora enfocamos nuestro análisis en la cepa doble mutante *hemKR*⁻. Si bien no pareciera ser una causa suficiente para explicar los resultados divergentes, es un aspecto que no fue directamente ensayado y que queda como perspectiva futura.

El ácido 5-aminolevulínico gatilla el apagado de HemK

La homeostasis del hemo está estrechamente vinculada a la del hierro, debido a que el hemo une hierro como cofactor para ejercer sus funciones celulares. Además, el hemo funciona como un almacenador intracelular del metal. Previamente se identificó a HemKR como un sistema importante en la regulación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de hemo^{259,261}. Hasta ahora, no se conocía la señal o señales ya sean ambientales o intracelulares detectadas por HemK, quien en última instancia es quien dicta el estado de activación de HemR. Mediante distintas técnicas, en este trabajo se evaluaron señales hipotéticas que HemK podría detectar, determinando consecuentemente el estado de fosforilación de HemR y su asociación o disociación de los sitios de unión del regulador a las regiones promotoras del ADN de genes diana. Recordemos que HemR fosforilado es capaz de unirse a la caja HemR guiando al sistema HemKR a su estado encendido; mientras que cuando HemR es desfosforilado, tiende a disociarse del ADN llevando al sistema a su estado apagado. En primer lugar, se planteó una estrategia en la cual esperábamos ver que, ante presencia de una señal detectada por HemKR, se observara una respuesta transcripcional de dichos genes en bacterias salvajes, pero no en las $\Delta HemKR$, indicando regulación HemKR-dependiente. El hecho que *L. biflexa* $\Delta HemKR$ es capaz de crecer en ausencia de 5ALA nos permitió evaluar la expresión génica ante la incubación con 5ALA como candidato a señal, en cultivos crecidos hasta fase exponencial media en medio EMJH estándar. Sabemos que 5ALA es un sustrato comprometido hacia la biosíntesis de porfirinas, incluyendo hemo, con lo que su presencia puede asimilarse a un “potencial de biosíntesis” alto para hemo. Esa revisión inicial del fenotipo de $\Delta HemKR$ fue entonces crucial para el desarrollo de este trabajo, pues como se demostró, el 5ALA es una señal que, directa o indirectamente, gatilla el apagado de la actividad quinasas de HemK, regulando de esta manera el estado de fosforilación de HemR.

Mediante PCR en tiempo real, se analizó la respuesta transcripcional de los genes *hemA* (vinculado a la biosíntesis de hemo) y *hmuO* (vinculado al catabolismo de hemo), que presentan una caja HemR en sus promotores²⁶¹, en función de la presencia de posibles señales detectadas por HemK. En condiciones estándar de cultivo, *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ no mostraron diferencias significativas en la expresión génica de *hemA*, pero sí de *hmuO*, cuya expresión está

aumentada en $\Delta HemKR$. Al incubar cultivos de *L. biflexa* salvajes y $\Delta HemKR$ con 5ALA se observó una clara dependencia de HemKR en la regulación de la expresión génica de *hemA* (y también *hmuO*), en donde al incubar con 5ALA en cultivos de *L. biflexa* salvaje hubo una represión de la expresión de *hemA* y un aumento en la expresión de *hmuO*, mientras que no se observaron diferencias en su expresión en cultivos de $\Delta HemKR$ tratados con 5ALA relativos a cultivos $\Delta HemKR$ sin tratar. Esto apoya lo descrito previamente, de que HemR es un regulador transcripcional dual de los genes vinculados al metabolismo del hemo²⁶¹, y sugiere fuertemente que el 5ALA es una señal detectada por HemKR induciendo el apagado de la vía; esto es, la desfosforilación de HemR mediante actividad fosfatasa de HemK.

Por otra parte, mediante ARN-Seq se observó la respuesta transcriptómica, global, de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ en presencia de 5ALA. La respuesta de *L. biflexa* en este contexto es mayormente dependiente de la señalización mediada por HemKR. Asimismo, se observó que el gen *exbB1*, también con una caja HemR en su sitio promotor, es efectivamente diferencialmente regulado en bacterias salvajes en comparación con $\Delta HemKR$, efecto que antes había sido sólo predicho²⁶¹. P~HemR activa la transcripción de *exbB1*. En fin, este trabajo permitió a su vez identificar un gen adicional, *LEPBl3432*, diferencialmente expresado en bacterias $\Delta HemKR$ (más específicamente, sobreexpresado en el mutante), que presenta una caja HemR en el sitio promotor del operón que conforma, aunque no había sido identificado antes. Como se mencionó previamente, *LEPBl3432* codifica para una proteína con homología a un receptor/transportador TonB-dependiente de hemo/sideróforos. En suma, los resultados derivados de los análisis transcripcionales van en línea con la hipótesis de que el 5ALA es efectivamente una señal que gatilla el apagado de HemKR, resultando en la activación de la expresión de genes catabólicos de hemo (*i. e.*, liberación de hierro al citosol) y disminución en la expresión génica de genes de biosíntesis de hemo, de un gen codificante para un sistema de provisión energética para la adquisición de moléculas y de otro gen que puede estar codificando un sistema de importación de hemo.

En cuanto a la evaluación de exceso o deficiencia de hierro como posible señal detectada por HemK, se observó que ante la presencia de DIP, un quelante de hierro (*i. e.*, señal de depleción de hierro), existe una dependencia al menos parcial de HemKR en la regulación transcripcional:

notablemente, en bacterias $\Delta HemKR$ tratadas con DIP se destacó el aumento en la expresión del gen *hemA*, en contraste a la disminución de dicho gen observada en bacterias salvajes en presencia de la señal. Asimismo, se observó un aumento notorio en la expresión del gen *LEPBl_a3432* en esta condición, relativo a lo que ocurre en *L. biflexa* salvaje tratada con DIP. Esto sugiere que el promotor de *hemA* y *LEPBl_a3432* en *L. biflexa* es controlado de forma sinérgica por otros reguladores que responden a hierro y/u otras señales (como, por ejemplo, intermediarios de la biosíntesis de hemo, incluyendo al hemo propiamente dicho). Estos resultados van en la dirección de que HemR, si bien es activador transcripcional de la expresión génica de *hemA* y *LEPBl_a3432*, juega también un rol como regulador negativo de otros reguladores sinérgicos de estos genes en condiciones de deficiencia de hierro ambiental, y lo hace independientemente de su estado de fosforilación. La regulación sinérgica de la expresión génica de *hemA* fue previamente reportada para otras bacterias^{313–316}. En suma, los resultados obtenidos mediante análisis transcripcionales sugieren un rol -al menos parcial- de HemKR tanto en la detección de hierro y 5ALA, como en la subsecuente regulación de la expresión del gen codificante de enzimas biosintéticas de hemo y de HmuO en *L. biflexa*.

La extracción de ARN de *L. biflexa* salvaje tratada con exceso de hierro como señal fue problemática; por lo que se analizó la expresión génica a través de una técnica alternativa, empleando GFP como gen reportero. Para esto, se utilizó una herramienta desarrollada por otros laboratorios, en donde se trabajó con un plásmido replicativo en *L. biflexa* con un inserto de GFP ingenierizado para la obtención de buena relación señal/ruido en cultivos de este género de bacterias. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en expresión de *hemA* al incubar cultivos de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ con 2 mM FeSO₄, sugiriendo que la adición de hierro no es una señal que regule el encendido de HemKR. Asimismo, se avanzó en la optimización de una técnica directa de análisis de la regulación de la actividad de HemKR, Phostag-SDS-PAGE + *Western blot* anti-HemR, en donde fue posible observar la fosforilación de HemR en extractos totales de proteína derivados de cultivos de *L. biflexa*. Los resultados obtenidos para la adición/depleción de hierro no mostraron diferencias significativas en los niveles de fosforilación de HemR comparado a cultivos sin tratar, contribuyendo a la conclusión de que el hierro no es una señal detectada por HemKR. No obstante, es llamativo el hecho de

que, al realizar extracción de ARN de cultivos de *L. biflexa* salvajes tratados con exceso de hierro, se haya observado de forma reproducible la precipitación de un *pellet* de color amarillo durante el procedimiento -más precisamente, en el paso de precipitación de ácidos nucleicos con isopropanol- que no se observó al realizar el mismo tratamiento con cultivos de *L. biflexa* $\Delta HemKR$. Este comportamiento, si bien impidió el análisis transcripcional comparativo de los cultivos salvajes vs $\Delta HemKR$ en presencia de un exceso de hierro, va en la dirección de que HemKR tiene un rol al menos parcial o indirecto en el mantenimiento de la homeostasis de hierro, tal como lo sugieren los resultados de expresión génica obtenidos al incubar cultivos con señal de depleción de hierro, discutidos previamente.

La evaluación directa del estado de fosforilación de HemR en *L. biflexa* salvaje tratadas con 5ALA mostró desfosforilación casi completa luego de incubadas con el metabolito. Este resultado confirmó que efectivamente el 5ALA es una señal que gatilla el apagado de HemKR. Cuando se incubó con 5ALA cultivos de un conjugante de $\Delta HemKR$ complementado con HemR y una variante de HemK que carece de actividad fosfatasa, no se observó desfosforilación significativa de HemR, indicando que es la actividad fosfatasa de HemK quien inactiva a HemR a partir de la detección de 5ALA. No obstante, no podemos descartar que los intermediarios de la vía de biosíntesis de hemo, o bien, hemo propiamente dicho, sean de hecho las señales específicas (y no 5ALA), o bien, señales adicionales detectadas por HemK. Aunque en principio puede parecer poco probable desde el punto de vista biológico que una bacteria de vida libre se encuentre con hemo ambiental, se ha descrito que el microambiente de raíces de plantas leguminosas pueden ser una rica fuente de hemo o sus intermediarios³¹⁷. El 5ALA, una molécula soluble, puede encontrarse presente en el suelo producto de la biosíntesis y transporte al medio extracelular a partir de microorganismos que residen en estos ambientes^{318–320}. Así como el 5ALA extracelular puede jugar roles señalizadores relevantes³²¹, será importante evaluar si las leptospiros son capaces de secretar 5ALA, y participar de la señalización bacteriana en el contexto de la formación de *biofilms*^{322–324}. Asimismo, se apuntará a identificar importadores de 5ALA en *Leptospira*, que hasta ahora para este género de bacterias no han sido descritos en las bases de datos ni en la bibliografía. Asimismo, será importante analizar si es efectivamente el 5ALA quien, directamente, se une y enciende la actividad autoquinasa de HemK. Para ello, una posibilidad es reconstituir a

HemK en liposomas y evaluar su actividad autoquinasa (e. g., empleando [γ - ^{32}P]ATP y analizando por autorradiografía) en ausencia o presencia tanto de 5ALA como de otros candidatos a señal (i. e., hemo o porfirinas relacionadas), como ha sido realizado previamente para otras HQs^{58,325}. Una ventaja del sistema de liposomas es su simplicidad, dado que únicamente se trabaja con la HQ de estudio y con las señales que se quieren evaluar, por lo que estos experimentos permitirían obtener conclusiones que complementarían las obtenidas en el presente trabajo.

Ante lo observado en este trabajo, se pueden formular dos hipótesis: (i) un mecanismo del tipo “*feedback*” negativo, en el que un intermediario de la biosíntesis, o bien el producto final hemo, sea de hecho la señal detectada por HemKR, resultando en su apagado y en la represión de la transcripción de los genes codificantes de dichas enzimas; o (ii) un mecanismo del tipo “*feedforward*” negativo, en el que el 5ALA está siendo, por un lado, procesado por la maquinaria enzimática “*housekeeping*” de biosíntesis de hemo, al mismo tiempo que por el otro lado está siendo detectado por HemKR, apagándose y de esa manera reprimiendo la transcripción (y traducción) de mayor cantidad de enzimas biosintéticas, que sintetizan no sólo 5ALA con un costo energético importante para la bacteria, sino una mayor cantidad de hemo que resulta tóxico para la bacteria.

La respuesta de HemR contribuye a la regulación de la homeostasis de hierro/hemo

En el contexto biológico, el apagado de HemKR ante la presencia de 5ALA apuntaría a conservar energía y recursos celulares: en *Leptospira*, el 5ALA intracelular es sintetizado a partir de glutamyl-ARNt, a expensas de ATP y poder reductor. Desde el punto de vista transcripcional, la detección de 5ALA induce una disminución de la transcripción de los genes codificantes para las enzimas biosintéticas de hemo; desde el punto de vista enzimático, se observa que al agregar 5ALA a los cultivos de *L. biflexa*, la biosíntesis de hemo aumenta tal como sugieren los análisis espectrales de los sobrenadantes de cultivos. Un corolario de esta observación es que HemB, la enzima que emplea 5ALA como sustrato, es activada por este último mediante un mecanismo de activación por sustrato (lo mismo ocurriría con las enzimas río abajo y cada uno de sus sustratos -i. e., los intermediarios de la biosíntesis de hemo-).

Dos resultados interesantes observados en cultivos de bacterias $\Delta HemKR$ son: (i) una mayor tolerancia a la deficiencia de hierro extracelular comparada con *L. biflexa* salvaje; y (ii) el aumento en la secreción de porfirinas al medio extracelular; mecanismo que se exacerba en presencia de 5ALA tanto en salvajes como mutantes, y en presencia de DIP sólo en $\Delta HemKR$. Los datos obtenidos mediante ARN-seq no mostraron cambios significativos en la expresión de genes que codifican homólogos de Fur²⁵² en bacterias $\Delta HemKR$ relativo a salvajes, sugiriendo que la ausencia/inactivación de HemR es importante para la regulación de la tolerancia a ambientes deficientes de hierro. En este contexto, el aumento en la expresión de *hmuO*, y en la actividad enzimática de HmuO, demostrados en este trabajo, resulta importante para entender lo observado en cultivos. Asimismo, en $\Delta HemKR$ se observó un aumento en la expresión de un gen homólogo a FecA, un importador de dicitrato férrico extracelular. Consecuentemente, esto permite que bacterias $\Delta HemKR$ crezcan en condiciones de bajo hierro biodisponible, en un contexto en el cual se adquiere mayor cantidad de hierro desde el medio extracelular, al mismo tiempo que hay hierro que se libera desde el almacenaje mediado por el hemo, resultando así en un aumento en su concentración libre intracelular. No se han descrito hasta ahora cajas Fur canónicas en *Leptospira*²⁵², por lo que no es posible por ahora evaluar comparativamente la expresión de genes controlados por homólogos de Fur, lo cual daría una idea preliminar de los niveles de hierro intracelular en las bacterias sometidas al análisis de este trabajo. Cuando las bacterias se enfrentan a ambientes de escaso hierro biodisponible, el mecanismo molecular intracelular por el cual se prioriza el uso de hierro lábil para los sistemas proteicos de crecimiento y división celular se denomina “*iron sparing*”; este concepto puede ser importante en la interfaz hospedero-patógeno, en donde el hospedero activa mecanismos moleculares de secuestro de hierro para impedir el crecimiento del patógeno^{102,326}. Se puede especular que el apagado de HemR conduzca a una respuesta que favorezca la utilización de hierro como cofactor de dichos sistemas de crecimiento y división celular, explicando así las diferencias de crecimiento entre $\Delta HemKR$ y salvajes en contexto de hierro ambiental limitante. A modo de perspectiva, será importante evaluar el comportamiento de los cultivos de *L. biflexa* salvaje en presencia de 5ALA y DIP, o en otras palabras, apagar a HemKR en un contexto de deficiencia de hierro: el resultado

esperado es que las bacterias salvajes puedan crecer en estas condiciones, similar a lo que ocurre con cultivos $\Delta HemKR$ en presencia de DIP.

