

Tesis Doctoral

# Factores de adhesión de *Rhizobium leguminosarum* y su rol en la formación de biofilms

Vozza, Nicolás Federico

2012

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

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

Cita tipo APA:

Vozza, Nicolás Federico. (2012). Factores de adhesión de *Rhizobium leguminosarum* y su rol en la formación de biofilms. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Vozza, Nicolás Federico. "Factores de adhesión de *Rhizobium leguminosarum* y su rol en la formación de biofilms". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

# **Factores de adhesión de *Rhizobium leguminosarum* y su rol en la formación de biofilms**

---

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

**Nicolás Federico Vozza**

**Director: Angeles Zorreguieta**

**Consejero de estudios: Angeles Zorreguieta**

**Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir**

**Buenos Aires, Marzo de 2012**

*A la memoria de mamá...*

“...your light’s reflected now,  
reflected from afar...  
We were but stones...  
Your light made us stars”  
(E. Vedder, “*Lightyears*”)

## **Agradecimientos**

A la Educación pública, laica y gratuita, que me formó desde los inicios de mi entendimiento y sin la cual nada de esta tesis hubiera sido posible. A la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por brindarme un lugar donde poder crecer académica, científica e intelectualmente.

A mi familia por brindarme un lugar donde poder crecer como persona. Por enseñarme entre todos y seguir educándome siempre: Papá, Mamá, Ceci, Gaby

A Euge por ser la compañera de ruta perfecta, el amor de mi vida y la mujer más hermosa al mismo tiempo y sobre todo por bancarme estos años de tesis.

A Angeles Zorreguieta por la darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por estar ahí, por la dirección, la paciencia y la confianza en mi trabajo todos estos años.

A todos los miembros del labo:

Fer, por la calma, la solidaridad y la amistad durante años  
Alf, por la ciencia de alto nivel, la ñoñez y la ayuda siempre dispuesta  
Dianim, por la ayuda experimental, logística, alimentaria y tanta, tanta otra  
Piku, por tu desinterés, tu ingenuidad y tu paciencia con las bromas (algunas pesadas!)  
Daniela, por hacerme un lugar en la línea de rhizobium y las enseñanzas iniciales  
Patri, por tu invaluable ayuda experimental y las pilas que le metes al labo  
Walter, por la buena onda, las plantitas en un labo de rizobios y por el "Club"  
Carol, por compartir tu cocina "especial" y ponerle el brazo fuerte al "Club"  
Gastoncito, por ponerle onda y humor, y por hacerme la gamba con el equipo  
Rodri, por el oído científico siempre abierto y los consejos positivos

A todo el Instituto Leloir por dejarme formar parte y a su personal científico y no científico por toda la ayuda desinteresada (menciones especiales a Maxi Neme, Lab 304, Lab 207, lab 202 y un montón de individualidades más).

A mi comisión de seguimiento: Dres. María T. Téllez-Iñón, Martín Radrizzani y Gastón París; por ser una constante fuente de coherencia, una ayuda importante y un cable a tierra cuando lo necesité.

A los amigos que me trajo la carrera: Ana, Mariana, Burri, Cliff, Lobo, LucasBuk, Georgi y un largo etcétera que injustamente queda afuera; por todos los esfuerzos compartidos en una carrera para nada fácil.

A los compañeros de LxR: Los históricos: Nacho, Gaita, Julito, Milo, CURI!, Daro y las nuevas generaciones: Leo, Gastón y todos los que se pusieron la camiseta: Rodrigo, Pablito, Maxi, Lukitas, Luis, Juve y otros tantos. Por los triunfos resonantes y las derrotas evitables 😊 pero también por hacer entre todos esfuerzos compartidos y sin reproches.

A Ambar, por los paseos y el amor incondicional, por llenarme de anécdotas y por necesitarme tanto.

A todos los compañeros de este viaje asombroso que duró tantos años y tantos kilómetros, gracias por ser parte de mi vida y dejarme ser parte de la suya.

## **Factores de adhesión de *Rhizobium leguminosarum* y su rol en la formación de biofilms**

*Rhizobium leguminosarum* es una  $\alpha$ -proteobacteria que puede establecer simbiosis con ciertas leguminosas. La formación de un biofilm puede favorecer la persistencia en suelos y en la rizosfera y también contribuir a la competitividad para la infección de la leguminosa. En esta tesis se estudiaron factores importantes para la adhesión a diversos sustratos y la formación de biofilms. Uno de los factores estudiados fue la proteína de adhesión RapA1, secretada a través del sistema PrsDE. Se sobreexpresó RapA1 y se observó que esto produjo diversos fenotipos de superficie, incluido el aumento de adhesión a sustratos abióticos y la formación aumentada de biofilms in vitro. Se estudió la relación entre RapA1 y el exopolisacárido ácido (EPS) y el requerimiento del EPS y PrsDE para formar biofilms en flujo continuo. Se analizó la localización de RapA1 y de otras proteínas relacionadas y se estudiaron posibles mecanismos involucrados en la localización. Algunos estudios complementarios sobre el efecto de RapA1 sobre la superficie, efecto de expresión de otras Raps y regulación de genes relacionados con la adhesión fueron encarados de manera inicial. La interacción entre Polisacáridos de superficie y adhesinas proteicas resulta clave para la adhesión y formación de biofilms, dos fenómenos importantes en la biología de *Rhizobium* y de relevancia para la humanidad.

**Palabras clave:** *Rhizobium*; biofilm; adhesión; exopolisacárido; proteínas secretadas; localización.

## **Adhesion factors from *Rhizobium leguminosarum* and their role on biofilm formation**

*Rhizobium leguminosarum* is an  $\alpha$ -proteobacteria that can establish symbiosis with certain legumes. Biofilm formation can improve persistence in soil and in the rhizosphere and can also contribute to competitiveness for legume infection. Several factors, important for substrate adhesion and biofilm formation, were studied in this thesis. The PrsDE-secreted protein RapA1 was one of the adhesion factors studied in this work. RapA1 was overexpressed and we observed this produced a complex surface phenotype, enhancing adhesion to abiotic substrata and the formation of biofilms in vitro. The interaction between RapA1 and the acidic exopolysaccharide (EPS) was examined as well as the requirement for EPS and a functional PrsDE for biofilm formation in continuous-flow conditions. The subcellular localization of RapA1 and related proteins was also examined and putative mechanisms for localization were studied. Some additional studies on the effect of RapA1 overexpression on cell surface, the expression of other Rap family members and the analysis of the expression of adhesion-relevant genes were performed but only preliminary results were obtained. The interactions between surface polysaccharides and adhesion proteins is key for adhesion and biofilm formation; two important phenomena in the biology of *Rhizobium* and of great relevance to man.

**Key words:** *Rhizobium*; biofilm; adhesion; exopolysaccharide; secreted proteins; localization

## **Abreviaturas**

aác. Aminoácido  
ABC. (ATP binding cassette) Cassette de unión al ATP  
ADN ácido desoxirribonucleico  
AHL. Acil-homoserina lactona  
AMP ampicilina  
ARN ácido ribonucleico  
ATP adenosina trifosfato  
bv. biovariedad  
Cm cloramfenicol  
CLSM “Confocal Laser Scanning Microscopy” (microscopía de barrido láser confocal)  
C-term. Carboxiterminal  
CPS polisacárido capsular  
EDTA ácido etilendiaminotetraacético  
EPS Exopolisacárido  
Fragm. Fragmento  
Fix- nódulos incapaces de fijar nitrógeno atmosférico  
Gal galactosa  
GalA ácido galacturónico  
GFP (green fluorescent protein) proteína verde fluorescente  
GluA ácido glucurónico  
GlcN glucosamina  
Kb kilo bases  
KDa KiloDalton  
LPS lipopolisacárido  
Man manosa  
ME membrana externa  
MFP (membrane fusion protein) proteína de fusión de membranas  
MI membrana interna  
min minuto  
mM milimolar  
Mpb mega pares de bases  
DO densidad óptica  
OMF (outer membrane factor) proteína de la membrana externa  
ORF (open reading frame) marco de lectura abierto  
pb pares de bases  
PCR (polimerase chain reaction) reacción en cadena de la polimerasa  
PM peso molecular  
PrsD-PrsE sistema de secreción de proteínas, componentes D y E.  
pSym plásmido simbiótico  
Rap (Rhizobium adhering protein) proteína de adhesión de Rhizobium  
rpm revoluciones por minuto  
RTX proteínas (repeat in toxin) repeticiones en tandem presentes en toxinas



SDS-PAGE Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)

Sist. Sistema

Spp especies

SST Sistema de Secreción Tipo (I, II, III, IV, V, VI)

TAT (Twin-Arginine Translocation) Sistema de secreción Traslocador de Doble Arginina.

TCA ácido tricloroacético

3-D tridimensional

UDP uridina trifosfato

....

**Glosario:**

Buffer: solución de pH constante o tampón.

Pellet: precipitado obtenido después de centrifugación de una solución

Uptake: incorporación mediante sistemas de transporte.

## **INDICE**

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
Rhizobium leguminosarum .....	12
Clasificación .....	12
Genética .....	13
Identificación .....	14
Fisiología .....	15
Nodulación y fijación de nitrógeno.....	17
Relevancia.....	17
Infección y nodulación.....	18
Adhesión a la raíz: el rol de los polisacáridos y lectinas.....	20
El EPS: su estructura, biosíntesis y su rol en la infección a la leguminosa.....	24
Secreción de proteínas: relevancia en los rizobios.....	27
Breve revisión sobre los sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas .....	27
Secreción de proteínas en los rizobios.....	31
SSTI y el sistema PrsDE de R. leguminosarum.....	34
Las proteínas Rap(s) (Rhizobial adhering proteins).....	37
Biofilms.....	41
Biofilms como modo de vida.....	41
Factores involucrados en la adhesión a superficies y en la formación de un biofilm. Matriz extracelular de un biofilm.....	44
Biofilms formados por rizobios y bacterias cercanas filogenéticamente .....	48
Objetivos .....	52
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO 1. Sobreproducción de RapA1 y estudio de sus efectos en la adhesión a superficies y formación de biofilms. ....</b>	<b>53</b>
1. Análisis de secuencias muestra un alto grado de homología entre RapA1 y RapA2 en diferentes biovars. ....	53
2. Análisis de la función de RapA1 en las interacciones celulares y la formación de biofilms in vitro	55
A. Sobreexpresión y secreción de RapA1 .....	55
B. La sobreexpresión de RapA1 afecta los fenotipos de colonia, sedimentación y formación de un biofilm in vitro.....	59
C. Interacciones célula-célula y localización de RapA1 .....	62
D. Los fenotipos y la localización de RapA1 requieren la presencia del exopolisacárido ácido (EPS) .....	65
<b>CAPITULO 2. Estudio de la formación de biofilms en flujo continuo. ....</b>	<b>70</b>
1. El sistema de flujo continuo.....	70
2. Análisis de las condiciones óptimas y requerimientos nutricionales.....	71
3. PrsDE y el EPS son necesarios para la formación de biofilm en flujo continuo .....	72
4. RapA1 aumenta la adhesión y la formación de biofilms in vitro en condiciones de flujo continuo. ....	74
5. El efecto de RapA1 es dependiente de la síntesis del EPS.....	77

<b>CAPITULO 3. Localización de proteínas Rap: factores involucrados .....</b>	<b>79</b>
1. Localización de PlyB.....	79
2. Rol de PrsDE en la localización de RapA1.....	81
<b>CAPÍTULO 4. Factores que participan en la formación de biofilms <i>in vitro</i>: otras observaciones .....</b>	<b>84</b>
1. Alteraciones de superficie y formación de microvesículas.....	84
2. Estudios sobre la función de RapB en las interacciones celulares y la formación de un biofilm <i>in vitro</i> .....	88
3. Estudios preliminares sobre la regulación de <i>rapA2</i> y <i>pssA</i> .....	91
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>97</b>
La función de RapA1 y su interacción con el EPS.....	97
Localización de RapA1 y PlyB.....	99
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>105</b>
Cepas y plásmidos.....	105
Medios y condiciones de cultivo .....	106
Antibióticos .....	108
Conservación de cepas.....	109
Amplificación de secuencias mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) ..	109
Oligonucleótidos.....	109
<i>Colony</i> PCR.....	110
Ligación en pGEMT-easy .....	110
Extracción de ADN cromosómico .....	111
Extracción de ADN plasmídico .....	112
Geles de agarosa .....	113
Extracción de proteínas extracelulares en <i>R. leguminosarum</i> .....	113
Electroforesis de proteínas.....	114
Western Blot .....	115
Conjugación tri- o biparental en placa .....	116
Preparación de células electrocompetentes y electroporación .....	117
<i>E. coli</i> de alta eficiencia para electroporación .....	118
Curvas de crecimiento .....	118
Cuantificación de la adhesión por cristal violeta .....	119
Secuenciación de ADN, análisis de secuencia .....	119
Análisis filogenéticos.....	119
Búsqueda de promotores.....	120
Ensayo autoagregación.....	120
Inmunofluorescencia, Microscopía de fluorescencia y confocal .....	120
Obtención de mutantes por inserción: <i>rapB</i> .....	121
Confirmación de la mutante <i>rapB</i> por PCR ( <i>R. leguminosarum</i> ).....	122
Construcción de fusiones de región regulatoria y GFP.....	122
Cultivo de biofilms en sistema de flujo continuo .....	123
Observación por Microscopía electrónica de barrido.....	124
Preparación de fracción de vesículas de membrana .....	124
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>125</b>



# INTRODUCCIÓN

## Rhizobium leguminosarum

### Clasificación

*Rhizobium leguminosarum* es una  $\alpha$ -proteobacteria que pertenece al orden Rhizobiales, dentro del cual también se encuentran familias que contienen patógenos animales, como *Brucellaceae* y *Bartonellaceae*, patógenos vegetales y diversos simbiontes como *Bradyrhizobiaceae* y *Rhizobiaceae* entre otros (Fig I1). Una característica común es su capacidad de interactuar con hospedadores eucariotas superiores, muchas veces como habitantes intracelulares en una relación que puede ser de patogenicidad como el caso de los

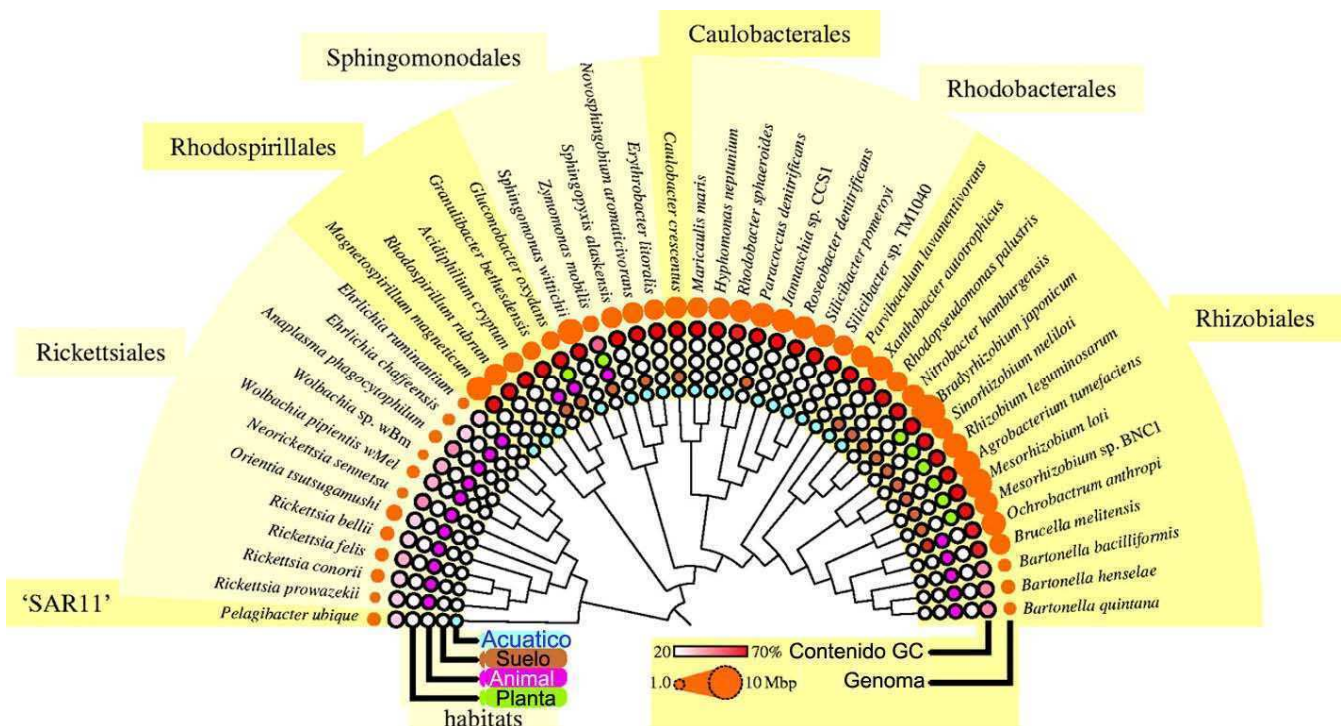


Figura I1. Clasificación de las  $\alpha$ -proteobacterias.

Se muestra el hábitat ecológico, el contenido de pares GC y los tamaños de los genomas de las especies más representativas. Adaptado de Ettema y col. 2003.

*Rickettsiales* o, dentro de los *Rhizobiales*, los géneros *Brucella* y *Bartonella* o en una interacción simbiótica como en el caso de las grupo genéricamente denominado “rizobios”. Los géneros capaces de establecer relaciones simbióticas con plantas presentan genomas de gran tamaño (7-9 Mb), característica común entre bacterias que deben subsistir en suelos y donde la presión de selección es alta ([1], Fig 11) y la diversidad metabólica es una ventaja adaptativa [2,3].

### **Genética**

En los genomas de rizobios analizados hasta el presente, se han detectado características comunes que son el reflejo del estilo de vida que afrontan. Los genomas de rizobios se presentan como multipartitos, con diferentes replicones de número variable según el género [4–6]. La mayoría cuenta con uno o dos cromosomas o genoma “core” (núcleo) y un número variable de plásmidos o genoma “accesorio”. Esta configuración podría ser ventajosa para la división, dado que presenta múltiples orígenes de replicación, lo que contribuiría a la velocidad de replicación del genoma y a la transferencia horizontal de genes. La posibilidad de movilizar plásmidos o regiones, como los “Plásmidos Simbióticos” ó “Islas de Simbiosis”, contribuiría a la transferencia de funciones simbióticas dentro de la comunidad de rizobios del suelo. El genoma de *R. leguminosarum* consta de un núcleo (core) y un número variable de megaplásmidos. En *R. leguminosarum* bv *viciae* 3841, el tamaño total del genoma asciende a 7,75 Mb y está compuesto por 7 replicones: un cromosoma de 5 Mb y 6 replicones independientes o “megaplásmidos”, dos de estos megaplásmidos pueden ser transferidos por conjugación (pRL7 y pRL8) y el plásmido simbiótico se halla bien identificado (pRL10); el cromosoma tiene una alta representación de genes esenciales, pero también hay genes importantes representados en los plásmidos. Existen similitudes entre los plásmidos y el cromosoma respecto de las clases funcionales de genes que poseen, a excepción de pRL7 que es bastante diferente del resto del genoma, con alta proporción de genes de función desconocida o aparentemente foráneos [5]. El genoma de *R. leguminosarum* bv *trifolii* WSM1325 tiene 7.4 Mb y está separado en 5 replicones: el cromosoma y 4 plasmidos [7]. Entre los genomas secuenciados de rizobios, se puede encontrar que una alta proporción de genes está involucrada en funciones metabólicas y a la movilización y el aprovechamiento de metabolitos o la eliminación de toxinas [4,5,8].

Se ha propuesto que la duplicación de genes explicaría el gran tamaño de los genomas de rizobacterias [4]. Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre el tamaño de genoma y el número de parálogos [9] y se planteó que este fenómeno sería una ventaja adaptativa al ambiente [10]. En los genomas de los rizobios se han observado un mayor número de vías metabólicas que las que se conocen, por ejemplo, en *E.coli* [6], incluyendo un número importante de posibilidades fermentativas. La plasticidad metabólica de los rizobios les permitiría colonizar competitivamente el suelo, la rizosfera y también, luego de diferenciarse a bacteroide, habitar el medio intracelular de la planta, tres nichos ciertamente muy diferentes.

Los rizobios son particularmente ricos en sistemas de transporte del tipo ABC (ATP-Binding Cassette); *R.leguminosarum* presenta un alto número de sistemas de transporte, distribuidos por todo el genoma, pero con especial representación en los plásmidos pRL9, pRL12 y pRL10 (27.5%, 21.7% y 18% del total de genes en cada replicón).

Esta distribución es consistente con la posesión de sistemas de eflujo y “uptake” como ventajas adaptativas de genoma “accesorio” para soportar diferentes condiciones ambientales y disponibilidad de recursos, también observado en otras especies del género [4].

### **Identificación**

*R. leguminosarum* pertenece al grupo *Rhizobium/Agrobacterium* y su especie posee dos biovars *trifolii* y *viciae*, identificados por el hospedador vegetal que son capaces de nodular (*trifolii* es capaz de nodular trébol y *viciae* es capaz de nodular vicia, arveja y algunas especies de poroto). Originalmente se incluía un tercer biovar en esta especie (*phaseoli*), recientemente asignado a una especie independiente cercana: *R. etli* [11].

Desde hace siglos se documentó el efecto fertilizante que la rotación de cultivos de leguminosas tenía sobre el suelo [12]. Luego se describió, a finales del siglo XIX, que los nódulos en las raíces eran responsables de la capacidad de estas plantas de aprovechar nitrógeno atmosférico (Hellriegel). Poco después se identificó un microorganismo a partir de los nódulos de *Vicia faba* (Beijerinck, 1888), inicialmente denominado *Bacillus radicola*, y luego denominado *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1889). Se demostró que ésta era la bacteria que inducía la formación de nódulos en la raíz de leguminosas dentro de los cuales bacterias diferenciadas proveían nitrógeno reducido a la planta. Al tiempo de ser publicados estos

trabajos se comenzó a emplear la práctica de inoculación en la agricultura [13].

Inicialmente se identificó que bacterias obtenidas de nódulos de arvejas no inducían nódulos en otras especies (Nobbe 1895), lo que dio origen a una clasificación basada en los grupos de organismos nodulados por cada rizobio. Sin embargo, se mostró que algunas especies son capaces de nodular una amplia gama de leguminosas; este es el caso de *Rhizobium* sp. NGR234, capaz de nodular más de cien géneros [14,15]. Esto introdujo la necesidad de un sistema de clasificación más robusto. Luego de casi un siglo de los trabajos e identificaciones iniciales, las técnicas moleculares de filogenia como la secuenciación de ADN y el uso de la secuencia de ciertos genes para la determinación de especies y grupos filogenéticos aportaron herramientas fundamentales para la clasificación de los rizobios [16]. Sin embargo en la última década se han planteado evidencias de la ambigüedad del uso de secuencias del rRNA como “gold standard” y se ha planteado la necesidad de una revisión general a la hora de asignar nomenclaturas y taxonomías dentro del género, sugiriéndose la combinación de diversas herramientas para una clasificación menos ambigua [15].

### ***Fisiología***

Los rizobios como grupo de bacterias rizosféricas que presentan la posibilidad de nodular leguminosas, se encuentran en su hábitat natural en varios estados fisiológicos posibles. En vida libre en el suelo pueden tener que afrontar estrés osmótico o ácido; en la rizosfera, las condiciones pueden ser más favorables nutricionalmente, pero es una región de alta competencia, y dentro del nódulo el estado fisiológico es muy particular cuando la bacteria se diferencia a bacteroide. Esta necesidad de lidiar con situaciones tan disímiles puede ser una explicación de los genomas de gran tamaño y complejos que las bacterias de este grupo presentan y que pueden albergar una amplia diversidad metabólica [17].

*Rhizobium leguminosarum* es microaerófilo, metaboliza azúcares a través de la vía Entner-Doudoroff [4,18] y es capaz de utilizar la vía de las pentosas fosfato y hacer gluconeogénesis para la síntesis de biomoléculas (aunque no está claro el requerimiento de la gluconeogénesis dentro del nódulo). Se ha detectado el uso del ciclo de los ácidos tricarbónicos para la oxidación de ácidos orgánicos [19] tanto en condiciones de cultivo como en bacteroides. También se ha descrito la utilización de di-sacáridos como sacarosa, por parte de los rizobios de “crecimiento rápido” (*Rhizobium* y *Sinorhizobium*) y se han identificado



operones que contienen sistemas de transporte y enzimas degradadoras de oligosacáridos como trehalosa, rafinosa, maltosa y sacarosa [20]. También se ha mostrado la capacidad de los rizobios de metabolizar polialcoholes, como el manitol [21] el cual puede ser usado como fuente principal de carbono.

*Rhizobium leguminosarum* puede utilizar una gran cantidad de moléculas con fines metabólicos; se observa en los genomas de los rizobios que existe una gran cantidad de sistemas de transporte y catabolismo de diferentes metabolitos que podrían estar relacionados a la diversificación de las bacterias asociadas a plantas [22]. Los rizobios también son capaces de metabolizar una amplia gama de moléculas liberadas por plantas; esta característica podría servir como ventaja adaptativa y como estrategia de “preselección” en la relación simbiótica, ya que según se ha propuesto, las capacidades simbióticas podrían estar ligadas genéticamente a capacidades metabólicas [17].

El metabolismo de aminoácidos es de gran importancia en *R. leguminosarum*; existe una estrecha relación entre el flujo de ácidos orgánicos di- o tricarboxílicos, la transaminación – que se realiza a través de glutamina sintasa/GOGAT- y la fijación de nitrógeno. La interrupción de alguno de estos procesos afecta seriamente el resto y resulta en reducción o pérdida de la capacidad de fijar nitrógeno [18]. Otros factores metabólicos importantes para el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico son los oligonutrientes como los metales y las vitaminas; además del complejo de nitrogenasa, que tiene requerimiento de Fe y Mo, se requieren otras metaloproteínas como algunos citocromos específicos de nódulo y proteínas de la cadena respiratoria. Los rizobios poseen una gran capacidad para obtener hierro, ya sea libre o para generar cofactores, y además tienen una notable capacidad de captar hierro asociado a cofactores no propios, demostrando una mayor amplitud de recursos para la obtención de este metal que otros linajes [17]. La regulación de genes por sensado de hierro se da a través de factores distintos a los utilizados por enterobacterias, utilizando una proteína del tipo RirA, sobre todo en el caso de *R. leguminosarum*, *S. meliloti* y especies cercanas, a diferencia de factores del tipo Fur utilizados por *E. coli*; sin embargo, un factor homólogo a Fur regula el operón *sitABCD*, identificado en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* como encargado de la captación de manganeso, un cofactor importante para la fijación de nitrógeno, entre otros procesos [23].

Recientemente se ha estudiado la captación de Níquel (un cofactor importante para la fijación de Nitrógeno), identificándose proteínas responsables del transporte de níquel en el

operón "Hup" (por Hydrogen uptake), destacándose en *Bradyrhizobium japonicum* una proteína secretada capaz de unir níquel mediante regiones ricas en histidina [24] y recientemente se identificó en *R. leguminosarum* un transportador de níquel requerido para la actividad de nitrogenasa [25].

Los rizobios requieren vitaminas para crecer, por ejemplo biotina, tiamina, ácido Pantoténico, riboflavina, ácido nicotínico y algunas otras, según la especie [26]; el activo metabolismo de ácidos carboxílicos hace importante el requerimiento de vitaminas que actúan como cofactores de rutas metabólicas de síntesis o degradación. Los medios de cultivo desarrollados para rizobios poseen estas vitaminas según necesidad, y se ha detectado que algunas de estas vitaminas se hallan en la rizósfera, ya sea por secreción por parte de la planta o porque son secretadas por otros organismos allí presentes como *Pseudomonas* o *Azospirillum*. En efecto, en ocasiones, el efecto positivo de la coinoculación con diferentes especies puede responder a la complementación metabólica-nutricional o de señales que se observa entre distintos géneros. Se han caracterizado algunas vías de biosíntesis o salvataje de vitaminas en rizobios [27,28], las cuales parecerían estar altamente inducidas en la rizosfera, posiblemente para aprovechar la captación de intermediarios secretados o por necesidad metabólica al momento de la nodulación.

## **Nodulación y fijación de nitrógeno**

### ***Relevancia***

Las leguminosas abarcan grupos de granos y forrajes (cereales, semillas, vainas y porotos). Componen el 27% de la producción de cultivos, consistiendo el 30% de la ingesta de proteínas de la población mundial [29]. El aporte nutricional de las leguminosas es importante, sobre todo si se tiene en cuenta la accesibilidad de grupos relegados económicamente en los que la representación de legumbres en la dieta es más elevada; se conoce a las legumbres como "la carne del pobre".

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso de importancia biológica y agronómica fácilmente distinguibles, sin embargo, también es importante en otros aspectos, por ejemplo en términos ecológicos, en los que la fertilización con nitrógeno de origen industrial demanda gastos de energía y químicos de orígenes no renovables, además de la contribución al cambio

climático por el gasto de combustible y energía en su producción y distribución. Para el año 2050, se espera que la población mundial se duplique. Es razonable esperar que la necesidad de nitrógeno fijado para la producción agrícola también se duplique. Si esta necesidad se supe a través de fuentes industriales, el uso de fertilizantes sintéticos de nitrógeno se incrementará hasta igualar la cantidad producida biológicamente. Esta cantidad de fertilizante requerirá la combustión de aproximadamente 270 millones de toneladas de carbón o su equivalente (fuente: Biological Nitrogen Fixation: Research Challenges - A Review of Research Grants Funded by the U.S. Agency for International Development [1994]).

Además, el mal uso de fertilizantes de nitrógeno puede llevar a la acumulación de nitrógeno en el suelo y su escorrentía a cuencas hidrográficas puede llevar a disminución en la concentración de oxígeno o inclusive a generar áreas de anoxia estacionales (fuente: <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/nitrogen/mcs-2011-nitro.pdf>). A nivel económico, sustituir la fijación biológica de nitrógeno con fertilizantes nitrogenados industriales, insumiría un gasto de 7 a 10 mil millones de dólares [30], además del impacto ambiental mencionado previamente. Resulta entonces de vital importancia para la producción de alimentos de la humanidad, que la nodulación simbiótica de las leguminosas ocurra de manera exitosa; la fijación biológica de nitrógeno en las simbiosis rizobio-leguminosa es sumamente beneficiosa para el sistema biológico, para la agricultura y puede evitar altos costos ecológicos y económicos en la provisión mundial de alimentos.

### ***Infeción y nodulación***

*Rhizobium leguminosarum* es capaz de establecer simbiosis con diversas leguminosas (arveja, lenteja, poroto, vicia y trébol, entre otros) y fijar nitrógeno dentro de nódulos de raíz. La interacción con leguminosas hospedadoras es un proceso que involucra un “diálogo” químico entre bacterias y hospedador, usando una variedad de moléculas señal [31,32]. Las plantas secretan compuestos fenólicos (flavonoides) que son reconocidos específicamente por una proteína sensora bacteriana (NodD) que activa diversos genes, incluyendo aquellos involucrados en la síntesis de los “factores de nodulación” o “factores Nod” compuestos por lipoquitooligosacáridos [33]. Las sustituciones químicas específicas en estos factores determinan la especificidad de interacción con la leguminosa hospedadora [34]. Luego de la interacción de los factores Nod específicos con sus receptores sobre la célula de la planta, se

inducen transformaciones morfológicas y fisiológicas, los pelos radiculares se curvan y los niveles de calcio intracelular oscilan [35]. Una bacteria asociada a superficie puede quedar atrapada al curvarse el pelo radicular y establecer un hilo de infección produciendo alteraciones en la membrana plasmática de las células del hospedador gracias al suplemento continuo de factores Nod [36]. Mientras tanto, se estimula la división de las células corticales de la raíz, llevando a la formación del primordio nodular [34]. De acuerdo al tejido radicular que genere el primordio nodular, se tratará de nódulos determinados cuando provienen de células corticales externas. Los nódulos determinados son, más frecuentes en especies de leguminosas “tropicales” (como la soja), presentan una morfología esférica y son viables por un período más corto. Cuando el nódulo se origina a partir de células corticales más profundas da lugar a un nódulo indeterminado, que es viable por períodos más prolongados y posee una morfología elongada, producto de su continuo crecimiento, pudiéndose diferenciar la región meristemática apical, donde hay activa fijación de nitrógeno, de la zona proximal, que se compone de células más próximas a la senescencia. Este tipo de nódulos es más frecuente en leguminosas del tipo “templado”, como alfalfa, nodulada por *Sinorhizobium meliloti* o vicia, nodulada por *R. leguminosarum*. [37]

Mientras se induce el primordio nodular, se desarrolla el hilo de infección; la bacteria infectante se divide produciendo una “infección clonal”, y cuando el hilo de infección alcanza el nódulo de la raíz, las bacterias son liberadas dentro de las células hospedadoras rodeadas de membrana de origen vegetal; a continuación, las bacterias se diferencian en bacteroides, expresando genes relacionados con la fijación de nitrógeno [38] (Fig 12).

En el fenómeno de nodulación, luego de un proceso de infección y de evasión de las defensas de la planta, los rizobios son liberados dentro de la estructura proliferativa que dará lugar al nódulo. Dentro del nódulo ocurre un proceso de diferenciación en el que se expresan los genes involucrados en la fijación biológica de nitrógeno y la fisiología de la bacteria cambia notablemente para dar lugar a un estado enfocado en la fijación de nitrógeno atmosférico en forma de amonio. Este proceso tiene una demanda energética muy alta, necesitándose 16 moléculas de ATP por cada molécula diatómica de nitrógeno atmosférico asimilado. Una vez reducido, el nitrógeno puede atravesar membranas por difusión y ser asimilado por la planta o bien ser transaminado por el bacteroide a esqueletos carbonados; el metabolismo de carboxilatos es muy importante en la simbiosis y se ha observado un importante flujo de ácidos di- o tri-carboxílicos hacia el bacteroide [18].

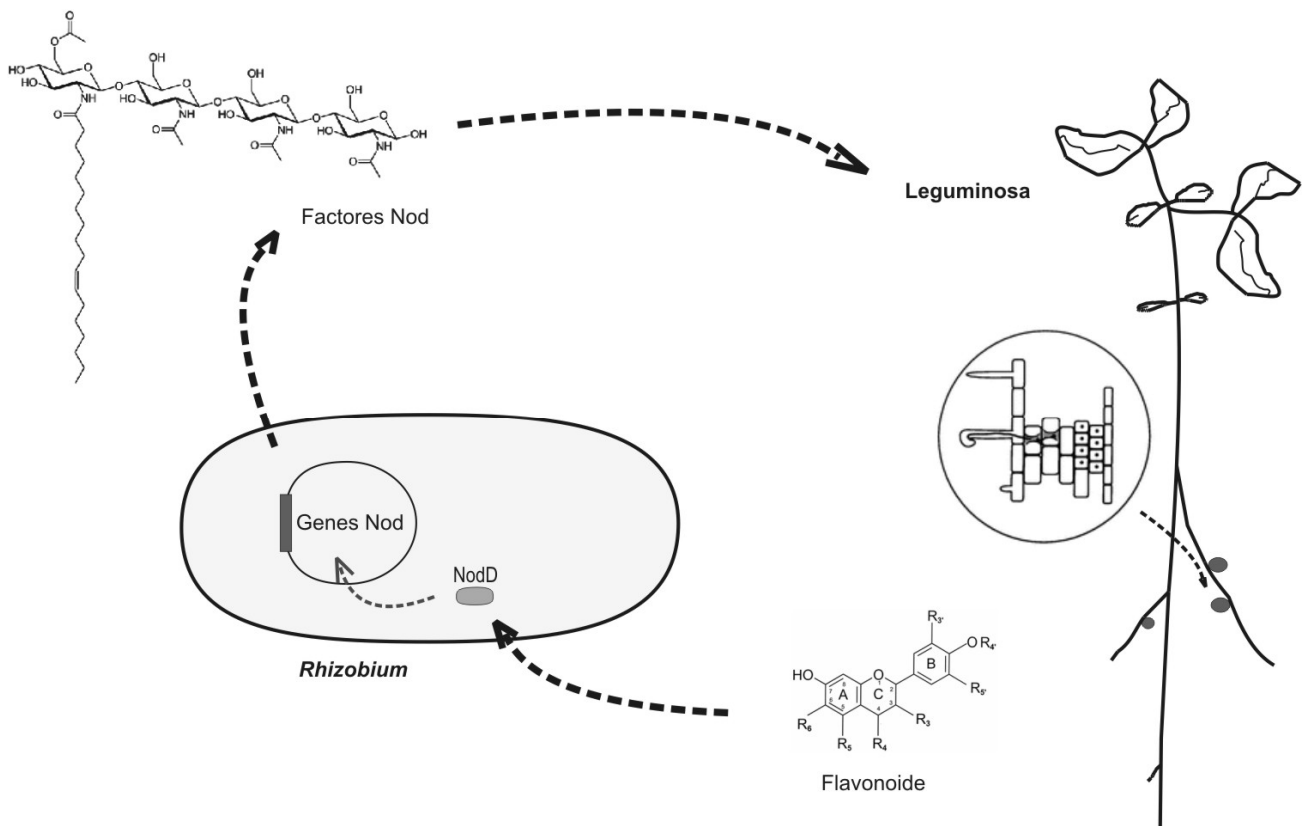


Figura 12. Interacción química entre leguminosa y rizobio.  
Se esquematiza el intercambio de atractantes químicos y la interacción con sus receptores.

### Adhesión a la raíz: el rol de los polisacáridos y lectinas.

La adhesión del rizobio al pelo radicular contribuye a la eficiencia de nodulación [33]. Es evidente que en este proceso las estructuras o moléculas asociadas a la superficie del rizobio pueden tener un rol crucial. Los rizobios son capaces de sintetizar diversos polisacáridos que cumplen múltiples roles fisiológicos. Los polisacáridos de superficie pueden tener un papel importante en la adhesión a superficies, y en el caso de adhesión a células vegetales, los polisacáridos son importantes tanto para la adhesión como para la infección. Se ha propuesto que diferentes mecanismos de adhesión mediados por distintos polisacáridos podrían estar disponibles en diferentes condiciones ambientales [33,39].

La unión del rizobio a los pelos radiculares es un paso clave en el establecimiento de simbiosis. En *R. leguminosarum*, la unión a raíz se planteó originalmente como diferenciable entre unión “temprana” y unión “firme”, en la que lectinas y diferentes polisacáridos tienen funciones particulares (Fig 13) [40].

Se postuló que las lectinas provenientes de la planta hospedadora tenían importancia en la especificidad de selección del rizobio que iba a nodular la planta debido a que se observaba especificidad rizobio-leguminosa ya en estadios iniciales de adhesión. Experimentos en los que se expresaba de manera transgénica una lectina de arveja en trébol, lograron cruzar la preferencia de un biovar de *R. leguminosarum*, siendo las plantas de trébol transgénicas noduladas por *R. leguminosarum* bv. *viciae* (biovar que nodula la arveja) [41]. Sin embargo, a medida que aumenta la divergencia entre el par leguminosa hospedadora y rizobio productor del factor Nod, la capacidad de ampliar el espectro de nodulación por agregado de lectina disminuye [42].

Un modelo planteado para la adhesión rizobio-planta hospedadora proponía que la adhesión inicial era mediada por lectinas de la planta hospedadora y que el reconocimiento entre lectina, rizobio y planta era específico y determinaba la especificidad de nodulación [43–45]. Luego se observó que la especificidad de interacción no está dada por las moléculas de adhesión, si no por la interacción entre el factor Nod secretado por el rizobio y el receptor de tipo LysM de la planta [35]; pero se plantea que lectinas de planta y proteínas de los rizobios son importantes en los

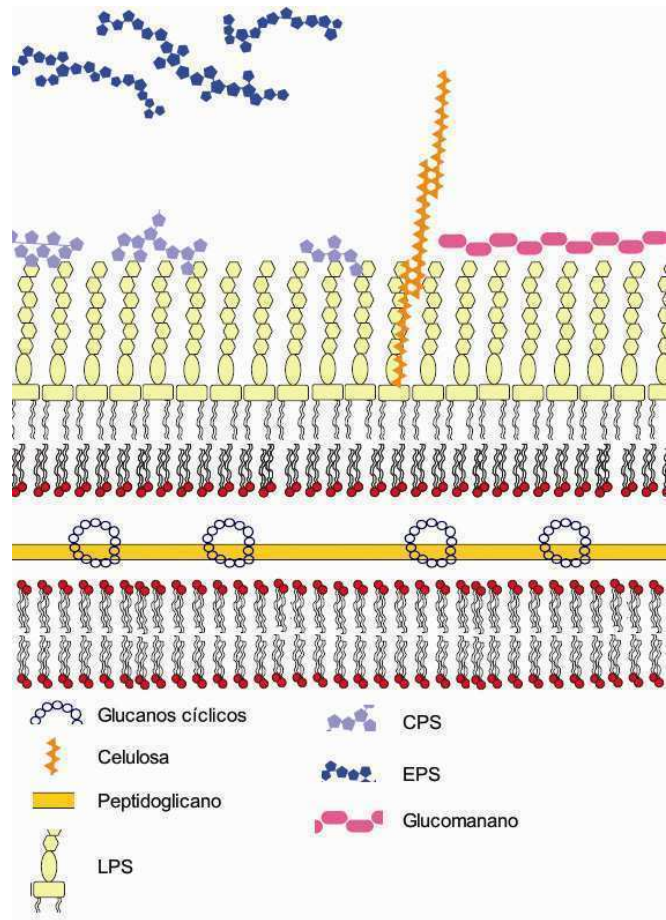


Figura 13. Modelo de polisacáridos de superficie de Rhizobium. Modificado a partir de Rodríguez-Navarro y col. 2007

pasos iniciales de adhesión [33,46]. En condiciones neutras o básicas especialmente, el calcio sería importante para la adhesión [47], y se ha propuesto que una proteína que une calcio, la rihadhesina, es fundamental para la adhesión de los rizobios y estaría difundida en varios géneros [46,48]. Se postuló que la rihadhesina posee dos dominios de unión, uno con afinidad por la superficie de la bacteria, otro capaz de unirse a la superficie de la raíz, y que la proteína actúa como “puente” estableciendo la unión. Se sabe que *R. leguminosarum* secreta diversas proteínas al medio y que éstas son capaces de unir calcio [49,50], sin embargo ninguna de estas proteínas identificadas es rihadhesina, ni se ha clonado el gen de rihadhesina.

RapA1 fue identificada en una búsqueda genética para identificar el gen de rihadhesina [51] (Ver sección 5.d); si bien existen varias similitudes entre Rihadhesina y RapA1, por ejemplo, ambas son proteínas secretadas, unen Calcio y podrían actuar como adhesinas; la diferencia entre los tamaños de ambas proteínas (14 KDa para Rihadhesina, 24KDa para RapA1) hace improbable que RapA1 sea Rihadhesina [51,52]. Además, la familia Rap tiene homólogos sólo en el género *Rhizobium*, mientras que se ha planteado la presencia de Rihadhesina en varios miembros de la familia rhizobiaceae [46,48]. El comportamiento de RapA1 asemeja en parte al de la lectina BJ38 de *B. japonicum*, que se localiza polarmente y es capaz de aglutinar bacterias en forma de rosetas [53].

Recientemente, se ha mostrado que en la unión temprana de *R. leguminosarum* a los pelos radiculares, participarían lectinas vegetales que interaccionarían con un polisacárido neutro de superficie y de localización polar denominado glucomanano [54,55]. El glucomanano fue capaz de unir las lectinas PSL (de *Pisum sativum*) y VSL (de *Vicia sativa*). Justamente, usando dichas lectinas acopladas a Rhodamina se demostró la localización unipolar del glucomanano sobre la superficie de la bacteria. Además, cuando se utilizó lectina acoplada a Rhodamina (PSL-Rh) para marcar bacterias asociadas a raíz, se observó que el polo marcado (donde está presente el Glucomanano) es el que interactúa con el pelo radicular. Esta marca puede ser desplazada por el hapteno, pero la unión a raíz no se altera, demostrando que el glucomanano no es suficiente por sí solo para la adhesión polar a pelos radiculares. Los autores proponen que al pH estudiado, la adhesión por rihadhesina (o similares) podría ser aun funcional. En condiciones ácidas, el calcio estaría no disponible por lo que adhesinas que usan calcio no serían un mecanismo viable de adhesión; en estas condiciones el mecanismo glucomanano-lectina sería preponderante [33]. Laus y col (2006) sugieren que

ciertas adhesinas proteicas se expresarían en el mismo polo que el glucomanano y serían responsables de la adhesión a pH~7.2 [54].

El gen *gmsA* que codifica para una glicosil transferasa fue identificado en una búsqueda de genes de biosíntesis de polisacáridos de superficie [55], entre los que se identificó también el gen *gelA* involucrado en la síntesis del polisacárido gelano; *gmsA* fue clave en la síntesis del glucomanano y los genes vecinos estarían relacionados en la producción y secreción del glucomanano; la mutación en *gmsA* no impidió la formación de biofilms *in vitro*, sin embargo la adhesión a raíz a pH ligeramente ácido (6,5) fue seriamente afectada en la cepa *gmsA*, pero no a pH ligeramente alcalino (7,5) de manera coherente al modelo planteado en trabajos previos, en el que el

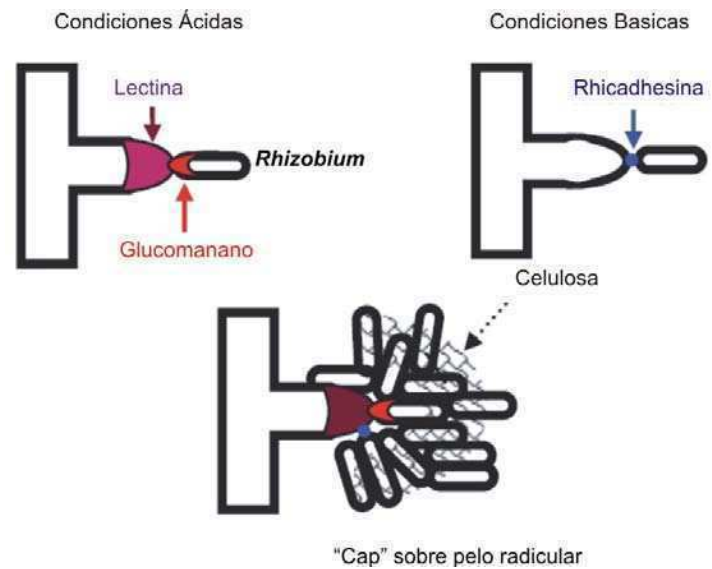


Figura 14. Modelo de adhesión a pelo radicular. Se distingue entre condiciones ácidas (izquierda) y condiciones neutras o básicas (derecha). Se observan diferentes roles de moléculas adhesivas de superficie. Adaptado de Downie (2010).

glucomanano es importante para la adhesión a pH ácido ya que en condiciones alcalinas las lectinas de planta que unen al glucomanano se separan de los pelos radiculares [54]. El grupo de genes asociado a *gmsA* estaría conservado en rizobios y *Agrobacterium* pero no en *Brucella*, sugiriendo que el glucomanano presentaría funciones relacionadas a la asociación con raíz. Una mutante deficiente en la síntesis del glucomanano presentó una desventaja competitiva frente a la cepa silvestre en la infección y la nodulación de plantas de arveja, confirmando que el glucomanano sería importante en la interacción con el pelo radicular [55].

La síntesis de celulosa tendría participación en la unión firme de *R. leguminosarum* a pelos radiculares formando un "cap" o "cofia" en el extremo del pelo radicular [48,56], pero no fue requerida para la unión de células individuales al pelo radicular o los pasos posteriores en la nodulación [55,57].



## El EPS: su estructura, biosíntesis y su rol en la infección a la leguminosa

Los rizobios suelen producir importantes cantidades de un hetero-exopolisacárido ácido (EPS). La estructura básica del EPS de *R. leguminosarum* consiste en un polímero de unidades repetitivas compuestas por un octasacárido que contiene glucosa, ácido glucurónico y galactosa, en una relación 5:2:1 con sustituciones particulares (Fig.15). Al EPS se le han adjudicado múltiples roles; las

investigaciones realizadas sobre el EPS ácido mostraron de manera consistente que las cepas deficientes en EPS son incapaces de lograr una nodulación exitosa y usualmente se detienen en el hilo de infección, los nódulos resultantes son pequeños, blancos e incapaces de fijar nitrógeno [58]. Se ha propuesto que en *S. meliloti*, fracciones de bajo peso molecular del EPS actúan como señales lo cual justificaría el fenotipo deficiente en infección. Otros datos experimentales apoyan esta hipótesis, dado que la fracción

de bajo peso molecular del EPS puede ser suplementada “en trans” (ya sea purificada o co-inoculando con cepa compatible fix-) y recuperarse la infectividad; mas aún, dicha complementación requiere cantidades picomolares de EPS cuando es suplementado, apoyando la hipótesis de molécula señal [57,59–61]. Además, la especificidad estructural es importante dado que la co-inoculación con rizobios que producen EPS con estructura diferente no reestablece la capacidad de nodulación [59]. Todos estos datos sugieren una función más compleja para el EPS que la de “cubierta protectora”. Se ha propuesto que el EPS actúa inhibiendo la respuesta de defensa de la planta hospedadora durante la infección y la nodulación [62,63]. Inclusive se ha sugerido al EPS como factor señal implicado en la elongación del hilo de infección y como “amplificador” de la vía de señalización de factores Nod [64].

La ruta biosintética del EPS se ha caracterizado en diversos estudios; en *R. leguminosarum* los genes *pss* (polysaccharide synthesis) se encuentran en grandes operones

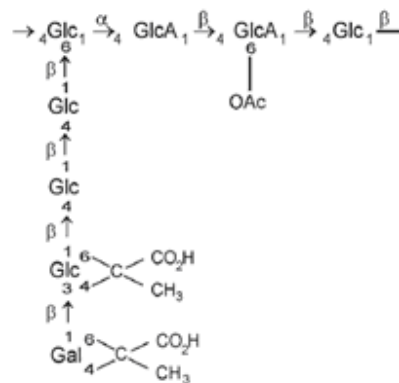


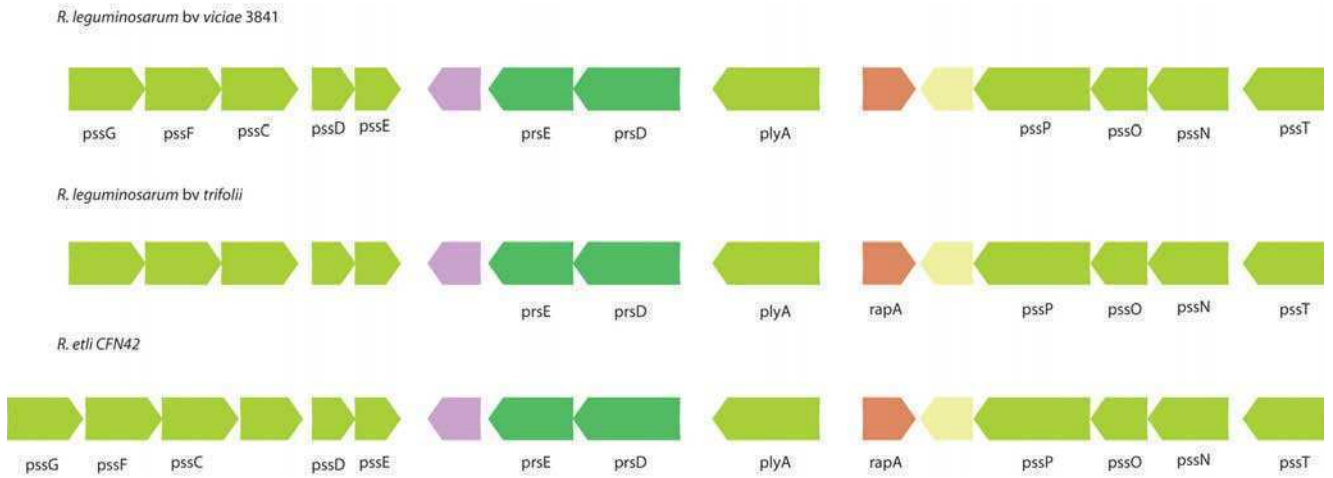
Figura 15. Unidad repetitiva del EPS de *R. leguminosarum*.

Glc, glucosa; GlcA, ácido glucurónico; Gal, galactosa; Se observan las sustituciones O-acetil (OAc) y piruvil.

conservados y cercanos genéticamente [64] (Fig 16). El gen *pssA* codifica para una poliprenol-glucosil transferasa, que genera el primer intermediario en la biosíntesis del EPS (Fig 16 A). Una mutación en el gen *pssA* previene completamente la producción del EPS (Fig 16); llamativamente, la mutación en *pssA* también afecta la síntesis del CPS de *R. leguminosarum* bv *viciae* [55,65]. Esto no debe sorprender, dado que ha sido reportado que ambos polisacáridos poseen idéntica composición de sus azúcares y posiblemente una fuerte similitud en su estructura siendo su única diferencia la proximidad relativa a la superficie celular de la bacteria (Fig 16) [64] y posiblemente el grado de sustitución por O-acetato o piruvato [66,67].

La síntesis del EPS/CPS sería necesaria para la adhesión a los pelos radiculares pero no a la raíz ya que una cepa *pssA* fue capaz de unirse a la región de las uniones entre células en la epidermis de raíz, por lo que se postula que diferentes determinantes son requeridos para establecer biofilms en diferentes superficies [55]. Además, se ha propuesto un equilibrio en el que el EPS enmascara las fibras de celulosa, controlando la agregación mediada por celulosa a lo largo del proceso de infección; como evidencia se ha observado que mutantes deficientes en EPS arrestan su proceso infeccioso antes que los mutantes deficientes en EPS y celulosa, debido a la agregación dentro del hilo de infección [57].

**A**



**B**

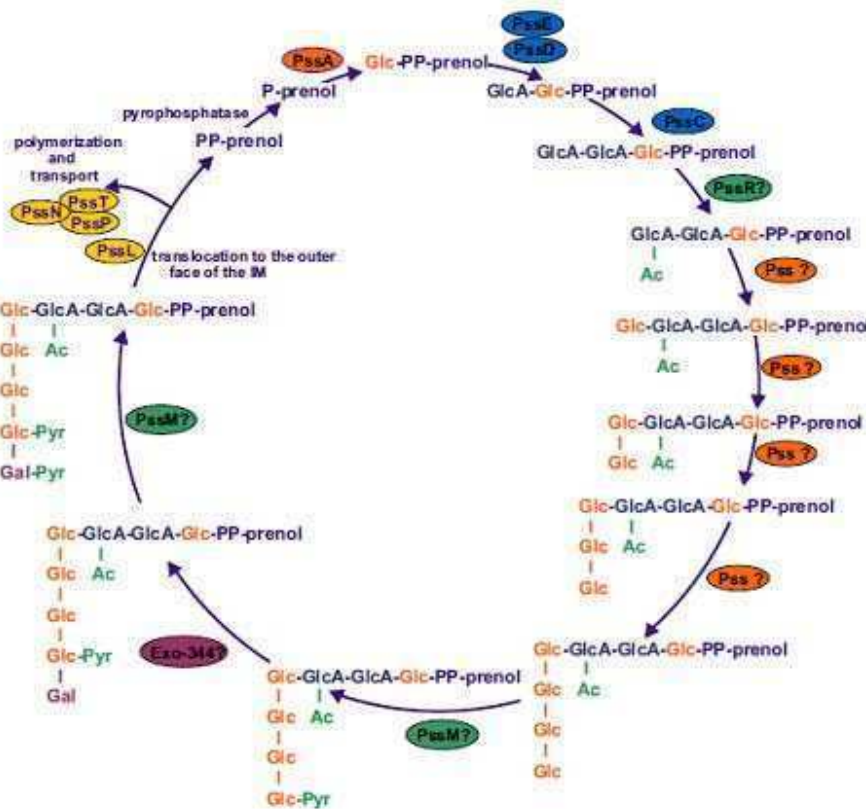


Figura I6. Organización genética. Operón *pssG-E* y *pssPONT* en diferentes cepas de *R. leguminosarum* y *R. etli* (A) Se observa la organización genética y la cercanía con *prsDE*, la glicanasa *plyA* y *rapA1*. Los genes marcados en verde corresponden a aquellos de la ruta biosintética del EPS ácido, en violeta se indica un ORF de función desconocida con homología a una lipasa y en amarillo una proteína hipotética conservada. Aquellos ORF sin nombre no han sido asignados. *rapA1* en *R. leguminosarum* 3841 es un pseudogen pero esta cepa alberga un gen parálogo a *rapA1* en otra región del genoma. (B) Ruta biosintética del exopolisacárido planteada por Skorupska y col. (2006). Se muestra PssA como una enzima fundamental en la síntesis del EPS

## Secreción de proteínas: relevancia en los rizobios

### *Breve revisión sobre los sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas*

La secreción de proteínas es un factor común entre todas las bacterias que tienen una activa relación con su entorno; en general los rizobios poseen una gran variedad de sistemas de secreción y una importante fracción de sus genomas dedicada a la secreción e incorporación de moléculas [4,5,68]. Las bacterias presentan estructuras dedicadas especialmente a la secreción de proteínas y existen diferentes tipos. Algunos de estos sistemas parecen haber evolucionado a partir de organelas asociadas a la superficie.

La investigación en la secreción de proteínas de las bacterias Gram-negativas ha logrado clasificar los sistemas de secreción en al menos 6 tipos. Todos ellos tienen una forma independiente de exportar proteínas a través de la membrana externa y algunos de ellos comparten vías de movilización a través de la membrana interna. Estos sistemas han sido denominados Sistemas de Secreción tipo I, II, III, IV, V y el más recientemente identificado, tipo VI.

Los Sistemas de Secreción Tipo I (SSTI) tienen como su ejemplo arquetípico la secreción de la  $\alpha$ -hemolisina (HlyA) de *E.coli*. Las características salientes de la secreción a través de estos sistemas es la ausencia de una secuencia señal clivada en la proteína secretada y la presencia de repeticiones de motivos tipo RTX (“Repeat in Toxin”) [69]. Las características del mecanismo de este sistema serán explicadas en la sección 5.c cuando se describa el SSTI PrsDE de *R. leguminosarum*.

El sistema de Secreción Tipo II se asocia fuertemente con el “General Export Pathway” (GEP) debido a que depende de éste. El SSTII es capaz de secretar proteínas que se hallan en el periplasma hacia el medio extracelular, las cuales pueden estar completamente plegadas o inclusive ser multiméricas. Los ejemplos más conocidos son la secreción de toxina cólica en *V. cholerae*, toxina entérica en *P. aeruginosa* y Pululanasa (amilasa) de *Klebsiella oxytoca* [70]. Este sistema de secreción guarda similitud significativa con la biogénesis del *pilus* tipo IV. La secreción a través de este sistema es un proceso en dos pasos definidos, siendo el primero la secreción al espacio periplásmico gracias los sistemas GEP o TAT (Twin-Arginine Traslocation), a través de la maquinaria “Sec” o “Gsp”, la cual se compone por una ATPasa

(SecA o GspE) y proteínas que forman un poro (*SecDEFGY* o *GspFGHIJKL*) o a través del TAT, un sistema capaz de traslocar proteínas plegadas al espacio periplásmico, reconociendo un motivo en el extremo amino terminal que posee dos argininas.

Cuando se completó el paso de secreción al periplasma, las proteínas pueden adquirir su plegamiento nativo (a veces gracias a isomerasa DsbA) y ser secretadas a través del poro formado por la secretina de membrana externa GspD [71].

Una vía secretoria similar es la vía “Chaperona/Acomodador” (en inglés “Chaperone/Usher”) que utiliza la secreción a través del GEP para luego dirigir, mediante una chaperona, la secreción a través del poro formado por “Usher”. Este estilo de secreción es utilizado por *E. coli* para secretar y generar fimbrias (genes *fim*) o pili tipo P (genes *pap*) ([72]).

Los sistemas de secreción tipo III están ampliamente difundidos en las bacterias patógenas a sea animales (*Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*) o vegetales (*Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*) [73]. La secreción a través del SSTIII ocurre de manera concertada atravesando las membranas interna y externa a través de un complejo multiproteico que las bacterias utilizan para traslocar efectores de virulencia al citoplasma de células hospedadoras. Este sistema de secreción posee una gran similitud con la maquinaria de biogénesis del flagelo, el anillo interno es semejante al motor flagelar y la secreción de proteínas se realiza con gasto de ATP; llegándose a clasificar a la maquinaria de producción del flagelo como un SSTIII.

Los genes estructurales del SSTIII son conservados entre las bacterias estudiadas, pero existe divergencia entre las proteínas traslocadas, llamadas “efectores”, de diferentes especies así como el blanco de las mismas en la célula huésped. Estos sistemas de secreción están en general codificados en regiones definidas de plásmidos o locus cromosomales, posiblemente movilizables y se los considera “Islas de Patogenicidad” o parte de ellas, como por ejemplo en *Salmonella* la isla SPI-II [74]. La secreción mediada por contacto que presenta el SSTIII y su estructura tridimensional estudiada por microscopía electrónica [75], que asemeja a una aguja capaz de inyectar efectores, generaron la denominación “inyectisoma” para este sistema, sin embargo, también se ha observado secreción de proteínas al ambiente, de manera independiente de contacto [76]. En el rizobio *Rhizobium* sp NGR234, un simbiote de amplio rango, se ha caracterizado la presencia de un SSTIII y su regulación y utilización en simbiosis [77,78].

El Sistema de Secreción tipo IV se estudió prototípicamente en *A. tumefaciens* y al igual que el SSTIII se caracteriza por la transmisión de moléculas a otra célula blanco, se han estudiado sistemas de secreción semejantes relacionados con la patogénesis de *H. pylori* [79] y *Brucella suis* [80] entre otros [81]. Se han descrito a grandes rasgos dos clases de SSTIV, uno de ellos es el *Vir* de *A. tumefaciens*, que trasloca el T-DNA a la célula vegetal. El otro tipo es semejante a los genes *tra* de conjugación, asociándose a la maquinaria conjugativa a la categoría de SSTIV.

Existen dos modelos sobre el modo de acción de este sistema. Uno de ellos sugiere que las proteínas tipo *Vir* forman un canal a través de ambas membranas y los complejos proteico o proteína-DNA atraviesan ya sea ambas membranas o inicialmente la membrana interna (a través del SSTIV o de GEP) y luego la membrana externa utilizando un canal formado por proteínas *Vir*. El otro modelo plantea que las proteínas o los complejos proteína-DNA son traslocados a una estructura tipo "pilus" y ésta es polimerizada desde la membrana interna hacia periplasma y luego hacia el exterior celular, empujando los sustratos secretado a la manera de un pistón. Esta dicotomía de modelos también se plantea para ciertos sistemas de secreción tipo II [82], con los que el SSTIV guarda semejanzas.

En *R. leguminosarum* no se ha identificado un SSTIV [68] (tabla I1), pero se halla presente en otros rizobios (tabla I1), así como en *A. tumefaciens*.

Los Autotransportadores componen el grupo llamado "Sistema de Secreción Tipo V". Éstos se componen por proteínas únicas o a veces pares de proteínas, que median la secreción de dominios a través de la membrana externa. Primero son secretadas a periplasma gracias a la maquinaria *Sec*; habitualmente las proteínas secretadas por autotransportadores poseen el péptido señal para secreción por *Sec*, que luego es removido. En el periplasma los Autotransportadores generan un poro gracias a la inserción de múltiples pasos transmembrana en forma de hojas  $\beta$  antiparalelas. Existen dos formatos de secreción tipo V: la secreción por Autotransportador o tipo Va, consiste en un único polipéptido de cadena larga que posee en su estructura primaria la secuencia señal reconocida por *Sec*, y la zona del barril  $\beta$ , además del dominio pasajero. Una vez secretado al periplasma, las hojas  $\beta$  se insertan en la membrana externa y el dominio pasajero adquiere su plegamiento en periplasma y es secretado; éste puede permanecer adherido a la superficie de la bacteria o ser clivado y liberado. La secreción tipo Vb, también llamada "Two-Partner Secretion" (secreción de dos compañeros) utiliza dos polipéptidos; ambos son secretados a periplasma de manera *Sec*-dependiente, una vez allí, el

polipéptido que codifica para el poro se inserta en membrana de manera semejante al dominio  $\beta$  en Autotransportadores, mientras el péptido pasajero (un polipéptido independiente en este caso) se pliega en periplasma y luego interactúa, al parecer específicamente, con el poro y es secretado. Muchas veces estos sistemas se hallan juntos en forma de operón [83] y al igual que el tipo Va, este sistema parece estar dedicado al tránsito de grandes proteínas.

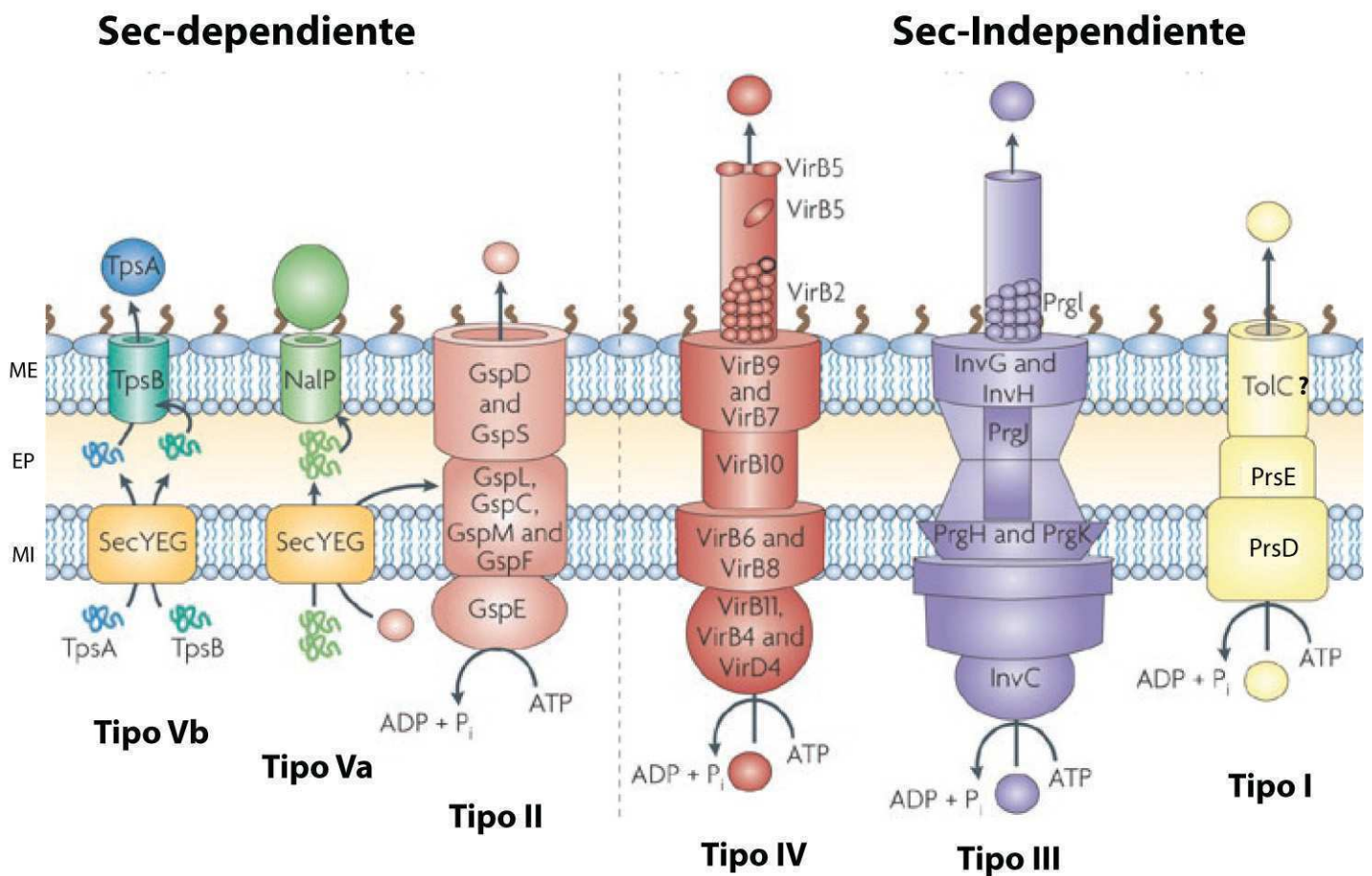


Figura 17. Sistemas de Secreción en bacterias Gram-Negativas. Se esquematizan los sistemas de secreción I, II, III, IV y V, indicándose los nombres de los genes de los sistemas mejor estudiados. Se indican los sistemas Sec-dependientes y Sec-independientes. MI, membrana interna; EP, espacio periplásmico, ME, membrana externa. Modificado a partir de Fronzes y col. 2009

En los últimos años se ha descrito un nuevo tipo de sistema de secreción, los sistemas de secreción tipo VI que presentan interacción con hospedadores eucariotas. Estos sistemas

están compuestos por complejos multiproteicos y guardan semejanza con los sistemas de inyección de los bacteriófagos [84]. Inicialmente se identificaron en bacterias patógenas como *Vibrio cholerae* [85] y *Legionella pneumophila* [86], pero paralelamente se identificó un *locus* en *Rhizobium leguminosarum* [87,88] que codifica para un sistema de secreción con homología a sistemas de secreción tipo VI identificados [89].

### ***Secreción de proteínas en los rizobios.***

Schmeisser y col. (2009)[4] hacen un relevamiento de los sistemas de secreción presentes en la cepa de amplio rango de infección *Rhizobium* sp. NGR234 y los comparan con los sistemas identificados en otros rizobios. Se establece una comparación entre genes identificados relacionados a los diferentes tipos de secreción, y se hace una correlación con su especificidad de hospedador.

Como se observa en la tabla I1, entre los rizobios estudiados, aquellos que presentan menor rango de hospedador (o mayor especificidad por el mismo) como *R. leguminosarum* bv *viciae*, *S. meliloti* o *R. etli*, presentan mayor participación de sistemas de secreción tipo I y algunos autotransportadores; mientras que no se han identificado genes de sistemas de secreción tipo 3 más allá de las proteínas flagelares, o aquellos relacionados con la secreción tipo 2 del tipo Gsp (General secretion pathway) y poseen mucho menor número de genes relacionados con la síntesis de flagelo o SSTIV (tabla I1). En *Rhizobium* sp NGR234 se observan mucho mayor número de sistemas de secreción tipo II, III, o IV; a veces se encuentran duplicados y con ambas copias funcionales. Este rizobio es el que mayor número de plantas es capaz de nodular [14].



Sistema de Secreción	Nº de ORF y genes ligados a la formación de sistemas de secreción en las cepas:					
	R.l.3841	R.e.CFN42	S.m.1021	R. NGR234	B.j. 110	M.I.MAFF
Tipo I						
PrtDE/TolC	3	1	4	4	2	3
AprD/E	8	2	5	2	2	4
Tipo II						
Gsp				13	8	11
Sec	12	7	5	7	5	7
Tipo III		21		42	21	21
Tipo IV						
Tipo-F (conj., Vir)	10	31	10	23	13	19
Tipo-P (Flp, adhesión)	10	10	17	35	11	9
Tipo V (Autotransportador)	3		2		2	1
TAT	3		3	3	3	3

Tabla I1. Sistemas de Secreción presentes en rizobios (a partir de Schmeisser y col. 2009). Se describe el tipo de Sist. de Secreción y el número de ORFs asignados a ese tipo de secreción en cada rizobio. R.l.3841, *R. leguminosarum* bv. *viciae* cepa 3841; R.e.CFN42, *R. etli* cepa CFN42; Sm1021, *S. meliloti* cepa 1021; R.NGR234, *Rhizobium* sp. NGR234; B.j110, *B. japonicum* cepa USDA 110; MI MAFF, *M. loti* cepa MAFF303099.

*R. leguminosarum* cuenta con genes para la secreción a través de “General Export Pathway” (genes Sec). Este sistema consta de genes *secA*, *secB*, *secD*, *secE*, *secF*, *secG* y *secY* que no se encuentran formando un operón o cercanos genéticamente [68].