El aumento en la excreción de porfirinas observado en $\Delta HemKR$ es un resultado intrigante y aún no del todo entendido; es notable que ante la ausencia/apagado de HemKR, la bacteria deba exportar moléculas esenciales para sobrevivir. Debido a que un exceso de hemo/hierro citosólico es tóxico para la bacteria^{148,180}, proponemos que la excreción de porfirinas hacia el medio extracelular apunta a mantener la tolerancia al estrés oxidativo, y que HemKR juega un rol importante en el mecanismo molecular subyacente. Es tentador especular con tres posibles explicaciones: (i) que es el aumento en el *pool* de hierro libre intracelular el que está vinculado a ello, de modo de disminuir la toxicidad resultado del catabolismo de hemo y de la importación de hierro, potencialmente dañino debido a la reacción de Fenton: el aumento de hierro libre resulta en un aumento en la concentración de especies reactivas del O_2 , las cuales pueden reaccionar con hierro, hemo o intermediarios del hemo; (ii) que la secreción de porfirinas esté vinculada a reducir la reactividad del hemo ante un aumento en la tensión de CO, también producto de la actividad hemo-oxigenasa; (iii) las porfirinas por sí mismas, por cierto, también son fuente de daño oxidativo si se encuentran en exceso; de hecho, se observó que la incubación con DIP -el cual bloquea la reacción de Fenton⁸⁶- en cultivos $\Delta HemKR$, resulta por un lado en el aumento en la expresión de genes de la biosíntesis de hemo, y por otro, en un aumento significativo en la secreción de porfirinas al medio extracelular. Cabe señalar en este punto que *L. biflexa* es más sensible al daño ocasionado por H_2O_2 debido a una menor actividad catalasa en estas bacterias^{242,327,328}; si por algún motivo el bloqueo de la reacción de Fenton resulta en un aumento tóxico de la concentración de H_2O_2 (dado que el Fe^{2+} libre ya no puede reaccionar y transformar el H_2O_2 en OH^- y $OH^\cdot$), entonces la exportación de porfirinas en el contexto de incubación con DIP apuntaría a evitar que las mismas reaccionen de manera indeseada con H_2O_2 . Como perspectiva, será importante evaluar curvas de crecimiento de *L. biflexa* salvaje y $\Delta HemKR$ en presencia de distintas concentraciones de H_2O_2 . Resumiendo, $\Delta HemKR$, si bien más tolerante a la falta de hierro extracelular, es por otra parte más sensible al estrés oxidativo, y que la excreción de porfirinas está vinculada a la protección de estas bacterias al daño oxidativo.

Es curioso que tanto en el contexto $\Delta HemKR$ como en presencia de 5ALA, en donde en ambos se observó un aumento de porfirinas extracelulares, también se haya observado -paradójicamente- un aumento en la expresión génica de importadores de hemo, más precisamente de un homólogo de *hemT*. Para resolver esta aparente paradoja, es aquí donde puede entrar en juego la importancia del sistema ExbBD-TonB, transcripcionalmente controlado por HemR: tanto en el contexto $\Delta HemKR$ como en presencia de 5ALA se observó una disminución en la expresión génica de *exbB1*. Es posible especular que al disminuir la transcripción (y, por tanto, la traducción) de los genes codificantes del complejo ExbBD, los sistemas de importación de hemo (entre otros) cuenten con menos energía para el importe activo de hemo. Un claro candidato a ser el sistema de importe de hemo asociado a *LEPBIa0149* es la proteína codificada por el gen *LEPBIa3432*, que también presenta una caja HemR en su promotor como se mencionó anteriormente, y presenta homología a un receptor/transportador de hemo. Se necesitará de un estudio más dedicado para evaluar si (i) *LEPBIa3432* efectivamente codifica para un sistema de importación de hemo y (ii) si *ExbB1* codificada por *LEPBIa0149* forma parte del sistema específico que provee de energía a *LEPBIa3432*. Cabe notar que río arriba del gen codificante de *exbB1* en *L. biflexa*, está anotado un gen (*LEPBIa0150*) con alta homología a una PUP con un posible sitio de unión a hemo. Su cercanía con *exbB1* (*LEPBIa0149*) sugiere que *LEPBIa0150* puede codificar para una proteína que podría ser el sistema de transporte de hemo asociado a este complejo ExbBD-TonB.

En cuanto a qué tipo de porfirina es la que se acumula en el medio extracelular, hipotetizamos que los candidatos son (i) hemo, en caso de que *LEPBIa3432* sea efectivamente un sistema de importación de hemo que está siendo desregulado (*i. e.*, expresión génica reprimida) en el contexto de presencia de 5ALA ambiental; (ii) porfirinas precursoras de hemo, *e. g.* PPIX, que en solución presenta una coloración similar al hemo²⁹⁶; no obstante, dado que en $\Delta HemKR$ se observó que la expresión génica de *hemH* (*LEPBIa1164*, codificante de la ferroquelatasa y no regulado por el mismo promotor que el operón *hemACBLENG*) es mayor que aquella de los genes *hemACBLENG* (ver Anexo), se puede especular con un escenario en el cual la HemH catalizará rápidamente la unión del hierro a la PPIX para producir hemo (ver Figura 7), por tanto la hipótesis de que estas porfirinas extracelulares sean precursores de hemo es menos probable. Alternativamente, (ii) intermediarios catabólicos del hemo, que presentan espectros con ligeras

diferencias respecto a aquellos del hemo y sus precursores³²⁹. Éstos últimos se encuentran mayoritariamente en complejo con la HmuO intracelular pero al ser inestables son transitorios, por tanto, este escenario también es menos probable; el paso limitante del catabolismo de hemo mediado por HmuO cuando la biliverdina-reductasa está ausente -tal como es el caso en *Leptospira*-, es la disociación de la interacción entre biliverdina (ya sin hierro unido) y la HmuO³²⁹. Como perspectiva, se puede realizar cromatografía líquida de alta presión combinada con espectrometría de masa (LC/MS/MS)³³⁰ para confirmar que las porfirinas que están siendo secretadas y detectadas espectroscópicamente a ~405 y ~670 nm son efectivamente hemo y biliverdina, respectivamente. También se avanzará en la identificación de transportadores vinculados al eflujo de hemo y porfirinas relacionadas en *Leptospira*, hasta ahora desconocidos.

La Figura 59 resume un modelo esquemático de la señalización mediada por HemKR en presencia de 5ALA, que contribuye a la regulación de la homeostasis de hierro y hemo en *L. biflexa*. Como perspectiva, será importante repetir los ensayos realizados en este trabajo pero esta vez con un organismo modelo patógeno como *L. interrogans* para confirmar que la señalización mediada por HemKR, caracterizada en este trabajo, es similar en dicho contexto; cabe recordar que en *Leptospiras* patógenas, las cajas HemR se encuentran en los sitios promotores de los genes ortólogos de *hemA* y *hmuO*²⁶¹ y que HmuO es un factor de virulencia documentado en estas especies²⁴⁹. Proponemos que, en el contexto del hospedero, el apagado de HemKR gatillado por la presencia de 5ALA o porfirinas (*i. e.*, PPIX, hemo...) que circulen en el torrente sanguíneo de mamíferos, resultaría en un fenotipo más tolerante a ciertas condiciones que impone el ambiente interno del hospedero a nivel molecular, por ejemplo, el secuestro del hierro biodisponible para el crecimiento y colonización del patógeno bacteriano.

HemK_{Δ80} recombinante se encuentra “atrapada” en un estado funcional constitutivamente activo

Habiéndose optimizado la producción y purificación de variantes de HemK y HemR recombinantes, se procedió al análisis enzimático de las mismas mediante PhosTag-SDS-PAGE. Estos ensayos permitieron confirmar que tanto HemK_{Δ80} como HemK_{Δ80,T102A} presentan actividad

autoquinasa en presencia de ATP, y también actividad fosfotransferasa sobre HemR y HemR_{REC}. Asimismo, tanto HemK_{Δ80} como para HemK_{Δ80,T102A} no se observó actividad fosfatasa al incubar con P~HemR ó P~HemR_{REC}. El hecho de que HemK_{Δ80} no presenta actividad fosfatasa sugiere que

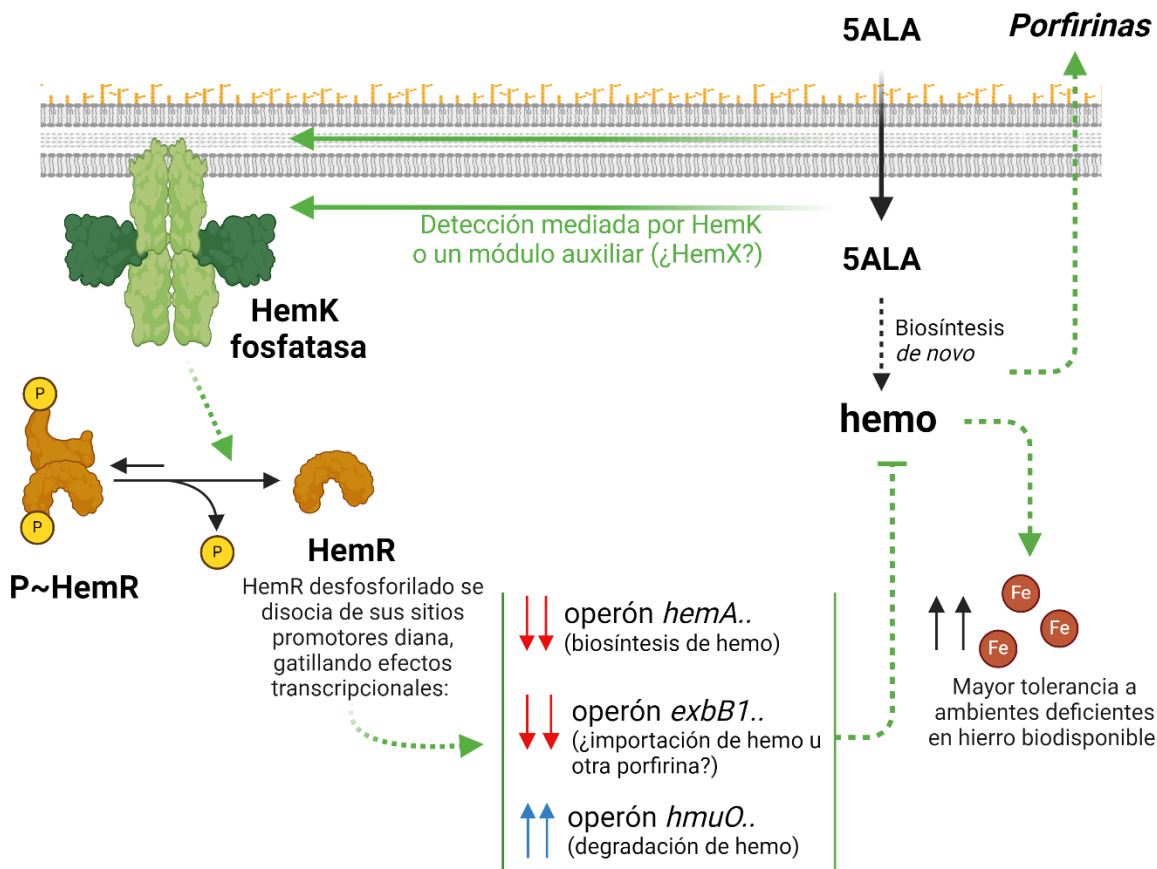


Figura 59. Modelo esquemático del efecto del 5ALA en el apagado de HemKR. Las flechas punteadas verdes marcan la ruta que sigue la señalización mediada por HemKR: 5ALA induce, directa o indirectamente, la desfosforilación de P~HemR a través de HemK, gatillando efectos transcripcionales sobre varios genes/operones relacionados a la homeostasis de hierro (Fe) y hemo, resultando en el catabolismo de hemo, liberación de hierro hacia el citosol y exportación de porfirinas al medio extracelular en *Leptospira*. Figura realizada mediante el software BioRender.

el dominio periplásmico/transmembrana de HemK es esencial para su actividad fosfatasa. Efectivamente, los experimentos posteriores en donde se observó actividad fosfatasa de HemK *in vivo* van precisamente en este sentido. Se ha documentado que la estabilización de estos dominios está correlacionada con el estado fosfatasa de las HQs, debido a la rigidificación

estructural que esto produce, limitando los movimientos conformacionales requeridos para el estado autoquinasa/fosfotransferasa^{46,47,58}. La ausencia de este dominio podría generar la desregulación de la actividad de HemK Δ 80, “trancando” a esta variante en la actividad autoquinasa/fosfotransferasa. Estos comportamientos se han visto en otras HQs de la familia HisKA; por ejemplo, en la HQ ThkA de *Thermotoga maritima* se observó que la delección del dominio PAS (hacia el N-terminal del DHp) resulta en una disminución de la actividad fosfatasa, sin alterar significativamente las actividades autoquinasa/fosfotrasferasa²⁹. Asimismo, una variante de la HQ CpxA, que carece del dominio sensor periplásmico, es constitutivamente activa⁶⁴. En este contexto, hay mucho que investigar aún sobre dinámicas conformacionales de la familia HisKA. En DesK fue posible atrapar a la HQ en estados funcionales discretos^{47,60} debido a que se realizaron mutaciones de forma dirigida sobre la hélice S, apuntando a estabilizar o desestabilizar el *coiled-coil*. En otras HQs se agregaron dominios que consisten en *coiled-coils* muy estables como por ejemplo tipo cierre de leucinas, para “atrapar” el dominio DHp en fases determinadas, de forma de regular el grado de exposición de la His fosforilable para recibir el fosforilo desde un dominio ABD cargado con ATP; sin embargo, en estos trabajos se evaluó principalmente actividad autoquinasa^{70,331}. En HemK, no se predice una estructura de hélice S que pueda establecer interacciones que resulten en la formación de un *coiled-coil*. Esto último va en la dirección de que HemK puede que sea una quinasa constitutivamente activa, con un dominio periplásmico/transmembrana que es esencial para su actividad fosfatasa. En suma, la conformación constitutivamente activa de HemK Δ 80 puede deberse a que la falta de dominio periplásmico/transmembrana desplaza el equilibrio conformacional hacia el estado autoquinasa/fosfotransferasa.

El estado funcional de los SDCs es dictado por la HQ. Nuestro laboratorio (durante mi trabajo de Maestría) y colaboradores propusimos que los equilibrios conformacionales, la geometría de los sitios activos y la oligomerización del RR gatillada por la HQ son los principales mecanismos que aseguran la eficiencia y direccionalidad de la transmisión de la señal desde módulos sensores hacia módulos efectores^{47,49,58–60,303}. En DesK, perteneciente a la familia HisKA_3, se observó una rotación que esconde la His fosforilable hacia el interior del haz de hélices del dominio DHp durante la actividad fosfatasa de la HQ sobre P~DesR, evitando así ciclos fútiles de

fosforilación^{47,49,60}. En esta dirección, se ha reportado que en la familia HisKA_3, la His fosforilable no juega un rol importante en la actividad fosfatasa; sin embargo, no está del todo claro si dicha His participa del mecanismo catalítico de fosfatasa en la familia HisKA³⁵. Se ha propuesto que la His fosforilable en los estados encendido y apagado de la HQ EnvZ, perteneciente a HisKA, presenta configuraciones diferenciales en estos dos estados funcionales discretos³³². De cualquier manera, resta arrojar luz sobre cómo las HQ de la familia HisKA regulan alostéricamente esta configuración diferencial entre actividades quinasa y fosfatasa. Se requieren más estructuras 3D experimentales de HQs HisKA “trancadas” en distintos estados funcionales⁶.