También se ha identificado la presencia de un sistema “TAT”, (descrito en la sección 5.a). Este sistema se encuentra en forma de un operón (*tatABC*) al igual que los homólogos identificados en otros rizobios [6,8,68,90]

El rol de los sistemas de secreción GEP y TAT es importante debido a la dependencia de múltiples sistemas de secreción en la localización de proteínas en el periplasma. No se han encontrado homólogos de sistemas de secreción tipo II en *R. leguminosarum*, así como

tampoco se han encontrado homólogos a SSTIII. Los genes con homología a un SSTIV reportados por Schmeisser, corresponden a maquinaria de flagelo o aparato de conjugación; no hay un SSTIV en *R. leguminosarum*. Se han identificado tres genes de autotransportadores (*autA*, *autB* y *autC*), que si bien no se ha encontrado que estén relacionados con la nodulación [68], podrían estar involucrados en la adhesión (ver sección 6.b.i), por ejemplo se observa homología entre *autB* (RL1196) y la adhesina AIDA de *E.coli*.

En *R. leguminosarum* se halla presente el operón *impBCDEFGHIJKLMN* el cual guarda homología con sistemas de secreción tipo VI identificados [89]. Sin embargo vale indicar que el ortólogo a *clpV* (pRL120476) está presente como pseudogen. Dado que este gen es determinante para la funcionalidad del sistema de secreción tipo VI [91], no se puede predecir que este sistema sea funcional en *R.leguminosarum* bv. *viciae* 3841.

### ***SSTI y el sistema PrsDE de R. leguminosarum.***

Los SSTI se forman a partir de los productos de tres genes que codifican: i) un componente de la membrana interna de la familia ABC (ATP-Binding Cassette), ii) otro también asociado a la membrana interna pero con un dominio importante en el periplasma, llamado el MFP (por Membrane Fusion Protein) y el componente de membrana externa OMF (Outer Membrane Factor). Los genes de los dos primeros se encuentran codificados en forma consecutiva mientras que OMF puede estar codificado cercano a dichos componentes o en otro sitio del genoma. Los SSTI se encuentran usualmente “dedicados” a uno o pocos sustratos específicos genéticamente cercanos al ABC-MFP [92]. El ensamblado del SSTI se induce mediante la interacción de un dímero de ABC, un trímero de MFP y un trímero de OMF. La estructura de los mismos permite vislumbrar la formación del canal a través del cual las proteínas son secretadas; el OMF forma un poro en la membrana externa mediante 4 pasos transmembrana en forma “beta” por cada subunidad (12 pasos beta en total) y el resto protruye hacia el espacio periplásmico formando un barril compuesto por  $\alpha$ -hélices que interactúan con el MFP [93]. El mecanismo propuesto para la secreción a través de un sistema tipo I, consiste en la interacción del componente ABC con una región C-terminal de la proteína sustrato [94]. En los casos en que el SSTI está dedicado a la secreción de uno o pocos sustratos, la interacción puede ser específica. Se ha propuesto que al mismo tiempo, o luego de la interacción ABC-sustrato, se forma el complejo ABC-MFP [95]; sólo a continuación se forma el SSTI completo con el componente OMF, que genera un cambio conformacional que, con gasto de ATP, dispara la secreción hacia el medio extracelular del sustrato, luego del cual se desensambla la interacción con el OMF [95]. Los SSTI son importantes para diversos aspectos de la fisiología bacteriana o la interacción con el ambiente de diversas proteobacterias. También se ha demostrado que son importantes para la virulencia [92]. Por ejemplo, los SSTI de *E. coli* están involucrados en la secreción de hemolisinas, colicinas, microcinas o enterobactinas [96], así como de enzimas degradativas en *Serratia* ([97] y *Erwinia* ([98]).

El factor de nodulación NodO es una proteína extracelular que une calcio y forma poros selectivos para cationes en la membrana plasmática de las células vegetales, produciendo alteraciones en las raíces de la planta hospedadora y contribuyendo a la nodulación [99,100]. Se demostró que el SSTI PrsDE de *R. leguminosarum* bv *viciae* A34 es responsable de la secreción de NodO, cuya expresión se induce en presencia de exudados de raíz de arveja o del flavonoide

de la planta. Como todos los sistemas tipo I, PrsDE (Fig I8) está compuesto por un componente de membrana interna (PrsD) de la familia ABC y el componente PrsE de la familia MFP que sería el que interactúa con el componente ABC y genera el canal a través del espacio periplásmico [95,101]. Aún no se ha identificado el componente de membrana externa (OMF) de este sistema. La mutante *prsD* de *R. leguminosarum* bv *viciae* A34 resultó deficiente en la infección y nodulación ya que los nódulos inducidos por esta mutante fueron blancos y desprovistos de bacterias [49]. Sin embargo, aún se desconoce la verdadera causa de este fenotipo.

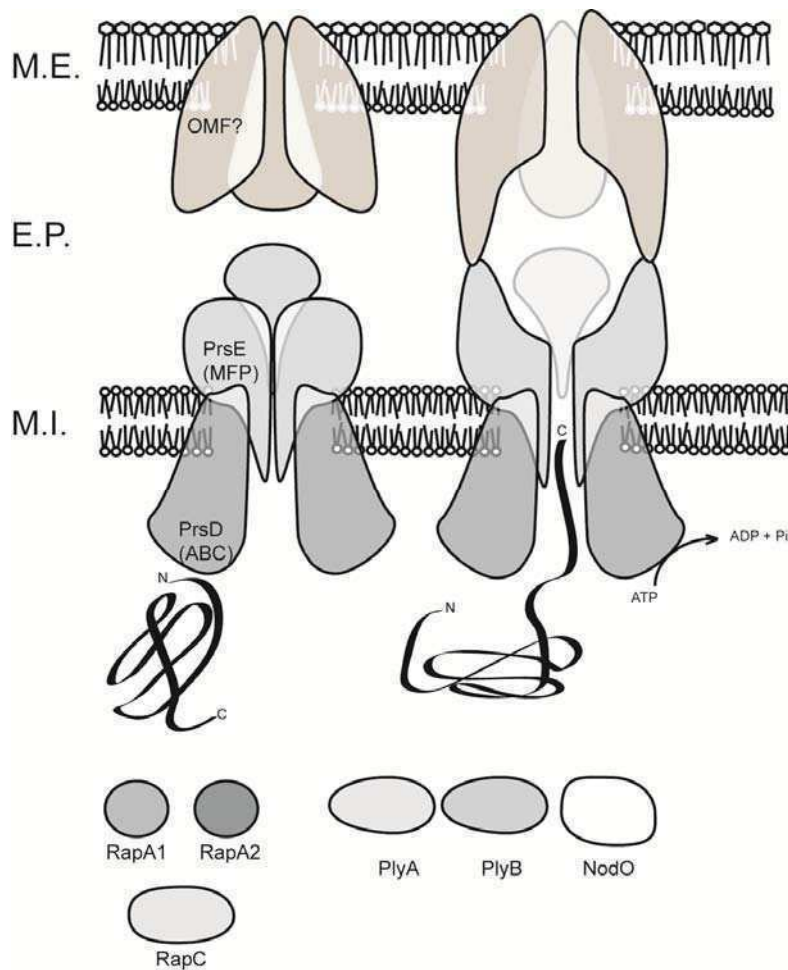


Figura I8. Esquema del sistema de secreción tipo 1 PrsDE.

Se indican los 3 componentes PrsD, PrsE y el OMF aún no identificado en *R. leguminosarum*. Se esquematiza el mecanismo concertado de secreción y los sustratos conocidos. MI, Membrana Interna; EP, Espacio periplásmico; ME, Membrana Externa.

Curiosamente el perfil extracelular de proteínas de las mutantes *prsD* o *prsE* en geles desnaturizantes mostró la ausencia de varias proteínas indicando que PrsDE sería responsable

de la secreción de proteínas adicionales [102,103]. La expresión de estas proteínas adicionales no necesitó la presencia del flavonoide en el medio de cultivo como ocurre en el caso de NodO. Sin embargo, tanto NodO como las otras de las proteínas secretadas por PrsDE fueron capaces de unir  $\text{Ca}^{2+}$  [102]. En un trabajo posterior se demostró que algunas de las proteínas adicionales secretadas por PrsDE (que estaban ausentes en las mutantes *prsD* y *prsE*) pertenecerían a la Rap, como RapA1, RapA2 y RapC [103], como se describirá en detalle mas adelante (ver sección 5.d)

Los cultivos líquidos en medio mínimo en presencia de un fuente de carbono como manitol de la mutante *prsD* eran particularmente viscosos y las colonias en el mismo medio de estas mutantes era muy pegajosas. Se planteó que la causa de estos fenotipos podría ser que el EPS producido por la mutante estuviera alterado. En efecto, el análisis de actividad de glicanasas extracelulares en ensayos en placa utilizando carboximetil-celulosa (CMC) como sustrato modelo, pudo demostrar que PrsDE también es responsable de la secreción de dos  $\beta$ 1,4 glicanasas que clivan el EPS (PlyA y PlyB) [50], que sólo son activas en contacto con la superficie de la célula [104]. Inicialmente, PlyA fue identificada por su proximidad genética con *prsDE* (Fig I6 A), algo usual en sustratos de SSTI, pero la actividad remanente en mutantes *plyA* indicó que existiría otro gen cuyo producto tendría actividad de glicanasa, capaz de clivar EPS y CMC que fue posteriormente identificado como *plyB* [50]. Mutantes dobles *plyA plyB* se asemejan a mutantes *prsDE*, en cuanto a que la actividad glicanasa extracelular está severamente reducida. Más aún, la cantidad de azúcares reductores en las cadenas de EPS presentes en el medio extracelular de esta mutante (y también de la mutante simple *plyB*) se encontró muy reducida, indicando que las moléculas de EPS son considerablemente más largas (o sea un menor grado de procesamiento).

Más recientemente se llevó adelante un estudio mas sistemático y mutacional para identificar los sustratos de los sistemas de secreción que surgen del genoma y su relevancia en el proceso de nodulación en *R. leguminosarum* bv *viciae* cepa 3841 [68]. Entre las proteínas secretadas vía PrsDE, además de las glicanasas PlyA y PlyB, y proteínas de la familia Rap (RapA2) se identificaron otras de función hipotética por homología como: una metaloproteasa (RL0790), una glicosil-hidrolasa (RL2412), una nucleósido bifosfato quinasa (RL1580) y posibles homólogos a cadherinas (RL2961 y pRL100309). Estos hallazgos indican la amplitud de sustratos que PrsDE secreta al medio extracelular, siendo estos codificados en zonas distantes del genoma, contrario a lo descripto habitualmente para los SSTI. Llamativamente, la mutación en el *locus* genético de este sistema no produjo fenotipo alterado en la nodulación en esta cepa (3841), lo cual sí había ocurrido en otras cepas de *R. leguminosarum* [102,105].

Es posible que la putativa metaloproteasa y putativa nucleósido-difosfato-quinasa sean relevantes en condiciones especiales de crecimiento, dado que su secreción PrsDE-dependiente fue demostrada en un medio de cultivo que contenía peptona como fuente de carbono [68]. La nucleósido-difosfato-quinasa podría responder a la modulación del pool extracelular de ATP en condiciones de nodulación.

Resulta interesante considerar las proteínas secretadas con homología a cadherinas (RL2961 y pRL100309), puesto que las cadherinas son proteínas principalmente estudiadas en mamíferos, con claros roles en la adhesión, éstas tienen dominios característicos y la característica de unir calcio. Recientemente se han descrito motivos del tipo cadherinas en proteínas de gran tamaño en bacterias gran negativas [106]. Estas promoverían la multimerización así como la adhesión a la superficie de la bacteria en *Sarcophagus degradans*. Investigaciones posteriores identificaron la capacidad de tales dominios de interactuar directamente con polisacáridos complejos [107].

La interpretación de estos hallazgos sugiere que PrsDE es un sistema general de secreción, probablemente el más relevante en condiciones de vida libre en *R. leguminosarum* [68]. Con excepción de NodO, las proteínas secretadas por PrsDE, estarían relacionadas con la modificación de los polisacáridos de superficie (PlyA, PlyB y posiblemente RL2412) y la adhesión (RapA1, RapA2, RapC, posiblemente RapB y RL2961 y pRL100309).

### ***Las proteínas Rap(s) (Rhizobial adhering proteins).***

Como se mencionó en la sección anterior, las mutantes *prsD* y *prsE* presentaron varias proteínas ausentes en el perfil de proteínas extracelulares de *R. leguminosarum* bv *viciae* A34 [102]. Por secuenciación del amino-terminal de varias de estas proteínas se pudo determinar que alguna de ellas eran homólogas a las proteínas Rap de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* cepa R200 y correspondieron a genes ortólogos a RapA1, RapA2 y RapC (ver Fig I9) [103].

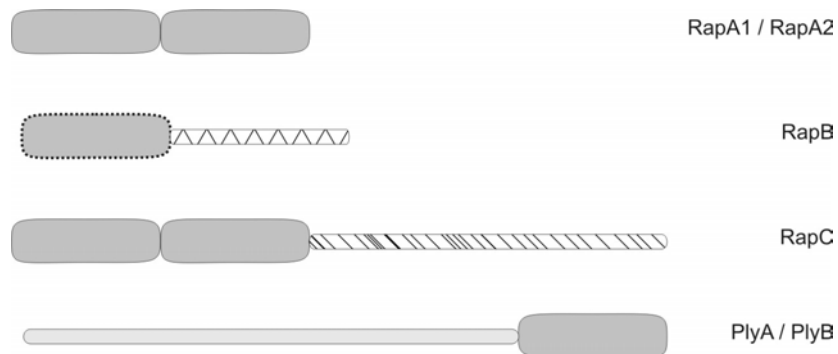


Figura I9. Familia de Proteínas de Adhesión Rhizobiales (Raps). Se encuentra esquematizado el número de dominios Ra (caja gris) y el largo relativo de las secuencias codificantes.

Las proteínas de la familia Rap fueron identificadas por *phage display* utilizando bacterias enteras como ligando [51]. La idea original de estos autores era identificar mediante este enfoque al gen de la *rhicadhesina* [46] y genes relacionados con la adhesión a la superficie de *R. leguminosarum* bv *trifolii*. El resultado fue la identificación de la familia Rap, cuyos componentes comparten al menos un dominio Ra (*Rhizobium adhering*) como la unidad mínima necesaria para la adhesión a la superficie de la bacteria. Los dominios aislados por *phage display* correspondieron a las proteínas homólogas RapA1 y RapA2 (de 24 kDa), las cuales están formadas casi enteramente por dos dominios Ra (Fig I9), la proteína RapB (30 kDa) que contiene sólo un dominio Ra y la proteína RapC (50 kDa) de mayor tamaño y con 2 dominios Ra (Fig I9) [51]. RapB presenta una región con baja similitud a una endoglucanasa de *Bacillus* sp. (AF265223); la ausencia de dos dominios Ra podría sugerir que RapB no sería capaz de aglutinar células de *R. leguminosarum* pero sí de unirse a su superficie.

Por inmunofluorescencia se pudo observar que RapA1 de *R. leguminosarum* bv *trifolii* R200 se localiza sobre la superficie de la bacteria en uno de sus polos, aunque sólo se la detecta en una fracción menor de las células. Curiosamente, RapA1 sólo estuvo presente en el sobrenadante de rizobios muy emparentados como *R. leguminosarum* y *R. etli* y no en otros como *S. fredii* y *Mesorhizobium loti* y *M. huakuii*. Más aún, bolitas de látex recubiertas de RapA1 recombinante sólo pudieron aglutinar células de *R. leguminosarum* y *R. etli* y no de

otros rizobios, lo cual confirma que no sólo se produce en especies cercanas del género *Rhizobium*, sino que la misma restricción aplica para su receptor [51].

RapA1 se ubica genéticamente cerca de los genes de producción de polisacárido (Fig 16 A). Además se observó que preparaciones crudas de EPS prevenían la aglutinación de células de *Rhizobium* por bolitas de latex cubiertas con RapA1, por lo que se sugirió que el EPS, o una estructura relacionada podría estar involucrado en el mecanismo de adhesión y aglutinación de RapA1 [51]. Las glicanasas PlyA y PlyB (que procesan el EPS, ver sección 5.c) son las únicas proteínas de función conocida que también poseen un dominio Ra en su estructura que está ubicado en el extremo carboxilo-terminal. Esto refuerza la hipótesis de que RapA1 podría interactuar con el EPS, dado que se ha demostrado que las glicanasas requieren para su actividad estar en contacto con la superficie de un rizobio productor de EPS/CPS [104].



Se ha sugerido que la expresión de *rapA1* estaría sometida a algún nivel de regulación, dado que no se la detecta mayoritariamente entre las proteínas secretadas y que sólo una

Clon	Homólogo en base de datos	Función celular <sup>a</sup>
AF116350	PssK, <i>R. leguminosarum</i>	Proteína de polimerización de polisacárido
AF116370	ExsH, <i>S. meliloti</i>	Endoglicanasa; síntesis de EPS
AF116390	ExoB, <i>S. meliloti</i>	UDP-glucosa epimerasa; síntesis del EPS
AF116424	pRL90140, <i>R. leguminosarum</i>	Putativa proteína exportada (tipo hemolisina- unión a calcio)
AF116442	PrsD, <i>R. leguminosarum</i>	Sistema de Secreción Tipo I, ATPasa
AF116414, AF116416, AF116418	RapA1*, <i>R. leguminosarum</i>	Putativa proteína exportada de autoagregación, secreción vía PrsDE

Tabla I3. Genes regulados por RosR en *R. etli*. Se indican los números de acceso en el GeneBank del NCBI (NIH). Los homólogos surgen del resultado del “Blast” de los números de acceso con la base de datos actualizada (2012) del NCBI. Confeccionada a partir de Bittinger y Handelsman (1999).

a- Función ingresada en base de datos (NCBI o *Rhizobium* DB)

\*- Los tres clones muestran mayor similitud con *rapA1* y en menor medida con *rapA2* y *rapC*

fracción de las células muestra localización de RapA1 en su superficie [51]. En un trabajo previo a la identificación de las Raps, se analizó el “Regulón RosR” [108], identificando los genes regulados transcripcionalmente por el factor RosR. Este factor está involucrado en la represión de genes de la ruta de biosíntesis de EPSII en *S. meliloti* [109] y la regulación de genes *vir* en *A. tumefaciens* [110] y se plantea que afecta las características de superficie de *R. etli* (Araujo y col. 1994) y *R. leguminosarum* bv *trifolii* [111]. Entre los genes de *R. etli* regulados por RosR, Bittinger y Handelsman identificaron genes relacionados con la síntesis y modificación del EPS y otros polisacáridos de superficie (glucosil transferasas, acetil transferasas, celulosa sintetasa, reguladores de rutas biosintéticas, *pssK*, endoglicanasas como ExoB y ExsH) y genes *vir* de *R. etli*. Dos sets de resultados llaman la atención, la detección de *prsD* como posible blanco de regulación de RosR (números de acceso AF116441-AF116442) y un gen que fue anotado (en 1999) como homólogo a *plyA* de *R. leguminosarum*. Sin embargo, la búsqueda actualizada en el algoritmo BLAST de los clones detectados en el trabajo original (números de acceso AF116413-AF116418) muestra que el gen regulador correspondería a un homólogo al gen *rapA* de *R. etli* y *rapA1* de *R. leguminosarum* bv *trifolii*. Esto plantea que la expresión de RapA1 estaría regulada por RosR, al igual que diversos genes que tienen que ver con las características de superficie de *Rhizobium* (Tabla I3).

Mongiardini y col (2008)[112] estudiaron el efecto de la sobreexpresión de RapA1 en *R. leguminosarum* bv *trifolii* R200 sobre la adhesión a la raíz de trébol (*Trifolium pratense*), dado que la presencia de parálogos y otros miembros de la familia Rap con alta similitud con RapA1 puede dificultar el enfoque mutacional debido a la posibilidad de redundancia. Se observó que la expresión aumentada de RapA1 favorece la adhesión de la cepa R200 a raíz de trébol especialmente en las etapas iniciales. Este efecto también se observó en otras leguminosas como poroto, soja o alfalfa, sugiriendo un mecanismo de baja especificidad por hospedador, pero de alta relevancia para la adhesión a raíz. No se observó un cambio significativo en los parámetros de nodulación cuando se sobreexpresó RapA1, confirmando que la función principal de RapA1 está relacionada con la adhesión temprana a raíz.

## **Biofilms**

### ***Biofilms como modo de vida***

El modo de vida en forma de biofilms se ha observado difundido en la naturaleza a través de todos los géneros bacterianos estudiados. Se acepta que la mayoría de los microorganismos persisten en la naturaleza formando parte de un biofilm estructurado, que se encuentra adherido a un sustrato biótico o abiótico y en el que los microorganismos están embebidos en una matriz extracelular que ellos mismos producen [113]. Las ventajas de formar un biofilm son muchas afectando desde la biología hasta la ecología de las bacterias, siendo su función principal la provisión de un micronicho con condiciones diferentes a las del resto del ambiente y promover en las bacterias funciones o estados fisiológicos particulares (Costerton y col. 1994 JBact; Morris et al. 2003). Entre las ventajas de formar parte de un biofilm podemos encontrar la resistencia a agentes ambientales potencialmente dañinos, por ejemplo el sistema inmune de un hospedador [115] o la resistencia incrementada a antibióticos [116] así como a condiciones nutricionales o físico-químicas desfavorables [117]. También puede favorecerse el intercambio genético entre bacterias si estas forman parte de un biofilm [118], y cuando el biofilm se establece entre múltiples especies (como ocurre habitualmente en los biofilms

formados en la naturaleza) las bacterias que lo componen pueden beneficiarse mediante el intercambio de productos metabólicos (sintrofismo), aprovechando la cercanía y la presencia de una matriz que puede mantener metabolitos liberados por una bacteria que pueden ser beneficiosas para otra especie presente en el biofilm [113].

Usualmente los biofilms proveen barreras que separan las bacterias de condiciones ambientales desfavorables, pero que además son funcionales para la persistencia de la comunidad. Los polisacáridos bacterianos pueden ser componentes esenciales de la matriz extracelular del biofilm. Además, proporcionan difusibilidad restringida para ciertas moléculas y permite el paso de agua, iones pequeños o gases, que son importantes productos o desechos metabólicos [113,119].

Además, en el caso de biofilms asociados con plantas, el exopolisacárido de un biofilm puede actuar como molécula señal para modular posibles respuestas de la planta ante el biofilm bacteriano (ver sección 4) [63,64]. Por último, los biofilms repletos de exopolisacáridos pueden actuar como “agregantes” de las partículas de suelo, lo que lleva a la estabilización del gránulo y la retención de agua, que es vital para el ecosistema [113].

La formación de un biofilm es un proceso que ha sido estudiado ampliamente en bacterias modelo como *Pseudomonas aeruginosa*. El interés inicial provino de la asociación de estas comunidades persistentes y refractarias a múltiples antimicrobianos con patologías como la fibrosis quística [120,121]. En algunos sistemas bacterianos como *P. aeruginosa* se reconocen una serie de pasos discretos que conducen a un biofilm maduro (Fig 110).

Inicialmente se dan los fenómenos de adhesión reversible (1), en general ayudado por flagelos o *pili* (moléculas de adhesión preformadas), en los cuales la bacteria toma contacto con la superficie del sustrato y puede deslizarse por la superficie [122], pero este contacto puede ser interrumpido. Se ha observado que ante “pausas” en el movimiento flagelar por contacto con una superficie, se pueden favorecer mecanismos complementarios de adhesión [123].

Luego puede generarse una unión fuerte (2) y la adhesión se hace irreversible. Esta adhesión está mediada por adhesinas que se forman en forma condicional y la síntesis de los polisacáridos [124] y otros elementos como proteínas y en algunos casos ácidos nucleicos que luego darán lugar a la matriz del biofilm [119,125].

A medida que avanza la formación de la matriz, también se da el crecimiento de

bacterias adheridas al sustrato, dando lugar a la formación de microcolonias (3), inmersas en una matriz de sustancias poliméricas. En las etapas siguientes de formación de biofilm (4), éstos se desarrollan espacialmente estructurados [113,126], esto se produce gracias a la capacidad de las bacterias que componen el biofilm de adherirse unas a otras y formar una matriz, y permite la formación de canales de flujo de agua y el acceso a nutrientes por parte de las células del biofilm [127], y al mismo tiempo una estructura adecuada le puede permitir soportar flujos hidrodinámicos (en el caso de biofilms acuáticos) [128] o fuerzas de tracción (como en el caso de la placa dental). De acuerdo a las condiciones en el biofilm, se pueden generar fenómenos de dispersión (5), liberándose células planctónicas o agregados de células. Los eventos de dispersión pueden generarse como respuesta a diferentes señales, como el cambio en las condiciones nutricionales (ya sea incremento o agotamiento de nutrientes), señales de “quorum sensing” o señales vía c-di-GMP [119,129–131]. Las células o agregados de células que se desprenden pueden generar otro biofilm una vez alcanzado un nicho nuevamente favorable.

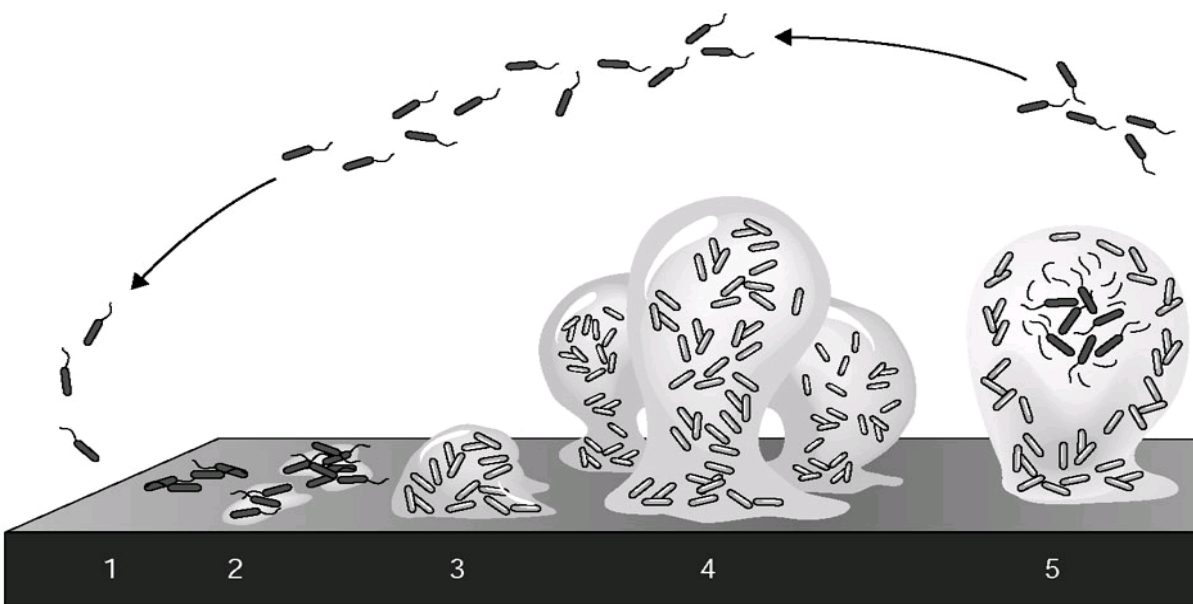


Figura I10. Etapas de formación de biofilm. Se distinguen 5 etapas discretas.

1-Adhesión reversible; 2-Adhesión irreversible y síntesis de matriz, 3-formación de microcolonias; 4-maduración; 5-dispersión

Se ha demostrado que el transcriptoma de las bacterias en biofilm es distinto a las que se encuentran en estado plantónico [132,133]. La transición al estado sésil conlleva cambios morfológicos y metabólicos que permiten formar el biofilm. El flagelo es importante para los procesos iniciales de migración hacia sustrato y adhesión inicial, pero luego su síntesis se ve disminuída para permitir la síntesis de componentes de matriz [134], en *P. aeruginosa*, la producción del polisacárido alginato se induce como resultado de la adhesión irreversible al sustrato, principalmente en los casos de infección crónica en fibrosis quística [135]

El estado fisiológico de las bacterias que componen el biofilm es marcadamente diferente a las bacterias plantónicas. Aún en biofilms monoespecie, pueden encontrarse regiones con niveles metabólicos diferentes [136]; existen regiones donde hay poca o nula división y la tasa metabólica es baja, esta es una de las razones por las cuales los biofilms son refractarios a algunos tratamientos con drogas. Estas regiones suelen ser las mas profundas, mientras que las zonas más cercanas a la superficie presentan mayor actividad metabólica, de síntesis y de división [137]. A lo largo de su desarrollo, dentro de un biofilm se pueden generar regiones heterogéneas químicamente. Esto puede generarse como resultado de la acumulación de productos de metabolismo en zonas mas densamente pobladas; esta distribución genera gradientes de metabolitos que influirán en el estado fisiológico de las bacterias del biofilm [138], como resultado pueden generarse variaciones genotípicas que otorgan una ventaja adaptativa [139]. También Se ha observado expresión diferencial de genes en la formación de la matriz del biofilm, por parte de una subpoblación de bacterias como respuesta a una cascada de regulación genética por parte de reguladores biestables [140].

### ***Factores involucrados en la adhesión a superficies y en la formación de un biofilm. Matriz extracelular de un biofilm***

#### **Adhesinas proteicas bacterianas**

Las adhesinas bacterianas tipo fimbriales o *pili* también pueden mediar la unión al hospedador [141,142]. Los complejos proteicos de *pili* se secretan a través del sistema “Chaperona-acomodador” [72] o “General secretion pathway (Gsp)” [71], La formación del Pilus tipo 1 o tipo P utiliza el sistema Chaperona/Acomodador (ver sección 5.a) para sintetizarse y

exportarse a la superficie formando la estructura polimérica. Por otro lado, los pili tipo 4 utilizan el Gsp que utiliza el sistema Sec y sistema tipo II para atravesar ambas membranas, y están relacionados con la patogénesis de *V. cholerae*, *P. aeruginosa* y *Neisseria* sp [141]. Los *pili* se forman a partir de la polimerización en forma helicoidal de subunidades (en general PapA) con una adhesina ubicada terminalmente (PapG) que tiene especificidad por residuos de manosa o galactosa, determinantes típicos del tejido que colonizan las diferentes cepas de *E. coli* patogénicas [142]. El complejo “curli” utiliza un sistema propio de exportación en membrana externa a partir de una lipoproteína y a partir de las subunidades se forma una estructura delgada, irregular y con alto grado de agregación [143].

En otras especies que interactúan con plantas como *Xylella* o *Xanthomonas*, se ha descrito la presencia de fimbrias o *pili*. Se ha propuesto que estas estructuras estarían relacionadas con la movilidad tipo “gliding” cercana a superficies y la adhesión inicial reversible al establecerse el biofilm [144].

En bacterias patogénicas se han descrito adhesinas del tipo autotransportadores. Es el caso de la adhesina AIDA de *E. coli* y la Hemagglutinina Filamentosa (FHA) de *Bordetella pertussis*. Estas adhesinas son de gran tamaño (mayor a 100 kDa) y permanecen unidas a la superficie de la bacteria mediando la adhesión a tejidos del hospedador [145,146]. Recientemente, nuestro grupo describió una nueva adhesina de esta familia (BmaC) de *Brucella suis* que contribuiría con la adhesión a la matriz extracelular y las células del hospedador [147].

Otras proteínas importantes para la adhesión en algunas bacterias patógenas o rizosféricas, son las que pertenecen a la familia de “Bap”; estas pueden ser proteínas de gran tamaño, identificadas en varias especies [148]; en *P. fluorescens* y *P. putida*, dos bacterias del suelo, se ha descrito la importancia de un miembro de esta familia, LapA, en la adhesión y formación de biofilms [149,150]; no se ha estudiado la presencia de estas adhesinas en *R. leguminosarum* ni en especies cercanas filogenéticamente.

En *Rhizobium leguminosarum* se han identificado genes que potencialmente podrían codificar proteínas de un pilus aunque aún no se ha demostrado su funcionalidad [68]. *R. leguminosarum* presenta pocos flagelos peritricos o uno o dos ubicados de manera sub-polar, dependiendo la cepa [151][152]; hasta ahora se desconoce el rol de estos flagelos en las propiedades de adhesión a superficies o en la formación de biofilms. Cepas mutantes deficientes en el flagelo en *S. meliloti* presentan disminuida su capacidad de adhesión y

formación de biofilms, así como su capacidad de fijar el nitrógeno [153]. El genoma publicado de *R. leguminosarum* alberga genes de posibles adhesinas pertenecientes al tipo de autotransportadores. Sin embargo, hasta ahora se desconoce la función de los mismos en la adhesión a superficies.

### **Matriz extracelular: exopolisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos**

La matriz es el material extracelular en el cual están inmersas las bacterias que componen el biofilm; es sintetizada por éstas y se estima que representa la mayoría del peso seco del biofilm [154,155]. La matriz mantiene a las células que componen al biofilm en cercanía permitiendo interacciones, pero también protegidas contra agentes externos como la deshidratación, agentes biocidas, antibióticos, cationes, radiación UV, predación por protozoos o ataques del sistema inmune de un hospedador.

La matriz también tiene una influencia importante en la arquitectura del biofilm [156]; estudios utilizando cepas no-mucoides de *P. aeruginosa* revelan estructuras muy diferentes a los biofilms de cepas mucosas, productoras del polisacárido alginato [157,158].

Entre los componentes de la matriz extracelular en un biofilm, los exopolisacáridos han sido los más estudiados y son el componente mayoritario de la matriz [119,154], en la mayoría de los casos, la producción de polisacáridos es necesaria para la formación de biofilms maduros y estructurados [159]. Los polisacáridos producidos por las bacterias ayudan a formar biofilms complejos y pueden ser homopolisacáridos como la celulosa o heteropolisacáridos compuestos por diferentes azúcares en proporciones dadas; a su vez los azúcares que componen el polisacárido pueden estar químicamente sustituidos (acetil, succinil, metil, entre otros grupos). Los heteropolisacáridos pueden estar formados por polímeros de unidades repetitivas, las cuales consisten en un oligosacárido compuesto por diferentes azúcares y unidos de manera diversa (lineales o ramificados, con enlaces  $\alpha$  o  $\beta$  en diferentes posiciones) y a su vez sustituidos en posiciones dadas. Algunos polisacáridos son comunes para diferentes especies no relacionadas, como la celulosa o el PGA [119]. La naturaleza química de los polisacáridos otorga propiedades que resultan valiosas para el biofilm; como su polaridad, las interacciones químicas que el polisacárido tiene y la presencia de grupos cargados. Estas propiedades pueden permitir selectividad de difusión para moléculas de agua, gases y solutos beneficiosos y a su vez dificultar el acceso a moléculas potencialmente dañinas para las

bacterias que forman el biofilm; al mismo tiempo, el flujo de hidratos de carbono desde y hacia la matriz permite manejar los niveles de carbono en situaciones de relación carbono nitrógeno desbalanceados [125].

Las proteínas que componen la matriz extracelular de un biofilm pueden catalogarse como proteínas estructurales o enzimas. Las proteínas estructurales son aquellas que le dan adhesividad a las células que componen el biofilm y pueden ayudar tanto en los pasos iniciales de adhesión al sustrato, así como en la estabilización del biofilm. En este grupo se encuentran adhesinas y otras estructuras como Fimbrias, Pili y Flagelos que pueden ayudar a la estabilización del biofilm [122,160–162] descritas en la sección 6.b.i. Un tercer grupo de proteínas estructurales es el que componen las lectinas bacterianas. Estas tienen la capacidad de unirse a carbohidratos con especificidad característica y se ha observado la presencia de lectinas en diversas especies y su participación en la adhesión y formación de biofilms [163,164].

En la matriz del biofilm también hay proteínas que cumplen funciones enzimáticas; estas pueden tener funciones modificadoras de la matriz, como glicosidasas o enzimas degradadoras de polisacáridos. Las funciones de tales enzimas pueden ser la degradación de polisacáridos para la provisión de azúcares como fuente de carbono y energía, así como la modificación de polisacáridos para la remodelación de la matriz y la estructura del biofilm [125]; a su vez, una función importante para las enzimas degradadoras de la matriz es la de ayudar en la dispersión en etapas tardías de la formación de biofilms, o ante cambios en las condiciones ambientales [130,165].

Otras enzimas presentes en la matriz de biofilms, son aquellas capaces de modificar o degradar compuestos que se encuentran en torno al biofilm, por ejemplo degradar polímeros presentes en el sustrato para proveer de Carbono y energía a las bacterias; o alterar las propiedades redox del entorno para favorecer el desarrollo de las bacterias que colonizan el biofilm. En general estas actividades enzimáticas son responsables por la biocorrosión generada por los biofilms [166]. Una particularidad de las enzimas componentes de la matriz de biofilms es la capacidad de unirse a polisacáridos. Esta característica genera la cercanía de las enzimas (y por tanto sus productos de reacción) a los microorganismos que se benefician de su actividad; asimismo, la unión a polisacáridos es capaz de estabilizar y hasta activar las enzimas [125].