No podemos descartar que la ausencia de actividad fosfatasa de HemK Δ ₈₀ sea producto de su inestabilidad en solución. En este sentido, el hecho de que la variante constitutivamente activa HemK Δ ₈₀_T102A sea más estable puede indicar que la ausencia de Thr102, un residuo esencial para la actividad fosfatasa de esta familia de HQs, favorece las dinámicas conformacionales y estabilidad proteica de una variante constitutivamente activa. Cabe agregar que todos los ortólogos de HemK en leptospiros, tanto saprófitas como patógenas, presentan esta Thr conservada, indicativo de su importancia funcional. Como perspectiva, se podría evaluar una variante de HemK Δ ₈₀ en donde se realice mutagénesis del residuo Glu99 por alanina (o por glutamina, para usar una sustitución isostérica: a sabiendas que el Glu ejerce su función como ácido/base, protonando/desprotonando la His fosforilable para modular su nucleofilicidad, clave en la reacción de autofosforilación con ATP)³⁶.

El análisis de termoestabilidad permitió profundizar en la búsqueda de condiciones en la cual las variantes de HemK se encuentren más estables en solución. Se confirmó que HemK Δ ₈₀,T102A es termodinámicamente más estable que HemK Δ ₈₀, y que la incubación con ATP resulta en un aumento en la termoestabilidad de ambas variantes. Adicionalmente, la incubación con el ligando ADP también resultó en un aumento en la termoestabilidad de HemK Δ ₈₀, aunque menor que si se empleara ATP. No se observaron diferencias significativas en termoestabilidad en presencia de AMPPCP, un análogo no hidrolizable de ATP. Se observó también que la concentración de amortiguador Tris es importante para la estabilidad de HemK Δ ₈₀ incubada con sus distintos ligandos. Los resultados obtenidos permiten sugerir fuertemente que la fosforilación estabiliza a HemK Δ ₈₀. Adicionalmente, la variante HemK Δ ₈₀,T102A, generado para

apuntar a la obtención de una variante sin actividad fosfatasa (o en otras palabras, una variante “trancada” en el estado autoquinasa/fosfotransferasa), es más estable que HemK $_{\Delta 80}$. En suma, lo observado tras el análisis de termoestabilidad, sumado al comportamiento de las distintas variantes de HemK en la purificación, sugieren que aquellas condiciones que favorecen el estado encendido de HemK $_{\Delta 80}$, ya sea mediante incubación con ATP o bien mutando el residuo Thr102, resultan en proteína termodinámicamente más estable. Por otra parte, valiéndonos de los análisis de termoestabilidad, se logró optimizar el protocolo de purificación de HemR, que nos permitió identificar una condición en la cual se evitó el clivaje inespecífico en la purificación: se observó que a mayor fuerza iónica, mayor es la estabilidad térmica de HemR. El aumento en la concentración de NaCl en el buffer empleado para el paso de gel filtración resultó en picos no solapados en el espectro obtenido tras la purificación, y la obtención de HemR recombinante homogénea.

Durante este trabajo, se intentaron generar cristales del complejo HemK:HemR para derivar explicaciones moleculares en la transmisión de información, en especial considerando que hay aún varias preguntas abiertas para las HQs de la familia HisKA (como es HemK). Como perspectiva, una opción interesante a explorar sería co-expresar HemK $_{\Delta 80, T102A}$ y HemR_{REC} en *E. coli*, de manera similar a lo que se hizo para la determinación estructural de complejos DesK:DesR, en donde se co-expresó a DesK recombinante junto con un exceso de DesR recombinante sobreexpresado para desplazar el equilibrio hacia la formación de complejo, eventualmente permitiendo la purificación del complejo DesK:DesR y posterior cristalogénesis^{47,49,60}. Una segunda alternativa consiste en realizar mutaciones sobre HemK y/o HemR a modo de generar variantes que resulten en la formación de un complejo estable. En este contexto, la determinación estructural del complejo HemK $_{\Delta 80, T102A}$:HemR_{REC} aparece como la más factible entre las distintas variantes, dado que HemK $_{\Delta 80, T102A}$ se purifica en mayor cantidad y es más estable que HemK $_{\Delta 80}$. Cabe destacar que la estructura tridimensional de HemR_{REC} ha sido previamente resuelta por nuestro laboratorio²⁶¹. El análisis de coevolución de residuos covariantes entre HemK y HemR mediante herramientas bioinformáticas, sumado al modelado *in silico* del complejo HemK:HemR utilizando los conocimientos que ya se tienen acerca de sus

estructuras, puede aportar información útil en la ingeniería de estas proteínas apuntando a generar un complejo HQ:RR estabilizado.

¿HemX está funcionalmente vinculada a la vía HemKR?

En *Leptospira* spp., el gen *hemX* codifica para una proteína de función hasta ahora desconocida. En la especie saprófita *L. biflexa*, *hemX* se encuentra codificada 48 pb río abajo de la región codificante de *hemKR*, sugiriendo que HemX podría estar vinculada funcionalmente al sistema HemKR. La organización génica de *hemKR* y *hemX* en especies saprófitas de *Leptospira* spp. es similar a lo observado para otros operones de SDCs donde genes adicionales codifican para proteínas auxiliares que actúan como reguladores de la actividad del SDC próximo. Ante las evidencias obtenidas para la función de HemKR, que regula transcripcionalmente el metabolismo de hemo y la homeostasis del hierro, resulta atractiva la posibilidad de que HemX, directa o indirectamente, esté implicada en la biología del hemo o del hierro (por ejemplo, debido a su vínculo con la biología redox). Cabe agregar que, en especies patógenas, los genes *hemKR* se relocalizaron mediante transposición dentro del operón de biosíntesis de hemo, quedando *hemX* en su locus original, quizás introduciendo variaciones a una relación funcional entre HemKR y HemX comparando con especies saprófitas. En este momento, nos encontramos colaborando con el Dr. Samuel García-Huete, de la Unidad de Biología de Espiroquetas del Institut Pasteur Paris, quien realizó análisis de filogenia preliminares de HemX que sugieren fuertemente que HemX es funcionalmente importante, dado que fue probablemente adquirida por la última *Leptospira* ancestral (Figura Suplementaria 2), y está particularmente conservada a nivel de secuencia en todo el género. Estamos realizando análisis de coevolución con todas las secuencias disponibles de HemX y HemK, para identificar residuos candidato que covaríen. En caso de encontrar residuos covariantes entre HemX y el dominio periplásmico de HemK, puede sugerir que exista una interacción entre ambas proteínas que tenga relevancia biológica, por ejemplo, que HemX sea el sensor del sistema HemKR y que señales determinadas (probablemente 5ALA, como se desarrolló en esta Tesis) regulen su capacidad de interacción con HemK, y por tanto, la actividad de ésta última. Previamente se mencionó al SDC CpxAR como un sistema

estructuralmente similar a HemKR; es importante resaltar que la actividad de la HQ CpxA es modulada a través de la proteína periplásmica CpxP, quien actúa como sensora de la vía: cuando CpxP interacciona con el dominio periplásmico de CpxA, ésta última se encuentra en estado apagado. CpxAR se enciende en el contexto de estrés de envoltura celular, en donde circundan moléculas mal plegadas de las subunidades PapE de los *pili* en el periplasma. La unión de PapE a CpxP induce alostéricamente su disociación del dominio periplásmico de CpxA⁷⁶. Dado que HemK depende de su dominio periplásmico/transmembrana para su actividad fosfatasa, es posible hipotetizar que HemX cumpla un rol análogo al de CpxP en *L. biflexa*.

Se produjo y purificó HemX recombinante, con el fin de analizar estructural y funcionalmente esta proteína, y poder evaluar experimentalmente su posible interacción con HemK. Similar a la purificación de HemK (ver Objetivo Específico 2), se obtuvieron buenos rendimientos de HemX en el último paso de cromatografía; sin embargo, el paso de concentrado de HemX mediante centrifugación resultó en precipitación de la mayor parte de la proteína recombinante. Cabe recordar que se observó que HemX recombinante se cliva en el extremo N-terminal desordenado; ahora con un mayor conocimiento de la estructura de HemX, como perspectiva se realizará mutagénesis truncando el extremo N-terminal hasta el residuo de Asn72, para eliminar la RID que puede estar dificultando la obtención de proteína estable en las condiciones empleadas de purificación. No obstante, se logró observar algunos comportamientos de la proteína que permiten especular sobre sus posibles funciones. Notablemente, al realizar cromatografía de afinidad a Ni²⁺ se observó un cambio de color de la columna de celeste (color del Ni²⁺ a pH 8) a violeta. En general al adherir proteínas recombinantes, las columnas de níquel tornan a un color blanco/amarillento o no cambian de color. Este cambio de coloración sugiere (i) la presencia de un cofactor unido a HemX, proveniente de su producción en la bacteria *E. coli*; o (ii) algún tipo de reacción de oxido-reducción; por ejemplo, el níquel torna a color violeta en presencia del agente reductor DTT. Los cofactores que producen cambio de color son usualmente metales o están conjugados a metales^{101,168}. Esto es en principio consistente con la hipótesis funcional de HemX, potencialmente ligada a transporte de electrones y biología redox, previamente mencionada.

El desarrollo de la herramienta bioinformática AlphaFold2 nos permitió predecir la estructura tridimensional de HemX con alta fiabilidad; dado que la estructura de una proteína está íntimamente ligada a su función, el modelo de HemX contribuye al entendimiento de su función en *Leptospira* spp. El análisis estructural de HemX, junto con las superposiciones estructurales obtenidas empleando el servidor DALI, permitió hipotetizar sobre la relación entre el tipo de plegamiento que presenta y su posible función. Como se mencionó anteriormente, el plegamiento del tipo 14-3-3 es común en proteínas que interactúan con péptidos o con otras proteínas, debido a que la disposición particular de las α -hélices en este tipo de plegamiento genera una concavidad que permitiría dicha interacción. Adicionalmente, la predicción de la estructura de HemX establecen que ésta presenta una RID que se extiende aproximadamente 77 AAs desde su extremo N-terminal, siendo los primeros 20 AAs un péptido señal, probablemente involucrado en la traslocación de HemX hacia el periplasma³³³. En las últimas décadas, las RIDs han sido interesantes objetos de estudio en el campo de la biología estructural, y consisten en regiones que carecen de estructuración secundaria pero que cumplen importantes funciones biológicas^{334,335}, rompiendo con el paradigma de que es necesaria una estructura terciaria plegada para la funcionalidad de una proteína. En este contexto, es posible que la RID de HemX cumpla un rol en su funcionalidad, por ejemplo, en la unión de un ligando o en la interacción con otras biomoléculas, e incluso, modulando intramolecularmente la dinámica conformacional de HemX. El alineamiento de secuencias aminoacídicas de ortólogos de HemX en *Leptospira* spp. mostró alto grado de conservación de secuencia de la RID (ver Figuras Suplementarias 1 y 2), contribuyendo a la hipótesis de que esta región es funcionalmente importante para HemX.

HemX presenta un porcentaje inusualmente alto de residuos aromáticos. El análisis estructural *in silico* reveló que la mayoría de éstos se apilan entre sí en el núcleo de la proteína, y el servidor eMAP predijo un posible canal de electrones que se establece entre la Tyr228 y la Tyr81. Curiosamente, la Tyr228 se ubica expuesta al solvente, enfrentando a la región C-terminal parcialmente desestructurada y de carga electrostática negativa, mientras que la Tyr81 se ubica enfrentando a la región N-terminal de HemX, más precisamente a la RID, rodeada de cargas electrostáticas positivas. El túnel central de residuos aromáticos en HemX también se rodea de cargas positivas, sugiriendo que dichas cargas podrían jugar un rol como “aislante” del canal de

electrones. Como ya se mencionó, un rol de HemX en la oxido-reducción de componentes periplásmicos sería consistente con lo observado experimentalmente. En los últimos años, se han reportado trabajos en donde se hipotetiza un rol de los residuos aromáticos en la canalización hacia la superficie de los electrones derivados de sitios catalíticos que generan intermediarios altamente reactivos. Los túneles de residuos aromáticos funcionarían en este contexto como canales de electrones, por ejemplo, como “caños de escape” de electrones reactivos, evitando el daño oxidativo de la proteína^{223,311}. La eyección de dichos electrones hacia la superficie sugiere la presencia de “scavengers” adicionales que puedan utilizarlos. En este contexto, es posible que HemX sea el *scavenger* propiamente dicho, facilitando la canalización de electrones derivados de radicales libres, hacia aceptores por ahora desconocidos que interaccionarían, por ejemplo, a nivel de la RID de la proteína. Asimismo, en el periplasma de especies patógenas de *Leptospira* no se han identificado hasta ahora proteínas típicamente involucradas en la tolerancia al estrés oxidativo, *e. g.* superóxido-dismutasas, por lo que no está del todo claro qué proteína(s) participan y cómo se da la tolerancia al estrés oxidativo ocasionado por $O_2^{\cdot-}$; similarmente, *L. biflexa* es significativamente más sensible al estrés oxidativo ocasionado por H_2O_2 ^{327,328}, sumando interrogantes adicionales de cómo se regula la homeostasis del H_2O_2 en saprófitas³³⁶. No descartamos entonces que HemX participe de la tolerancia al estrés oxidativo a nivel del periplasma. Alternativamente, es posible hipotetizar un modelo mecanístico de HemX en el cual un cofactor metálico o conjugado a metal, en estado reducido, interacciona con el parche electrostático negativo que rodea a la Tyr228. Allí los electrones son canalizados vía el túnel central de residuos aromáticos hacia la Tyr81, quien reducirá un ligando oxidado -probablemente un péptido o proteína- que se une a la RID, asistido por la concavidad 1 (ver Figura 57) quien podría también participar de dicha interacción.

CONTRIBUCIONES A LA LITERATURA

Mi trabajo de posgrado contribuyó a la publicación hasta ahora de 5 artículos:

1. Trajtenberg F, Imelio JA, Machado MR, Larrieux N, Marti MA, Obal G, Mechaly AE, Buschiazso A (2016). **Regulation of signaling directionality revealed by 3D snapshots of a kinase:regulator complex in action.** *eLife*. doi:10.7554/eLife.21422
2. Imelio JA, Larrieux N, Mechaly AE, Trajtenberg F, Buschiazso A (2017). **Snapshots of the Signaling Complex DesK:DesR in Different Functional States Using Rational Mutagenesis and X-ray Crystallography.** *Bioprotocol*. doi:10.21769/BioProtoc.2510
3. Imelio JA, Trajtenberg F, Buschiazso A (2021). **Allostery and protein plasticity: the keystones for bacterial signaling and regulation.** *Biophysical Reviews*. doi:10.1007/s12551-021-00892-9
4. Lima S, Blanco J, Olivieri F, Imelio JA, Nieves M, Carrión F, Álvarez B, Buschiazso A, Marti M, Trajtenberg F (2023). **An allosteric switch ensures efficient unidirectional information transmission by the histidine kinase DesK from *Bacillus subtilis*.** *Science Signaling*. doi:10.1126/scisignal.abo7588
5. Imelio JA, Trajtenberg F, Mondino S, Zarantonelli L, Vitrenko I, Lemée L, Cokelaer T, Picardeau M, Buschiazso A. (2024). **Signal-sensing triggers the shutdown of HemKR, regulating heme and iron metabolism in the spirochete *Leptospira biflexa*.** *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0311040

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla Suplementaria 1 (continúa en siguiente página). Secuencias de oligonucleótidos.

Mutagénesis para generar HemK_{Δ80,T102A}	
HemK_T102A_Fw	CTCACGAGATGAAAGCGCCTATCGCCAGCTTAC
HemK_Rev	CATGTGACCTCGTTCAAACCTCAG
Confirmación de genotipos de <i>L. biflexa</i> salvaje y <i>hemKR</i>	
F1	GAGATTTTCGTCGAAGTTCAAAGTTG
R1	CTGAAATGGTTTTGGCTTGGCG
F2	GGAGCGGAATTGGACTTTATATTGTG
R2	GAAATTGTTTTGGCCACTCTACAC
F3	GAAGGATCCATCCGAAATGTAAGG
R3	CAAGCACCGAGAGAAACCGAAAAC
F4	GTTTCGGAGTATTTGGCAAAGTAC
R4	CCGATGACACAGATAGTCTCATC
KanaR_Fw	CCGCTGCGTAAAAGATACG
KanaR_Rev	CATACCACTTGTCGCCC
PCR en tiempo real	
hemA_Fw	CCTTGATACAGCTCCCATC
hemA_Rev	GCAAACCTGTCAAAGGAC
hmuO_Fw	CTTGCGGTCTACCGAGTGATG
hmuO_Rev	CTCGAAATAAACTGGGGAAG
rpoB_Fw	GAACTGGTATGGAAGCTC
rpoB_Rev	CAAACACCTGTTGCATCCAC
Clonado de construcciones reporteras en pRAT724	
rrnDt_PhemA_Fw	GGATCCGGTACCACTAGTCGTGTGCATAGTATTCACCAG
PhemA_GFPenh_Rev	GCTCGCCCGGGCTCGACATACAATTATTCTATCAAATAC
rrnDt_PhmuO_Fw	GGATCCGGTACCACTAGTCGGATACCTCCGTAAAGTGG
PhmuO_GFPenh_Rev	GCTCGCCCGGGCTCGACATATATGACACTACCCTGAC
Clonado de construcciones para ensayos de complementación en pMAORI	
HemR_pMAORI_Fw	CCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGATGAAACCAAGAATTTTACTCGTAGAAG
HemR_pMAORI_Rev	GTGGGAATATGCTATACGGATTTGCCTCATACCAAGGGTTGAAGAGG
P _{HemKR} _pMAORI_Fw	CCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGTGTTTCGATTCTTGGTCTACTG
P _{HemKR} _pMAORI_Rev	CTTCTACGAGTAAATTTCTGGTTTCATTTTTGCCTCTCAAAACAAGATCAGG
HemK_pMAORI_Fw	CCTGATCTTGTTTTGAGAGGCAAAATTGAGAGGATCTGCACAATTC
HemK_pMAORI_Rev	CTTCTACGAGTAAATTTCTGGTTTCATGTGACCTCGTTCAAACCTCAGTTTGAC
Confirmación de clonado en pRAT724	
pRAT_Fw	GGCGCCTCCTTTTGATACTG
pRAT_Rev	CGGGCAGGATAGGTGAAGTA

Clonado de *hemX* en el vector de expresión pQE80L

HemX_Δ21_Fw	CCTGTATTTTCAGGGATCCGGTTCAGCTTGGGAAACAGACATCGATTAC
HemX_Δ54_Fw	CCTGTATTTTCAGGGATCCGGTTCACCCAAATACTTAGAAGATTTTATG
HemX_Rev	CCAAGATCCTTTTAAAGCTTTTAGCGGTCGATTAAATCGAGG

Tabla Suplementaria 2. p-valores obtenidos tras análisis estadístico de Figura 29. Los indicados con asterisco representan diferencias estadísticamente significativas (p-valor menor a 0,05). ns: no significativo. Los experimentos se realizaron en triplicado.

<i>hemA</i>	salvaje	salvaje + 5ALA	salvaje + DIP	$\Delta HemKR$	$\Delta HemKR$ + 5ALA	$\Delta HemKR$ + DIP
salvaje	x	< 0.0001 (****)	< 0.0001 (****)	0.0613 (ns)	0.0012 (**)	0.0168 (*)
salvaje + 5ALA	x	x	0.8923 (ns)	0.0267 (*)	0.0012 (**)	< 0.0001 (****)
salvaje + DIP	x	x	x	0.0266 (*)	0.0009 (***)	< 0.0001 (****)
$\Delta HemKR$	x	x	x	x	0.6186 (ns)	0.0159 (*)
$\Delta HemKR$ + 5ALA	x	x	x	x	x	0.0003 (***)
$\Delta HemKR$ + DIP	x	x	x	x	x	x

<i>hmuO</i>	salvaje	salvaje + 5ALA	salvaje + DIP	$\Delta HemKR$	$\Delta HemKR$ + 5ALA	$\Delta HemKR$ + DIP
salvaje	x	0.0017 (**)	< 0.0001 (****)	< 0.0001 (****)	< 0.0001 (****)	< 0.0001 (****)
salvaje + 5ALA	x	x	< 0.0001 (****)	< 0.0001 (****)	< 0.0001 (****)	< 0.0001 (****)
salvaje + DIP	x	x	x	< 0.0001 (****)	< 0.0001 (****)	< 0.0001 (****)
$\Delta HemKR$	x	x	x	x	0.1087 (ns)	< 0.0001 (****)
$\Delta HemKR$ + 5ALA	x	x	x	x	x	< 0.0001 (****)
$\Delta HemKR$ + DIP	x	x	x	x	x	x

Tabla Suplementaria 3. Valores de concentración de ARN y RIN obtenidos para cada muestra.

Muestra	Concentración (ng/μL)	RIN
salvaje sin tratar 1	699	9.3
salvaje sin tratar 2	692	9.2
salvaje sin tratar 3	735	8.9
salvaje sin tratar 4	828	9.1
salvaje + 5ALA 1	711	9.2
salvaje + 5ALA 2	616	8.9
salvaje + 5ALA 3	829	9.1
salvaje + 5ALA 4	22	N/D
salvaje + DIP 1	661	9.1
salvaje + DIP 2	762	8.2
salvaje + DIP 3	127	8
salvaje + DIP 4	729	8.9
Δ HemKR sin tratar 1	1835	9.5
Δ HemKR sin tratar 2	2157	9.4
Δ HemKR sin tratar 3	1573	9.5
Δ HemKR sin tratar 4	1703	9
Δ HemKR + 5ALA 1	1516	9.4
Δ HemKR + 5ALA 2	1146	9.1
Δ HemKR + 5ALA 3	1054	9.6
Δ HemKR + 5ALA 4	1003	9.3
Δ HemKR + DIP 1	606	9.3
Δ HemKR + DIP 2	1151	8.9
Δ HemKR + DIP 3	1497	9.5
Δ HemKR + DIP 4	1278	9.4

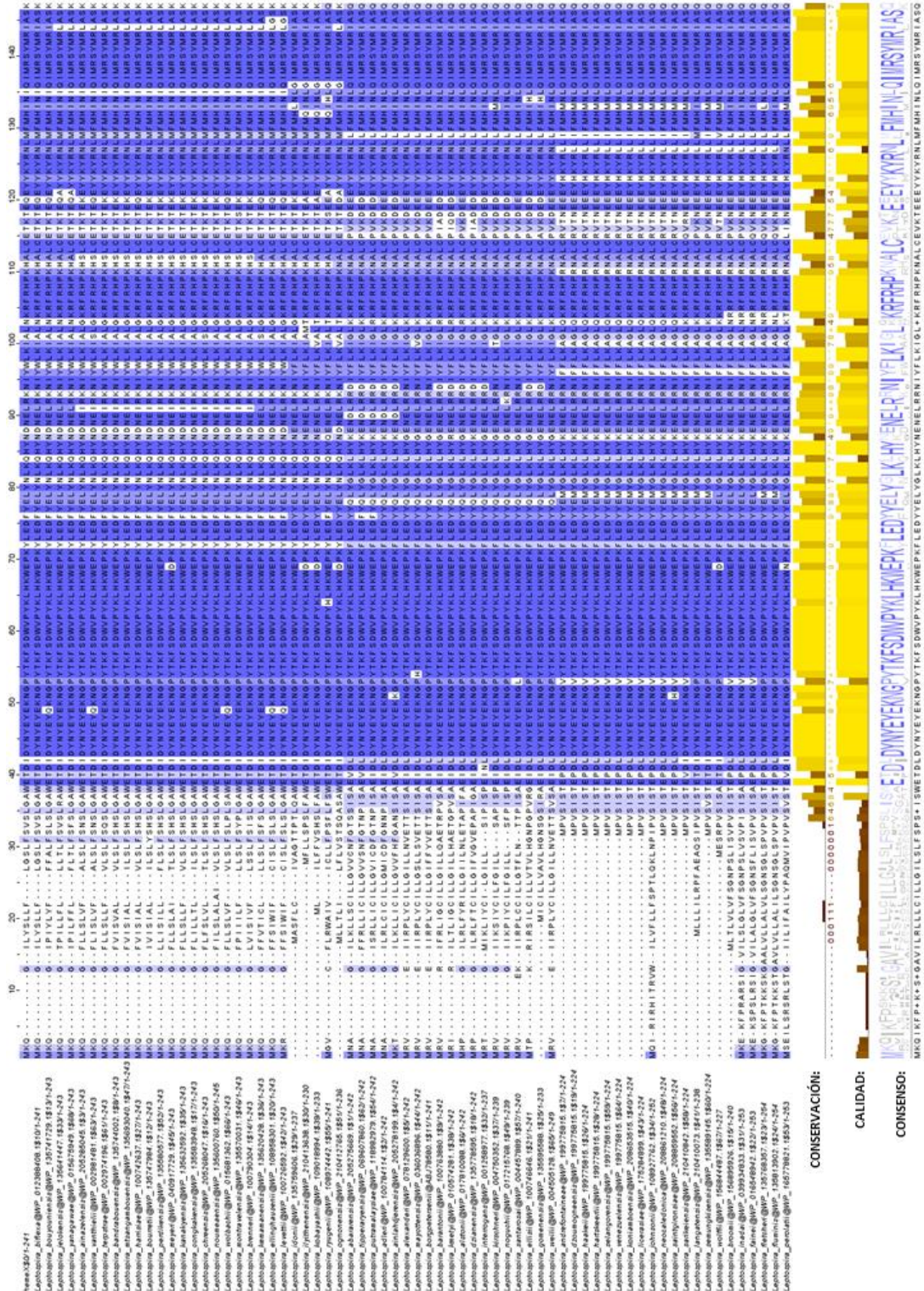


Figura Suplementaria 1 (continuación).

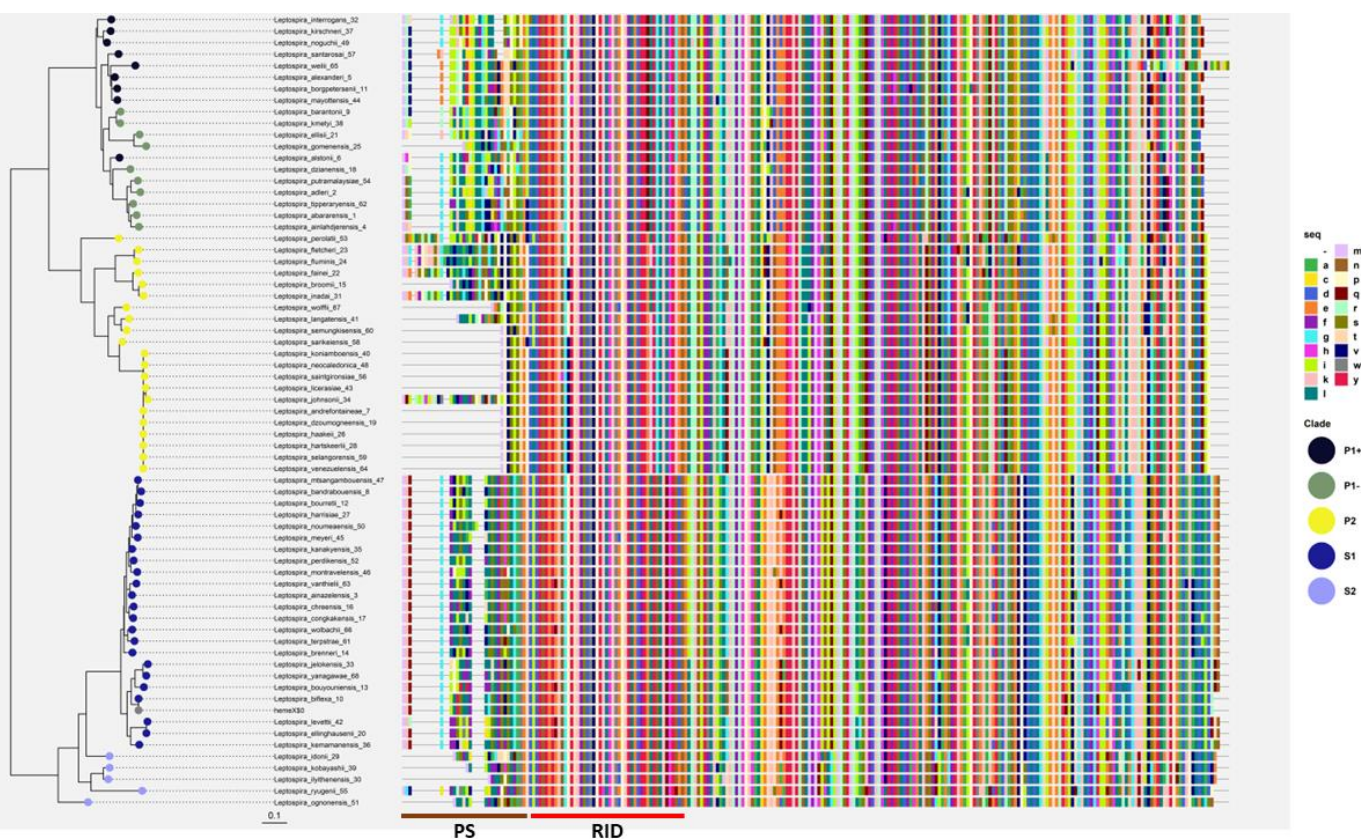


Figura Suplementaria 2. Filogenia y alineamiento de ortólogos de HemX en *Leptospira* spp. Se indican a la derecha de la imagen los códigos de color para los distintos aminoácidos y los clados de *Leptospira* (P1, P2: especies patógenas; S1, S2: especies saprófitas). Se indica también la región del marco abierto de lectura correspondiente al péptido señal de traslocación a periplasma (PS) y la región intrínsecamente desordenada (RID). La idea, el experimento y la Figura fue diseñada y realizada por el Dr. Samuel García-Huete (Unidad de Biología de Espiroquetas, Institut Pasteur París, Francia; samuel.garcia-huete@pasteur.fr).

ABREVIACIONES

6xHisTag: etiqueta N-terminal de seis histidinas.

Å: Angstrom, unidad de longitud = 10^{-10} m

α HemR: anticuerpo primario anti-HemR.

μ g: microgramos = 10^{-6} g.

μ M: micromolar = 10^{-6} M.

μ L: microlitros = 10^{-6} L.

μ m: micrómetros = 10^{-6} m.

°C: Celsius, unidad de temperatura.

Ala, A: residuo de alanina.

AcP: acetil-fosfato.