Además de Polisacáridos y proteínas, la matriz de muchos biofilms presenta ADN entre



sus componentes [167]. Inicialmente se creyó que la presencia de DNA se debía a lisis, pero evidencias confirmaron el rol activo del ADN en la matriz del biofilm [118]. Los estudios sobre el ADN en el biofilm fueron realizados principalmente en *P. aeruginosa* [159,165,168]; sin embargo se ha caracterizado en diversas especies la presencia de ADN en la matriz de sus biofilms [169–173]. Que contribuye a la estabilización del biofilm entre otros factores.

Un componente poco caracterizado de la matriz de biofilms son los lípidos [125,154,156]. En los últimos años se ha observado la presencia de vesículas de membrana en diversas especies bacterianas [174] y se ha observado vesículas como componente de los biofilms bacterianos, mostrando además que el contenido de las microvesículas puede ser diferente cuando se producen en un biofilm que en cultivos plantónicos [175]. Las vesículas de membrana cumplen diversas funciones en un biofilm, pueden llevar moléculas señal [176] o ayudar en la inactivación de compuestos dañinos [174], además de ayudar en la nucleación de bacterias por sus propiedades adhesivas. Se ha observado la importancia de las vesículas en las infecciones epiteliales (donde los biofilms son importantes para la infección) [177,178] y se ha demostrado que la adición exógena de vesículas puede incrementar la capacidad de formación de biofilm [179].

### ***Biofilms formados por rizobios y bacterias cercanas filogeneticamente***

La mayor parte del tiempo los rizobios colonizan y sobreviven en el suelo, en la rizosfera o inclusive en comunidades complejas sobre la raíz. Es de esperar que la capacidad formadora de un biofilm puede representar una estrategia importante de supervivencia y ventajas competitivas en estos nichos [114,180]. Debido a que la competencia por la rizosfera, y por lo tanto alcanzar el nicho simbiótico es alta, cualquier estrategia adaptativa puede significar colonizar exitosamente la rizosfera o establecerse en el suelo de manera de posicionarse ventajosamente ante condiciones favorables para iniciar la simbiosis. La raíz produce exudados entre los que hay una buena provisión de carbohidratos (entre el 5% y el 20% de los productos de fotosíntesis) y otras moléculas así como moléculas bioactivas que ayudan a controlar la microflora de la rizosfera [181], en comparación con el suelo, donde la proporción de fuentes de carbono es baja, la rizosfera resulta una región fértil para los microorganismos. Colonizar este nicho, rico en fuentes de carbono puede garantizar que al momento de iniciar la

nodulación, la bacteria adherida a la superficie de la raíz en el sitio correcto sea la elegida para la infección y formación del nódulo. Esto asegura la generación de un *pool* genético dentro del nódulo, dado que la infección es clonal, que luego ante la senescencia puede ser liberado nuevamente al ambiente para repetir la colonización y el proceso de nodulación [33]. La formación de biofilms depende fuertemente de la capacidad de formación de una matriz (sección 6.b) y como principal componente encontramos a los Polisacáridos. Los rizobios son capaces de generar una gran variedad de polisacáridos (brevemente revisados en sección 3).

Entre los rizobios capaces de formar biofilms, se pueden encontrar aquellos que establecen relaciones de patogénesis con la planta, como *A. tumefaciens* [182] o *P. aeruginosa* [183], así como también existen bacterias que generan beneficios a la planta. Algunas especies rizosféricas de *Pseudomonas* pueden comportarse como promotoras de crecimiento, como *P. putida* o *P. fluorescens*, las cuales pueden proteger contra patógenos y estimular el crecimiento vegetal [184,185], otras especies de rizobios pueden ser diazotrofos, algunos de vida libre. Estos rizobios, como los pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Azoarcus* y *Burkholderia* tienen la capacidad de movilizar nitrógeno de maneras utilizables para la planta, así como también generan fitohormonas y otras moléculas señal. Pueden encontrarse asociadas a raíz o como endófitas en interacciones simbióticas con plantas no-leguminosas; estas bacterias presentan mecanismos de adhesión semejantes a los estudiados previamente (sección 3) y se los puede encontrar en distintas regiones de la raíz formando microcolonias o biofilms [13].

*R. leguminosarum* es capaz de formar sobre superficies inertes, en un medio mínimo en presencia de manitol, una estructura tridimensional de biofilm. La formación de este biofilm se inicia con la adhesión de algunas células a una superficie (a menudo a través de un polo), seguido de la formación de agregados celulares por división y reclutamiento de células. Las bacterias interaccionan formando microcolonias de una estructura típica con gran preponderancia de uniones laterales entre bacterias [103]. Hemos mostrado que el exopolisacárido ácido (EPS) sintetizado por *R. leguminosarum* es crucial para la adhesión al sustrato desde las primeras etapas y la formación de un biofilm maduro in vitro . En efecto, la inactivación del gen *pssA* (ver sección 4) afecta severamente la formación de microcolonias y de un biofilm tanto en *R. leguminosarum* A34 (nuestra cepa de laboratorio) como 3841 (la cepa secuenciada) [55,103]. Las mutantes *pssA* producen colonias secas y no son adherentes en ensayos de microplacas y los biofilms estáticos observados son planos y desprovistos de estructura tridimensional compleja, asemejándose más a precipitados de bacterias que a biofilms estructurados espacialmente [103].

La inactivación de genes claves en la síntesis de otros polisacáridos como el glucomanano, la celulosa y el polisacárido que produce geles no alteró la formación de un biofilm *in vitro* [55]. La observación que la celulosa y el glucomanano fueron necesarios para la formación del “cap” sobre el pelo radicular (ver sección 3), pero no para la formación de biofilms *in vitro*, sugiere que ambos polisacáridos son importantes en condiciones en las que pueden interactuar con determinantes de la planta hospedadora (lectinas por ejemplo). Es posible, entonces, hacer una distinción entre los biofilms formados *in vitro* y los que se forman sobre la raíz en cuanto a los diferentes requerimientos.

Por otro lado, el sistema de secreción PrsDE también fue requerido para la maduración del biofilm *in vitro*. La figura I11 muestra el desarrollo del biofilm en la cepa silvestre A34 y su comparación con el fenotipo observado en la mutante *prsD*. Un fenotipo similar se observó en la mutante *prsE* [103].

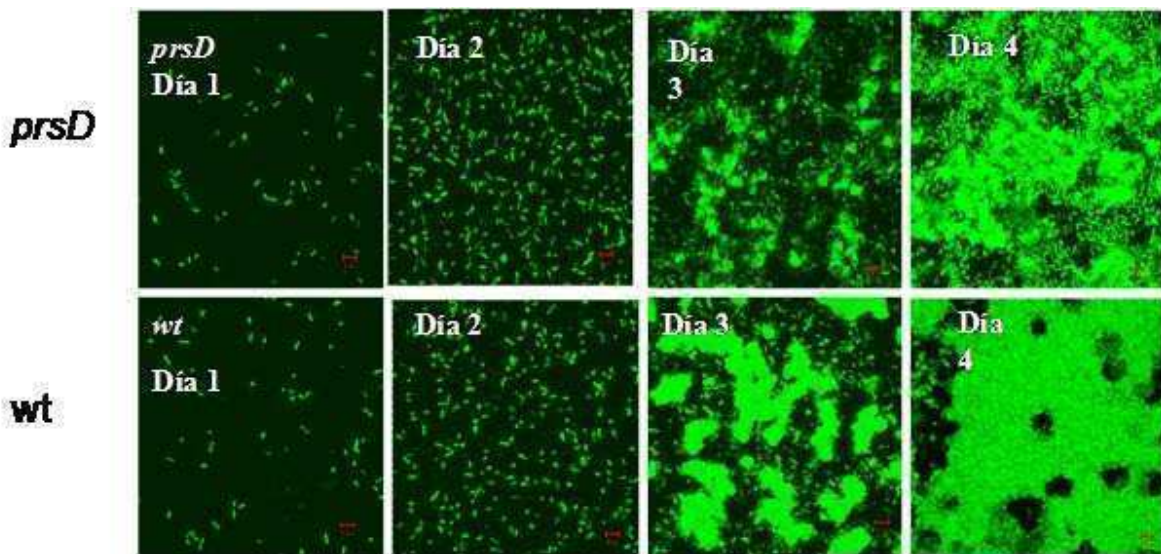


Figura I11. Formación de biofilms estáticos *in vitro* de *R. leguminosarum* en cepa silvestre (A34) o mutante defectiva en el sistema de secreción PrsDE.

Como ya se mencionó (ver sección 5.c), diversas proteínas secretadas vía PrsDE están relacionadas al EPS como enzimas modificadoras (PlyA and PlyB) o como proteínas de unión al EPS (las mencionadas glicanasas y la familia de proteínas Rap) probablemente debido a la presencia conservada en todas estas proteínas de al menos un dominio Ra. La presencia

de un dominio común entre glicanasas y las proteínas Rap, la observación que todas estas proteínas son secretadas por PrsDE y la posibilidad de regulación común junto con enzimas de síntesis de EPS [108] sugiere que las proteínas secretadas vía PrsDE están funcionalmente relacionadas y poseen un rol importante en la adhesión EPS-dependiente y la formación de un biofilm. En *R. leguminosarum* también se ha identificado un transportador tipo ABC relacionado con la tolerancia a stress hídrico y la formación de biofilms; se encontró que la cepa mutante en el transportador estaba afectada en la producción de EPS, lo cual puede resultar en menor tolerancia a stress [186].

La inactivación de *rapA1* en *R. leguminosarum* A34 por inserción de un cassette de resistencia a antibiótico no produjo fenotipos de adhesión diferentes a los de la cepa silvestre; como ya se dijo, esto podría deberse a una posible redundancia funcional entre miembros de la familia Rap con alta similitud a RapA1 en la cepa A34 (e.g. RapA2). Esta idea es apoyada por la evidencia que a pesar que el gen ortólogo a *rapA1* en la cepa secuenciada 3841 posee múltiples mutaciones resultando en un pseudogen no funcional, esta cepa no muestra deficiencia en la adhesión a superficies o formación de un biofilm in vitro [55].

## Objetivos

El objetivo general de esta tesis de doctorado es contribuir a la comprensión del rol de diversos factores de superficie o extracelulares en la adhesión de *R. leguminosarum* a sustratos abióticos y la formación de biofilms in vitro.

Los objetivos específicos de esta tesis son:

- 1) Evaluar el rol de RapA1 en la formación de biofilms de *R. leguminosarum* a través de un enfoque de sobre-expresión
- 2) Estudiar el rol del exopolisacárido ácido (EPS) en la adhesión mediada por RapA1.
- 3) Utilizar y establecer un sistema de flujo continuo para el análisis de biofilms en los rizobios.
- 4) Explorar los mecanismos involucrados en la localización unipolar de RapA1 y de otras proteínas pertenecientes a la misma familia.

## RESULTADOS

### **CAPÍTULO 1. Sobreproducción de RapA1 y estudio de sus efectos en la adhesión a superficies y formación de biofilms.**

#### **1. Análisis de secuencias muestra un alto grado de homología entre RapA1 y RapA2 en diferentes biovars.**

RapA1 fue identificada originalmente por *phage display* a partir de un *screening* sobre una biblioteca genómica de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* R200 [51]. También se han identificado los genes *rapA1*, *rapA2* y *rapC* en el sobrenadante de *R. leguminosarum* bv. *viciae* cepa A34 [103]. La mutante en *rapA1* en la cepa A34 no presentó alteración en la formación de un biofilm *in vitro* [103] y tampoco se observaron alteraciones en la morfología de colonias ni alteraciones evidentes en el perfil de sedimentación en los cultivos líquidos de dicha mutante (Fig. R1 C).

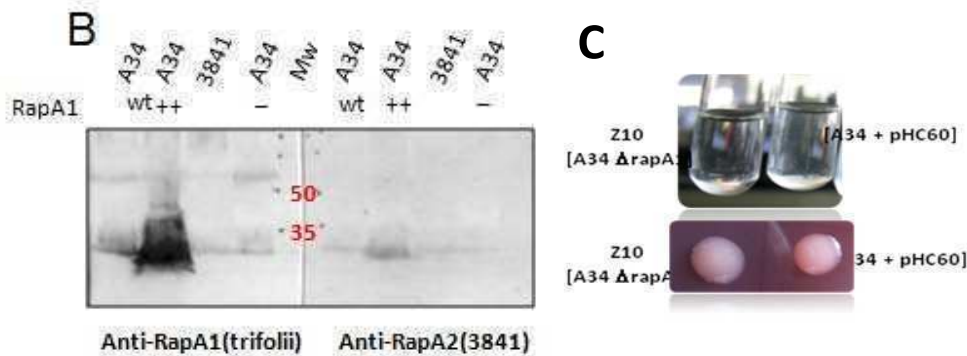
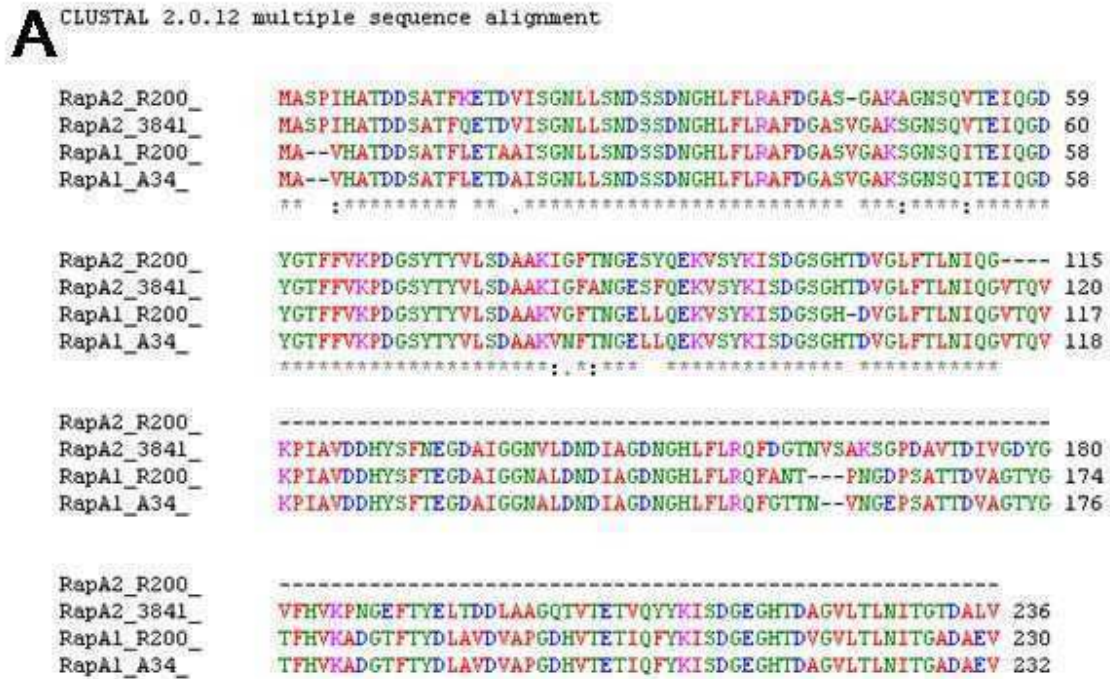


Figura R1. Análisis de similitud de de secuencias de RapA. (A)Secuencias de RapA1 y RapA2 de diferentes cepas fueron analizados por el programa Clustal. (B) Western Blot contra dos isoformas de RapA utilizando distintos anticuerpos. (C) Fenotipos de cultivo y morfología de colonia de cepa silvestre A34 y mutante *rapA1*. A34 y 3841 son cepas de *R.leguminosarum* bv. *viciae*; R200 es una cepa de *R.leguminosarum* bv *trifolii*.

El análisis genómico de *R. leguminosarum* bv. *viciae* cepa 3841, muestra que el gen que sería el homólogo a *rapA1* contiene varias mutaciones en la secuencia codificante. Este locus (RL3660) no está anotado como un ORF ni como proteína hipotética sino como *pseudogen*. Sin embargo, en el plásmido simbiótico (pRL100451) de 3841 se encuentra un ORF que correspondería a un homólogo a *rapA2*. La secuencia del producto de este gen presenta una alta identidad de secuencia con RapA1 (92%; Fig. R1a). En nuestro laboratorio se generó un antisuero utilizando la proteína recombinante RapA2 proveniente de *R. leguminosarum* bv *viciae* cepa 3841 (Abdián y col. manuscrito en preparación). Utilizamos ese antisuero para detectar por Western blot la presencia de RapA2 en preparaciones de proteínas

extracelulares de la cepa mutante en el gen *rapA1* proveniente del background genético A34 [103] (Fig. R1b calles 6 a 9). En paralelo se utilizó el antisuero generado contra RapA1 de la cepa R200 de *R. leguminosarum* bv *trifolii* [51] (calles 1 a 4). Observamos que el antisuero anti RapA2 detecta una señal en la cepa mutante A34 *rapA1* (Fig. R1B, calle 9) que es equivalente en peso molecular aparente a la señal que se observa en la preparación de la cepa 3841 (calle 8), lo cual confirma la presencia de al menos un homólogo a *rapA1* en A34. Además, se observa que el antisuero generado contra RapA2 es capaz de detectar RapA1 en una cepa que sobreexpresa RapA1 (ver más abajo) (calle 7). Como era previsible, anti-RapA1 es capaz de detectar una señal tenue en la muestra proveniente de la cepa 3841 (calle 3) que correspondería a RapA2. Estas observaciones junto con la similitud de secuencia sugieren una fuerte semejanza estructural entre isoformas de RapA y apoya la idea de una posible redundancia funcional entre miembros de la familia Rap, lo cual podría explicar la ausencia de fenotipos diferenciales entre la cepa mutante *rapA1* y la cepa silvestre en el contexto A34.

## **2. Análisis de la función de RapA1 en las interacciones celulares y la formación de biofilms in vitro**

### **A. Sobreexpresión y secreción de RapA1**

En este trabajo nos propusimos esclarecer el rol de RapA1 en las propiedades adhesivas y la formación de biofilms in vitro caracterizando su interacción con el EPS. Dado que es posible que exista una superposición funcional, lo cual puede empañar resultados si se utiliza un enfoque mutacional, se decidió sobre-expresar RapA1 en diferentes background genéticos para analizar el efecto de la sobreproducción de RapA1 sobre fenómenos relacionados a la formación de biofilms y poder obtener información sobre su interacción con otras estructuras. Para esto último, se utilizaron cepas deficientes en la síntesis del EPS ácido y por lo tanto en el CPS (ver Introducción, sección 4) y cepas mutantes en PrsDE (ver Introducción, sección 5.c) para determinar el rol de estas estructuras en los fenotipos de las cepas sobreproductoras de RapA1.

Un derivado del vector pHc60 [187] que expresa RapA1 y GFP desde el promotor constitutivo *plac* (pHCRapAS) [112] fue transferido por conjugación a nuestra cepa de trabajo A34. Como control de crecimiento, se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm a distintos tiempos de la curva de crecimiento de la cepa silvestre A34 que contiene el vector vacío pHc60 y la cepa isogénica conteniendo el plásmido pHCRapAS (Fig. R2). La figura R2 muestra que no hay alteraciones en el crecimiento de la cepa que lleva pHCRapAS respecto de la cepa



silvestre con el plásmido vacío.

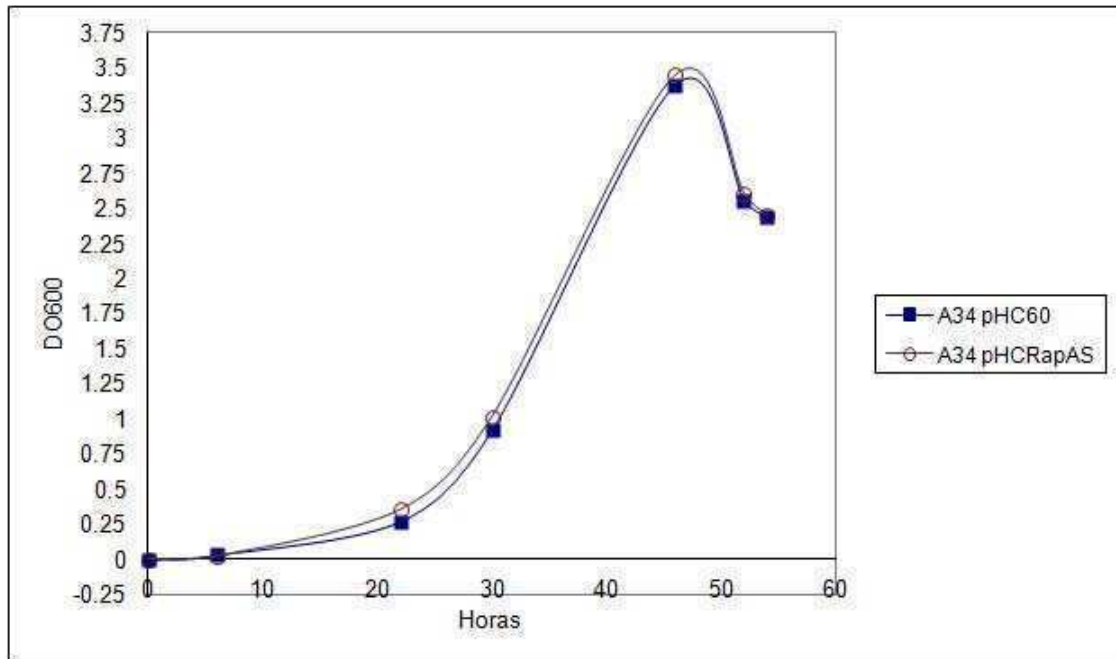


Figura R2. Curva de crecimiento de cepa silvestre A34 conteniendo el plásmido control pHC60 o plásmido de sobreexpresión de RapA1, pHCRapAS. Se muestra una curva representativa de 3 experiencias independientes.

El plásmido pHCRapAS fue transferido también a *R. leguminosarum* bv *viciae* cepa 3841 ([5]; <http://www.genedb.org/Homepage/>). Dado que RapA1 fue originalmente caracterizada en *R. leguminosarum* bv *trifolii* cepa R200 [51], también analizamos algunos efectos de sobreexpresión de RapA1 en esta cepa. La secreción de RapA1 en las distintas cepas de *Rhizobium* se analizó mediante SDS-PAGE de las proteínas extracelulares de bacterias cultivadas en medio mínimo o rico por 24 horas con agitación. Las proteínas secretadas se precipitaron en presencia de de ácido tricloroacético (TCA, concentración final 10%) de los

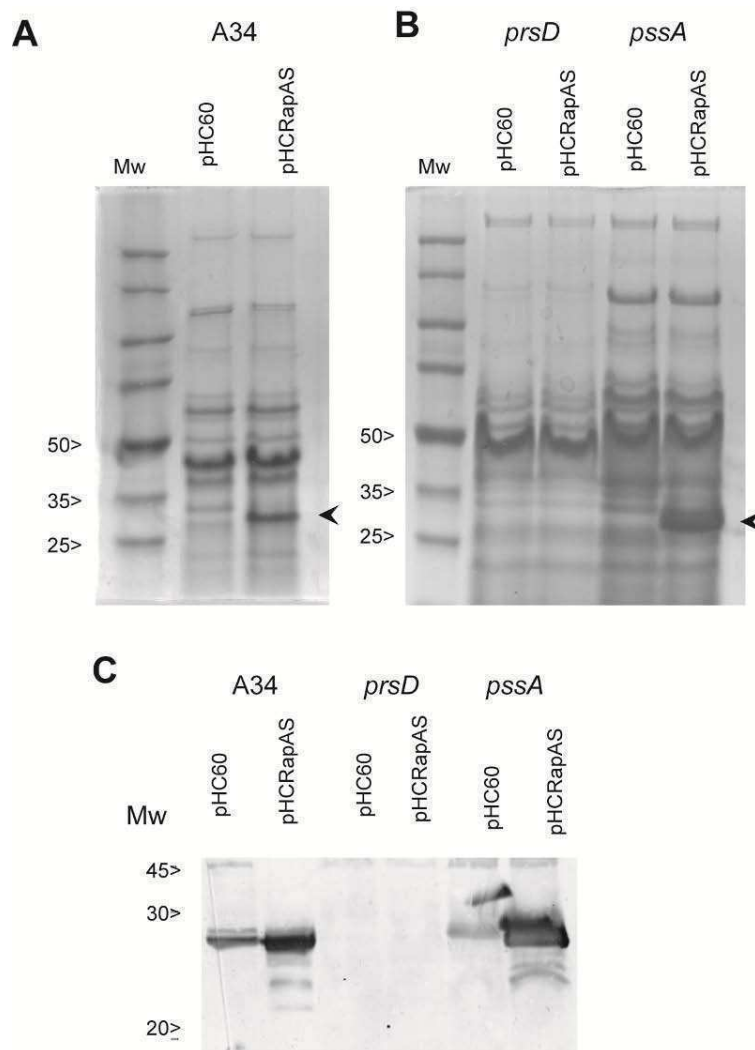


Figura R3. Sobreexpresión de RapA1. Se observa sobreexpresión de RapA1 en cepa Silvestre A34 (A) y sus derivadas mutantes en el sistema de secreción PrsDE y gen de producción de EPS *pssA* (B). La flecha indica la banda diferencial perteneciente a RapA1. Se confirma específicamente por Western Blot la sobreexpresión en las diferentes cepas.

sobrenadantes de cultivos equivalentes (densidad óptica a 600 nm de 0.75).

Las proteínas fueron resuspendidas en volúmenes iguales de buffer de Laemmli y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se observó una banda diferencial intensa de aproximadamente 28 kDa teñida con Coomassie blue en la cepa que contiene el plásmido pHCRapAS (Fig R3A). Por Western blot usando anticuerpos anti-RapA1, se observó la banda específica correspondiente a RapA1 (Fig. R3C) confirmando la sobreexpresión (y secreción aumentada) de RapA1 en *R. leguminosarum* bv *viciae*. Se analizó la diferencia de intensidad de bandas utilizando el software ImageJ (RSB, NIH, EEUU), estimándose un aumento de 10 veces en la producción y secreción de RapA1 en A34 pHCRapAS.

Para confirmar que la secreción de RapA1 endógena o proveniente de la sobreexpresión detectada en el medio extracelular es mediada por el sistema PrsDE, se analizó la sobreexpresión y secreción de RapA1 en la cepa mutante A412 (*prsD*) (ver tabla 1, Materiales y Métodos) (Fig. R3B calles 1 y 2). El análisis de proteínas extracelulares de la cepa A412 conteniendo el plásmido pHCRapAS no mostró secreción de RapA1 aún en condiciones de sobreexpresión. Inclusive el análisis por Western blot no detectó presencia de RapA1 en el sobrenadante de la cepa A412 cuando se sobreexpresa RapA1 (Fig. R3C, calles 3 y 4). Estas observaciones indican que la presencia de RapA1 en el medio extracelular no se debe a fenómenos de lisis u otros inespecíficos y además, que aún en condiciones de sobreexpresión, RapA1 es secretada exclusivamente vía PrsDE y no por otros sistemas de secreción identificados en el genoma de *R. leguminosarum* [68]. También se analizó la producción y secreción de RapA1 en la cepa A1077 (*pssA::Tn5*), deficiente en la síntesis del EPS (ver Materiales y métodos tabla 1). Se observó que la ausencia del EPS no interfiere con la sobreproducción y secreción de RapA1. Más aún, la banda diferencial correspondiente a RapA1 fue consistentemente más intensa (aproximadamente 2-3 veces) en la preparación de proteínas extracelulares de la mutante *pssA* que la que proviene de la cepa silvestre tanto cuando son analizadas por tinción con Coomassie blue (Fig. R3b), como por Western blot (Fig. R3c).

## **B. La sobreexpresión de RapA1 afecta los fenotipos de colonia, sedimentación y formación de un biofilm in vitro**

RapA1 es una proteína secretada, con afinidad por la superficie de *R. leguminosarum* [51]; además se observó que la sobreproducción de RapA1 aumenta la capacidad de adhesión de la bacteria a la raíz [112]. Para determinar si las interacciones celulares o la adhesión bacteriana a diferentes sustratos abióticos son afectadas por la sobreexpresión de RapA1, estudiamos los fenotipos macroscópicos de cepas sobreproductoras de RapA1. Se analizó la morfología de colonias durante el crecimiento en medio sólido de cepas sobreproductoras de RapA1. Para ello, se sembraron 2  $\mu$ l de suspensiones bacterianas estandarizadas en placas de agar conteniendo colorante (Congo Red y Coomassie blue). Mientras que la colonia de la cepa silvestre presentó una morfología de colonia típica de *R. leguminosarum* (brillante y mucoide) debido a la producción de polisacáridos, la cepa isogénica que sobreexpresa RapA1 formó una colonia opaca, blanca, irregular y plana. Un fenotipo similar de morfología de colonia se observó en las cepas silvestres de *R. leguminosarum* 3841 y R200 que sobreexpresan RapA1 (Fig. R3A). El colorante Congo red se une a diferentes componentes de la matriz extracelular de bacterias y fue usado para determinar el estado nativo de dicha matriz [188]; además, ciertos fenotipos alterados de morfología de colonia se han ligado a la presencia de algunas adhesinas [189]; por lo tanto, la morfología de colonia puede ser indicativo de alteraciones en las interacciones celulares y en la organización multicelular.

También observamos un fenotipo particular en cultivos líquidos en cepas sobreproductoras de RapA1. Estas cepas mostraron un patrón de sedimentación alterado respecto a las cepas silvestres. Las bacterias se cultivaron hasta DO similares en etapa exponencial tardía, se dejó el cultivo estático por 4 horas y se observó que en las cepas que sobreexpresan RapA1, las bacterias permanecían aún en suspensión, mientras que en los cultivos de bacterias silvestres, las células habían sedimentado al fondo del tubo luego del mismo tiempo en condiciones estáticas (Fig. R3B). Este fenotipo fue observado tanto en cultivos en medio rico como en medio mínimo. En una cepa mutante para el sistema de secreción PrsDE, la sobreexpresión de RapA1 no produjo un fenotipo distinguible en cuanto a la morfología de colonia o en el patrón de sedimentación en cultivo líquido (Fig. R3C), indicando que ambos fenotipos están directamente relacionados con la secreción de RapA1. Una posible explicación para estos fenotipos es que la cantidad aumentada de RapA1 extracelular (y posiblemente asociada a la superficie de la célula) altera las interacciones

célula-célula, resultando en la reducción de la densidad de los agregados celulares. Los fenotipos de agregación están de algún modo inhibidos por el exceso de RapA1 asociada a células, sugiriendo fuertemente una interacción con componentes de la matriz extracelular (por ejemplo exopolisacaridos) que engloba a las bacterias en las colonias o en los agregados.

La evaluación de la adhesión bacteriana a una superficie abiótica como el poliestireno provee una herramienta para examinar tanto la afinidad de la superficie bacteriana por una superficie hidrofóbica como la habilidad de las bacterias de interactuar entre ellas. El método de microplacas de 96 pocillos y tinción con Cristal Violeta es ampliamente utilizado para determinar capacidad de adhesión y formación de biofilms [122]. Los cultivos en fase estacionaria fueron diluidos a una DO de 0.01 e incubados sin agitación por 4 días a 28°C y los biofilms fueron teñidos usando Cristal Violeta de acuerdo a Russo y col. (2006). Observamos que la sobreexpresión de RapA1 otorgó a la cepa silvestre (A34) una mayor capacidad de adhesión (aproximadamente 4 veces más) respecto a la cepa con expresión endógena de RapA1 (y conteniendo el vector sin inserto) (Fig. R4A); un resultado similar se observó cuando se analizó la adhesión a la superficie abiótica de las cepas silvestres 3841 del biovar *viciae* (4 veces mayor) y R200 del biovar *trifolii* (3 veces mayor) que sobreexpresan RapA1 (Fig. R4A). De manera consistente con los resultados anteriores, la sobreexpresión de RapA1 en un mutante del sistema de secreción PrsDE no alteró la adhesión a poliestireno, confirmando que la formación de biofilm aumentada es consecuencia de la sobreexpresión y secreción de RapA1 (Fig. R4B).

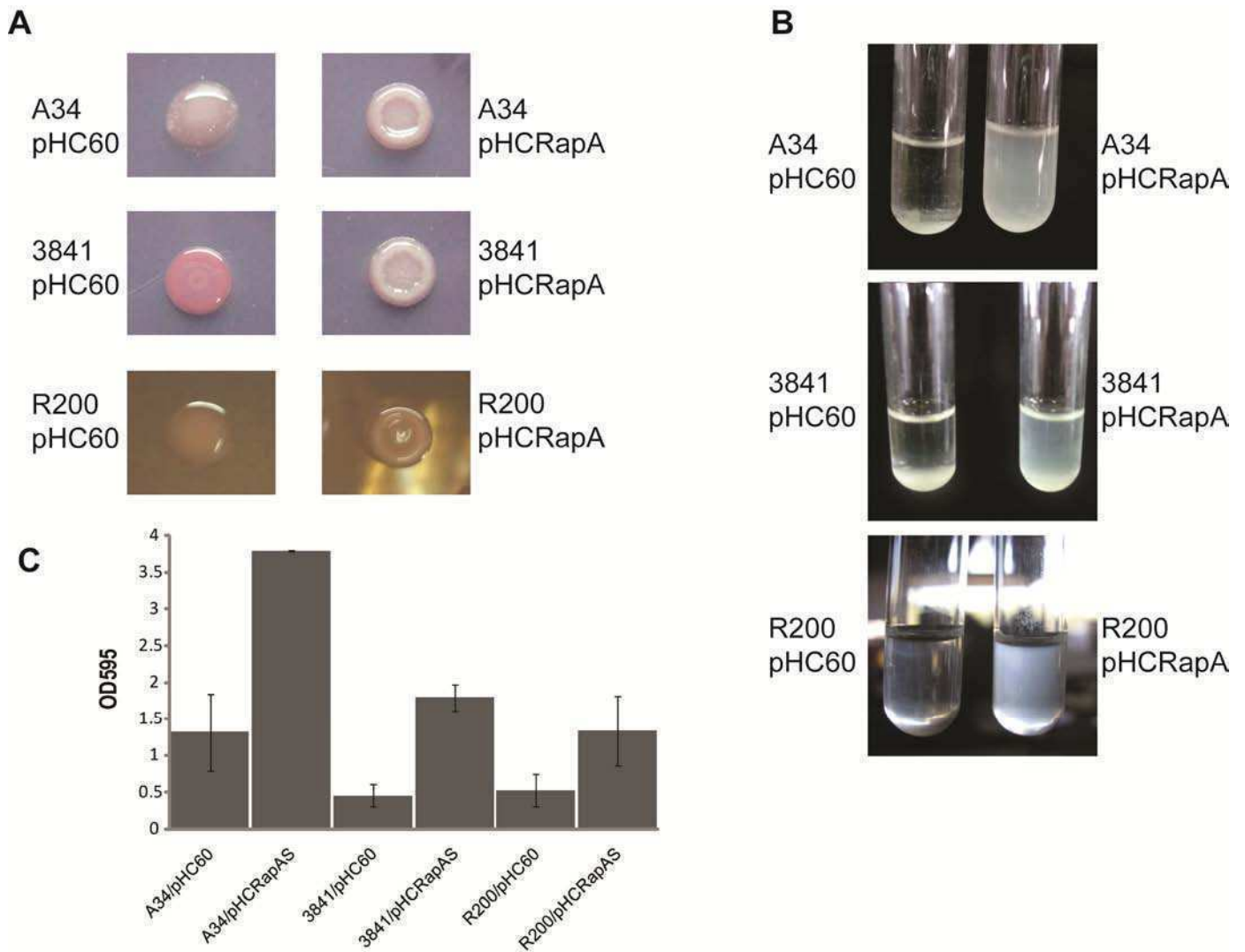


Figura R4. Fenotipos observados durante la sobreexpresión de RapA1. Se observaron los fenotipos de morfología de colonias (A) y sedimentación en cultivo líquido (B) de las 3 cepas silvestres de *R. leguminosarum*. La adhesión a poliestireno fue evaluada por tinción con “cristal violeta” (C); se observa un experimento representativo de 3 réplicas con 4 pocillos por réplica. Barras de error: desvío estándar.