(Dominio o *cassette*) ABC: “*ATP-binding cassette*”.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADP: adenosín-difosfato.

Ag^{2+} : catión de plata.

5ALA: ácido 5-aminolevulínico.

AMPPCP: adenosín-5'-[(β,γ)-metileno]trifosfato.

Arg, R: residuo de arginina.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal.

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia.

Asn, N: residuo de asparagina.

Asp, D: residuo de aspartato.

ATP: adenosina-trifosfato.

bar: unidad de presión.

Cd^{2+} : catión de cadmio.

Co²⁺: catión de cobalto.

CO: monóxido de carbono.

Cu²⁺: catión de cobre.

Cys, C: residuo de cisteína.

Da: Dalton, unidad de peso molecular.

DIP: 2,2'-dipiridilo.

DO₄₂₀: densidad óptica a 420 nm.

DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm.

(Dominio) ABD: *"ATP-binding (domain)"*.

(Dominio) DHp: *"dimerization and histidine phosphotransfer (domain)"*.

(Dominio) REC: (dominio) receptor.

DSF: *"differential scanning fluorimetry"*.

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

FC: *fold-change*, cambio en la expresión relativa de un gen en una condición experimental relativo a otra.

Fe²⁺: catión ferroso (estado reducido del ion hierro).

Fe³⁺: catión férrico (estado oxidado del ion hierro).

FeSO₄: sulfato ferroso.

g: gramos, unidad de masa.

Gln, Q: residuo de glutamina.

Glu, E: residuo de glutamato.

GFP: *"green fluorescent protein"*, o proteína fluorescente verde.

GTP: guanosín-trifosfato.

h: horas, unidad de tiempo.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

His, H: residuo de histidina.

HQ: histidín-quinasa.

IAA: iodoacetamida.

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

K_D: constante de disociación.

kDa: kiloDalton = 10^3 Da.

L: litros, unidad de volumen.

Lys, K: residuo de lisina.

m: metros; unidad de longitud.

M: molar; unidad de concentración.

Mg²⁺: catión de magnesio.

MgCl₂: cloruro de magnesio.

Mn²⁺: catión de manganeso.

mg: miligramos = 10^{-3} g.

mL: mililitros = 10^{-3} L.

mM: milimolar = 10^{-3} M.

mV: milivoltios = 10^{-3} V.

min: minutos, unidad de tiempo.

NaCl: cloruro de sodio.

NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato, estado reducido.

NADP⁺: nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato, estado oxidado.

NADH: nicotinamida-adenina-dinucleótido.

NO: óxido nítrico.

Ni²⁺: catión de níquel.

NiSO₄: sulfato de níquel.

O₂: oxígeno.

O₂⁻: radical libre superóxido.

OH⁻: ion hidróxido.

OH[•]: radical libre hidroxilo.

P~: grupo fosforilo; refiere a una proteína fosforilada.

P_{adj}: p-valor ajustado.

PBS: buffer fosfato salino.

pg: picogramos = 10^{-12} g

Phe, F: residuo de fenilalanina.

PUP: proteína de unión periplasmática.

RID: región intrínsecamente desordenada.

rpm: revoluciones por minuto.

RR: regulador de respuesta.

s: segundos, unidad de tiempo.

SDC: sistema de dos componentes.

SDS-PAGE: “*sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*”.

Ser, S: residuo de serina.

T_M: temperatura de *melting*.

T_{onset}: temperatura de *onset*.

TEV: refiere a proteasa del “*tobacco etch virus*” empleada para clivar el 6xHisTag.

Thr, T: residuo de treonina.

Trp, W: residuo de triptófano.

Tyr, Y: residuo de tirosina.

U: unidades de actividad enzimática.

(%) v/v: volumen de soluto en 100 mL de solución.

x g: “*relative centrifugal force*” o fuerza centrífuga relativa a la aceleración gravitatoria. Múltiplo de la aceleración gravitatoria.

X-Y: refiere al par específico de reconocimiento entre molécula X y molécula Y.

X:Y: refiere al complejo transitorio que se establece entre una molécula X y una molécula Y

Zn²⁺: catión de zinc.

ZnCl₂: cloruro de zinc.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stock, J. B., Stock, A. M. & Mottonen, J. M. Signal transduction in bacteria. *Nature* **344**, 395–400 (1990).
2. Galperin, M. Y. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* **5**, 35 (2005).
3. Ulrich, L. E., Koonin, E. V. & Zhulin, I. B. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **13**, 52–56 (2005).
4. Watts, K. J., Vaknin, A., Fuqua, C. & Kazmierczak, B. I. New Twists and Turns in Bacterial Locomotion and Signal Transduction. *J. Bacteriol.* **201**, (2019).
5. Harshey, R. M., Kawagishi, I., Maddock, J. & Kenney, L. J. Function, Diversity, and Evolution of Signal Transduction in Prokaryotes. *Dev. Cell* **4**, 459–465 (2003).
6. Buschiazzo, A. & Trajtenberg, F. Two-Component Sensing and Regulation: How Do Histidine Kinases Talk with Response Regulators at the Molecular Level? *Annu. Rev. Microbiol.* **73**, 507–528 (2019).
7. Skerker, J. M., Prasol, M. S., Perchuk, B. S., Biondi, E. G. & Laub, M. T. Two-Component Signal Transduction Pathways Regulating Growth and Cell Cycle Progression in a Bacterium: A System-Level Analysis. *PLoS Biol.* **3**, e334 (2005).
8. Laub, M. T. & Goulian, M. Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 121–145 (2007).
9. Burbulys, D., Trach, K. A. & Hoch, J. A. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**, 545–552 (1991).
10. Appleby, J. L., Parkinson, J. S. & Bourret, R. B. Signal Transduction via the Multi-Step Phosphorelay: Not Necessarily a Road Less Traveled. *Cell* **86**, 845–848 (1996).
11. Janiak-Spens, F., Cook, P. F. & West, A. H. Kinetic analysis of YPD1-dependent phosphotransfer reactions in the yeast osmoregulatory phosphorelay system. *Biochemistry* **44**, 377–386 (2005).
12. Bretl, D. J., Demetriadou, C. & Zahrt, T. C. Adaptation to Environmental Stimuli within the Host: Two-Component Signal Transduction Systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 566–582 (2011).
13. Kenney, L. J. How important is the phosphatase activity of sensor kinases? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 168–176 (2010).
14. Lori, C. *et al.* Cyclic di-GMP acts as a cell cycle oscillator to drive chromosome replication. *Nature* **523**, 236–239 (2015).
15. Ishii, E. & Eguchi, Y. Diversity in Sensing and Signaling of Bacterial Sensor Histidine Kinases. *Biomolecules* **11**, 1524 (2021).

16. Lukat, G. S., McCleary, W. R., Stock, A. M. & Stock, J. B. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 718–722 (1992).
17. Thomas, S. A., Brewster, J. A. & Bourret, R. B. Two variable active site residues modulate response regulator phosphoryl group stability. *Mol. Microbiol.* **69**, 453–465 (2008).
18. Pazy, Y. *et al.* Matching Biochemical Reaction Kinetics to the Timescales of Life: Structural Determinants That Influence the Autodephosphorylation Rate of Response Regulator Proteins. *J. Mol. Biol.* **392**, 1205–1220 (2009).
19. Thomas, S. A., Immormino, R. M., Bourret, R. B. & Silversmith, R. E. Nonconserved Active Site Residues Modulate CheY Autophosphorylation Kinetics and Phosphodonor Preference. *Biochemistry* **52**, 2262–2273 (2013).
20. Page, S. C., Immormino, R. M., Miller, T. H. & Bourret, R. B. Experimental Analysis of Functional Variation within Protein Families: Receiver Domain Autodephosphorylation Kinetics. *J. Bacteriol.* **198**, 2483–2493 (2016).
21. Hentschel, E. *et al.* Phosphatase activity of the histidine kinases ensures pathway specificity of the CHRSA and HRRSA two-component systems in *C. orynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **92**, 1326–1342 (2014).
22. Francis, V. I., Stevenson, E. C. & Porter, S. L. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **364**, (2017).
23. Siryaporn, A. & Goulian, M. Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR two-component systems in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* **70**, 494–506 (2008).
24. Podgornaia, A. I. & Laub, M. T. Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 156–162 (2013).
25. Willett, J. W. *et al.* Specificity Residues Determine Binding Affinity for Two-Component Signal Transduction Systems. *mBio* **4**, e00420-13 (2013).
26. Cheung, J. & Hendrickson, W. A. Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 116–123 (2010).
27. Ortega, Á., Zhulin, I. B. & Krell, T. Sensory Repertoire of Bacterial Chemoreceptors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **81**, e00033-17 (2017).
28. Bhate, M. P., Molnar, K. S., Goulian, M. & DeGrado, W. F. Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures. *Structure* **23**, 981–994 (2015).
29. Yamada, S. *et al.* Structure of PAS-Linked Histidine Kinase and the Response Regulator Complex. *Structure* **17**, 1333–1344 (2009).
30. Anantharaman, V., Balaji, S. & Aravind, L. The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins. *Biol. Direct* **1**, 25 (2006).
31. Dutta, R. & Inouye, M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 24–28 (2000).

32. Gao, R. & Stock, A. M. Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 133–154 (2009).
33. Nakano, M. M. & Zhu, Y. Involvement of ResE Phosphatase Activity in Down-Regulation of ResD-Controlled Genes in *Bacillus subtilis* during Aerobic Growth. *J. Bacteriol.* **183**, 1938–1944 (2001).
34. Huynh, T. N., Noriega, C. E. & Stewart, V. Conserved mechanism for sensor phosphatase control of two-component signaling revealed in the nitrate sensor NarX. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 21140–21145 (2010).
35. Huynh, T. N. & Stewart, V. Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity: Transmitter phosphatase in two-component signalling. *Mol. Microbiol.* **82**, 275–286 (2011).
36. Willett, J. W. & Kirby, J. R. Genetic and Biochemical Dissection of a HisKA Domain Identifies Residues Required Exclusively for Kinase and Phosphatase Activities. *PLoS Genet.* **8**, e1003084 (2012).
37. Bourret, R. B. Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 142–149 (2010).
38. Fabret, C., Feher, V. A. & Hoch, J. A. Two-Component Signal Transduction in *Bacillus subtilis* : How One Organism Sees Its World. *J. Bacteriol.* **181**, 1975–1983 (1999).
39. Birck, C. *et al.* Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure* **7**, 1505–1515 (1999).
40. Groisman, E. A. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**, 103–124 (2016).
41. Hengge, R. The Two-Component Network and the General Stress Sigma Factor RpoS (σ S) in *Escherichia coli*. in *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets* (ed. Utsumi, R.) vol. 631 40–53 (Springer New York, New York, NY, 2008).
42. Shu, C. J. & Zhulin, I. B. ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 3–5 (2002).
43. Teixeira, R. D., Holzschuh, F. & Schirmer, T. Activation mechanism of a small prototypic Rec-GGDEF diguanylate cyclase. *Nat. Commun.* **12**, 2162 (2021).
44. Imelio, J. A., Trajtenberg, F. & Buschiazzi, A. Allostery and protein plasticity: the keystones for bacterial signaling and regulation. *Biophys. Rev.* **13**, 943–953 (2021).
45. Singh, M., Berger, B., Kim, P. S., Berger, J. M. & Cochran, A. G. Computational learning reveals coiled coil-like motifs in histidine kinase linker domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 2738–2743 (1998).
46. Casino, P., Rubio, V. & Marina, A. Structural Insight into Partner Specificity and Phosphoryl Transfer in Two-Component Signal Transduction. *Cell* **139**, 325–336 (2009).
47. Trajtenberg, F. *et al.* Regulation of signaling directionality revealed by 3D snapshots of a kinase:regulator complex in action. *eLife* **5**, e21422 (2016).

48. Xie, M., Wu, M. & Han, A. Structural insights into the signal transduction mechanism of the K⁺-sensing two-component system KdpDE. *Sci. Signal.* **13**, eaaz2970 (2020).
49. Imelio, J. A. Señalización en bacterias: ¿qué determina la dirección en la transmisión de la señal? (PEDECIBA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 2017).
50. Gao, R. & Stock, A. M. Quantitative Kinetic Analyses of Shutting Off a Two-Component System. *mBio* **8**, e00412-17 (2017).
51. Mideros-Mora, C., Miguel-Romero, L., Felipe-Ruiz, A., Casino, P. & Marina, A. Revisiting the pH-gated conformational switch on the activities of HisKA-family histidine kinases. *Nat. Commun.* **11**, 769 (2020).
52. Shinar, G., Milo, R., Martínez, M. R. & Alon, U. Input–output robustness in simple bacterial signaling systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 19931–19935 (2007).
53. Klein, A. H., Shulla, A., Reimann, S. A., Keating, D. H. & Wolfe, A. J. The Intracellular Concentration of Acetyl Phosphate in *Escherichia coli* Is Sufficient for Direct Phosphorylation of Two-Component Response Regulators. *J. Bacteriol.* **189**, 5574–5581 (2007).
54. Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T. & Inouye, M. Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 7808–7813 (2000).
55. Stewart, R. C., VanBruggen, R., Ellefson, D. D. & Wolfe, A. J. TNP-ATP and TNP-ADP as Probes of the Nucleotide Binding Site of CheA, the Histidine Protein Kinase in the Chemotaxis Signal Transduction Pathway of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 12269–12279 (1998).
56. Plesniak, L. *et al.* Probing the Nucleotide Binding Domain of the Osmoregulator EnvZ Using Fluorescent Nucleotide Derivatives. *Biochemistry* **41**, 13876–13882 (2002).
57. Li, Y., Zeng, J. & He, Z.-G. Characterization of a functional C-terminus of the Mycobacterium tuberculosis MtrA responsible for both DNA binding and interaction with its two-component partner protein, MtrB. *J. Biochem. (Tokyo)* **148**, 549–556 (2010).
58. Albanesi, D. *et al.* Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 16185–16190 (2009).
59. Saita, E. *et al.* A coiled coil switch mediates cold sensing by the thermosensory protein DesK: Signal sensing and transduction by DesK. *Mol. Microbiol.* **98**, 258–271 (2015).
60. Imelio, J., Larrieux, N., Mechaly, A., Trajtenberg, F. & Buschiazzi, A. Snapshots of the Signaling Complex DesK:DesR in Different Functional States Using Rational Mutagenesis and X-ray Crystallography. *BIO-Protoc.* **7**, (2017).
61. Berntsson, O. *et al.* Sequential conformational transitions and α -helical supercoiling regulate a sensor histidine kinase. *Nat. Commun.* **8**, 284 (2017).
62. Berntsson, O. *et al.* Time-Resolved X-Ray Solution Scattering Reveals the Structural Photoactivation of a Light-Oxygen-Voltage Photoreceptor. *Structure* **25**, 933-938.e3 (2017).

63. Gushchin, I. *et al.* Mechanism of transmembrane signaling by sensor histidine kinases. *Science* **356**, eaah6345 (2017).
64. Mechaly, A. E., Sassoon, N., Betton, J.-M. & Alzari, P. M. Segmental Helical Motions and Dynamical Asymmetry Modulate Histidine Kinase Autophosphorylation. *PLoS Biol.* **12**, e1001776 (2014).
65. Willett, J. W., Herrou, J., Briegel, A., Rotskoff, G. & Crosson, S. Structural asymmetry in a conserved signaling system that regulates division, replication, and virulence of an intracellular pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, (2015).
66. Mechaly, A. E. *et al.* Structural Coupling between Autokinase and Phosphotransferase Reactions in a Bacterial Histidine Kinase. *Structure* **25**, 939–944.e3 (2017).
67. Casino, P., Miguel-Romero, L. & Marina, A. Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nat. Commun.* **5**, 3258 (2014).
68. Ferris, H. U., Coles, M., Lupas, A. N. & Hartmann, M. D. Crystallographic snapshot of the Escherichia coli EnvZ histidine kinase in an active conformation. *J. Struct. Biol.* **186**, 376–379 (2014).
69. Hulko, M. *et al.* The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* **126**, 929–940 (2006).
70. Wang, B., Zhao, A., Novick, R. P. & Muir, T. W. Activation and Inhibition of the Receptor Histidine Kinase AgrC Occurs through Opposite Helical Transduction Motions. *Mol. Cell* **53**, 929–940 (2014).
71. Gao, R. & Stock, A. M. Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 160–167 (2010).
72. Slamti, L. & Waldor, M. K. Genetic Analysis of Activation of the *Vibrio cholerae* Cpx Pathway. *J. Bacteriol.* **191**, 5044–5056 (2009).
73. Boyle-Vavra, S., Yin, S., Jo, D. S., Montgomery, C. P. & Daum, R. S. VraT/YvqF Is Required for Methicillin Resistance and Activation of the VraSR Regulon in Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 83–95 (2013).
74. Buelow, D. R. & Raivio, T. L. Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases: Auxiliary regulators of histidine kinases. *Mol. Microbiol.* **75**, 547–566 (2010).
75. Jung, K., Fried, L., Behr, S. & Heermann, R. Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 118–124 (2012).
76. Tschauner, K., Hörnschemeyer, P., Müller, V. S. & Hunke, S. Dynamic Interaction between the CpxA Sensor Kinase and the Periplasmic Accessory Protein CpxP Mediates Signal Recognition in E. coli. *PLoS ONE* **9**, e107383 (2014).
77. Göpel, Y. & Görke, B. Interaction of lipoprotein QseG with sensor kinase QseE in the periplasm controls the phosphorylation state of the two-component system QseE/QseF in Escherichia coli. *PLOS Genet.* **14**, e1007547 (2018).

78. Eguchi, Y. *et al.* B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 18712–18717 (2007).
79. Bick, M. J. *et al.* How to Switch Off a Histidine Kinase: Crystal Structure of *Geobacillus stearothermophilus* KinB with the inhibitor Sda. *J. Mol. Biol.* **386**, 163–177 (2009).
80. Sourjik, V. Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis. *Trends Microbiol.* **12**, 569–576 (2004).
81. Kirby, J. R. Chemotaxis-Like Regulatory Systems: Unique Roles in Diverse Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 45–59 (2009).
82. Huang, Z. *et al.* Cross Talk between Chemosensory Pathways That Modulate Chemotaxis and Biofilm Formation. *mBio* **10**, e02876-18 (2019).
83. Pazy, Y. *et al.* Identical phosphatase mechanisms achieved through distinct modes of binding phosphoprotein substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 1924–1929 (2010).
84. Silversmith, R. E. Auxiliary phosphatases in two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 177–183 (2010).
85. Parashar, V., Mirouze, N., Dubnau, D. A. & Neiditch, M. B. Structural Basis of Response Regulator Dephosphorylation by Rap Phosphatases. *PLoS Biol.* **9**, e1000589 (2011).
86. Pierre, J. L. & Fontecave, M. Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *BioMetals* **12**, 195–199 (1999).
87. Sánchez, M., Sabio, L., Gálvez, N., Capdevila, M. & Dominguez-Vera, J. M. Iron chemistry at the service of life. *IUBMB Life* **69**, 382–388 (2017).
88. Payne, S. M. & Neilands, I. B. Iron and Virulence in the Family Enterobacteriaceae. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **16**, 81–111 (1988).
89. Rosenzweig, A. C. *et al.* Crystal structures of the methane monooxygenase hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath): implications for substrate gating and component interactions. *Proteins* **29**, 141–152 (1997).
90. Krebs, C., Matthews, M. L., Jiang, W. & Bollinger, J. M. AurF from *Streptomyces thioluteus* and a Possible New Family of Manganese/Iron Oxygenases. *Biochemistry* **46**, 10413–10418 (2007).
91. Strushkevich, N. *et al.* Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 10139–10143 (2011).
92. Posey, J. E., Hardham, J. M., Norris, S. J. & Gherardini, F. C. Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 10887–10892 (1999).
93. Posey, J. E. & Gherardini, F. C. Lack of a Role for Iron in the Lyme Disease Pathogen. *Science* **288**, 1651–1653 (2000).
94. Archibald, F. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol. Lett.* **19**, 29–32 (1983).

95. Khademian, M. & Imlay, J. A. How Microbes Evolved to Tolerate Oxygen. *Trends Microbiol.* **29**, 428–440 (2021).
96. Weinberg, E. D. Clinical enhancement of nutritional immunity. *Compr. Ther.* **1**, 38–40 (1975).
97. Skaar, E. P. The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *PLoS Pathog.* **6**, e1000949 (2010).
98. Krewulak, K. D. & Vogel, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1778**, 1781–1804 (2008).
99. Imlay, J. A. Pathways of Oxidative Damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395–418 (2003).
100. Hohenberger, J., Ray, K. & Meyer, K. The biology and chemistry of high-valent iron–oxo and iron–nitrido complexes. *Nat. Commun.* **3**, 720 (2012).
101. Muok, A. R. *et al.* A di-iron protein recruited as an Fe[II] and oxygen sensor for bacterial chemotaxis functions by stabilizing an iron-peroxy species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 14955–14960 (2019).
102. Chandrangu, P., Rensing, C. & Helmann, J. D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 338–350 (2017).
103. Kammler, M., Schön, C. & Hantke, K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 6212–6219 (1993).
104. Lau, C. K. Y., Krewulak, K. D. & Vogel, H. J. Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 273–298 (2016).
105. Louvel, H., Saint Girons, I. & Picardeau, M. Isolation and Characterization of FecA- and FeoB-Mediated Iron Acquisition Systems of the Spirochete *Leptospira biflexa* by Random Insertional Mutagenesis. *J. Bacteriol.* **187**, 3249–3254 (2005).
106. Sestok, A. E., O’Sullivan, S. M. & Smith, A. T. A general protocol for the expression and purification of the intact transmembrane transporter FeoB. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1864**, 183973 (2022).
107. Makui, H. *et al.* Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MnH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol. Microbiol.* **35**, 1065–1078 (2000).
108. Courville, P., Chaloupka, R., Veyrier, F. & Cellier, M. F. M. Determination of Transmembrane Topology of the *Escherichia coli* Natural Resistance-associated Macrophage Protein (Nramp) Ortholog. *J. Biol. Chem.* **279**, 3318–3326 (2004).
109. Grass, G. *et al.* The Metal Permease ZupT from *Escherichia coli* Is a Transporter with a Broad Substrate Spectrum. *J. Bacteriol.* **187**, 1604–1611 (2005).
110. Perry, R. D. *et al.* Manganese transporters Yfe and MnH are Fur-regulated and important for the virulence of *Yersinia pestis*. *Microbiology* **158**, 804–815 (2012).

111. Koropatkin, N., Randich, A. M., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H. B. & Smith, T. J. The Structure of the Iron-binding Protein, FutA1, from *Synechocystis* 6803. *J. Biol. Chem.* **282**, 27468–27477 (2007).
112. Cao, J., Woodhall, M. R., Alvarez, J., Cartron, M. L. & Andrews, S. C. EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe²⁺ transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157:H7: Low pH, Fe²⁺ transporter in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* **65**, 857–875 (2007).
113. Guerinot, M. L. MICROBIAL IRON TRANSPORT. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 743–772 (1994).
114. Faraldo-Gómez, J. D. & Sansom, M. S. P. Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 105–116 (2003).
115. Hider, R. C. & Kong, X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 637 (2010).
116. Albelda-Berenguer, M., Monachon, M. & Joseph, E. Siderophores: From natural roles to potential applications. in *Advances in Applied Microbiology* vol. 106 193–225 (Elsevier, 2019).
117. Chu, B. C. *et al.* Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *BioMetals* **23**, 601–611 (2010).
118. Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003).
119. Ude, J. *et al.* Outer membrane permeability: Antimicrobials and diverse nutrients bypass porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2107644118 (2021).
120. Ferguson, A. D. *et al.* Structural Basis of Gating by the Outer Membrane Transporter FecA. *Science* **295**, 1715–1719 (2002).
121. Yue, W. W., Grizot, S. & Buchanan, S. K. Structural Evidence for Iron-free Citrate and Ferric Citrate Binding to the TonB-dependent Outer Membrane Transporter FecA. *J. Mol. Biol.* **332**, 353–368 (2003).
122. Locher, K. P. *et al.* Transmembrane Signaling across the Ligand-Gated FhuA Receptor. *Cell* **95**, 771–778 (1998).
123. Ferguson, A. D. *et al.* Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Sci.* **9**, 956–963 (2000).
124. Cobessi, D., Celia, H. & Pattus, F. Crystal Structure at High Resolution of Ferric-pyochelin and its Membrane Receptor FptA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **352**, 893–904 (2005).
125. Buchanan, S. K. *et al.* Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 56–63 (1999).
126. Krewulak, K. D. & Vogel, H. J. TonB or not TonB: is that the question? This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue entitled CSBMCB 53rd Annual Meeting — Membrane Proteins in Health and Disease, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochem. Cell Biol.* **89**, 87–97 (2011).

127. Celia, H. *et al.* Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. *Nature* **538**, 60–65 (2016).
128. Karlsson, M., Hannavy, K. & Higgins, C. F. ExbB acts as a chaperone-like protein to stabilize TonB in the cytoplasm. *Mol. Microbiol.* **8**, 389–396 (1993).
129. Kampfenkel, K. & Braun, V. Membrane topology of the Escherichia coli ExbD protein. *J. Bacteriol.* **174**, 5485–5487 (1992).
130. Killmann, H., Videnov, G., Jung, G., Schwarz, H. & Braun, V. Identification of receptor binding sites by competitive peptide mapping: phages T1, T5, and phi 80 and colicin M bind to the gating loop of FhuA. *J. Bacteriol.* **177**, 694–698 (1995).
131. Neugebauer, H. *et al.* ExbBD-Dependent Transport of Maltodextrins through the Novel MalA Protein across the Outer Membrane of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **187**, 8300–8311 (2005).
132. Blanvillain, S. *et al.* Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLoS ONE* **2**, e224 (2007).
133. Cascales, E. *et al.* Colicin Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 158–229 (2007).
134. Schauer, K., Gouget, B., Carrière, M., Labigne, A. & De Reuse, H. Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol. Microbiol.* **63**, 1054–1068 (2007).
135. Chu, B. C. H. & Vogel, H. J. A structural and functional analysis of type III periplasmic and substrate binding proteins: their role in bacterial siderophore and heme transport. *Biol. Chem.* **392**, (2011).
136. Pi, H. & Helmann, J. D. Genome-Wide Characterization of the Fur Regulatory Network Reveals a Link between Catechol Degradation and Bacillibactin Metabolism in *Bacillus subtilis*. *mBio* **9**, e01451-18 (2018).
137. Gray-Owen, S. D. & Schyvers, A. B. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol.* **4**, 185–191 (1996).
138. Boulton, I. C., Gorringe, A. R., Shergill, J. K., Joannou, C. L. & Evans, R. W. A Dynamic Model of the Meningococcal Transferrin Receptor. *J. Theor. Biol.* **198**, 497–505 (1999).
139. Boulton, I. C. *et al.* Purified meningococcal transferrin-binding protein B interacts with a secondary, strain-specific, binding site in the N-terminal lobe of human transferrin. *Biochem. J.* **339** (Pt 1), 143–149 (1999).
140. Shouldice, S. R. *et al.* Structural Basis for Iron Binding and Release by a Novel Class of Periplasmic Iron-Binding Proteins Found in Gram-Negative Pathogens. *J. Bacteriol.* **186**, 3903–3910 (2004).
141. Khasheii, B., Mahmoodi, P. & Mohammadzadeh, A. Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiol. Res.* **250**, 126790 (2021).

142. Gonciarz, R. L. & Renslo, A. R. Emerging role of ferrous iron in bacterial growth and host–pathogen interaction: New tools for chemical (micro)biology and antibacterial therapy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **61**, 170–178 (2021).
143. Outten, C. E. & O’Halloran, A. T. V. Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis. *Science* **292**, 2488–2492 (2001).
144. Escolar, L., Pérez-Martín, J. & De Lorenzo, V. Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *J. Bacteriol.* **181**, 6223–6229 (1999).
145. Hantke, K. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172–177 (2001).
146. Deng, Z. *et al.* Mechanistic insights into metal ion activation and operator recognition by the ferric uptake regulator. *Nat. Commun.* **6**, 7642 (2015).
147. Pérard, J. *et al.* Structural and functional studies of the metalloregulator Fur identify a promoter-binding mechanism and its role in *Francisella tularensis* virulence. *Commun. Biol.* **1**, 93 (2018).
148. Bradley, J. M. *et al.* Bacterial iron detoxification at the molecular level. *J. Biol. Chem.* **295**, 17602–17623 (2020).
149. Delany, I., Rappuoli, R. & Scarlato, V. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*: Regulatory role of Fur in *N. meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **52**, 1081–1090 (2004).
150. Brune, I. *et al.* The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* **7**, 21 (2006).
151. Frunzke, J., Gätgens, C., Brocker, M. & Bott, M. Control of Heme Homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* by the Two-Component System HrrSA. *J. Bacteriol.* **193**, 1212–1221 (2011).
152. Tao, X., Schiering, N., Zeng, H., Ringe, D. & Murphy, J. R. Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. *Mol. Microbiol.* **14**, 191–197 (1994).
153. D’Aquino, J. A., Tetenbaum-Novatt, J., White, A., Berkovitch, F. & Ringe, D. Mechanism of metal ion activation of the diphtheria toxin repressor DtxR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 18408–18413 (2005).
154. Wösten, M. M. S. M., Kox, L. F. F., Chamnongpol, S., Soncini, F. C. & Groisman, E. A. A Signal Transduction System that Responds to Extracellular Iron. *Cell* **103**, 113–125 (2000).
155. Trikha, J., Theil, E. C. & Allewell, N. M. High Resolution Crystal Structures of Amphibian Red-Cell L Ferritin: Potential Roles for Structural Plasticity and Solvation in Function. *J. Mol. Biol.* **248**, 949–967 (1995).
156. Stearman, R., Yuan, D. S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R. D. & Dancis, A. A Permease-Oxidase Complex Involved in High-Affinity Iron Uptake in Yeast. *Science* **271**, 1552–1557 (1996).
157. Groisman, E. A., Kayser, J. & Soncini, F. C. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J. Bacteriol.* **179**, 7040–7045 (1997).