### ***C. Interacciones célula-célula y localización de RapA1***

Las observaciones macroscópicas hasta aquí descritas de cepas que sobreexpresan RapA1 pueden surgir como “propiedades emergentes” de las interacciones entre células; esto es, pueden ser un resultado de la forma alterada que tienen las células de interactuar entre sí, propagando el efecto hasta generarse un efecto macroscópicamente observable. Para evaluar en profundidad el efecto de RapA1 en interacciones célula-célula y estructura del biofilm, usamos microscopía laser confocal (CLSM).

Los biofilms desarrollados en forma estática fueron generados en cámaras con fondo de borosilicato de un espesor de 0,15 mm. Las bacterias fueron cultivadas en medio mínimo Y en presencia de manitol como fuente de carbono partiendo de una DO inicial de 0,01. Se ha observado en trabajos previos que estas condiciones son óptimas para la formación de biofilms estructurados [103]. Por CLSM se observó el desarrollo de las distintas etapas del biofilm in vitro en los tres contextos genéticos (A34, 3841 y R200), silvestres (en presencia del vector pHc60) o en condiciones de sobreexpresión de RapA1 (en presencia de pHCRapAS). Mientras que las células dentro de las microcolonias silvestres mostraban un empaquetamiento cercano, con predominancia de interacciones laterales [103], las interacciones celulares en las bacterias que sobreexpresan RapA1 estaban alteradas y los biofilms eran menos estructurados y desorganizados (Fig. R5). Las mismas alteraciones se observaron en las tres cepas silvestres analizadas. Los detalles de cada biofilm muestran que se observa mayor distancia entre células y se pierde la estructura de “panal de abeja” que caracteriza a las microcolonias de las cepas silvestres (Fig. R5 A, C y E).

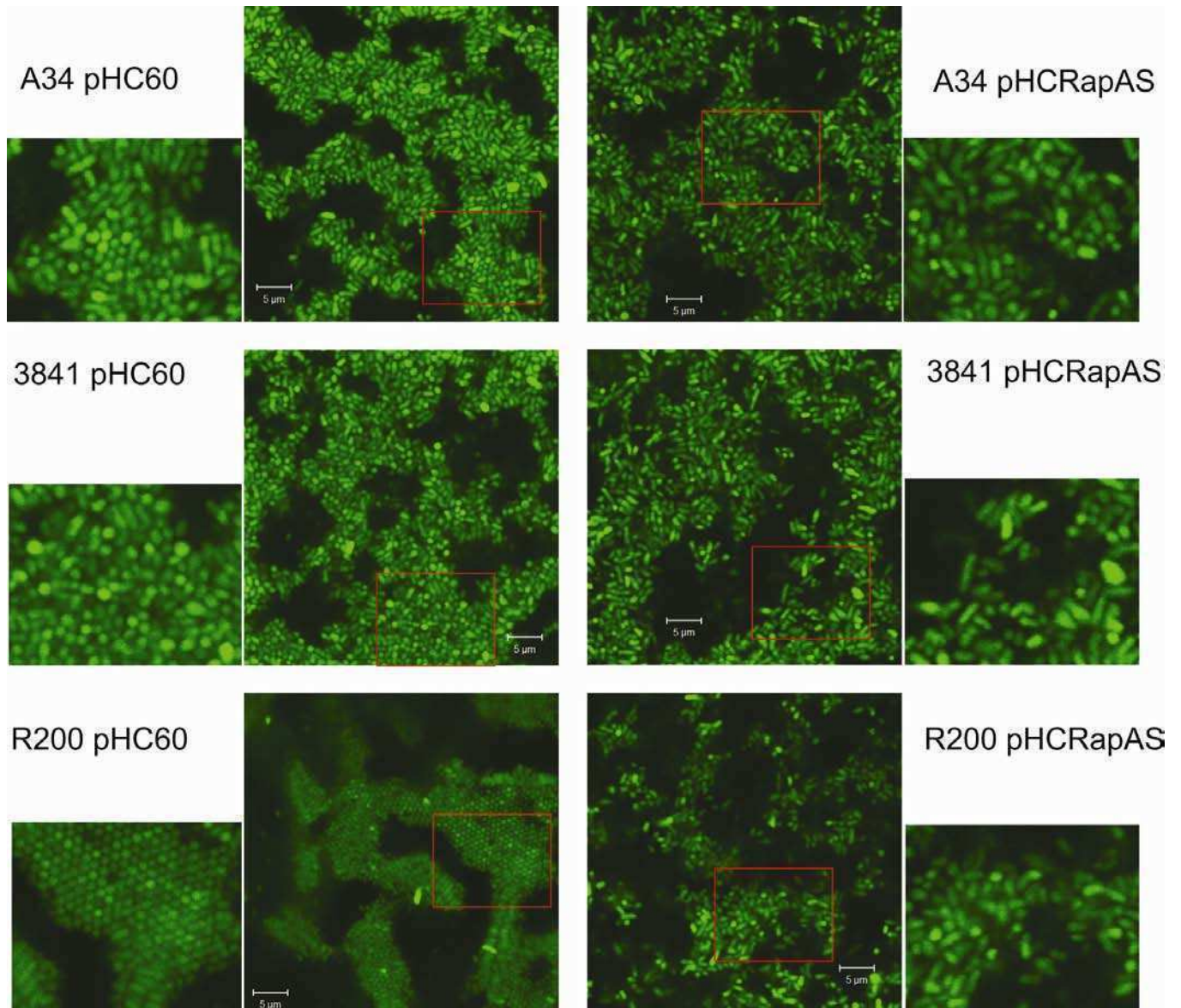


Figura R5. Interacciones célula-célula dentro de Biofilms estáticos. Diferentes cepas silvestres de *R. leguminosarum* fueron incubadas hasta la formación de un biofilm maduro. Se observan los biofilms de las cepas silvestres (izq.) o sobreexpresando RapA1 (der.); regiones aumentadas de las imágenes se indican en rojo.

Los biofilms fueron crecidos en medio mínimo Y durante 4 días y observados por CLSM (aumento 100x), barra blanca: 5µm



Los fenotipos observados son consistentes con el fenotipo observado en cultivos líquidos, en los que el aumento en la producción de RapA1 disminuye la autoagregación y sedimentación. Si los elevados niveles de RapA1 detectados (Fig. R3) se localizan sobre la superficie celular, esto podría alterar la capacidad de interacción célula-célula. Resulta importante determinar la localización de RapA1 sobre la superficie celular en condiciones normales y de sobreexpresión.

Para evaluar la presencia y la localización de RapA1, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos policlonales contra RapA1 (hechos en conejo) seguidos por anticuerpos secundarios (anti-Ig de conejo) acoplados a un fluoróforo (Cy3) y observando por CLSM (Fig. R6). Los cultivos de *R. leguminosarum* A34 y la cepa isogénica que sobreexpresa RapA1 (ambos expresan GFP) de etapas tempranas o tardías de crecimiento logarítmico fueron sometidos a un protocolo de inmunodetección usando células vivas (ver "Métodos"). Luego de la inmunotinción, las células fueron montadas en portaobjetos cubiertos de agarosa y observadas usando CLSM.

Como se había reportado previamente [51], observamos que RapA1 se localiza en un polo de la superficie bacteriana en células de la cepa A34 en condiciones de expresión endógena (Fig. R6, panel izquierdo). Sin embargo, cuando RapA1 es sobreexpresada, la inmunolocalización mostró una señal difusa rodeando toda la superficie celular (Fig. R6, panel derecho), indicando que RapA1 se acumula en torno a las células. Este efecto podría explicar el fenotipo observado en biofilms estáticos (Fig. R5), en los que las interacciones laterales cercanas estaban impedidas. Además, la acumulación de RapA1 en la superficie también puede generar la reducción en la densidad de agregación bacteriana en cultivos líquidos resultando en menor sedimentación (Fig. R4B).

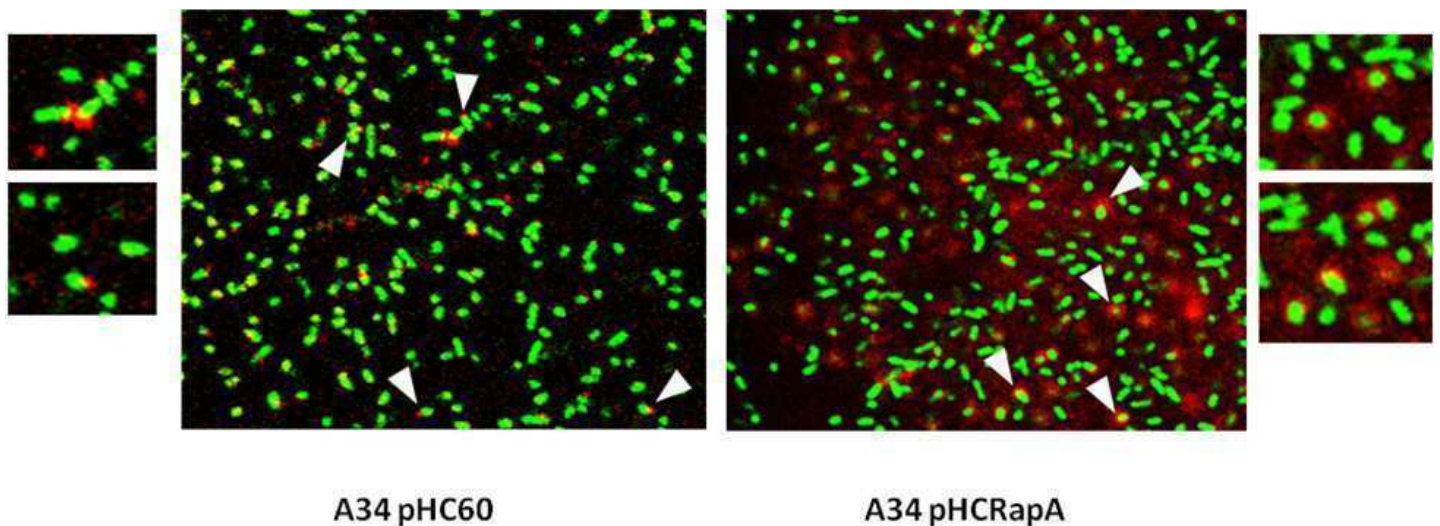


Figura R6. Localización de RapA1 por inmunofluorescencia. Células silvestres (izq.) o sobreproductoras de RapA1 (der.) fueron sometidas a Inmunofluorescencia para detectar la localización de RapA1 sobre su superficie. Las flechas blancas indican los ejemplos más representativos. Se muestran detalles.

#### ***D. Los fenotipos y la localización de RapA1 requieren la presencia del exopolisacárido ácido (EPS)***

RapA1 es secretada por el sistema de secreción tipo I PrsDE, en condiciones de expresión endógena o de sobreexpresión (Fig. R3c). La secreción de RapA1 no se vio afectada por la ausencia de EPS maduro ya que la cepa mutante *pssA* fue capaz de secretar RapA1 en condiciones de expresión endógena o de sobreexpresión (Fig. R3B, calles 4 y 5). Además, dado que iguales cantidades de material fueron procesadas, la señal más fuerte en la cepa sobreproductora de RapA1 deficiente en EPS, sugiere que ante la ausencia de EPS hay una incrementada liberación de RapA1 al medio extracelular mientras que en cepas silvestres productoras de EPS, una fracción de proteína secretada podría permanecer unida a la superficie celular.

Se estudió si los fenotipos asociados a la sobreproducción de RapA1 son dependientes de la síntesis del EPS, analizando como se describió la mutante *pssA* que contiene el plásmido pHCRapAS. La sobreexpresión de RapA1 en la cepa deficiente en EPS no afectó la agregación, sugiriendo que hay una interacción entre RapA1 y el EPS (Fig. R7A). Las colonias de la cepa mutante *pssA*, isogénica de A34 (deficiente en el EPS) presentan una morfología de colonias característica [103]; la ausencia de EPS genera colonias planas y opacas, mientras que las colonias típicas de *R. leguminosarum* son mucoides y brillantes debido a la gran

cantidad de EPS que producen [190]. La sobreexpresión de RapA1 en el contexto genético *pssA* no produjo un fenotipo diferencial de colonia respecto de la misma cepa con vector vacío (Fig. R7B).

RapA1 claramente intensifica la adhesión de cepas silvestres de *R. leguminosarum* a placas multipocillo de poliestireno (Fig. R4). Para determinar si esta adhesión es dependiente del EPS, se analizó la adhesión a poliestireno de la cepa deficientes de EPS (*pssA*) que produce cantidades normales o que sobreproduce RapA1 (Fig. R7C). La cepa A1077 (*pssA*) no mostró diferencias cuando sobreexpresa RapA1 respecto de la cepa con el vector vacío. Como se predice, la cepa A412 –mutante en PrsDE- que es incapaz de secretar RapA1 al medio extracelular no presenta diferencias en la adhesión al poliestireno cuando contiene el vector pHC60 o el plásmido pHCRapAS.

Estas observaciones refuerzan la noción que la síntesis del EPS es necesaria para los efectos conferidos por RapA1 a las cepas de rizobios, sugiriendo fuertemente la interacción entre RapA1 y el EPS.

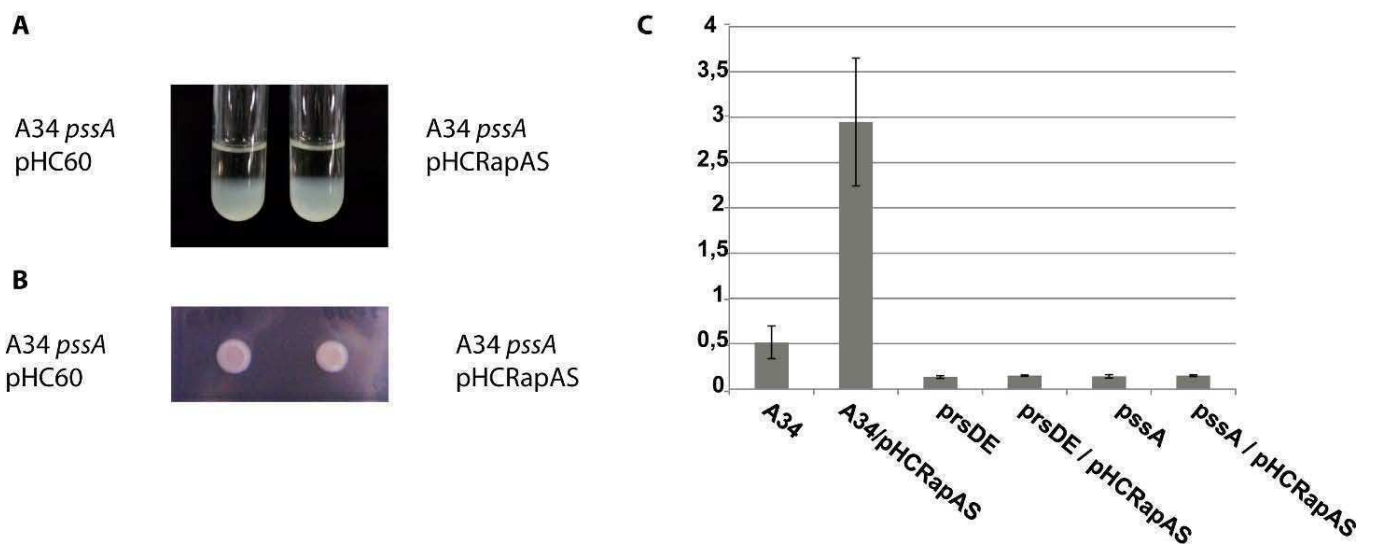


Figura R7. La sobreexpresión de RapA1 no genera fenotipos de superficie o cambios en la adhesión en la cepa *pssA* deficiente en la síntesis del EPS. Observación de sedimentación de cultivos líquidos (A) y morfología de colonias (B) en cepas *pssA* control (izq) o que sobreexpresan RapA1 (der). Adhesión a poliestireno de cepa deficiente en el EPS o mutante de *PrsDE* (C). Se observa la adhesión de cepa silvestre (A34), su derivada mutante en *prsDE* o deficiente en EPS (*pssA*) en condiciones normales o de sobreexpresión de RapA1 (valores de densidad óptica a 595nm). Se muestra un resultado representativo de 3 experimentos. Cada experimento consistió en 4 pocillos replicados para cada condición. Barras de error: Desvío estándar

Se decidió estudiar si la ausencia de fenotipos en condiciones de sobreproducción de RapA1 está relacionada a la localización de RapA1 sobre la superficie celular. Para investigar esta posibilidad, se analizó la localización de RapA1 por inmunofluorescencia de la cepa *pssA* (A1077) que expresan GFP y niveles endógenos o aumentados de RapA1 (Fig. R7A). La observación por CLSM muestra una reducción importante (de 12% a 2%) en la señal polar de RapA1 en la cepa deficiente en EPS (panel izq.), confirmando que el EPS/CPS es importante para la retención de RapA1 sobre la superficie celular. Sin embargo, todavía se pudo observar señal de RapA1 en algunas células. En condiciones de sobreexpresión, RapA1 también se mostró mayoritariamente ausente de la superficie celular, el patrón de localización difuso en torno a la superficie celular (que se formaba en células de la cepa silvestre) no se observó cuando la mutante *pssA* llevaba el plásmido pHCRapAS que dirige la sobreexpresión de RapA1 (panel derecho); aportando fuerte evidencia de la interacción entre el EPS y RapA1.

Dado que aún se observa señal de RapA1 en un polo de la bacteria en ausencia de EPS, resulta aparente que la localización polar no es completamente dependiente de EPS/CPS. La presencia de un polisacárido de superficie, con localización polar [54], y la posible afinidad de RapA1 por polisacáridos; hace interesante el estudio de interacción entre RapA1 y el glucomanano (desarrollado en “Discusión”).

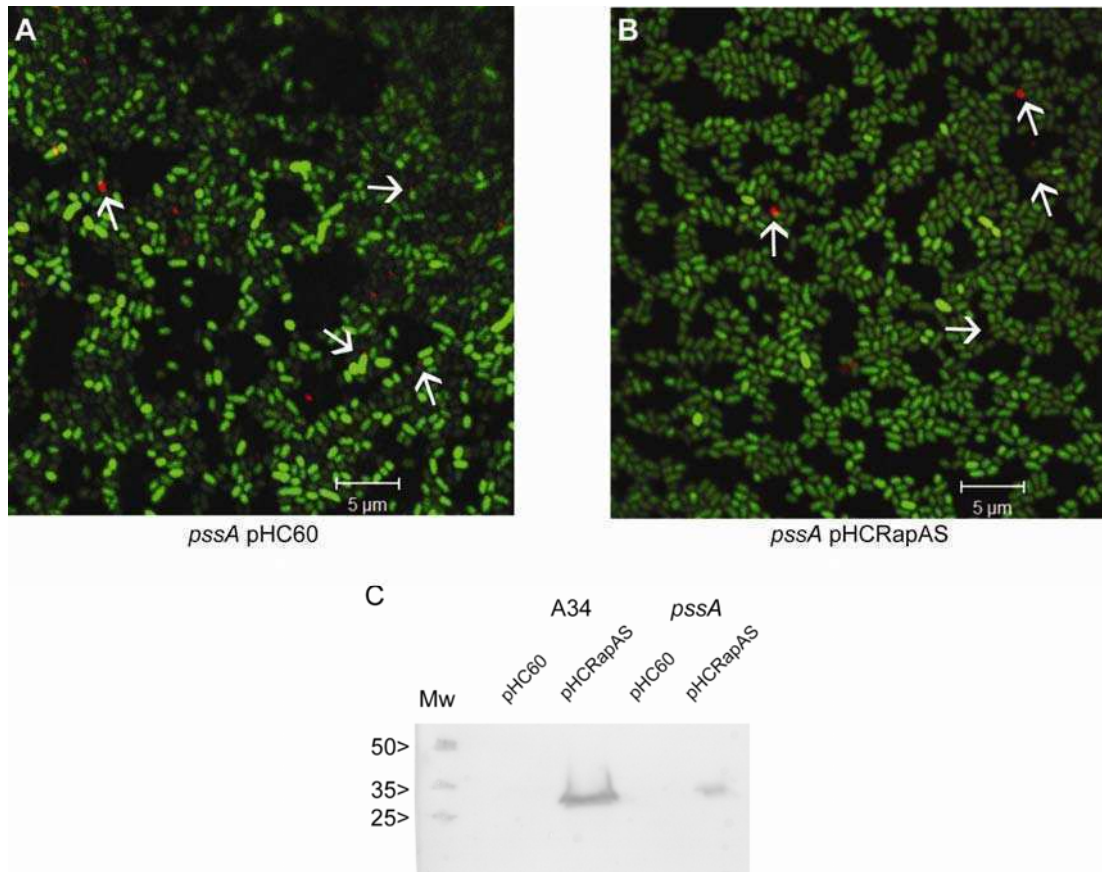


Figura R8. RapA1 se localiza polarmente en cepas deficientes en EPS. Se observa que la localización de RapA1 continúa siendo polar en ausencia de EPS (flechas) en condiciones de expresión endógena (A) y en condiciones de sobreexpresión (B). Se muestran campos representativos de 4 experimentos diferentes (Aumento 100x). Western blot de preparaciones de proteínas asociadas a la célula (C) muestran menor presencia de RapA1 en ausencia de EPS.

Para determinar si efectivamente, el EPS es necesario para la estabilización de RapA1 sobre la superficie celular, se purificó la fracción de proteínas asociadas a la superficie celular y se analizó por Western blot la presencia de RapA1 en la superficie de células silvestres o deficientes en EPS en condiciones normales o de sobreexpresión (Fig. R8B). Las células provenientes de cultivos equivalentes, fueron centrifugadas y lavadas para remover polisacáridos extracelulares y luego se las incubó en solución buffer salino (PBS, pH=7.4) a

60°C por una hora con varias rondas de agitación por vortex. Los resultados confirman que una fracción menor de RapA1 permanece unida a la superficie celular en ausencia de EPS respecto a la cepa silvestre. (Fig. R8C).

### **Conclusiones parciales:**

Los resultados descritos hasta ahora en su conjunto indican que la secreción aumentada RapA1 tiene un importante impacto en las propiedades adhesivas y en la formación de una biomasa de biofilm por los rizobios. Sin embargo, RapA1 no parece ser una típica adhesina que promueve la autoagregación. Curiosamente, el efecto ejercido por RapA1 es absolutamente dependiente de la síntesis del EPS/CPS. Más aún, las evidencias indican que la función de RapA1 está estrechamente ligada a la del EPS en la formación de una matriz extracelular durante el desarrollo de un biofilm.

## **CAPITULO 2. Estudio de la formación de biofilms en flujo continuo.**

### **1. El sistema de flujo continuo**

Para profundizar la investigación en la formación de biofilms *in vitro* y el estudio del rol de RapA1, decidimos utilizar un sistema que genere condiciones de trabajo de mayor rigurosidad, en el que la capacidad de formar un biofilm robusto resulte determinante y genere resultados concluyentes. Para esto utilizamos el sistema de biofilms en celda de flujo continuo desarrollado por el grupo del Dr. Soeren Molin en la Universidad Técnica de Copenhague, Dinamarca [191] (Fig. R9). Este sistema se usa en combinación con CLSM para el seguimiento continuo de la formación del biofilm [192]. Este enfoque no ha sido usado nunca en *Rhizobiaceae* y puede aportar valiosa información sobre la formación de biofilms en condiciones dinámicas y más estrictas.

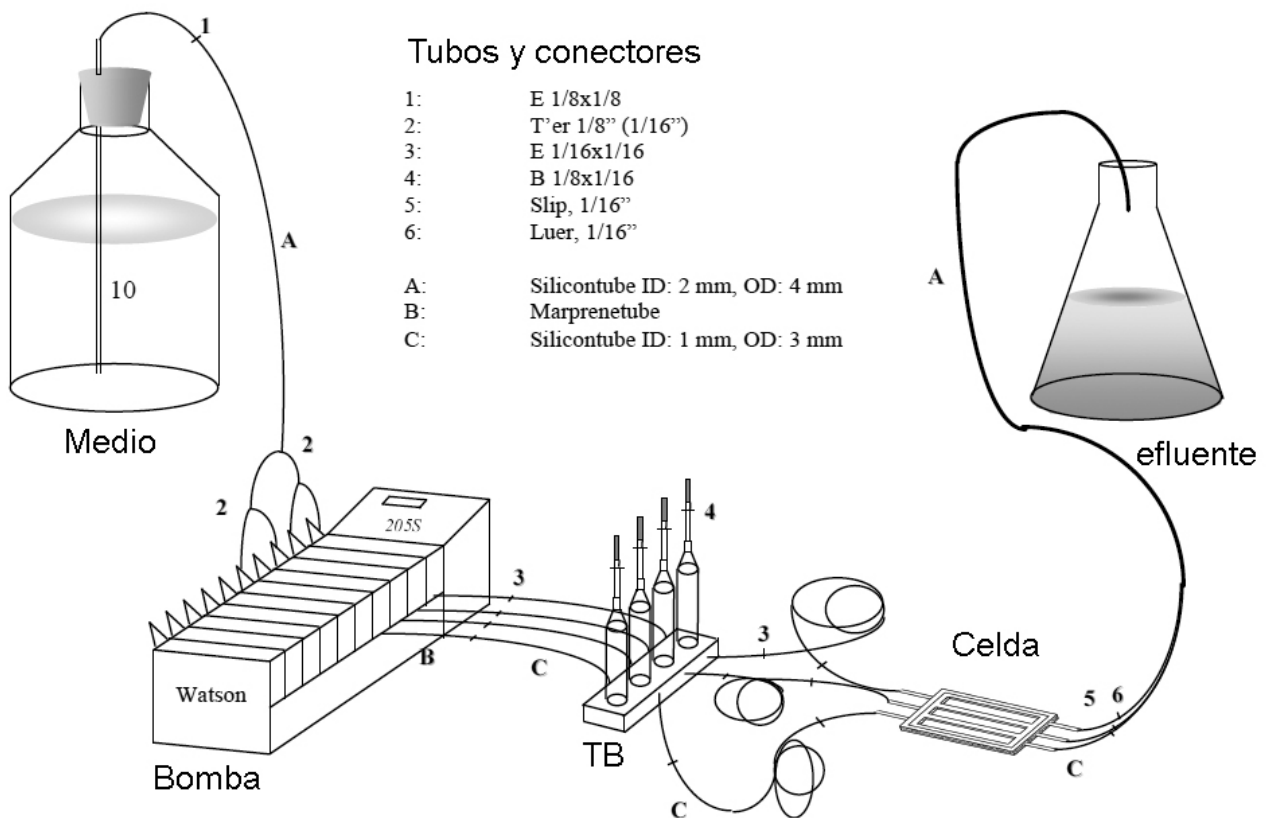


Figura R9. Esquema del sistema de flujo continuo utilizado para el análisis de biofilms. El envase con medio fresco provee medio bombeado a través de la bomba peristáltica ("Bomba") y las burbujas son eliminadas en la trampa de burbujas ("TB"). Luego el medio fluye a través de la celda de cultivo y el efluente con medio usado y células se colecta en un recipiente.

## 2. Análisis de las condiciones óptimas y requerimientos nutricionales

Inicialmente, se analizó la formación de biofilms por las cepas silvestres para determinar si *R. leguminosarum* es capaz de adherirse al sustrato (borosilicato) y formar biofilms en condiciones de flujo continuo. Como primera medida, se estudiaron diferentes condiciones nutricionales, las cuales pueden influir notoriamente en la formación de biofilms [193,194]. Se estudiaron diversas condiciones nutricionales para determinar las condiciones óptimas de formación de biofilm dado que se ha observado que medios de cultivo demasiado ricos desfavorecen el desarrollo de biofilms. Se ensayaron diferentes concentraciones de medio rico diluido (YEM 10%, 5% o 2% en H<sub>2</sub>O) o medio mínimo Y con diferentes concentraciones de



fuente de Carbono (manitol 2%, 0,2% o succinato 2%). Se observó que en medio rico diluido, ninguna de las cepas ensayadas fue capaz de formar estructuras complejas luego de 4 o 5 días de incubación en flujo continuo (Fig. R10). Luego de varias rondas de experimentos, observamos que las cepas silvestres de *R. leguminosarum* bv *viciae* son capaces de formar microcolonias y agregados de bacterias en condiciones de flujo continuo luego de 4 o 5 días de cultivo en medio mínimo Y, en presencia de manitol como fuente de carbono. Las condiciones de crecimiento optimas para el desarrollo de biofilms fueron similares a aquellas usadas estudiando biofilms estáticos (Y-manitol) [55,103], posiblemente por la capacidad de *Rhizobium* de generar mayor cantidad de exopolisacáridos cuando crece en presencia de manitol [190].

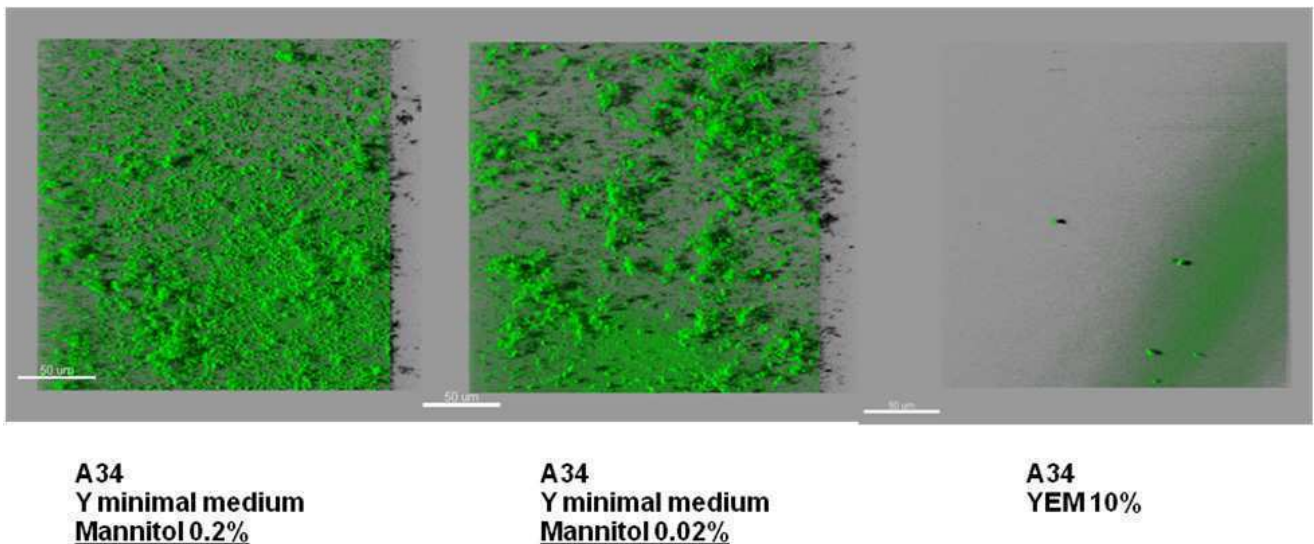


Fig R10. Biofilms formados en celda de flujo continuo crecidos en diferentes condiciones nutricionales. Se utilizaron medio mínimo Y con diferentes cantidades de fuente de carbono (Manitol) o medio rico (YEM) diluido. Se observa la adhesión y formación de biofilms de *R.leguminosarum* bv *viciae* A34 luego de 4 días. Las imágenes fueron tomadas por CLSM con aumento de 63x y procesadas por el software Bitplane Imaris. Barra blanca: 50 micrómetros

### 3. PrsDE y el EPS son necesarios para la formación de biofilm en flujo continuo

Con el objeto de determinar si las proteínas secretadas por PrsDE o el EPS son requeridos para la formación de biofilms en condiciones de flujo continuo, se analizó en mismas condiciones mencionadas en la sección anterior, la formación de biofilm por las cepas mutantes *pssA* y *prsDE* (A412 y A1077, respectivamente). Es de esperar que una cepa deficiente en el

EPS sea incapaz de formar biofilms en condiciones dinámicas, dado que la adhesión inicial es un evento clave para el establecimiento de un biofilm y la ausencia de EPS interfiere con la adhesión y formación de un biofilm en condiciones estáticas en *Rhizobium* [103]. Por otro lado, en condiciones estáticas, las mutantes en el sistema PrsDE forman biofilms inmaduros [33,68,103].

Utilizando las condiciones óptimas de crecimiento, establecidas previamente, se observó que en etapas tempranas tanto la cepa mutante *pssA* como la mutante *prsD* forman pequeñas cantidades de células o microcolonias adheridas al sustrato; sin embargo, estas microcolonias se desprendieron rápidamente de las celdas de flujo y no hubo desarrollo de un biofilm (Fig. R11). Estos datos confirman el requerimiento del EPS y de proteínas secretadas por PrsDE para la formación de biofilms robustos en *R. leguminosarum*, especialmente en condiciones de stress mecánico, en las que la adhesión inicial es crucial para el posterior desarrollo del biofilm.

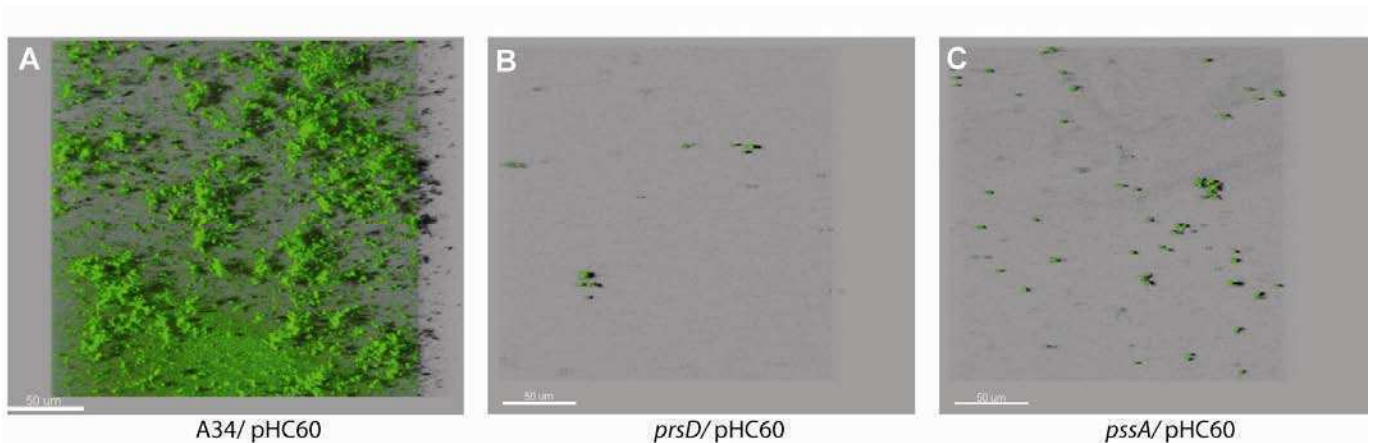


Figura R11. Formación de biofilms en flujo continuo de cepas deficientes en EPS o PrsDE. Se utilizó medio mínimo Y con manitol y los biofilms fueron generados durante 4 días. La DO de los inóculos iniciales fueron equivalentes. Se observa la adhesión y formación de biofilms de *R.leguminosarum* bv *viciae* A34 (A), A34 *prsD* (B) y A34 *pssA* (C). Las imágenes fueron tomadas por CLSM con aumento de 63x y procesadas por el software Bitplane Imaris. Barra blanca: 50 micrómetros

#### **4. RapA1 aumenta la adhesión y la formación de biofilms in vitro en condiciones de flujo continuo**

Como se describió en el capítulo anterior, la sobreproducción de RapA1 confiere adhesión incrementada a un soporte como el poliestireno (sección 2.b); por lo tanto podemos postular que en condiciones de flujo continuo, cantidades incrementadas de RapA1 pueden ser beneficiosas para la adhesión y luego, el desarrollo de un biofilm. Sin embargo, si la producción aumentada de RapA1 resulta en un fenotipo de interacciones celulares alteradas (ver sección 2.c), se espera que las cepas que sobreexpresan RapA1 sean más fácilmente desprendidas por las condiciones de flujo y que no se formen biofilms complejos.

Se analizó el efecto de la secreción aumentada de RapA1 sobre la capacidad de formar biofilms en flujo continuo de las cepas A34, 3841 y R200 que contienen el plásmido pHCRapAS comparados con las cepas que contienen el vector sin inserto. No fue posible obtener resultados concluyentes con la cepa R200, dado que no se obtuvo un crecimiento significativo en flujo continuo en las condiciones ensayadas. Fue interesante la observación que las cepas A34 y 3841 que sobreproducen RapA1 presentan mayor capacidad de adherirse y formar microcolonias, comparadas con las correspondientes cepas silvestres que no sobreexpresan RapA1 (Fig. R12). El fenómeno de adhesión inicial es relativamente rápido (1-2 horas); es posible que en esta etapa intervengan estructuras formadas previamente y no hay lugar para la replicación celular antes de la puesta en marcha del flujo. Por lo tanto, si la adhesión inicial está favorecida, la cepa contará con mayor número de células de partida para iniciar la formación de estructuras más complejas.