158. Gunn, J. S. *et al.* PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**, 1171–1182 (1998).
159. Wösten, M. M. S. M. & Groisman, E. A. Molecular Characterization of the PmrA Regulon. *J. Biol. Chem.* **274**, 27185–27190 (1999).
160. Soncini, F. C. & Groisman, E. A. Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J. Bacteriol.* **178**, 6796–6801 (1996).
161. Ainsaar, K., Mumm, K., Ilves, H. & Hörak, R. The ColRS signal transduction system responds to the excess of external zinc, iron, manganese, and cadmium. *BMC Microbiol.* **14**, 162 (2014).
162. Olaya-Abril, A. *et al.* The NtrYX Two-Component System of *Paracoccus denitrificans* Is Required for the Maintenance of Cellular Iron Homeostasis and for a Complete Denitrification under Iron-Limited Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 9172 (2022).
163. Steele, K. H., O'Connor, L. H., Burpo, N., Kohler, K. & Johnston, J. W. Characterization of a Ferrous Iron-Responsive Two-Component System in Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **194**, 6162–6173 (2012).
164. Andrews, S. C. Iron Storage in Bacteria. in *Advances in Microbial Physiology* vol. 40 281–351 (Elsevier, 1998).
165. Yang, X., Chiancone, E., Stefanini, S., Ilari, A. & Chasteen, D. N. Iron oxidation and hydrolysis reactions of a novel ferritin from *Listeria innocua*. *Biochem. J.* **349**, 783–786 (2000).
166. Küberl, A., Polen, T. & Bott, M. The pupylation machinery is involved in iron homeostasis by targeting the iron storage protein ferritin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 4806–4811 (2016).
167. Liu, Y., Bauer, S. C. & Imlay, J. A. The YaaA Protein of the *Escherichia coli* OxyR Regulon Lessens Hydrogen Peroxide Toxicity by Diminishing the Amount of Intracellular Unincorporated Iron. *J. Bacteriol.* **193**, 2186–2196 (2011).
168. *Tetrapyrroles: Birth, Life, and Death*. (Landes Bioscience ; Springer Science & Business Media, Austin, Tex. : New York, N.Y., 2009).
169. Gong, H. *et al.* An electron transfer path connects subunits of a mycobacterial respiratory supercomplex. *Science* **362**, eaat8923 (2018).
170. Baureder, M. & Hederstedt, L. Genes Important for Catalase Activity in *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE* **7**, e36725 (2012).
171. Baureder, M. & Hederstedt, L. Heme Proteins in Lactic Acid Bacteria. in *Advances in Microbial Physiology* vol. 62 1–43 (Elsevier, 2013).
172. Hunter, G. A. & Ferreira, G. C. 5-aminolevulinate synthase: catalysis of the first step of heme biosynthesis. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* **55**, 102–110 (2009).
173. Moser, J. V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J.* **20**, 6583–6590 (2001).

174. Dailey, H. A. *et al.* Prokaryotic Heme Biosynthesis: Multiple Pathways to a Common Essential Product. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **81**, e00048-16 (2017).
175. Jordan, P. M. & Seehra, J. S. The biosynthesis of uroporphyrinogen III: Order of assembly of the four porphobilinogen molecules in the formation of the tetrapyrrole ring. *FEBS Lett.* **104**, 364–366 (1979).
176. Schubert, H. L. *et al.* Structural diversity in metal ion chelation and the structure of uroporphyrinogen III synthase. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 595–600 (2002).
177. Schubert, H. L. The structure of *Saccharomyces cerevisiae* Met8p, a bifunctional dehydrogenase and ferrochelatase. *EMBO J.* **21**, 2068–2075 (2002).
178. Hansson, M. & Wachenfeldt, C. Heme b (protoheme IX) is a precursor of heme a and heme d in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**, 121–125 (1993).
179. Hederstedt, L. Heme A biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1817**, 920–927 (2012).
180. Anzaldi, L. L. & Skaar, E. P. Overcoming the Heme Paradox: Heme Toxicity and Tolerance in Bacterial Pathogens. *Infect. Immun.* **78**, 4977–4989 (2010).
181. Genco, C. A. & Dixon, D. W. Emerging strategies in microbial haem capture.: MicroReview. *Mol. Microbiol.* **39**, 1–11 (2001).
182. Wandersman, C. & Stojiljkovic, I. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 215–220 (2000).
183. Hornung, J. M., Jones, H. A. & Perry, R. D. The *hmu* locus of *Yersinia pestis* is essential for utilization of free haemin and haem-protein complexes as iron sources. *Mol. Microbiol.* **20**, 725–739 (1996).
184. Eakanunkul, S. *et al.* Characterization of the Periplasmic Heme-Binding Protein ShuT from the Heme Uptake System of *Shigella dysenteriae*. *Biochemistry* **44**, 13179–13191 (2005).
185. Burkhard, K. A. & Wilks, A. Characterization of the Outer Membrane Receptor ShuA from the Heme Uptake System of *Shigella dysenteriae*. *J. Biol. Chem.* **282**, 15126–15136 (2007).
186. Lansky, I. B. *et al.* The Cytoplasmic Heme-binding Protein (PhuS) from the Heme Uptake System of *Pseudomonas aeruginosa* Is an Intracellular Heme-trafficking Protein to the δ -Regioselective Heme Oxygenase. *J. Biol. Chem.* **281**, 13652–13662 (2006).
187. Ho, W. W. *et al.* Holo- and Apo-bound Structures of Bacterial Periplasmic Heme-binding Proteins. *J. Biol. Chem.* **282**, 35796–35802 (2007).
188. Tong, Y. & Guo, M. Cloning and characterization of a novel periplasmic heme-transport protein from the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **12**, 735–750 (2007).
189. Tong, Y. & Guo, M. Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Arch. Biochem. Biophys.* **481**, 1–15 (2009).

190. Amarelle, V. *et al.* HmuS and HmuQ of *Ensifer/Sinorhizobium meliloti* degrade heme in vitro and participate in heme metabolism in vivo. *BioMetals* **29**, 333–347 (2016).
191. Izadi, N. *et al.* Purification and Characterization of an Extracellular Heme-Binding Protein, HasA, Involved in Heme Iron Acquisition. *Biochemistry* **36**, 7050–7057 (1997).
192. Létoffé, S., Omori, K. & Wandersman, C. Functional Characterization of the HasA_{PF} Hemophore and Its Truncated and Chimeric Variants: Determination of a Region Involved in Binding to the Hemophore Receptor. *J. Bacteriol.* **182**, 4401–4405 (2000).
193. Rossi, M.-S. *et al.* Identification and Characterization of the Hemophore-Dependent Heme Acquisition System of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **69**, 6707–6717 (2001).
194. Arnoux, P. *et al.* The crystal structure of HasA, a hemophore secreted by *Serratia marcescens*. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 516–520 (1999).
195. Verkamp, E., Backman, V. M., Björnsson, J. M., Söll, D. & Eggertsson, G. The periplasmic dipeptide permease system transports 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 1452–1456 (1993).
196. Létoffé, S., Delepelaire, P. & Wandersman, C. Functional Differences between Heme Permeases: *Serratia marcescens* HemTUV Permease Exhibits a Narrower Substrate Specificity (Restricted to Heme) Than the *Escherichia coli* DppABCDF Peptide-Heme Permease. *J. Bacteriol.* **190**, 1866–1870 (2008).
197. Elliott, T. Transport of 5-aminolevulinic acid by the dipeptide permease in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **175**, 325–331 (1993).
198. Maqbool, A. *et al.* Compensating Stereochemical Changes Allow Murein Tripeptide to Be Accommodated in a Conventional Peptide-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 31512–31521 (2011).
199. Wandersman, C. & Delepelaire, P. Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 611–647 (2004).
200. Reniere, M. L., Torres, V. J. & Skaar, E. P. Intracellular metalloporphyrin metabolism in *Staphylococcus aureus*. *BioMetals* **20**, 333–345 (2007).
201. Ascenzi, P., Santucci, R., Coletta, M. & Polticelli, F. Cytochromes: Reactivity of the “dark side” of the heme. *Biophys. Chem.* **152**, 21–27 (2010).
202. Shimizu, T. Binding of cysteine thiolate to the Fe(III) heme complex is critical for the function of heme sensor proteins. *J. Inorg. Biochem.* **108**, 171–177 (2012).
203. Reinhard, M. E. *et al.* Short-lived metal-centered excited state initiates iron-methionine photodissociation in ferrous cytochrome c. *Nat. Commun.* **12**, 1086 (2021).
204. Nishinaga, M. *et al.* Heme controls the structural rearrangement of its sensor protein mediating the hemolytic bacterial survival. *Commun. Biol.* **4**, 467 (2021).
205. Qi, Z. & O’Brian, M. R. Interaction between the Bacterial Iron Response Regulator and Ferrochelatase Mediates Genetic Control of Heme Biosynthesis. *Mol. Cell* **9**, 155–162 (2002).

206. O'Brian, M. R. Perception and Homeostatic Control of Iron in the Rhizobia and Related Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 229–245 (2015).
207. Costa, D., Amarelle, V., Valverde, C., O'Brian, M. R. & Fabiano, E. The Irr and RirA Proteins Participate in a Complex Regulatory Circuit and Act in Concert To Modulate Bacterioferritin Expression in *Ensifer meliloti* 1021. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00895-17 (2017).
208. Keppel, M. *et al.* HrrSA orchestrates a systemic response to heme and determines prioritization of terminal cytochrome oxidase expression. *Nucleic Acids Res.* **48**, 6547–6562 (2020).
209. Keppel, M., Piepenbreier, H., Gätgens, C., Fritz, G. & Frunzke, J. Toxic but tasty – temporal dynamics and network architecture of heme-responsive two-component signaling in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **111**, 1367–1381 (2019).
210. Burgos, J. M. & Schmitt, M. P. The ChrA Response Regulator in *Corynebacterium diphtheriae* Controls Hemin-Regulated Gene Expression through Binding to the *hmuO* and *hrtAB* Promoter Regions. *J. Bacteriol.* **194**, 1717–1729 (2012).
211. Bibb, L. A., Kunkle, C. A. & Schmitt, M. P. The ChrA-ChrS and HrrA-HrrS Signal Transduction Systems Are Required for Activation of the *hmuO* Promoter and Repression of the *hemA* Promoter in *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect. Immun.* **75**, 2421–2431 (2007).
212. Stauff, D. L. & Skaar, E. P. The Heme Sensor System of *Staphylococcus aureus*. in *Contributions to Microbiology* (eds. Collin, M. & Schuch, R.) vol. 16 120–135 (KARGER, Basel, 2009).
213. Stauff, D. L. & Skaar, E. P. *Bacillus anthracis* HssRS signalling to HrtAB regulates haem resistance during infection. *Mol. Microbiol.* **72**, 763–778 (2009).
214. Mike, L. A. *et al.* Two-Component System Cross-Regulation Integrates *Bacillus anthracis* Response to Heme and Cell Envelope Stress. *PLoS Pathog.* **10**, e1004044 (2014).
215. Scott, J. C., Klein, B. A., Duran-Pinedo, A., Hu, L. & Duncan, M. J. A Two-Component System Regulates Hemin Acquisition in *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS ONE* **8**, e73351 (2013).
216. Kumar, A., Toledo, J. C., Patel, R. P., Lancaster, J. R. & Steyn, A. J. C. *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 11568–11573 (2007).
217. Cho, H. Y., Cho, H. J., Kim, Y. M., Oh, J. I. & Kang, B. S. Structural Insight into the Heme-based Redox Sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **284**, 13057–13067 (2009).
218. Voskuil, M. I. *et al.* Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program. *J. Exp. Med.* **198**, 705–713 (2003).
219. Sevalkar, R. R. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* DosS binds H₂S through its Fe³⁺ heme iron to regulate the DosR dormancy regulon. *Redox Biol.* **52**, 102316 (2022).
220. Orillard, E. & Watts, K. J. *Leptospira interrogans* Aer2: an Unusual Membrane-Bound PAS-Heme Oxygen Sensor. *J. Bacteriol.* **204**, e00567-21 (2022).
221. Calvin, M. Chemical evolution. *Chem. Br.* **5**, 22–28 (1969).

222. Stojilkovic, I., Evavold, B. D. & Kumar, V. Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert Opin. Investig. Drugs* **10**, 309–320 (2001).
223. Gray, H. B. & Winkler, J. R. Hole hopping through tyrosine/tryptophan chains protects proteins from oxidative damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 10920–10925 (2015).
224. Finnigan, J. D., Young, C., Cook, D. J., Charnock, S. J. & Black, G. W. Cytochromes P450 (P450s): A review of the class system with a focus on prokaryotic P450s. in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* vol. 122 289–320 (Elsevier, 2020).
225. Nóbrega, C. S. & Pauleta, S. R. Reduction of hydrogen peroxide in gram-negative bacteria – bacterial peroxidases. in *Advances in Microbial Physiology* vol. 74 415–464 (Elsevier, 2019).
226. Wilks, A. Heme Oxygenase: Evolution, Structure, and Mechanism. *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 603–614 (2002).
227. Mathew, L. G., Beattie, N. R., Pritchett, C. & Lanzilotta, W. N. New Insight into the Mechanism of Anaerobic Heme Degradation. *Biochemistry* **58**, 4641–4654 (2019).
228. Hirotsu, S. *et al.* The Crystal Structures of the Ferric and Ferrous Forms of the Heme Complex of HmuO, a Heme Oxygenase of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 11937–11947 (2004).
229. Rivera, M. & Zeng, Y. Heme oxygenase, steering dioxygen activation toward heme hydroxylation. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 337–354 (2005).
230. Unno, M., Matsui, T. & Ikeda-Saito, M. Structure and catalytic mechanism of heme oxygenase. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 553 (2007).
231. Wilks, A. & Heinzl, G. Heme oxygenation and the widening paradigm of heme degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* **544**, 87–95 (2014).
232. Frankenberg-Dinkel, N. Bacterial Heme Oxygenases. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 825–834 (2004).
233. Wahlgren, W. Y. *et al.* Structural mechanism of signal transduction in a phytochrome histidine kinase. *Nat. Commun.* **13**, 7673 (2022).
234. Wilks, A. & Ikeda-Saito, M. Heme Utilization by Pathogenic Bacteria: Not All Pathways Lead to Biliverdin. *Acc. Chem. Res.* **47**, 2291–2298 (2014).
235. Bibb, L. A. & Schmitt, M. P. The ABC Transporter HrtAB Confers Resistance to Hemin Toxicity and Is Regulated in a Hemin-Dependent Manner by the ChrAS Two-Component System in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **192**, 4606–4617 (2010).
236. Fernandez, A. *et al.* Two Coregulated Efflux Transporters Modulate Intracellular Heme and Protoporphyrin IX Availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.* **6**, e1000860 (2010).
237. Holt, S. C. Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol. Rev.* **42**, 114–160 (1978).
238. Charon, N. W. & Goldstein, S. F. Genetics of Motility and Chemotaxis of a Fascinating Group of Bacteria: The Spirochetes. *Annu. Rev. Genet.* **36**, 47–73 (2002).