Luego de 4 días de cultivo en flujo continuo la cepa A34 que sobreexpresa RapA1 desarrolló estructuras considerablemente mayores y complejas comparadas a la cepa A34 pH60. Un resultado similar y aún más evidente se observó en la cepa 3841 pHCRapAS (Fig. R13). Es posible que el fuerte efecto sobre la formación de un biofilm se deba al notable incremento en la adhesión a soportes abióticos observada en las cepas silvestres cuando sobreexpresan RapA1 (Fig. R4C, R7C y R12), lo cual conduce a un mayor desarrollo de biofilms. Además, a pesar que las uniones íntimas entre bacterias están alteradas en dichas condiciones, no se puede descartar que el efecto global sobre la modulación de la estructura de la matriz extracelular sea favorecer la formación de una mayor biomasa de bacterias.

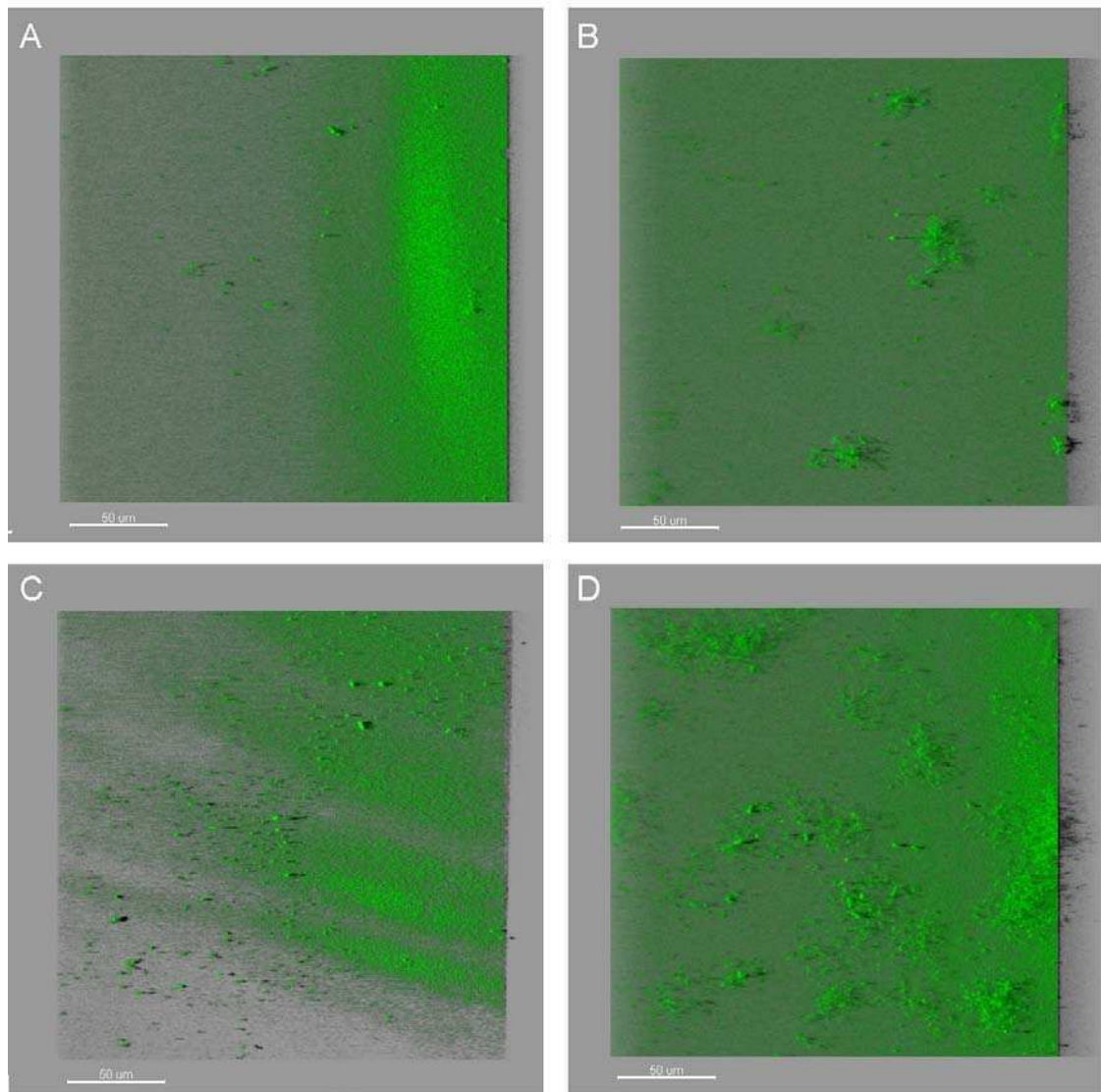


Figura R12. Adhesión inicial y formación de microcolonias en flujo continuo. Cepas silvestres (izq.) o sobreproductoras de RapA1 (der.) fueron cultivadas en celdas de flujo continuo durante 24 horas. Todas las cepas fueron inoculadas con volúmenes iguales de inóculos de DO estandarizada. Se utilizaron *R. leguminosarum* bv *viciae* A34 con vector vacío pHC60 (A) o pHCrapAS (B) y *R. leguminosarum* bv *viciae* 3841 con vector vacío pHC60 (C) o pHCrapAS (D).

Las imágenes fueron tomadas por CLSM con aumento de 63x y procesadas por el software Bitplane Imaris. Barra blanca: 50 micrometros



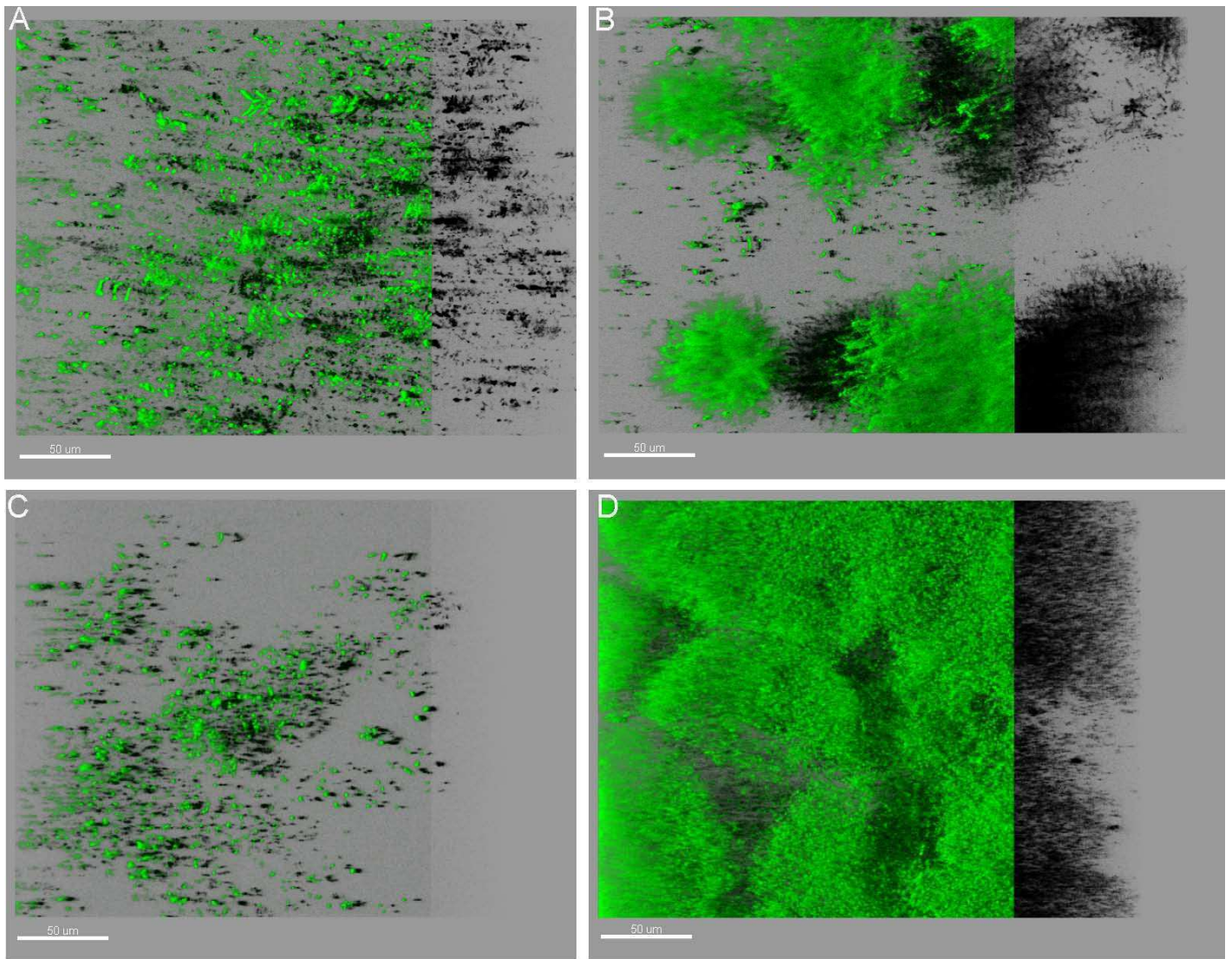


Figura R13. Formación de biofilms en flujo continuo. Cepas silvestres (izq.) o sobreproductoras de RapA1 (der.) fueron cultivadas en celdas de flujo continuo durante 4 días. Todas las cepas fueron inoculadas con volúmenes iguales de inóculos de DO estandarizada. Se utilizaron *R. leguminosarum* bv *viciae* A34 con vector vacío pHC60 (A) o pHCRapAS (B) y *R. leguminosarum* bv *viciae* 3841 con vector vacío pHC60 (C) o pHCRapAS (D).

Las imágenes fueron tomadas por CLSM con aumento de 63x y procesadas por el software Bitplane Imaris. Barra blanca: 50 micrometros

## 5. El efecto de RapA1 es dependiente de la síntesis del EPS

Con el objetivo de evaluar si el efecto de la sobreproducción de RapA1 sobre la formación de biofilms en flujo continuo es dependiente de la síntesis del EPS, se analizó el efecto de la sobreexpresión de RapA1 en el contexto mutante *pssA* (isogénica de A34) a las 24 horas y luego de 4 días en flujo continuo en las mismas condiciones ensayadas en los experimentos anteriores (Y-manitol 11 mM). Como se esperaba, la mutante *pssA* pHCRapAS mostró un comportamiento muy similar a la cepa que expresa cantidades normales de RapA1 (*pssA* pHC60), es decir, tanto la adhesión al soporte como la formación de microcolonias estuvieron muy desfavorecidas (Fig. R14). Esta observación demuestra una vez más la estrecha relación entre RapA1 y el EPS/CPS.

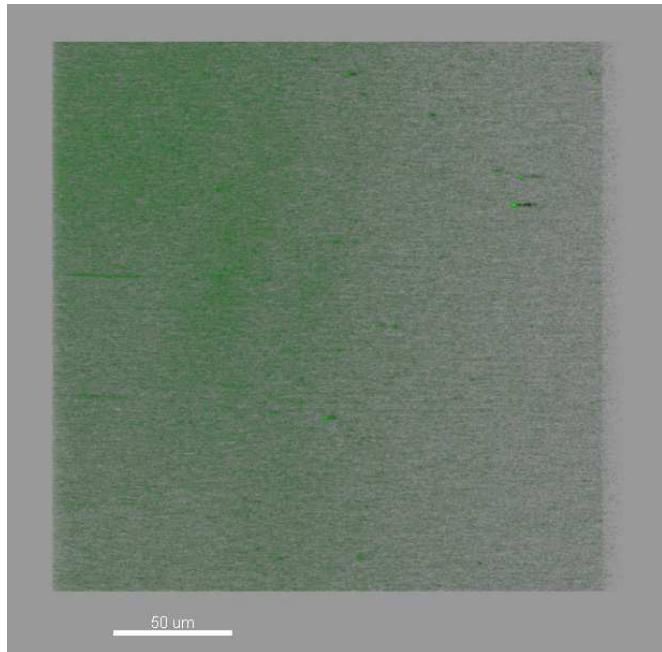


Figura R14. Formación de Biofilm cepa *pssA* pHCRapAS. Bacterias de la cepa *pssA* sobreproductoras de RapA1 cultivadas en celdas de flujo continuo durante 4 días. Las imágenes fueron tomadas por CLSM con aumento de 63x y procesadas por el software Bitplane Imaris. Barra blanca: 50 micrometros

### Conclusiones parciales:

Los resultados presentados en esta parte demuestran que el EPS ácido es crucial para la adhesión inicial estable al soporte y para la formación de microcolonias y de un biofilm robusto en las condiciones restrictivas de flujo continuo. De la misma manera, se mostró el requerimiento de un sistema de secreción tipo I (PrsDE) funcional para la generación de una

biomasa considerable de un biofilm en flujo continuo. Vale aclarar que entre las proteínas secretadas por PrsDE se encuentran las glicanasas  $\beta$ 1,4 (PlyB y PlyA) que clivan el EPS, modulando el largo de las cadenas, y al menos 3-5 proteínas Rap (Introducción, sección 5.c). Por otro lado, la secreción aumentada de RapA1 favoreció notablemente la adhesión y la formación de un biofilm robusto en A34 y 3841, apoyando la idea que la función de RapA1 está muy relacionada a las propiedades de adhesión de la bacteria y/o a la formación de la matriz extracelular. En este sentido, la dependencia de la síntesis del EPS sobre los efectos conferidos por RapA1 en flujo continuo apoya la idea que RapA1 y el EPS están funcionalmente relacionados.

### **CAPITULO 3. Localización de proteínas Rap: factores involucrados**

Como ya se mencionó, RapA1 es de localización unipolar ([51]; este trabajo). Altos niveles de secreción de RapA1 afectan las interacciones estrechas entre bacterias, en especial las interacciones laterales dentro del biofilm, debido a su acumulación sobre toda la superficie de las células, de manera dependiente de la producción de EPS y perdiendo su característica ubicación unipolar. Sin embargo, la localización polar de RapA1 no fue absolutamente dependiente de la síntesis del EPS. Estas observaciones abren preguntas interesantes: i) ¿alguna de las otras proteínas secretadas PrsDE (que hemos propuesto estarían funcionalmente relacionadas) (Introducción, sección 5.c), también se expresan de forma unipolar?, ii) ¿qué otros factores están involucrados en la localización polar y iii) que relación existe entre la localización extracelular de las proteínas secretadas por PrsDE y la producción de la matriz extracelular de un biofilm?. En las próximas secciones se describirán los enfoques que hemos comenzado a realizar para abordar las primeras dos preguntas.

#### **1. Localización de PlyB**

PlyA y PlyB son exportadas por PrsDE y poseen un dominio “Ra” (Introducción, sección 5.d). A diferencia de RapA1, RapA2, RapB y RapC; PlyB posee un único dominio “Ra” en su región C-terminal; sin embargo, se ha observado que para tener actividad de glicanasa, es necesario el contacto de PlyB con la superficie de una bacteria productora de EPS [104]. Para extender el análisis de localización de proteínas con dominios “Ra”, se estudió la localización extracelular de la glicanasa PlyB por inmunofluorescencia de bacterias no fijadas como ya se explicó (Capítulo 1, sección 2.d). La localización de PlyB fue estudiada gracias a la disponibilidad de anticuerpos policlonales anti-PlyB (Abdian y col. en preparación). Estos anticuerpos fueron utilizados para realizar inmunofluorescencias seguidas de observación por CLSM, a partir de células de *R. leguminosarum* cultivadas en medio rico (TY) o medio mínimo (Y). Es importante aclarar que es posible que los anticuerpos también sean capaces de reconocer a la proteína PlyA por la alta similitud que existe entre PlyA y PlyB [50]. De todas maneras, se puede obtener información valiosa en cuanto a una u otra glicanasa.



Se observa que, al igual que RapA1, PlyB se localiza sobre la superficie celular en un polo de la bacteria (Fig. R17). Esta observación sugiere que PlyB presenta un comportamiento semejante a RapA1 y apoya la idea de una relación funcional entre las dos proteínas. Aún no

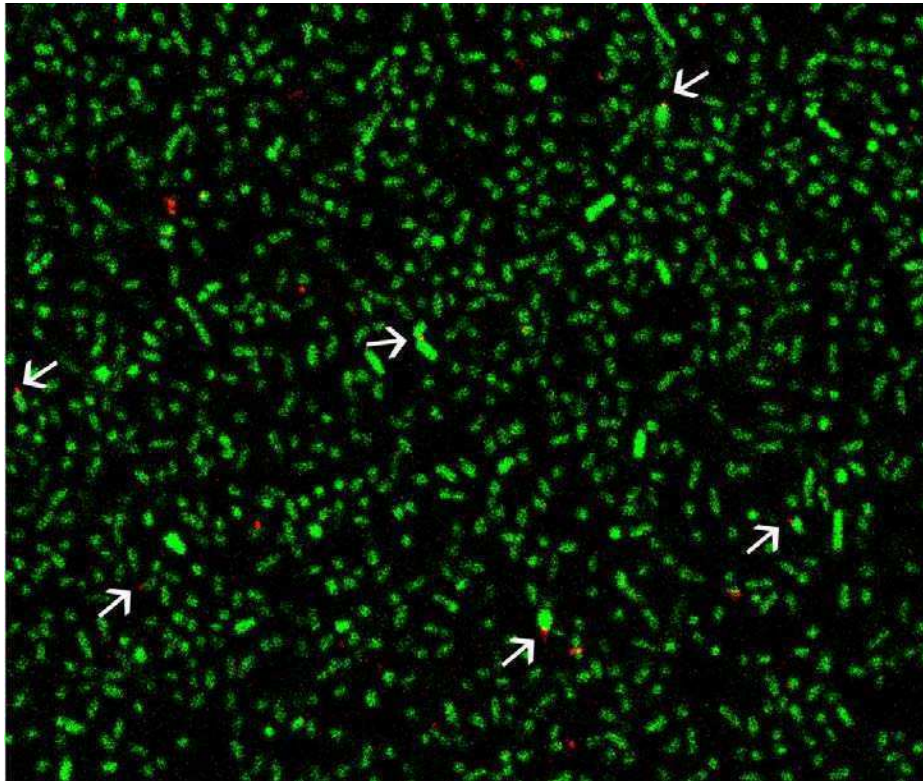


Figura R17. Localización de PlyB por inmunofluorescencia. Se utilizaron anticuerpos anti-PlyB y un anticuerpo secundario acoplado a Cy3, A partir de 1ml de bacterias obtenido de un cultivo en fase exponencial ( $DO_{600}$ : 0,6). La fluorescencia se analizó por CLSM. Las flechas indican las células donde se observa la localización polar de PlyB (Rojo). Las bacterias expresan GFP (verde). Las imágenes son representativas de cuatro experimentos diferentes; observaciones hechas con aumento 100x.

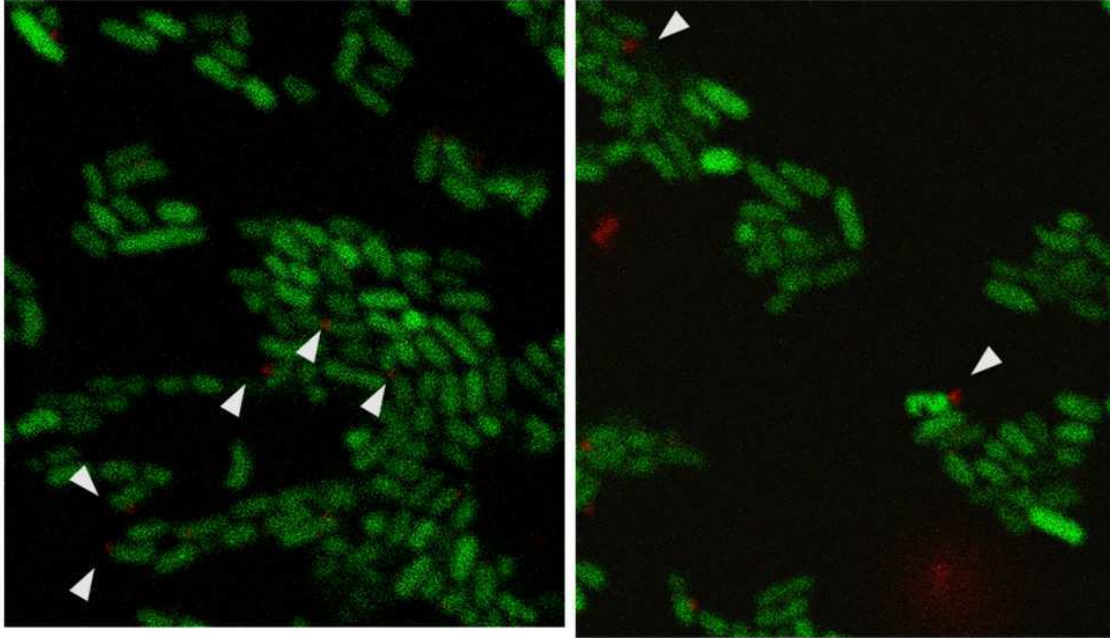
podemos confirmar si se encuentran en el mismo polo y cuál de los polos (el nuevo o el viejo). La posibilidad que varias de las proteínas secretadas por PrsDE estén relacionadas a la modulación de la estructura de la matriz extracelular (hecha de EPS) y varias de ellas se ubiquen en un mismo polo es interesante, sobre todo si se tiene en cuenta que se ha propuesto que las cadenas de EPS emergen de un polo [195,196].

## 2. Rol de PrsDE en la localización de RapA1

La localización polar de RapA1 sobre la superficie de las células en condiciones de expresión endógena estuvo disminuida en mutantes para la producción de EPS; sin embargo, no perdió totalmente su localización unipolar (ver Capítulo 1, sección 2.d, Fig. R8), sugiriendo que existe otro determinante de la localización de RapA1 distinto al EPS. Dado que al menos dos proteínas secretadas por PrsDE se ubican polarmente (RapA1 y PlyB), la pregunta que surge es si esta localización está determinada por la secreción a través de PrsDE. Este sistema o alguno de sus componentes podría ubicarse en un polo de la bacteria. Si este fuera el caso, un escenario posible sería la secreción localizada a través de PrsDE y luego la estabilización sobre la superficie gracias a la interacción de estas proteínas con el EPS.

Para determinar si esto es posible, se analizó la presencia de RapA1 sobre las células por inmunofluorescencia, suplementando exógenamente las proteínas secretadas por la cepa A1077 (*pssA*) conteniendo pHCRapAS a un cultivo de la cepa A412 (*prsD*), mutante en el sistema tipo I, PrsDE. Esta cepa no es capaz de secretar RapA1, glicanasas y otras proteínas [103]. Si la localización polar es dependiente de la secreción por el sistema PrsDE, entonces, el agregado exógeno de proteínas secretadas no permitiría que estas se localicen polarmente y su localización sería difusa en torno a la bacteria. Por el contrario, si la localización de proteínas se da por un mecanismo independiente de su secreción; las proteínas agregadas exógenamente se ubicarían polarmente sin importar el mecanismo por el cual alcanzan la superficie de la bacteria.

La mutante A412 (conteniendo pHC60 que expresa GFP, Materiales y Métodos tabla 1) fue cultivada durante 24 hs, hasta llegar a una DO de 0,75. El sobrenadante se eliminó por centrifugación y las bacterias se resuspendieron en un volumen equivalente (al original) de un sobrenadante de cultivo de la cepa mutante *pssA* A1077 luego de filtrarlo por una membrana de 0,45  $\mu$ M para eliminar todo resto de células. La mutante A1077 libera al medio extracelular altas cantidades de RapA1 (Capítulo 1, sección 2.1) y al no producir EPS permite la fácil recuperación de proteínas por centrifugación. Para evitar problemas de inestabilidad o proteólisis se incubó el sobrenadante con la cepa A412 durante un período no mayor a 4 horas. Luego de suplementar las proteínas extracelulares, se realizó una detección por inmunofluorescencia de RapA1, utilizando el mismo protocolo utilizado anteriormente (Capítulo 1, sección 2.d) y se analizó por CLSM (Fig. R15).



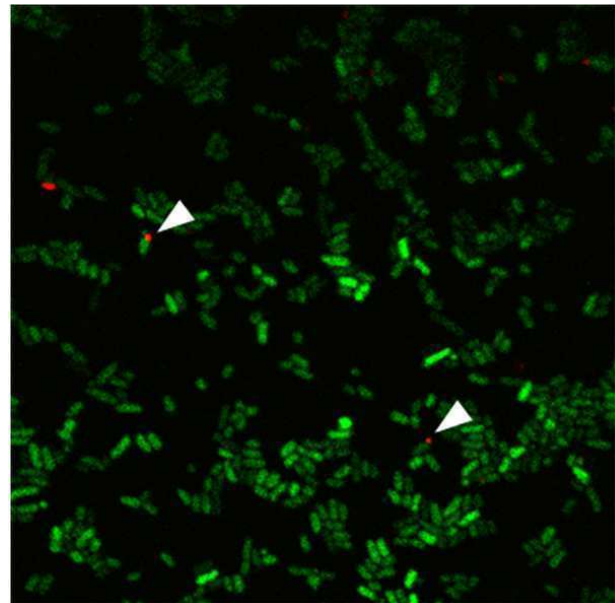
**A34 *prsDE*::Tn5 pFC1(GFP)**

Figura R15. Localización de RapA1 agregada exógenamente.

Localización de RapA1 por inmunofluorescencia cuando se agregó el sobrenadante de *pssA* (A1077) a células de cepa defectiva en *PrsDE*. Se indica con flechas la localización de la señal de RapA1. Imágenes representativas de 3 experimentos, obtenidas por CLSM. Aumento 100x, zoom 2x.

Sólo algunas bacterias (menos del 5%) mostraron señal roja; sin embargo en todos los casos la ubicación de RapA1 agregada exógenamente a mutantes A412 fue unipolar (Fig. R15), lo cual indicaría que la localización no estaría determinada por la secreción.

Dado que la mutante *prsD* (cepa A412) no es capaz de secretar glicanasas, la longitud de las cadenas de EPS que produce es mayor a lo normal [49]; para evitar artificios debido a esto, se realizó el mismo experimento de agregado exógeno de proteínas extracelulares utilizando un sobrenadante de un cultivo de A1077 pHCRapAS en fase exponencial (DO: 0,7) a células de la cepa A550 (*plyA-prsD-pssC-V*) (Materiales y métodos, Tabla 1) que posee una deleción que incluye el locus *plyA prsDE* y *pss* que además del sistema de secreción, anula la síntesis de EPS [104]. Una proporción muy baja de células (1%) de bacterias mostró señal roja en un polo sobre la superficie de la célula (Fig. R16). Este resultado confirma que el EPS no es necesario para la localización polar; además, sugiere fuertemente que esta ubicación no está determinada por PrsDE.



$\Delta plyA-prs-pss::nptII$  pFC1(GFP)

PrsDE<sup>-</sup> EPS<sup>-</sup>

Figura R16. Inmunofluorescencia contra RapA1 en cepa deficiente en EPS y mutante PrsDE. Se agregó con el sobrenadante a cultivos de cepa mutante. Se indica con flechas la localización donde se observe. Imágenes obtenidas por CLSM. Aumento 100x.

### Conclusiones parciales y perspectivas:

PlyB, una de las glicanasas secretadas por PrsDE mostró, al igual que RapA1, localización polar sobre la superficie celular. Por otro lado, los primeros enfoques realizados para explorar el mecanismo de localización polar de RapA1 sugieren fuertemente dicha localización no estaría mediada por su secreción vía PrsDE. En el futuro será de interés explorar si algún otro componente de la superficie (proteico, lipídico o polisacárido) es responsable de la unión inicial de RapA1 (y PlyB) a la superficie de la bacteria.

## **CAPÍTULO 4. Factores que participan en la formación de biofilms *in vitro*: otras observaciones**

### **1. Alteraciones de superficie y formación de microvesículas**

Se ha observado que en condiciones de sobreexpresión RapA1 cubre la superficie celular mostrando una posible saturación de la superficie, lo cual previene las interacciones estrechas entre células. Para analizar si la superficie celular muestra en estas condiciones alteraciones de porosidad o de otro tipo, se observaron, por microscopía electrónica de barrido células de *R. leguminosarum* bv *viciae* A34 que expresan RapA1 en condiciones normales o de sobreexpresión. Para ello, las bacterias fueron crecidas en presencia de cubreobjetos de vidrio borosilicato en medio líquido Ty hasta fase exponencial (DO: 0,7), lavadas y sometidas a un proceso de deshidratación secuencial con etanol y luego sometidas a secado de punto crítico.

Las primeras observaciones obtenidas muestran que las bacterias que sobreexpresan RapA1 (en presencia de pHCRapAS) presentan alteraciones en su superficie semejantes a extrusiones membranosas que no son evidentes en bacterias que contienen el vector vacío (Fig. 18). Las alteraciones de membrana se observan en todos los campos observados en la mayoría de las bacterias; también se observan numerosas vesículas adheridas al vidrio. En la muestra de células silvestres no se observa formación de vesículas ni la presencia de estas en el soporte. Este tipo de alteraciones se ha observado en bacterias capaces de generar vesículas de membrana externa [174], las cuales se ha descrito que participan en la patogénesis [197], adhesión [179] y formación de biofilms [175] aunque también puede darse debido a estrés por acumulación de proteínas [198].

Esta información nos condujo a realizar una preparación de fracción extracelular precipitable por ultracentrifugación (100.000 x g). Se ha demostrado que ciertas estructuras similares a vesículas de membrana producidas por otras especies bacterias sedimentan en estas condiciones. Se obtuvo esta fracción luego de una ultracentrifugación por 4 horas a 100.000 x g de sobrenadantes libres de bacterias provenientes de cultivos en medio Ty de A34 y 3841 que contienen el vector vacío y de A34 pHCRapAS y 3841 pHCRapAS que sobreexpresan RapA1. La fracción de 100.000 x g fue resuspendida en PBS y cantidades equivalentes de cada condición fue analizada por SDS-PAGE. El gel fue teñido con la técnica de tinción por Ag-NH<sub>3</sub> (Fig. R19). El resultado muestra una banda diferencial de peso

molecular correspondiente a RapA1 en las cepas que poseen el vector de sobreexpresión pHCRapAS (flecha) así como otras bandas de peso molecular diferente (diamante) en la cepa

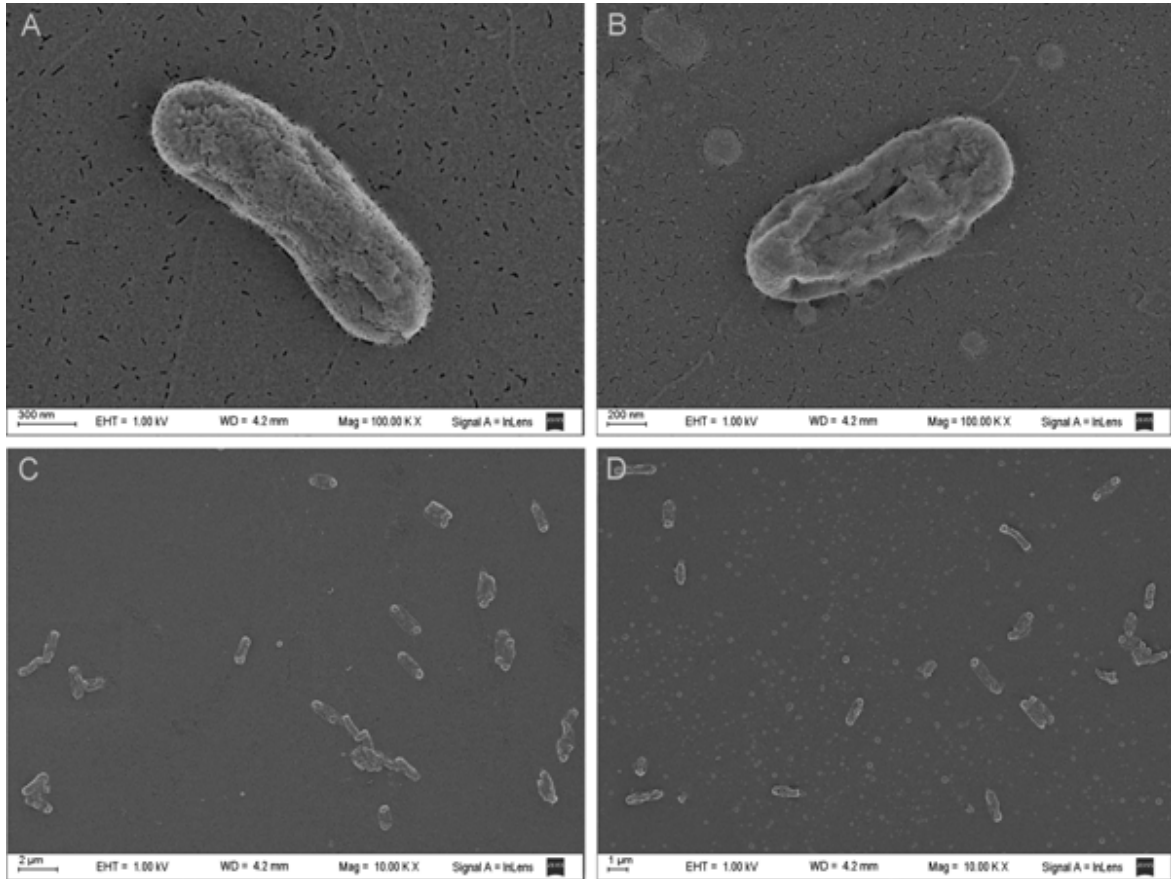


Figura R18. Alteraciones de superficie. Se observó por SEM la superficie de células de *R. leguminosarum* cepa A34 silvestre (A y C) o sobreexpresando RapA1 (B y D). Se observan con magnificación 100000X (A y B) o 10000x (C y D). La formación de vesículas se observa sobre la superficie de la bacteria (B) y en el medio (D).

3841, lo cual podría indicar que la sobreexpresión de RapA1 favorece el reclutamiento de otras proteínas a la fracción subcelular estudiada en esta cepa.

También se observan otras bandas que probablemente correspondan a las formas LPS1 y LPS2 del lipopolisacárido (LPS) [199,200] (Fig. R19), que confirma la presencia de componentes de membrana externa en la fracción estudiada.



Para confirmar si la proteína localizada en la fracción “100.000 x g” es responsable de los fenotipos de adhesión, se realizó un ensayo de adhesión y formación de biofilms en placas

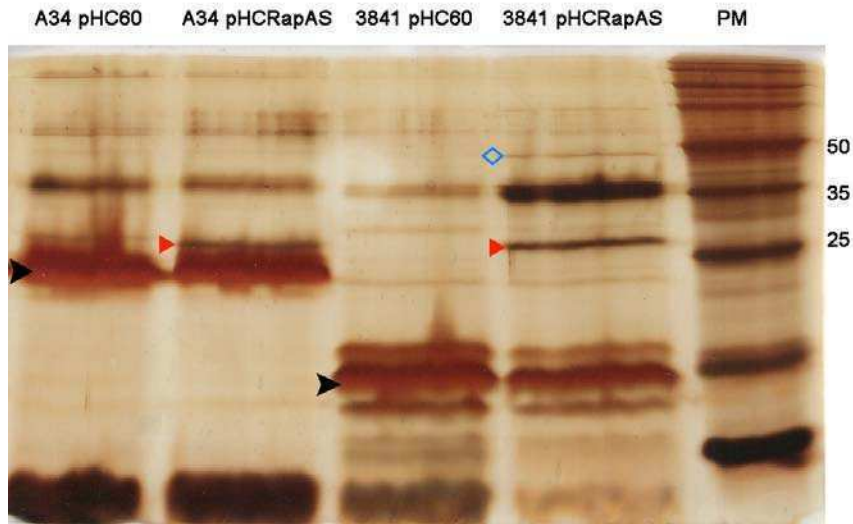


Figura R19. SDS-PAGE de la fracción 100.000 x g obtenida de sobrenadantes de cultivos de cepas silvestres o sobreproductoras de RapA1. Flecha roja indica la banda diferencial de RapA1. Otras proteínas diferenciales se marcan con diamante azul. Las bandas de Lipopolisacárido se indican con flecha negra. A la derecha se indican pesos moleculares para referencia.

de 96 pocillos. Los cultivos de *R. leguminosarum* bv *viciae* A34 y 3841 en medio mínimo fueron incubados en presencia de una alícuota (equivalente a 1 ml del cultivo original) de la fracción de ultracentrifugación proveniente de la misma cepa (control) o de la cepa que sobreexpresa RapA1 (Fig. R20).

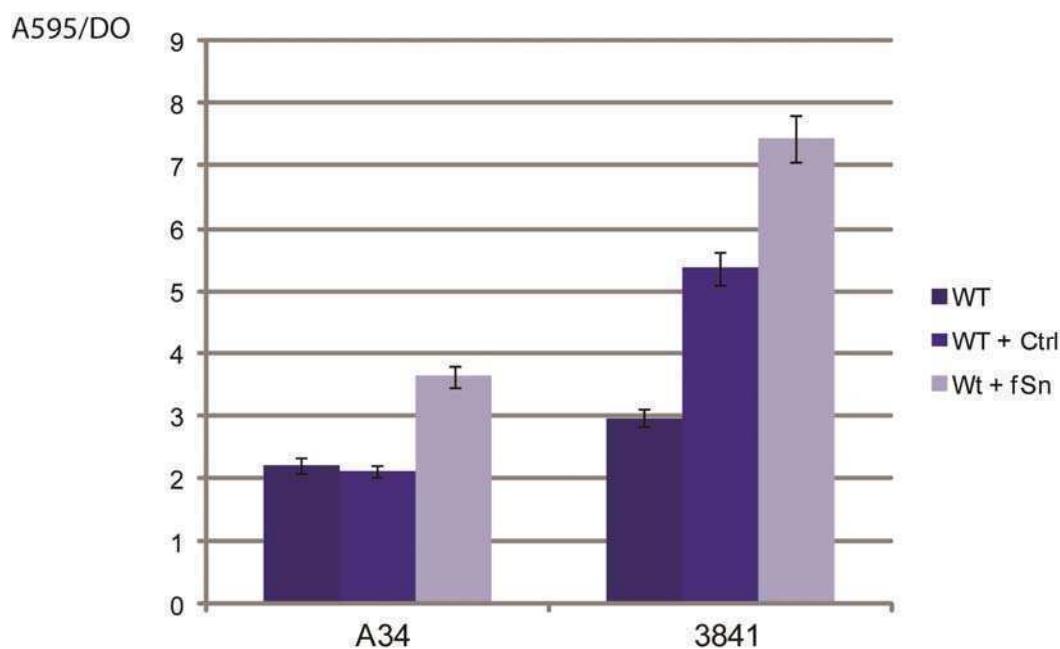


Figura R20. Adhesión a poliestireno y formación de biofilms con el agregado de microvesículas. Cepas silvestres de *R. leguminosarum* bv *viciae* A34 o 3841 fueron crecidas en placas multipocillo de poliestireno en condiciones de medio mínimo (WT), medio mínimo con una alícuota de la fracción 100Kxg de cepa silvestre (WT + ctrl) o medio mínimo suplementado con una alícuota de la fracción 100Kxg de la cepa sobreproductora de RapA1 (WT + fSn). Se indica la fracción adsorbida, teñida con “Cristal Violeta” relativizada a la DO del cultivo. Se muestran experimentos representativos de 3 réplicas con 4 pocillos replicados por condición. Barras de error: desvío estándar.

Se observa que el agregado de la fracción de 100000 x g proveniente de la cepa que sobreexpresa RapA1 fue capaz de generar un aumento en la adhesión y formación de una biomasa de biofilms en ambas cepas silvestres estudiadas. El agregado de la fracción de 100000 x g proveniente de la cepa silvestre también produjo un aumento de adhesión y formación de biofilms en la cepa 3841, aunque ésta fue de menor magnitud; esto puede deberse a la mayor cantidad de material (LPS y proteínas) encontrado en esta fracción de esa cepa en comparación con la cepa A34.

**Perspectivas:** Estas observaciones abren la posibilidad que las estructuras membranosas, observadas por microscopía electrónica, que eventualmente son liberadas al medio extracelular pueden contener RapA1 y favorecer la adhesión de la bacteria a superficies y la formación de un biofilm robusto (capítulo 1, sección b y d). Resultará interesante analizar la identidad de



otras proteínas presentes diferencialmente en la fracción de membrana obtenida de la cepa 3841 pHCRapAS. Se deberá analizar si la sobreproducción de proteínas no relacionadas también genera alteraciones de membrana semejantes.

## 2. Estudios sobre la función de RapB en las interacciones celulares y la formación de un biofilm in vitro

PrsDE secreta varios miembros de la familia Rap, entre ellos, RapA1 que está prácticamente formada por 2 dominios Ra (introducción, sección 5.c y 5.d). Otros miembros de la familia incluyen a RapB, de aproximadamente 30 kDa, pero con un solo dominio Ra, y RapC que posee dos dominios Ra, pero un tamaño mayor (50 KDa) a los otros miembros.

Con el objeto de analizar el rol de otra proteína de la familia Rap, se decidió clonar y sobreexpresar *rapB*. Se amplificó la secuencia codificante de RapB junto con su posible región promotora en un vector con origen capaz de replicar en *Rhizobium* (pBBR). En el mismo vector, a continuación del sitio de clonado (donde se insertó el locus *rapB*) se encuentra la secuencia codificante de una versión inestable de la proteína fluorescente verde (GFPaav, [201]) Esta construcción fue conjugada a *R. leguminosarum* bv *viciae* cepa 3841. Lamentablemente, no se detectó ninguna banda diferencial en el perfil de proteínas extracelulares. Posteriormente se estudió la emisión de fluorescencia usando un lector de placas de ELISA capaz de detectar emisiones fluorescentes (fluorescencia verde 530nm), sin embargo no se detectó emisión de fluorescencia por sobre el nivel de la cepa con vector vacío. Estos resultados sugieren que *rapB* presenta una expresión baja o por debajo del nivel de detección, al menos en las condiciones ensayadas.

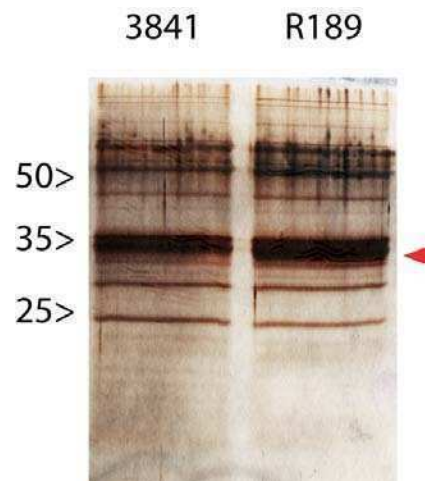


Figura R21. SDS-PAGE cepas sobreproductoras de RapB. Las proteínas extracelulares fueron precipitadas con TCA y analizadas en gel desnaturalizantes SDS-PAGE y reveladas por tinción con plata. 3841, preparación de cepa silvestre *R. leguminosum* bv *viciae* 3841, R189 cepa isogénica conteniendo pHCRapB. Se indica la distancia migrada por los marcadores de peso molecular (izquierda).

También se utilizó el vector pHC60 empleando una estrategia similar a la realizada en la construcción de pHCRapAS. La construcción pHCRapB se generó de acuerdo a lo detallado en Métodos y se transfirió por conjugación a las cepas de *R. leguminosarum* bv *viciae* A34 y 3841. Las cepas que contienen pHCRapB o el vector vacío fueron cultivadas en medio TY por 24 horas con agitación hasta llegar a una DO de 0.75 y las proteínas extracelulares fueron precipitadas con TCA y analizadas mediante SDS-PAGE como se explica en Métodos. Las proteínas se revelaron por tinción con Plata Amoniacal (Fig. R21). Se observa una banda diferencial en la cepa que lleva la construcción pHCRapB respecto de la cepa silvestre; el peso molecular aparente de la banda es ligeramente superior al peso molecular esperado para RapB (30.5kDa), pero la misma movilidad diferente a la esperada se ha observado para RapA1 (Fig. R2).

Las observaciones preliminares obtenidas hasta el momento no muestran evidencias de alteraciones en las propiedades de adhesión de las cepas que producen RapB en más

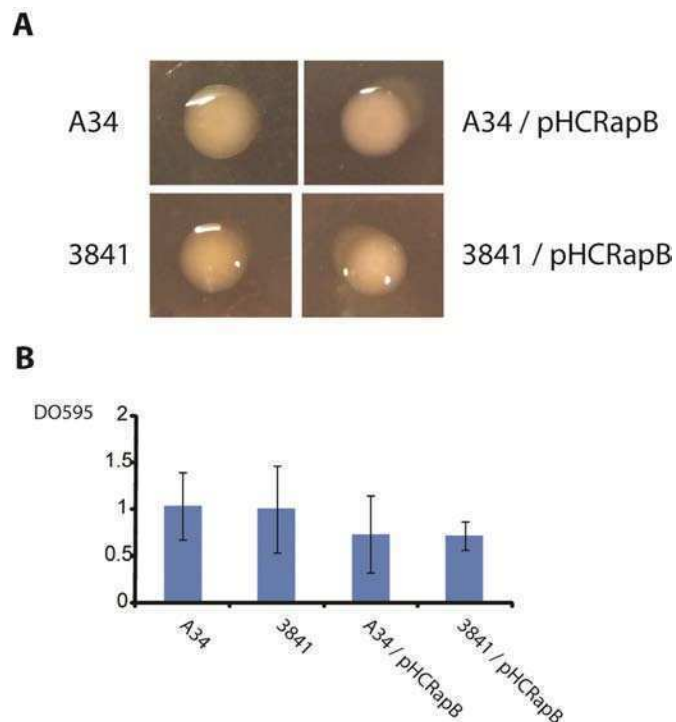


Figura R22. Fenotipos de sobreproducción de RapB. Se observa la morfología de colonias (A) de cepas silvestres de *R. leguminosarum* bv *viciae* A34 o 3841 (izquierda) y de las mismas cepas conteniendo pHCRapB (derecha). La adhesión a poliestireno fue medida por la técnica de tinción con "Cristal Violeta"(B). Se muestra un experimento representativo de 3 repeticiones diferentes con 4 réplicas por cepa. Barras de error: desvío estándar.

cantidad. Por un lado, la mayor secreción de RapB no produjo una adhesión aumentada a la placa de poliestireno (Fig. R22B). De manera consistente con este resultado, cuando se analizó la sedimentación de cultivos líquidos que llevaban la construcción pHCRapB, no se observaron alteraciones en la sedimentación, así como tampoco se observaron alteraciones en la morfología de colonias de las cepas cuando expresan RapB respecto de las cepas silvestres (Fig. R22A).

La cepa 3841 de *R. leguminosarum* posee su genoma completamente secuenciado [5]; mediante el análisis de secuencias y la búsqueda de homólogos se identificó que esa cepa posee sólo un alelo funcional de RapA (*rapA2*, denominado pRL100451), dado que el homólogo a *rapA1* se halla como pseudogen (capítulo 1, sección 1). Analizando la presencia de otros miembros de la familia Rap, se identificaron homólogos a *rapB* (RL3911) y a *rapC* (RL3074). Se generó una cepa mutante en *rapB*. Para ello, se clonó una región de 1.4 kb que incluye la región codificante (0.85 kb) y una región río arriba del inicio (0.5 Kb). A continuación se aprovechó la presencia de sitios de restricción en el inicio de la secuencia codificante de *rapB* para introducir un cassette que interrumpe la secuencia codificante con

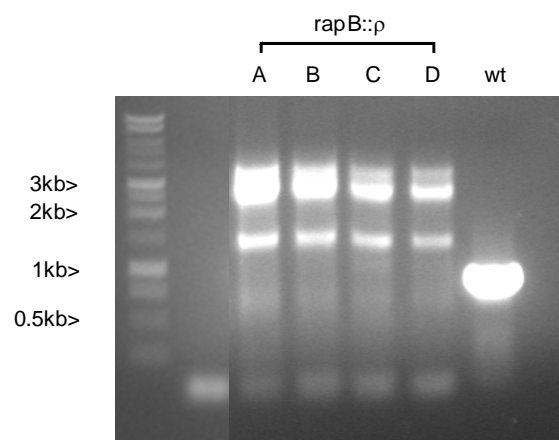


Figura R23. Confirmación de la insercción del cassette  $\Omega$  en la secuencia codificante de *rapB*. Calle 2: control negativo. Calles A-D: clones posibles *rapB::\Omega* . Calle7: control positivo, alelo silvestre.

terminadores y además confiere resistencia a espectinomicina (*cassette*  $\Omega$ ). El constructo *rapB::\Omega* fue subclonado en un “vector suicida” (gentamicina resistente) que no es capaz de replicar en *Rhizobium* y que posee el gen *sacB* para contraseleccionar en presencia de sacarosa [202]; esta construcción fue transferida a *R. leguminosarum* bv *viciae* cepa 3841 por conjugación. Posteriormente se seleccionaron las dobles recombinantes que hayan reemplazado su alelo silvestre de *rapB* por la versión *rapB::\Omega*, en presencia de sacarosa 10%. Se confirmó que fueran sensibles a gentamicina para descartar simples recombinantes. Las mutantes candidatas se confirmaron PCR utilizando oligonucleótidos que amplifican la región genética del locus *rapB*. El resultado de la PCR muestra que el producto de amplificación tiene el tamaño equivalente al locus *rapB* junto con el cassette  $\Omega$  (3 kb) (Fig. R23). A pesar de los esfuerzos hechos, hasta ahora no se han observado fenotipos distintivos de adhesión en

comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, es necesario realizar estudios más profundos para obtener datos concluyentes en este sentido.

**Perspectivas:** Próximamente se analizará la mutante *rapB::Ω* en cuanto a su comportamiento en biofilms estáticos o en flujo continuo por CLSM, para investigar si la proteína RapB está involucrada en algún paso de la formación de un biofilm in vitro, así como en la modulación de la matriz extracelular. También se propone estudiar el efecto de la inactivación de *rapB* como de su secreción aumentada (dirigida por pHCRapB) sobre la adhesión a los pelos radiculares de arveja.

### 3. Estudios preliminares sobre la regulación de *rapA2* y *pssA*

Se ha descrito en bibliografía que el factor regulatorio RosR es capaz de actuar sobre la expresión de genes de síntesis de polisacáridos [108]. Entre los genes regulados por RosR se identificó un *locus* que contiene un ORF que codifica para una proteína propuesta “como homóloga a PlyA”. Sin embargo, esta conclusión se basó en la presencia en PlyA de un dominio “Ra” que luego fue descrito por Ausmees y col (2001). El análisis actual de comparación de secuencias que hemos realizado muestra que dicho ORF corresponde a un homólogo a *rapA1*. Entre las otras regiones susceptibles a regulación por RosR se encuentran genes de síntesis de EPS y el gen *prsD* que codifica para el componente ABC de PrsDE (ver sección 5.d de la Introducción). La posibilidad de una regulación conjunta entre genes de producción de EPS y genes de proteínas que interactúan con el EPS, no es inesperada, especialmente si se tiene en cuenta que muchas proteínas con caminos fisiológicos o biosintéticos relacionados, se encuentran en proximidad genética.

Para analizar la expresión de los genes de adhesinas y de síntesis de EPS, se utilizó la cepa de *R. leguminosarum* bv *viciae* 3841, cuyo genoma ha sido secuenciado y está disponible públicamente (<http://www.genedb.org/Homepage/Rleguminosarum>). Se decidió estudiar el homólogo funcional a *rapA1* (*rapA2*, pRL100451) y *pssA* (RL3752), este último crucial para la síntesis del EPS. Estos genes no se encuentran contiguos a otra región codificante y el espacio intergénico respecto al marco de lectura abierto que se encuentra río arriba, es suficientemente extenso como para albergar una región promotora.

Con la información genómica se diseñaron oligonucleótidos de manera de amplificar una región que comprende toda la zona intergénica precedente a la secuencia codificante de ambos genes y una pequeña región de la secuencia codificante para asegurarnos de incluir todas las secuencias regulatorias (ver Materiales Métodos). La región amplificada de cada gen fue clonada en un vector replicativo en *Rhizobium* (grupo de incompatibilidad pBBR) que luego de su sitio de clonado múltiple, posee la secuencia codificante para una variante de la proteína fluorescente verde (GFPaav) que es inestable en *Rhizobium* [201]. Esto permite monitorear la magnitud de expresión en tiempo real. Las construcciones genéticas *pssAUS-GFP* o *RapA2US-GFP* fueron transferidas a la cepa de *R. leguminosarum* bv *viciae* 3841 por conjugación triparental y seleccionadas por resistencia a gentamicina. Como control de fluorescencia y de expresión basal, también se conjugó a las diferentes cepas un vector compatible con pBBR, derivado del pHc60, que expresa de manera constitutiva una proteína autofluorescente roja (mCherry, [203]).

Para cuantificar la expresión del gen de reporte se midió la fluorescencia en placas de múltiples pocillos en un lector de absorbancia y fluorescencia (DTX 880, Beckman Coulter). Se analizaron réplicas de diferentes condiciones nutricionales, para determinar las condiciones de mayor expresión de *rapA2* y *pssA*. Las variables fueron medio rico (TY) o medio mínimo (Y), en el cual se ensayaron diferentes concentraciones de fuente de carbono (manitol), dado que el manitol favorece la producción de EPS. Además se analizó la expresión génica en medio mínimo con menor concentración de calcio, dado que suele estar asociado a los EPSs y se ha propuesto que se une a RapA1. Las bacterias se cultivaron por 48 horas en medio rico TY hasta llegar a fase estacionaria. Una alícuota de este cultivo se utilizó para inocular el medio de cultivo (a una  $DO_{600}$  inicial de 0.01). Las placas se incubaron a 28° por 24 horas y se midió la intensidad de fluorescencia de GFPaav.

Los resultados muestran que *pssA-gfp* tiene un alto nivel de expresión, independientemente del medio de cultivo (Fig. R24); como control positivo se utilizó la cepa A34 silvestre con el vector pHc60 que expresa constitutivamente una variante estable de GFP. Se observó un aumento de la expresión de *pssA-gfp* en medio mínimo en presencia de manitol 33 mM, es decir, una concentración de manitol 3 veces mayor a la cantidad que se utiliza habitualmente (ver Materiales y Métodos). El cambio en la concentración de calcio no produjo cambios en la expresión de *pssA*.

La expresión de *rapA2-gfp* en las distintas condiciones ensayadas en medio mínimo fue muy similar (Fig. R25) y en valor absoluto inferior a la de *pssA-gfp*. En efecto, a diferencia de *pssA*, no se observaron diferencias a distintas concentraciones de la fuente de carbono. Aunque la expresión de *rapA2-gfp* fue un 40% mayor en medio rico TY, no se puede descartar que esto se deba a un efecto fisiológico general dado que la expresión del control endógeno también aumentó proporcionalmente.

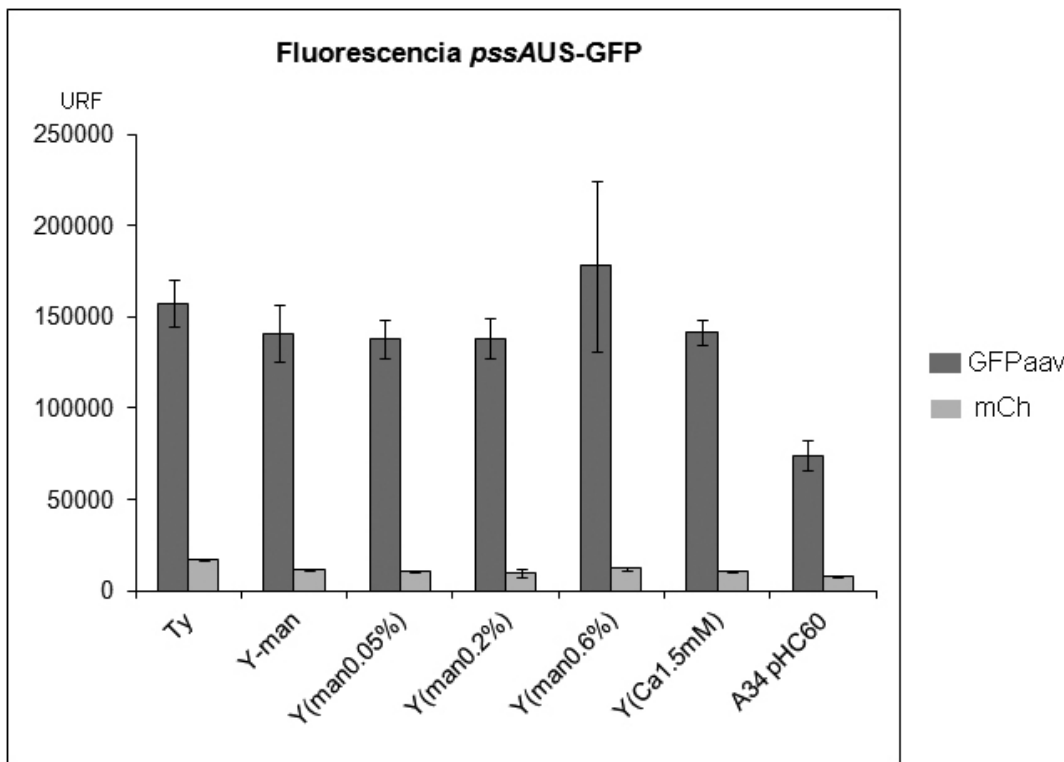


Figura R24. Análisis de expresión de la región reguladora de *pssA*.

Se midió la expresión del gen de reporte en la cepa silvestre A34 que contiene el plásmido *pssAUS-GFP* incubadas en medio rico (TY) o mínimo (Y) con concentraciones variables de manitol (fuente de carbono). El valor de fluorescencia verde (GFPaav) se muestra como columna oscura, y la fluorescencia roja (control interno, mCh) se muestra como columna clara. Se expresan valores en unidades relativas de fluorescencia (URF). Se muestran experimentos representativos de 3 repeticiones. Barras de error: Desvío estándar

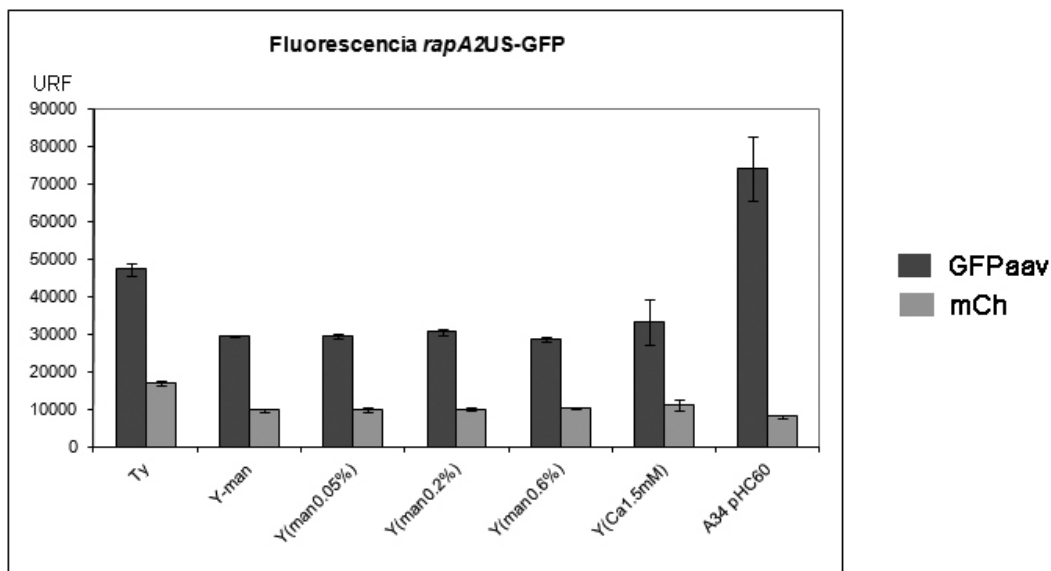


Figura R25. Análisis de expresión de la región reguladora de *rapA2*.

Cepas silvestres conteniendo RA2US-GFP incubadas en medio rico (Ty) o mínimo (Y) con concentraciones variables de Manitol (fuente de Carbono). El valor de fluorescencia verde (GFPaav) se muestra como columna oscura, y la fluorescencia roja (control interno, mCh) se muestra como columna clara. Valores expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF). Se muestran experimentos representativos de 3 repeticiones. Barras de error: Desvío estándar

En resumen, estos resultados muestran que en bacterias planctónicas en cultivos líquidos la expresión promedio de la población de bacterias de *pssA* (y por consiguiente la producción de precursores de síntesis de EPS) es constitutiva. Es posible que otros genes involucrados en la vía biosintética del EPS sean los responsables de modular la producción del EPS (citas). Por otro lado, la expresión de *rapA2-gfp* tampoco presentó variaciones en las distintas condiciones ensayadas.

Se ha propuesto que en un biofilm, habría heterogeneidad fenotípica y una expresión diferencial dentro de la población de bacterias que lo forman [138,211]. Por ejemplo, ciertas subpoblaciones estarían abocadas a producir alguno de los componentes de la matriz extracelular como exopolisacáridos. Otras subpoblaciones expresarían el flagelo para dirigir eventualmente la dispersión a otros nichos [140,212]. La cuantificación de la expresión de genes como se describió en los párrafos anteriores no podría dar cuenta de este escenario. Por lo tanto, se analizó si existe una expresión diferencial tanto temporal como espacial de *pssA-gfp* y de *rapA2-gfp*, analizando

biofilms generados en las cámaras de flujo continuo por CLSM. Como se indicó previamente (sección 3 de este capítulo), la fluorescencia de *rapA2US-GFP* resultó inferior a la observada para *pssA-GFP* y también menor a la cepa control A34 pH60; esto no permitió una observación clara de la inducción de *rapA2*. La intensidad de fluorescencia en la cepa conteniendo *pssA-GFP* permitió la observación de biofilms formados en flujo continuo y la inducción de *pssA* en estas condiciones. Se generaron biofilms en condiciones similares a experiencias previas (capítulo 2, sección 3 y 4), y se observó que una alta proporción de células expresa GFP, sin embargo

para visualizar claramente la forma del biofilm fue necesario incluir observación por luz directa transmitida (Fig. R26). También se observa que la intensidad es variable entre distintas células, a diferencia de la fluorescencia homogénea de las células que llevan pH60 (capítulo 2).

**Perspectivas:** Se utilizarán las construcciones para estudiar la expresión de *pssA* y *rapA2* en el proceso de adhesión a raíz, esto se puede observar por CLSM utilizando semillas

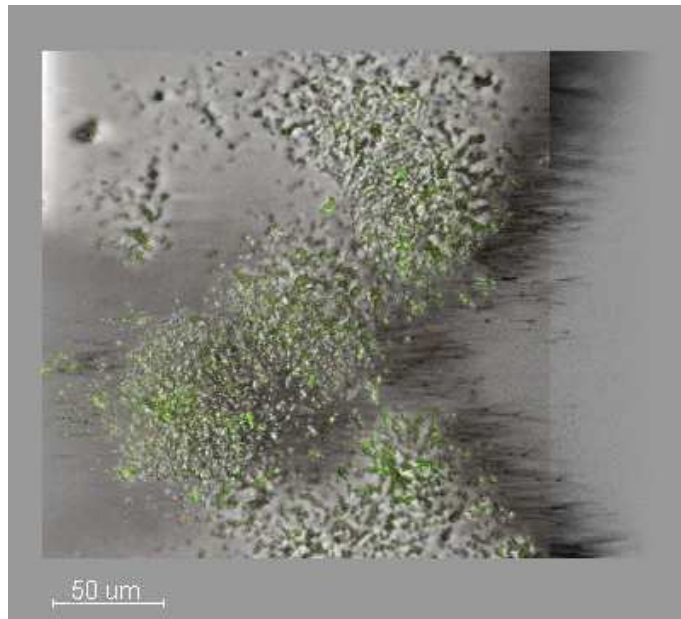


Fig. R26 fluorescencia de *pssA-GFP* en biofilm de flujo continuo. Se utilizó medio mínimo Y con manitol y los biofilms fueron generados durante 4 días de acuerdo a la sección 2. Las imágenes fueron tomadas por CLSM con aumento de 63x y procesadas por el software Bitplane Imaris. Barra blanca: 50 micrómetros



germinadas *in vitro*. Se puede estudiar una biblioteca de mutantes para identificar mutantes que induzcan la expresión de ambos genes para determinar si existe regulación conjunta.

## DISCUSIÓN

La formación de biofilms es un proceso complejo y muy estudiado, con impacto en muchas áreas de interés. Dado que *R. leguminosarum* es un rizobio de interés agronómico y se utiliza como inoculante, es de relevancia estudiar la formación de biofilms como una forma de manejar la persistencia en el suelo de una bacteria beneficiosa para los cultivos (y por lo tanto para el hombre).

El modo de vida en biofilms es una forma muy difundida de lidiar con condiciones de estrés ambientales. *R. leguminosarum* es una bacteria Gram negativa del suelo que puede establecer simbiosis con leguminosas; por lo tanto, la persistencia en el suelo es importante para aumentar la probabilidad de nodulación. Dado que este evento es generalmente clonal, puede actuar como un "depósito genético" de un clon determinado. Después de la senescencia de los nódulos, los bacteroides de un determinado clon se liberan al suelo y están disponibles nuevamente para una nueva infección. *R. leguminosarum* es capaz de sintetizar varios polisacáridos que pueden ayudar a resistir el estrés ambiental tanto en el suelo, como en la rizosfera o sobre las raíces de las plantas y dar forma a la matriz de un biofilm.

### La función de RapA1 y su interacción con el EPS

En este trabajo se estudió el papel de RapA1 en las interacciones celulares y la formación de un biofilm *in vitro*. Hemos confirmado que RapA1 se secreta a través del sistema de secreción PrsDE, incluso cuando se produce en exceso. A pesar que *R. leguminosarum* alberga varios sistemas de secreción de proteínas tipo I, sólo PrsDE fue responsable de la secreción de los substratos proteicos (dependientes de sistemas tipo I), identificados en el medio extracelular de cultivos planctónicos [68].

La secreción a través de PrsDE es otra característica común entre RapA1 y las enzimas de modificación de EPS, PlyA y PlyB, con quienes también comparte el dominio "Ra". Por lo tanto, habíamos planteado que la función de RapA1 podría estar relacionada con la adhesión y la interacción con superficies o la interacción y modulación de la estructura del EPS. El trabajo previo de Ausmees y col. (2001)[51] había propuesto que existiría una interacción entre RapA1 y el EPS *in vitro* en un ensayo de aglutinación de partículas. Hemos presentado nuevas evidencias que demuestran una interacción directa o indirecta entre RapA1 y el EPS ácido, lo

cual se refleja en la falta de fenotipo en las cepas que secretan RapA1 en mayor cantidad en la mutante defectiva en la síntesis del EPS. Confirmamos la asociación entre el EPS y RapA1 por inmunofluorescencia de células vivas utilizando cepas productoras y no productoras de EPS. Otros resultados del laboratorio utilizando enfoques biofísicos y bioquímicos demuestran, además, que el homólogo RapA2 se uniría de manera directa y específica a un hapteno del EPS ácido producido por *R. leguminosarum* (Abdian y col. en preparación).

La sobre-expresión y secreción de RapA1 produce efectos macroscópicos distintivos en los cultivos líquidos o sólidos. Proponemos que estos efectos se presentan como resultado de los efectos microscópicos, es decir, interacciones celulares alteradas o cambios en las propiedades adhesivas de la superficie celular de las bacterias, y es la propagación de estos efectos microscópicos lo que produce el fenotipo observado tanto en cultivos de líquido y medio sólido. Friedman y Kolter (2004)[188] han sugerido que las propiedades de superficie se pueden deducir de la morfología de las colonias alteradas y, en particular, de la unión diferencial a Congo red. En nuestro caso, la reducción en la unión a este colorante no se debería a la reducción o la alteración en la biosíntesis de polisacáridos, sino probablemente a la inaccesibilidad del colorante a los exopolisacáridos, debida a la interacción de RapA1 con el EPS. Cuando se aumenta la secreción de RapA1, esta proteína se ubica alrededor de la bacteria impidiendo agregados compactos lo que disminuye la autoagregación. En el caso de la adhesión a placas de multipocillo, se observa que la sobreexpresión de RapA1 genera una adhesión incrementada en un orden de magnitud. Este efecto no había sido observado previamente [112], probablemente debido a que el análisis había sido realizado en medio rico; mientras que los rizobios forman biofilms mas robustos en medio mínimo .

En este trabajo se ha estudiado la formación de biofilms de *Rhizobium leguminosarum* en un sistema de alta rigurosidad y reproducibilidad como es el sistema de flujo continuo empleado en DTU [191]. Se estudiaron las condiciones nutricionales óptimas para la formación de biofilms en este sistema y se observó que el medio rico desfavorece la adhesión y formación de biofilms. Por el contrario, el medio mínimo Y [204] resultó óptimo y se desarrollaron biofilms maduros y robustos; este resultado refuerza los estudios hechos por nuestro grupo hasta la fecha [103]. Si bien se ha descrito la necesidad de contar con un sistema de secreción funcional PrsDE y la importancia del EPS para la formación de biofilms típicos en forma estática, este estudio muestra que las cepas mutantes *prsD* o *pssA*, están severamente afectadas en la capacidad de adherirse y crecer en biofilms en condiciones de flujo continuo, lo cual confirma el requerimiento tanto de la síntesis del EPS como de la

secreción de proteínas a través del sistema PrsDE.

Se observó que la sobreexpresión de RapA1 mejora la adhesión a distintas superficies, no sólo a una superficie hidrofóbica como poliestireno sino también la adhesión al vidrio de la celda de flujo continuo. Además de observarse un mayor número inicial de bacterias adheridas a la superficie; también la formación de microcolonias y agregados de mayor tamaño en etapas posteriores estuvo notablemente favorecida en condiciones de flujo continuo. Estos efectos fueron dependientes de la síntesis del EPS. Estas observaciones muestran que RapA1 tiene un rol en la formación de biofilms probablemente en la modulación de la matriz extracelular por su interacción con el EPS.

El exopolisacárido ácido posee la misma unidad repetitiva que el polisacárido capsular [64,66,205] y la interrupción de algunos genes altera la producción de ambos polisacáridos [54,55]. Se ha propuesto que la diferencia entre ambos podría ser el grado de sustitución por O-acetato o piruvato [64,66,67]. Una adhesina que tiene afinidad por el exopolisacárido ácido, puede mostrar también afinidad por el CPS, el cual permanece unido a la superficie de la bacteria. Por lo tanto, RapA1 puede unirse al EPS que es secretado al medio extracelular ayudando a la formación de una matriz compleja con interacciones EPS-proteína y la unión de RapA1 al CPS puede ayudar a generar mayor adhesividad en la superficie de la bacteria.

Las glicanasas PlyA y PlyB también presentan un dominio Ra. Como ya se mencionó en resultados (sección 3.1), estas glicanasas son activas sólo sobre la superficie de bacterias productoras de EPS [104]. Se puede plantear un modelo en el que RapA1 (y quizás otras Rap(s), incluidas las glicanasas, se unen al polisacárido que emerge por un polo, cumpliendo distintas funciones. RapA1 podría actuar como “puente” entre moléculas de EPS, ayudando a generar una matriz entrecruzada. RapA1 también podría asistir a las glicanasas u otras proteínas secretadas por PrsDE a cumplir su función bioquímica.

### **Localización de RapA1 y PlyB**

La presencia de RapA1 en el polo de la cepa *pssA*, si bien se observa en una proporción baja de células respecto a la cepa silvestre, sugiere que hay estructuras todavía presentes que permiten la localización de RapA1 sobre un polo de la bacteria.

La evidencia experimental sugiere que PlyB, también secretada por PrsDE presenta, al igual que RapA1 localización unipolar. Por lo tanto, los estudios sobre el mecanismo de

localización de RapA1 podrían tomarse como modelo para comprender la secreción y localización de otras proteínas de esta familia. La diferencia entre unipolaridad en condiciones silvestres y deslocalización en condiciones de sobreexpresión de RapA1 sugieren que existe algún factor complementario a la ubicación del EPS/CPS para dirigir la localización de RapA1, puesto que el exopolisacárido (como CPS o como EPS) se encuentra en torno a la bacteria sin localización preferencial.