239. Wolgemuth, C. W., Charon, N. W., Goldstein, S. F. & Goldstein, R. E. The Flagellar Cytoskeleton of the Spirochetes. *Microb. Physiol.* **11**, 221–227 (2006).
240. Haake, D. A. & Matsunaga, J. Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane: Leptospiral outer membrane. *Mol. Microbiol.* no-no (2010) doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07262.x.
241. Adler, B. History of Leptospirosis and Leptospira. in *Leptospira and Leptospirosis* (ed. Adler, B.) vol. 387 1–9 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015).
242. Picardeau, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 297–307 (2017).
243. Vincent, A. T. *et al.* Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007270 (2019).
244. Costa, F. *et al.* Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003898 (2015).
245. Andre-Fontaine, G., Aviat, F. & Thorin, C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic Leptospira spp. in Fresh Water. *Curr. Microbiol.* **71**, 136–142 (2015).
246. Nakamura, S. & Islam, Md. S. Motility of Spirochetes. in *The Bacterial Flagellum* (eds. Minamino, T. & Namba, K.) vol. 1593 243–251 (Springer New York, New York, NY, 2017).
247. Guégan, R., Camadro, J.-M., Saint Girons, I. & Picardeau, M. Leptospira spp. possess a complete haem biosynthetic pathway and are able to use exogenous haem sources: Synthesis and utilization of haem in Leptospira. *Mol. Microbiol.* **49**, 745–754 (2004).
248. Murray, G. L., Ellis, K. M., Lo, M. & Adler, B. Leptospira interrogans requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. *Microbes Infect.* **10**, 791–797 (2008).
249. Murray, G. L. *et al.* Leptospira interrogans requires heme oxygenase for disease pathogenesis. *Microbes Infect.* **11**, 311–314 (2009).
250. Soldano, A. *et al.* Structural and mutational analyses of the Leptospira interrogans virulence-related heme oxygenase provide insights into its catalytic mechanism. *PLOS ONE* **12**, e0182535 (2017).
251. Soldano, A., Yao, H., Rivera, M., Ceccarelli, E. A. & Catalano-Dupuy, D. L. Heme-iron utilization by Leptospira interrogans requires a heme oxygenase and a plastidic-type ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1840**, 3208–3217 (2014).
252. Louvel, H. *et al.* Comparative and Functional Genomic Analyses of Iron Transport and Regulation in Leptospira spp. *J. Bacteriol.* **188**, 7893–7904 (2006).
253. Lo, M. *et al.* Transcriptional Response of Leptospira interrogans to Iron Limitation and Characterization of a PerR Homolog. *Infect. Immun.* **78**, 4850–4859 (2010).
254. Picardeau, M. *et al.* Genome Sequence of the Saprophyte Leptospira biflexa Provides Insights into the Evolution of Leptospira and the Pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS ONE* **3**, e1607 (2008).

255. Kebouchi, M. *et al.* Structure and function of the *Leptospira* interrogans peroxide stress regulator (PerR), an atypical PerR devoid of a structural metal-binding site. *J. Biol. Chem.* **293**, 497–509 (2018).
256. Zavala-Alvarado, C. *et al.* The transcriptional response of pathogenic *Leptospira* to peroxide reveals new defenses against infection-related oxidative stress. *PLOS Pathog.* **16**, e1008904 (2020).
257. Zavala-Alvarado, C. *et al.* The oxidative stress response of pathogenic *Leptospira* is controlled by two peroxide stress regulators which putatively cooperate in controlling virulence. *PLOS Pathog.* **17**, e1009087 (2021).
258. Grassmann, A. A. *et al.* The FUR-like regulators PerRA and PerRB integrate a complex regulatory network that promotes mammalian host-adaptation and virulence of *Leptospira* interrogans. *PLOS Pathog.* **17**, e1009078 (2021).
259. Louvel, H., Betton, J.-M. & Picardeau, M. Heme rescues a two-component system *Leptospira biflexa* mutant. *BMC Microbiol.* **8**, 25 (2008).
260. Picardeau, M. Toolbox of Molecular Techniques for Studying *Leptospira* Spp. in *Spirochete Biology: The Post Genomic Era* (ed. Adler, B.) vol. 415 141–162 (Springer International Publishing, Cham, 2017).
261. Morero, N. R. *et al.* HemR is an OmpR/PhoB-like response regulator from *L. leptospira*, which simultaneously effects transcriptional activation and repression of key haem metabolism genes: *Leptospira* HemR: mechanistics of haem regulation. *Mol. Microbiol.* **94**, 340–352 (2014).
262. Goarant, C., Girault, D., Thibeaux, R. & Soupé-Gilbert, M.-E. Isolation and Culture of *Leptospira* from Clinical and Environmental Samples. in *Leptospira spp.* (eds. Koizumi, N. & Picardeau, M.) vol. 2134 1–9 (Springer US, New York, NY, 2020).
263. Zavala-Alvarado, C. & Benaroudj, N. The Single-Step Method of RNA Purification Applied to *Leptospira*. in *Leptospira spp.* (eds. Koizumi, N. & Picardeau, M.) vol. 2134 41–51 (Springer US, New York, NY, 2020).
264. Cokelaer, T., Desvillechabrol, D., Legendre, R. & Cardon, M. ‘Sequana’: a Set of Snakemake NGS pipelines. *J. Open Source Softw.* **2**, 352 (2017).
265. Köster, J. & Rahmann, S. Snakemake—a scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics* **28**, 2520–2522 (2012).
266. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**, i884–i890 (2018).
267. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359 (2012).
268. Vallenet, D. *et al.* MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Res.* gkz926 (2019) doi:10.1093/nar/gkz926.

269. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2014).
270. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
271. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **57**, 289–300 (1995).
272. St. Laurent, G. *et al.* On the importance of small changes in RNA expression. *Methods* **63**, 18–24 (2013).
273. Aviat, F., Slamti, L., Cerqueira, G. M., Lourdault, K. & Picardeau, M. Expanding the Genetic Toolbox for *Leptospira* Species by Generation of Fluorescent Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 8135–8142 (2010).
274. Cerqueira, G. M. *et al.* Development of Transcriptional Fusions to Assess *Leptospira* interrogans Promoter Activity. *PLoS ONE* **6**, e17409 (2011).
275. Ratet, G. *et al.* Live Imaging of Bioluminescent *Leptospira* interrogans in Mice Reveals Renal Colonization as a Stealth Escape from the Blood Defenses and Antibiotics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3359 (2014).
276. Ozuru, R. *et al.* Adipose tissue is the first colonization site of *Leptospira* interrogans in subcutaneously infected hamsters. *PLoS ONE* **12**, e0172973 (2017).
277. Matsunaga, J. & Haake, D. A. *cis* -Acting Determinant Limiting Expression of Sphingomyelinase Gene *sph2* in *Leptospira* interrogans, Identified with a *gfp* Reporter Plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e02068-18 (2018).
278. Pappas, C. J., Benaroudj, N. & Picardeau, M. A Replicative Plasmid Vector Allows Efficient Complementation of Pathogenic *Leptospira* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 3176–3181 (2015).
279. Demarre, G. *et al.* A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPα) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Res. Microbiol.* **156**, 245–255 (2005).
280. Picardeau, M. Conjugative Transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira* spp. as a New Genetic Tool. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 319–322 (2008).
281. Van Den Ent, F. & Löwe, J. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* **67**, 67–74 (2006).
282. Cooper, H. M. & Patterson, Y. Production of Polyclonal Antisera. *Curr. Protoc. Immunol.* **82**, (2008).
283. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. & Koike, T. Phosphate-binding Tag, a New Tool to Visualize Phosphorylated Proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 749–757 (2006).
284. Gao, R. & Stock, A. M. Quantitative Analysis of Intracellular Response Regulator Phosphatase Activity of Histidine Kinases. in *Methods in Enzymology* vol. 607 301–319 (Elsevier, 2018).

285. Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R. & Peleg, Y. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J. Struct. Biol.* **172**, 34–44 (2010).
286. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
287. Slabinski, L. *et al.* XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics* **23**, 3403–3405 (2007).
288. Jones, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices 1 Edited by G. Von Heijne. *J. Mol. Biol.* **292**, 195–202 (1999).
289. Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F. & Jones, D. T. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *J. Mol. Biol.* **337**, 635–645 (2004).
290. Almagro Armenteros, J. J. *et al.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* **37**, 420–423 (2019).
291. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
292. Mirdita, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* **19**, 679–682 (2022).
293. Price, M. N., Dehal, P. S. & Arkin, A. P. FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles instead of a Distance Matrix. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 1641–1650 (2009).
294. Holm, L. Dali server: structural unification of protein families. *Nucleic Acids Res.* **50**, W210–W215 (2022).
295. Tazhigulov, R. N., Gayvert, J. R., Wei, M. & Bravaya, K. B. eMap: A Web Application for Identifying and Visualizing Electron or Hole Hopping Pathways in Proteins. *J. Phys. Chem. B* **123**, 6946–6951 (2019).
296. Tahoun, M., Gee, C. T., McCoy, V. E., Sander, P. M. & Müller, C. E. Chemistry of porphyrins in fossil plants and animals. *RSC Adv.* **11**, 7552–7563 (2021).
297. Abdelhameed, S. A. M. *et al.* Expanding the reactivity of inorganic clusters towards proteins: the interplay between the redox and hydrolytic activity of Ce(IV)-substituted polyoxometalates as artificial proteases. *Chem. Sci.* **12**, 10655–10663 (2021).
298. Moreira, L. M., Poli, A. L., Costa-Filho, A. J. & Imasato, H. Ferric species equilibrium of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* in alkaline medium: HALS hemichrome as a precursor of pentacoordinate species. *Int. J. Biol. Macromol.* **42**, 103–110 (2008).
299. Traore, E. S. *et al.* Heme Binding to HupZ with a C-Terminal Tag from Group A *Streptococcus*. *Molecules* **26**, 549 (2021).

300. Green, M. R. & Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, 2012).
301. Schroeder, A. *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* **7**, 3 (2006).
302. Poggi, D., Oliveira De Giuseppe, P. & Picardeau, M. Antibiotic Resistance Markers for Genetic Manipulations of *Leptospira* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4882–4885 (2010).
303. Lima, S. *et al.* An allosteric switch ensures efficient unidirectional information transmission by the histidine kinase DesK from *Bacillus subtilis*. *Sci. Signal.* **16**, eabo7588 (2023).
304. Suskiewicz, M. J., Sussman, J. L., Silman, I. & Shaul, Y. Context-dependent resistance to proteolysis of intrinsically disordered proteins. *Protein Sci.* **20**, 1285–1297 (2011).
305. Yang, X. *et al.* Structural basis for protein–protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 17237–17242 (2006).
306. Yang, J., Roe, S. M., Prickett, T. D., Brautigan, D. L. & Barford, D. The Structure of Tap42/ α 4 Reveals a Tetratricopeptide Repeat-like Fold and Provides Insights into PP2A Regulation. *Biochemistry* **46**, 8807–8815 (2007).
307. Schaeffer, R. D. & Daggett, V. Protein folds and protein folding. *Protein Eng. Des. Sel.* **24**, 11–19 (2011).
308. Yeh, T.-L., Lee, C.-Y. S., Amzel, L. M., Espenshade, P. J. & Bianchet, M. A. The Hypoxic Regulator of Sterol Synthesis Nro1 Is a Nuclear Import Adaptor. *Structure* **19**, 503–514 (2011).
309. Gao, Y. *et al.* Acetylation of histone H3K27 signals the transcriptional elongation for estrogen receptor α . *Commun. Biol.* **3**, 165 (2020).
310. Jiang, L. *et al.* Structural basis of protein phosphatase 2A stable latency. *Nat. Commun.* **4**, 1699 (2013).
311. Polizzi, N. F., Migliore, A., Therien, M. J. & Beratan, D. N. Defusing redox bombs? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 10821–10822 (2015).
312. Schreier, S., Triampo, W., Dounghawee, G., Triampo, D. & Chadsuthi, S. Leptospirosis research: fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospires. *Biol. Res.* **42**, (2009).
313. Darie, S. & Gunsalus, R. P. Effect of heme and oxygen availability on hemA gene expression in *Escherichia coli*: role of the *fnr*, *arcA*, and *himA* gene products. *J. Bacteriol.* **176**, 5270–5276 (1994).
314. Choi, P., Wang, L., Archer, C. D. & Elliott, T. Transcription of the glutamyl-tRNA reductase (hemA) gene in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: role of the hemA P1 promoter and the *arcA* gene product. *J. Bacteriol.* **178**, 638–646 (1996).
315. Krieger, R., Rompf, A., Schobert, M. & Jahn, D. The *Pseudomonas aeruginosa* hemA promoter is regulated by Anr, Dnr, NarL and Integration Host Factor. *Mol. Genet. Genomics* **267**, 409–417 (2002).
316. Ranson-Olson, B. & Zeilstra-Ryalls, J. H. Regulation of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 hemA Gene by PrrA and FnrL. *J. Bacteriol.* **190**, 6769–6778 (2008).

317. Gruss, A., Borezée-Durant, E. & Lechardeur, D. Environmental Heme Utilization by Heme-Auxotrophic Bacteria. in *Advances in Microbial Physiology* vol. 61 69–124 (Elsevier, 2012).
318. Akram, N. A. & Ashraf, M. Regulation in Plant Stress Tolerance by a Potential Plant Growth Regulator, 5-Aminolevulinic Acid. *J. Plant Growth Regul.* **32**, 663–679 (2013).
319. Sasaki, M., Watanabe, T., Tanaka, T., K. Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 23–29 (2002).
320. Jiang, M. *et al.* Natural 5-Aminolevulinic Acid: Sources, Biosynthesis, Detection and Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 841443 (2022).
321. Rhaman, M. S. *et al.* 5-aminolevulinic acid-mediated plant adaptive responses to abiotic stress. *Plant Cell Rep.* **40**, 1451–1469 (2021).
322. Iraola, G. *et al.* Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in *Leptospira biflexa* Biofilms. *mSphere* **1**, e00042-16 (2016).
323. Davignon, G. *et al.* *Leptospira interrogans* biofilm transcriptome highlights adaption to starvation and general stress while maintaining virulence. *Npj Biofilms Microbiomes* **10**, 95 (2024).
324. Meganathan, Y., Vishwakarma, A. & Ramya, M. Biofilm formation and social interaction of *Leptospira* in natural and artificial environments. *Res. Microbiol.* **173**, 103981 (2022).
325. Möker, N., Reihlen, P., Krämer, R. & Morbach, S. Osmosensing Properties of the Histidine Protein Kinase MtrB from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **282**, 27666–27677 (2007).
326. Massé, E. & Arguin, M. Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 462–468 (2005).
327. Eshghi, A. *et al.* *Leptospira interrogans* Catalase Is Required for Resistance to H₂O₂ and for Virulence. *Infect. Immun.* **80**, 3892–3899 (2012).
328. Corin, R. E., Boggs, E. & Cox, C. D. Enzymatic degradation of H₂O₂ by *Leptospira*. *Infect. Immun.* **22**, 672–675 (1978).
329. Liu, Y. & Ortiz De Montellano, P. R. Reaction Intermediates and Single Turnover Rate Constants for the Oxidation of Heme by Human Heme Oxygenase-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 5297–5307 (2000).
330. Fateen, E., Abd-Elfattah, A., Gouda, A., Ragab, L. & Nazim, W. Porphyrins profile by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for the diagnosis of porphyria. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* **12**, 49–58 (2011).
331. Lesne, E. *et al.* Coiled-Coil Antagonism Regulates Activity of Venus Flytrap-Domain-Containing Sensor Kinases of the BvgS Family. *mBio* **9**, e02052-17 (2018).
332. Hsing, W., Russo, F. D., Bernd, K. K. & Silhavy, T. J. Mutations That Alter the Kinase and Phosphatase Activities of the Two-Component Sensor EnvZ. *J. Bacteriol.* **180**, 4538–4546 (1998).
333. Izzard, J. W. & Kendall, D. A. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.* **13**, 765–773 (1994).

334. Deiana, A., Forcelloni, S., Porrello, A. & Giansanti, A. Intrinsically disordered proteins and structured proteins with intrinsically disordered regions have different functional roles in the cell. *PLOS ONE* **14**, e0217889 (2019).
335. Handa, T., Kundu, D. & Dubey, V. K. Perspectives on evolutionary and functional importance of intrinsically disordered proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **224**, 243–255 (2023).
336. Huete, S. G. & Benaroudj, N. The Arsenal of Leptospira Species against Oxidants. *Antioxidants* **12**, 1273 (2023).