Existen algunas hipótesis que podrían explicar la localización unipolar de RapA1 y también la localización difusa en condiciones de sobreexpresión. En este trabajo de tesis se intentó discernir si la secreción a través de PrsDE causaba la localización polar. Una de las hipótesis consideraba la posibilidad que PrsDE esté localizado polarmente y luego de la secreción, las proteínas con dominios Ra quedarían directamente ancladas al EPS en el punto de salida de la célula (el polo). Sin embargo, utilizando mutantes en el sistema de secreción se ha observado que al agregar RapA1 exógenamente, ésta mantiene su localización polar. Otra de las hipótesis que se consideraron tomó en cuenta que el EPS es probablemente sintetizado o secretado polarmente a través de su propia maquinaria. En este caso, las proteínas con afinidad por el EPS, se localizarían sobre el EPS naciente para modular su longitud, como es el caso de las glicanasas, o para modular su estructura, como podría ser el caso de RapA1. Sin embargo, el agregado exógeno del sobrenadante de una cepa productora de RapA1 a células de una mutante doble defectiva tanto en el sistema de secreción PrsDE como en el EPS/CPS, mostró que RapA1 aún en este contexto genético se localiza polarmente. Esto es coherente con la observación que RapA1 se localiza en un polo en células deficientes para la producción de EPS. Dado que la mutación *pssA* afecta el primer paso en la ruta biosintética del EPS y también afecta seriamente la producción del CPS [55], debemos descartar que se produzca algún precursor o EPS residual o abortivo. La localización unipolar en ausencia de PrsDE y de EPS/CPS sugiere que existiría otro determinante para la localización de RapA1 sobre el polo de la bacteria.

Como ya se describió, *R. leguminosarum* produce un glucomanano de localización polar que es importante para el contacto con el pelo radicular [54]. Surge entonces la hipótesis que el glucomanano podría estar relacionado con la localización unipolar de RapA1. Sin embargo, la composición del glucomanano es químicamente distinta al EPS en su composición sacarídica y además, a diferencia del EPS/CPS, es neutro. En efecto, mientras el EPS/CPS tiene residuos de glucosa, galactosa y ácido glucurónico, que le confiere carga negativa, el glucomanano es un polisacárido neutro y presenta una alta proporción de manosa en su

composición y en igual o menor medida glucosa y una fracción pequeña de galactosa y ramnosa. Además, la capacidad de RapA1 de unir  $\text{Ca}^{2+}$  es otra evidencia de su posible interacción con polisacáridos acídicos. De todas maneras, resultará interesante evaluar si existe alguna dependencia de la localización unipolar de RapA1 con la presencia del glucomanano y/o determinar si RapA1 se ubica en el mismo polo que éste.

Desde la caracterización inicial de RapA1 [51], una de las características salientes es su localización unipolar. Es interesante la observación que diversas funciones en bacterias cercanas filogenéticamente a *R. leguminosarum*, como *A. tumefaciens* y *S. meliloti*, también tienen características polares [206]. Las primeras investigaciones de la polaridad en *R. leguminosarum* fueron realizadas en relación a la capacidad de unir lectina de trébol [195] demostrando la polaridad en la remodelación dinámica de polisacáridos de superficie y en la capacidad de unir proteínas exudadas por la raíz de trébol. Investigaciones posteriores revelan la producción de la cápsula como un fenómeno que se inicia en un polo de la bacteria y luego se extiende al resto de la superficie celular [196]. El estudio de la localización de proteínas involucradas en la polimerización o exportación de EPS/CPS podría aportar valiosa información en cuanto a la relación de este camino biosintético y las proteínas Rap.

La sobreproducción de RapA1 produjo alteraciones en la superficie de la bacteria, observables por microscopía electrónica de barrido. Estas alteraciones producirían vesículas de membrana, la cuales formarían la fracción de 100000 x g purificada y analizada. El contenido de LPS presente en esta fracción confirma la presencia de membranas tanto en la cepa silvestre como en la cepa que sobreexpresa RapA1. Analizando la fracción obtenida, se observa la presencia de la banda diferencial de RapA1, junto a otras proteínas ausentes en la fracción de la cepa silvestre. Esto sugiere que la sobreexpresión de RapA1 modifica la localización de otras proteínas de superficie, ya sea por interacción directa, o como consecuencia de la alteración de otras estructuras de superficie (EPS, LPS o algún complejo proteico). Resulta interesante identificar la proteína localizada diferencialmente en la fracción de 100000 x g. Esto contribuiría a determinar si es posible que RapA1 forme complejos con otras proteínas y a comprender el mecanismo de adhesión y localización polar.

El origen filogenético de la familia de genes *rap* resulta interesante; su distribución limitada a dos especies cercanas filogenéticamente sugiere que su aparición fue un evento reciente evolutivamente. Si bien no se han hecho estudios evolutivos, se puede plantear que la

familia de Raps podría haberse generado a partir de un evento de duplicación de glicanasas como PlyA, las cuales tienen el dominio “Ra” [50], lo que sugiere una aparición evolutiva más temprana que las Raps. La estructura de RapC, que posee dos dominios “Ra” similares a RapA1 y RapA2, pero tiene una región C-terminal extendida sugiere una aparición de *rapC* cercana a *rapA1* y *rapA2*. Por otro lado, RapB posee divergencias en la secuencia de su único dominio “Ra”, además de una región con baja similitud a una endoglicanasa de *Bacillus* [51], lo cual sugiere una aparición independiente y posiblemente previa a los demás miembros de la familia.

Para establecer un modelo sobre la interacción entre la síntesis de EPS/CPS y la secreción y localización de RapA1 (y PlyB) se debe tener en cuenta la posible síntesis y secreción polar del EPS/CPS ácido [196], la cual podría ser dependiente de la etapa de crecimiento. Esta síntesis genera una “cápsula” asimétrica que se origina en un polo y luego madura hacia el resto de la superficie. Esto plantea la posibilidad que RapA1 interactúe con cierto determinante del EPS/CPS que se genera en una etapa particular; sin embargo, nuestro estudios de inmunofluorescencia mostraron que la localización polar se mantiene en igual proporción en cultivos “jóvenes” (baja DO) y cultivos “saturados” (DO mayor o igual a 1) (resultados no mostrados). El mismo efecto fue observado previamente, aunque la capacidad de aglutinación de bacterias por RapA1 fue mayor en etapas exponenciales de cultivo, posiblemente por menor saturación de receptores de RapA1 [51].

La posibilidad que se refuerza ante esta evidencia, es que la producción de EPS/CPS sea constantemente polar y RapA1 tenga afinidad por algún determinante presente en el polisacárido recientemente sintetizado. Simultáneamente, el largo de cadena del EPS/CPS puede ser modulado por la acción de diferentes enzimas, como las glicanasas PlyA o PlyB (las cuales también tendrían localización polar, además de poseer un dominio Ra) y otras enzimas modificadoras. Se ha reportado que el nivel de sustituciones no glicosídicas (piruvato y acetato) varía de acuerdo a la etapa de crecimiento en que se analiza el cultivo [196], lo cual contribuye a la maduración dinámica del EPS/CPS y podría contribuir a la afinidad diferencial de RapA1 por el EPS/CPS recientemente sintetizado. No se puede descartar que las proteínas RapA cumplan algún rol en la actividad de las enzimas moduladoras del tamaño de las cadenas del EPS/CPS, que como se ha descrito es importante para la formación de un biofilm típico [103].

Se puede plantear un modelo de producción de capsula en *R. leguminosarum* en el que la síntesis y secreción de EPS/CPS se produce de manera polar (de acuerdo a las evidencias de Dazzo y col 1982 y Sherwood y col.1984[195,196]) y éste va migrando sobre la superficie hacia el otro polo. Mientras se produce esta migración o de manera coordinada con la síntesis y secreción, ocurre la maduración y modificación del polisacárido, probablemente por acción de glicanasas (como PlyA y PlyB), acetilasas y succinil- o piruvil-transferasas. Mientras se produce la migración y maduración, se produciría la liberación del polisacárido como EPS o éste permanecería unido como CPS (posiblemente esto sea determinado por el grado y tipo de sustituciones no sacarídicas del polisacárido) (Figura D1). La localización de proteínas como RapA1 que se unen al EPS/CPS podría estar determinada por la afinidad al polisacárido recientemente sintetizado. Esta interacción contribuiría al correcto funcionamiento de enzimas modificadoras del EPS/CPS en regiones particulares, optimizando el uso de enzimas y la liberación de EPS y formación de la cápsula. El factor determinante de la ubicación y actividad de enzimas como PlyA y PlyB podría ser el grado de modificación de las unidades repetitivas por sustituyentes acetato o piruvato. Estas enzimas cuentan con un dominio Ra en su estructura que le permitiría interactuar con el EPS/CPS y por extensión se puede esperar que otras proteínas Rap tengan afinidad por los mismos determinantes que las glicanasas. Este modelo podría explicar la localización de RapA1, así como también la localización de PlyB, y es consistente con hallazgos previos de localización polar de síntesis de EPS/CPS [195,196], actividad sobre la superficie de glicanasas [207,208], actividad diferencial de glicanasas sobre exopolisacáridos con sustituyentes no sacarídicos [209] y la actividad de glicanasas sobre cadenas nacientes de exopolisacáridos [104,210].

Si bien *rapA1* parece tener un nivel de expresión bajo ([51], esta tesis), hay indicios de regulación de su expresión. Se ha sugerido que *rapA1* podría formar parte del regulón RosR [108]. En este trabajo se analizó la expresión de *rapA2* de *R. leguminosarum* bv *viciae* 3841 en paralelo con la expresión de *pssA*, para determinar si existía una respuesta similar a las condiciones nutricionales que favorecen el desarrollo de biofilms. Nos interesa también estudiar la expresión y regulación de otros genes *rap* (como *rapB*) y su relación con la regulación de la síntesis del EPS/CPS y comprobar si efectivamente RosR es un regulador de las proteínas Rap. Utilizando fusiones a GFP (variante inestable) podrán realizarse ensayos de mayor complejidad como la evaluación temporal o espacial de los genes requeridos para la formación de un biofilm in vitro; se realizaron ensayos de manera preliminar (Fig. R26),



observando la expresión de *pssA*. También será de interés la visualización de bacterias adheridas a raíz para observar si la inducción de *rapA2* es condicional al contacto con la raíz.

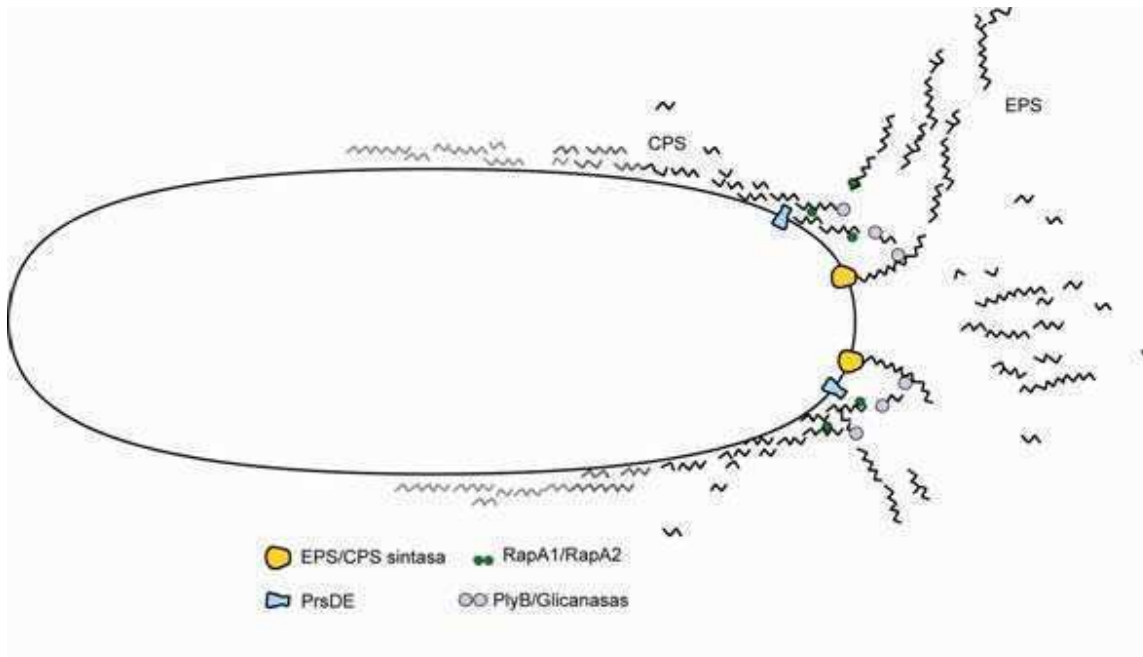


Figura D1. Modelo de formación de capsula de *R. leguminosarum*.  
Se observa la posición propuesta para la maquinaria de síntesis y modificación del EPS.

## Materiales y Métodos

### Cepas y plásmidos

Las cepas de *Escherichia coli* y *Rhizobium leguminosarum*, así como los plásmidos utilizados, se detallan a continuación en la Tabla 1.

Cepa o Plásmido	Genotipo y características relevantes	Origen
<b>Plásmidos</b>		
pHC60	Origen derivado RK2 (grupo Inc JP2), plásmido bajo número de copias, GFP bajo promotor constitutivo, Tet <sup>R</sup>	Cheng & Walker (1998) [24]
pHCmCH	Origen derivado RK2 (grupo Inc JP2), plásmido bajo número de copias mRFP bajo promotor constitutivo, Tet <sup>R</sup>	Este trabajo
pHCRapAS	pHC60 con la secuencia codificante de rapA1 clonada río arriba de la GFP, Tet <sup>R</sup>	Mongiardini et al. (2008)[4]
pHCRapB	pHC60 con la secuencia codificante de rapB clonada (sin GFP), Tet <sup>R</sup>	Esta Tesis
pRU1099	Derivado de pOT1, origen pBBR, GFPaav luego del MCS, Gm <sup>R</sup>	Addgene Inc.
pJQ200	Origen P15A, region mob RP4, sacB de <i>B. subtilis</i> , Gm <sup>R</sup>	Quandt et al. (1993) [25]
pFC178	pRU1099 con la región pssAUS clonada en sitios SphI y SpeI	Este trabajo
pFC179	pRU1099 con la región RA2US clonada en sitios BamHI y XbaI	Este trabajo
pFC223	Derivado de pRU1099, Región de 1.4Kb conteniendo rapB junto con su region río arriba clonada en sitios Sall/SpeI, Gm <sup>R</sup>	Este trabajo
pFC204	Derivado de pJQ200, Región de 1.4Kb conteniendo rapB junto con su region upstream interrumpida por cassette $\Omega$ en el nucleótido 620, clonada en sitios Xho/Xba, Gm <sup>R</sup>	Este trabajo

### Cepas de *Escherichia coli*

DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-mk+ phoA supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1.	New England Biolabs
HB101(pRK600)	Cepa helper para conjugación triparental, tra+.	
S17-1	Cepa para conjugación biparental en <i>R. leguminosarum</i>	Dr. Anibal Lodeiro

### Cepas de *Rhizobium leguminosarum*

A34	Cepa silvestre <i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i> (derivado de la cepa 8401 llevando plásmido simbiótico pRL1JI)(St <sup>R</sup> )	Downie et al. (1983) [26]
3841	Cepa silvestre <i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i> (derivado Streptomycina-resistente de la cepa 300) (St <sup>R</sup> )	Johnston et al. (1975) [27]
R200	Cepa silvestre <i>R. leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i> (derivado streptomycina-resistente de la cepa 2046) (St <sup>R</sup> )	Ausmees et al. (2001)[2]
A412	Derivado A34, <i>prsD</i> ::Tn5 (Km <sup>R</sup> ); mutante Sistema de Secrecion tipo I	Finnie et al. (1997) [28]
A1077	derivado A34, <i>pssA</i> ::Tn5 (Km <sup>R</sup> ); mutante EPS-deficiente	Russo et al. (2006) [7]
Z10	derivado A34, <i>rapA1</i> :: $\Omega$ (Sp <sup>R</sup> ); gen rapA1 interrumpido por cassette Omega	Russo et al. (2006) [7]
A550	A34 $\Delta$ plyA-prs-pssC-V::npt II; Km <sup>R</sup>	Zorreguieta et al. (2000) [14]
Z33	derivado 3841, <i>rapB</i> :: $\Omega$ (Sp <sup>R</sup> )	Este trabajo

---

### Medios y condiciones de cultivo

*E. coli* fue cultivada en medio Luria-Bertani (LB) durante 16 a 24 hs y *R. leguminosarum* en medio rico TY [6] o medio mínimo Y [29], se incubó durante 24 a 48 hs, y en todos los casos se empleó en los medios sólidos 1,7% (p/v) de agar. En el caso de los cultivos líquidos, las células fueron cultivadas con agitación (200 rpm/min) a 37° C para *E. coli* o a 28° para *R. leguminosarum*. Se utilizaron antibióticos en

las concentraciones de trabajo según la Tabla 2. Cuando se agregó Congo Red a las placas de medio sólido su concentración final fue 40 µg/ml y en el caso de Coomassie Blue, se utilizó 20 µg/ml de concentración final.

### Medios de cultivo

⊕ <b>LB</b>	gramos por litro de medio
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
(Agar	17 g)

⊕ <b>TY</b>	gramos por litro de medio
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,87 g
(Agar	17 g)

### ⊕ **Medio Mínimo Y**

1) Se preparó el siguiente *stock* de sales:

	gramos cada 1000 ml
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.1 g
MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	0.01 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> •5H <sub>2</sub> O	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	7.5 g

- 2) Se preparó el “medio sales” 1X a partir de cada *stock* en agua milliQ.
- 3) *Se fraccionó en volumen necesario.*
- 4) Se agregó agar (para medio sólido): 3 g por cada 200 ml de medio.
- 5) *Se autoclavó.*
- 6) *En el momento de usar, se agregaron los siguientes suplementos que son esterilizados por separado:*

Suplemento	en 1 litro de medio	
Manitol 10% (p/v)	4ml	
Glutamato 4.4% (p/v)	5ml	
Vitaminas * (en 50mM Buffer fosfato pH 7)	1 ml	
*Vitaminas:	biotina	0.01 µg/ml
	tiamina	0.2 µg/ml
	D/L ácido pantoténico	0.04 µg/ml
(Esterilizadas por filtración, <i>millipore</i> 0.22 µm).		

## Antibióticos

Tabla 2: drogas y concentraciones empleadas

Antibiótico	Solución Madre	Concentración final	
		<i>E. coli</i>	<i>R. leguminosarum</i>
	mg/ml	µg/ml	µg/ml
Ampicilina	200 (H <sub>2</sub> O)	400	10
Gentamicina	20 (H <sub>2</sub> O)	20	5
Kanamicina	50 (H <sub>2</sub> O)	50	25
Espectinomicina	100 (H <sub>2</sub> O)	200	50
Estreptomina	200 (H <sub>2</sub> O)	400	400
Tetraciclina	5 (70% Etanol)	10	-

## Conservación de cepas

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas fue realizada por congelamiento rápido de cultivos en fase logarítmica tardía, suplididos con glicerol estéril a una concentración final de 20% (v/v) en criotubos conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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

En todos los casos las reacciones de PCR fueron realizadas en microtubos de pared delgada de 0.2 ml. La composición de la mezcla de reacción por tubo fue la siguiente:

<i>Buffer</i> 10X libre de $\text{Mg}^{++}$	5 $\mu\text{l}$
$\text{MgCl}_2$ (50 mM)	*
dNTPs (40 mM)	1 $\mu\text{l}$
<i>Primer</i> 1* (10 $\mu\text{M}$ )	2.5 $\mu\text{l}$
<i>Primer</i> 2 * (10 $\mu\text{M}$ )	2.5 $\mu\text{l}$
<i>Taq/pfu</i> polimerasa	0.5 $\mu\text{l}$
ADN molde*	1- 6 $\mu\text{l}$
<u><math>\text{H}_2\text{O}</math> (milliQ)</u>	<u>para llevar a volumen</u>
Vol. final	50 $\mu\text{l}$

\* Variaron de acuerdo a la reacción.

## Oligonucleótidos

Las secuencias de todos los *primers* empleados se detallan a continuación en la tabla 3.

---

Tabla 3. Lista de oligos utilizados en esta tesis

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Origen</b>
<b>PssAUSFw1</b>	CGGCACAATCCTTTGCA	Esta tesis
<b>PssAUSRv1</b>	GCACTTAGGTCTTGGA	Esta tesis
<b>pssDEUSfw</b>	TTGATATTGTTTACGCAGG	Esta tesis
<b>pssDEUSRv</b>	CATAAACAGGCATCTCCTA	Esta tesis
<b>RapBUSFw1</b>	CTCGAGGGAAAATCTCACCAGGGATC	Esta tesis
<b>RapBUSRv1</b>	TCTAGATGCCATTTCTACCTCCCCTG	Esta tesis
<b>RA2USFw</b>	GGATCCGCATTTTCGAGTTCTCCTTGT	Esta tesis
<b>RA2USRv</b>	TCTAGAGCGAAGCCATTGCACTCTCC	Esta tesis
<b>GFPseqUS</b>	CCATCTAATTCAACAAGAATTGGGACAAC	Addgene
<b>RapBCDSFw1</b>	GGATCCAGAAATGGCAAACCACAAGC	Esta tesis
<b>RapBCDSRv1</b>	TCTAGACCTTTCCCCCTTCGTCAAAC	Esta tesis
<b>RA2CDSFw</b>	GGATCCCAATGGCTTCGCCGATACAT	Esta tesis
<b>RA2CDSRv</b>	TCTAGATGATCAAACGAGAGCGTCGG	Esta tesis
<b>RA1CDSFw</b>	GGATCCTCCATGACAGTGCTTGCA	Esta tesis
<b>RA1CDSRv</b>	TCTAGAATGGCCGGAGCTGACGTA	Esta tesis

### **Colony PCR**

Se empleó como molde ADN total proveniente de colonias bacterianas, que fue preparado de la siguiente manera: se emplearon escarbadienes estériles para picar colonias de los clones de interés; una punta de escarbadienes de bacterias fue resuspendida en 50 µl de agua milliQ estéril. Esta suspensión fue sometida a 94° C durante 5 min, luego fue centrifugada a 10000 rpm por 30 seg. y 5 µl del sobrenadante fueron utilizados en la reacción de amplificación (de la forma antes descrita).

### **Ligación en pGEMT-easy**

Ciertas polimerasas termoestables (usadas frecuentemente en PCR) agregan al extremo 3' de los fragmentos amplificados una deoxiadenosina (A) no apareada. Esta característica es aprovechada por

los sistemas de vectores pGEM-T<sup>®</sup> y pGEM-Teasy<sup>®</sup>, que poseen una deoxitimidina (T) no apareada en cada uno de sus extremos 3', proporcionando un extremo cohesivo compatible. Además, la base extra incorporada al vector lineal impide el religado del mismo, elevando la eficiencia de ligación vector-inserto.

Todos los amplicones fueron clonados en el vector pGEM-Teasy<sup>®</sup>, usando una relación molar inserto:vector 3:1, en la siguiente reacción de ligación:

---

2X Rapid Ligation Buffer <sup>®</sup>	5 µl
Vector pGEM-Teasy <sup>®</sup> (50 ng)	1 µl
Producto de PCR	X µl
T4 ADN Ligasa <sup>®</sup> (3 Weiss u/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O milliQ	a 10 µl

<sup>®</sup> Promega

### Extracción de ADN cromosómico

Para purificar ADN cromosómico de *R. leguminosarum* se empleó el siguiente protocolo:

1. Se cultivó la cepa de interés por 2 días, hasta obtener un pre-cultivo en fase estacionaria (2 - 5 ml en medio Ty con antibióticos).
2. Se inocularon 25 ml de medio Ty con 0.25 ml del pre-cultivo en fase estacionaria.
3. Cuando el cultivo llegó a una DO<sub>600</sub>=0.6 (en medio Ty 24 hs. *R. leguminosarum*) se cosecharon las bacterias por centrifugación (8000 rpm en rotor SS34 de Sorvall a 4°C por 5 min.).
4. Luego se realizaron los siguientes lavados, centrifugando el pellet por 5 min. y resuspendiendo:
  - dos veces con 5 ml de TE20-0.1% sarcosil.
  - dos veces con 5 ml de TE20.
5. Se resuspendieron las células en 1ml de TE-25% sacarosa.
6. Se agregaron 30 µl de lisozima (50 mg/ml) y 400 µl de EDTA (0.25 M) a las células en TE-25% sacarosa (1ml) y se mezcló por inversión.
7. Se incubó a 37°C por 10 minutos.
8. Se agregaron 2 ml de H<sub>2</sub>O milliQ y 200 µl de SDS 10% y se mezcló.
9. Se agregaron 50 µl de RNAsa (10 mg/ml).
10. Se mezcló e incubó a 37°C durante 15 min.
11. Se agregaron 50 µl de proteinasa K (10 mg/ml), se mezcló e incubó durante 5 min a 37°C.



12. Se extrajo con un volumen igual de fenol:cloroformo (aprox. 4ml). Se centrifugó (5000 rpm 4°C por 15 min.) y se transfirió la fase superior (acuosa) a un tubo limpio. Se repitió hasta que la interfase se hallase limpia.
13. Se extrajo con igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
14. Se agregaron acetato de potasio pH 4.8 (0.3 M final) y dos volúmenes de EtOH absoluto. Se mezcló por inversión.
15. Se centrifugó 10 min. máxima velocidad y se lavó el pellet con Etanol 70% (500µl).
16. Se retiró todo el Etanol, y se resuspendió en *buffer* TE.

*Buffers:*

TE20: 50mM Tris (pH 8), 20mM EDTA, 1M NaCl.

TE: 10mM Tris (pH 8), 1mM EDTA.

### **Extracción de ADN plasmídico**

Se ensayaron diferentes técnicas para la extracción de plásmidos: técnica de lisis alcalina, descrita por Birnboim *et al* y STET prep (método de *boiling*), que se describe a continuación:

#### **Miniprep STET**

1. Se cultivaron las bacterias por 16 hs. en 2 ml de LB con antibióticos.
2. Se traspasaron las bacterias a un tubo de polipropileno de 1.5 ml.
3. Se centrifugaron máxima velocidad por 30 segundos, luego se descartó el sobrenadante.
4. Se resuspendió el pellet con pipeta en 200 µl de STET.
5. Se agregaron 20 µl de lisozima (10mg/ml), se mezcló por inversión, y se incubó 5 min. a temperatura ambiente.
6. Se colocó la muestra en agua hirviendo (100°C) durante 1 minuto exacto.
7. Se centrifugó 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Se removió el pellet con un escarbadietes estéril.
9. Se extrajo con 200 µl de fenol:cloroformo (1:1). Se recuperó la fase acuosa.
10. Se agregó igual volumen de isopropanol (si fue necesario se llevó a volumen el sobrenadante con H<sub>2</sub>O milliQ estéril) y se dejó a temperatura ambiente 15 min.
11. Se centrifugó 5 min. a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante.
12. Se lavó el pellet con 200 µl de etanol 70%.

13. Se resuspendió el pellet en H<sub>2</sub>O milliQ estéril

#### *Buffer STET*

8% sacarosa

50 mM EDTA pH 8

50 mM Tris-HCl pH 8

0.5 % Tritón X-100

#### **Geles de agarosa**

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

#### **Extracción de proteínas extracelulares en *R. leguminosarum***

Se prepararon proteínas extracelulares, a partir de cultivos de *R. leguminosarum*, mediante el siguiente protocolo:

1. Se cultivó la cepa de interés por 3 días, hasta obtener un pre-cultivo en fase estacionaria (2 - 5 ml en medio Ty con antibióticos).
2. Se inocularon 25 ml de medio (TY o Y) con 0.25 ml del pre-cultivo en fase estacionaria.
3. Cuando el cultivo llegó a una DO<sub>600</sub>=0.6 se cosecharon las bacterias por centrifugación (8000 rpm en rotor SS34 de Sorvall a 4°C por 60 min.).
4. Se traspasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se repitió la centrifugación tantas veces como fue necesario para que el sobrenadante estuviese totalmente libre de bacterias.
5. Se traspasó el sobrenadante con cuidado a un tubo de vidrio *corex* de 35 ml.
6. Se precipitaron las proteínas del sobrenadante (medio extracelular) con TCA 10 % final y se mezcló por inversión.
7. Se dejó precipitar en hielo por 1- 2 horas.
8. Se centrifugó la muestra durante 60 min. a 9000 rpm (rotor SS34, Sorvall).
9. Se descartó el sobrenadante, cuidando no perder el precipitado.

10. Se lavó cuidadosamente el precipitado con 2 ml de acetona fría (-20°C), girando el tubo en forma horizontal de modo tal que todas las paredes se lavasen.
11. Se descartó con cuidado la acetona.
12. Se resuspendió el precipitado directamente en 100 µl de *buffer* de siembra para proteínas, con SDS.
13. Se analizó el perfil de proteínas en un SDS-PAGE 12%.

### Electroforesis de proteínas

Las muestras proteicas fueron resuspendidas en *buffer* de siembra[30] y calentadas a 100° C por 5 min. Luego fueron sometidas a electroforesis en gel discontinuo[30] de poliacrilamida 12 % con SDS (desnaturalizante), cuya composición se describe a continuación (tabla 4):

<b>Sol. STOCK</b>	<b>Gel de corrida 12/</b>	<b>X2</b>	<b>Stacking Gel 5/</b>	<b>X2</b>
H <sub>2</sub> O bd	1,65 ml	3,3 ml	0,78 ml	1,54 ml
Tris HCl	1,25 ml (1.5 M pH 8.8)	2,5 ml	1,25 ml (0.25 M pH 6.8)	2,5 ml
Acrilamida:bisacrilamida 30% (p/v) (29.2:0.8)	2 ml	4 ml	0,425 ml	0,85
SDS 20%	25 µl	50 µl	12,5 µl	25 µl
TEMED	3,5 µl	7 µl	3,0 µl	6 µl
APS 10%	50 µl	100 µl	30 µl	60 µl
Volumen Final	5 ml	10 ml	2,5 ml	5 ml

**Tabla 4: composición geles discontinuos de poliacrilamida.**

Las proteínas fueron teñidas con *coomassie brilliant blue* R-250. La solución de tinte fue usada 0.25 % (p/v) en metanol: ácido acético: agua (40:10:30). La decoloración se llevó a cabo mediante lavado con metanol 50 % (v/v) y ácido acético 12 % (v/v).

### Protocolo tinción con plata amoniacal

1. Colocar el gel en un recipiente de plástico conteniendo 50 ml de **solución de Fijación y Lavado**. Dejar 30 minutos con agitación suave en la rondina.

Nota: Puede dejarse sin agitación toda la noche o eventualmente el fin de semana.

2. Volcar la solución de fijación en el bidón de Descarte de Solventes Orgánicos y agregar 50 ml de **Glutaraldehído 10%**. Dejar 30 minutos con agitación suave en la rondina.
3. Volcar la solución de Glutaraldehído en el bidón de Descarte de Solventes Orgánicos . Agregar 250 ml de agua destilada y dejar con agitación suave en la rondina durante 10 minutos.
4. Descartar el agua de lavado y repetir este procedimiento de lavado durante no menos de 1 hora y media.

Nota: Puede dejarse sin agitación toda la noche.

5. Descartar el agua del último lavado y agregar 50 ml de **Solución de Tinción con Plata**

(preparada en el momento mezclando 2 ml de solución madre de nitrato de plata + 48 ml de solución de amoníaco para tinción con plata. Si se observa turbidez o precipitado, agregar Amoniaco 100% gota a gota hasta que se solubilice).

Dejar durante 5 minutos con agitación suave en la rondina.

6. Volcar la solución de Tinción con Plata en el bidón de Descartes. Agregar 250 ml de agua destilada y dejar durante 5 minutos con agitación suave en la rondina.
7. Descartar el agua de lavado y repetir este procedimiento de lavado dos veces más.
8. Descartar el agua del último lavado y agregar 25 ml de **Solución de Revelado para Tinción con plata**. Mantener el gel en esta solución hasta que sean claramente visibles los marcadores de Peso Molecular y revele la muestra más diluída.
9. Descartar inmediatamente la solución de revelado y agregar 50 ml de **10% ácido acético** para frenar el desarrollo del color.

## Western Blot

Las muestras proteicas luego de electroforesis en gel desnaturizante fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF (Millipore) aplicando 100V durante 60 min. En solución de transferencias Tris-Glicina SDS 10%, metanol 20%. Luego de la transferencia, la membrana fue teñida reversiblemente con solución de Rojo Ponceau para confirmar la transferencia de proteínas a la membrana . La membrana fue incubada con solución de bloqueo (BSA 2% o Leche descremada en polvo 5% en TBS con 0,05% Tween 20) durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se incubó con solución de anticuerpo primario (dilución 1:1000 en solución de bloqueo) durante 2 horas a temperatura ambiente, se hicieron 3 lavados durante 5 minutos con solución de lavado (TBS-tween 0,05%) y luego se incubó durante 1 ó 2

horas con anticuerpo secundario conjugado a Fosfatasa alcalina. Luego de la incubación se hicieron 3 lavados con Solución de lavado y se reveló con buffer de revelado (contiene *Nitroblue tetrazolium* NBT y *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* BCIP ambos en concentración 50 mg/ml) hasta aparición de señal. Se detuvo la reacción por lavado con H<sub>2</sub>O.

Solución de revelado Fosftasa alcalina

Tris	(12,14 g/l )
NaCl	(5,844 g/l)
MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	(1,02 g/l)

### Conjugación tri- o biparental en placa

Se empleó esta técnica para lograr la transferencia de plásmidos autotransmisibles desde cepas movilizadoras (dadoras) de *E. coli* a cepas receptoras de *R.leguminosarum*, utilizando las cepas de *E. coli* S17 (biparental) o HB101(triparental). En el caso de la conjugación triparental se empleó, además de la cepa dadora, una cepa *Helper* para lograr la transferencia de plásmidos no-autotransmisibles.

Se emplearon cultivos frescos de las cepas. El método se describe a continuación (Fig.1):

- Se cultivaron las cepas a DO estandarizada.
- Se lavaron los cultivos tres veces para retirar posibles restos de antibióticos.
- Los *pellets* se resuspendieron en aproximadamente 100 µl de PBS cada uno.
- Se dividió en dos una placa sin antibióticos: zona de conjugación y zona control (se usó medio Ty).
- Se sembró por separado una pequeña estría de cada cepa en la zona control. Se mezclaron las cepas y se sembraron en la zona de conjugación sobre el filtro.
- Se incubó la placa durante 24 hs. a 30°C.
- Se realizó una réplica a una placa con los antibióticos necesarios para seleccionar las transconjugantes.
- Se aislaron colonias (transconjugantes) en una placa nueva con antibióticos.

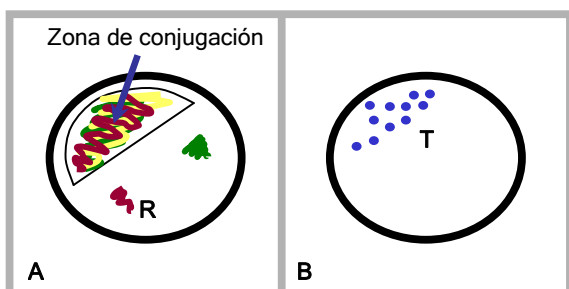


Fig.M1: conjugación en placa. A:

R: cepa receptora

D: cepa dadora

B: luego de la réplica,

T: transconjugantes (notar que las cepas parentales son incapaces de crecer en el medio selectivo).

### Preparación de células electrocompetentes y electroporación

Se prepararon las células de alta eficiencia de acuerdo al protocolo descrito más adelante.

Se emplearon en cada electroporación 50  $\mu$ l de suspensión de células electrocompetentes y 1 a 2  $\mu$ l (1-10  $\mu$ g) de ADN (disuelto en agua milliQ). El procedimiento se llevó a cabo en cubetas de 2 mm (Bio-Rad).

Condiciones de electroporación:

Capacitancia	25 $\mu$ F
Voltaje	2.5 kV
Resistencia	200 $\Omega$
Intensidad del campo	12.5 kV/cm

Electroporador: *Gene Pulser. Transfection Apparatus*, Bio-Rad.

Luego de la electroporación se incubaron las células por una hora a 37° C en medio rico SOC\*. Finalmente se plaquearon en medio selectivo.

\* SOC:

SOB:	Triptona	20g
	Extracto de levadura	5g
	NaCl	0.5g
	KCl 1M	2.5 ml
	H <sub>2</sub> O destilada	a 1000 ml

A un litro de la solución estéril de medio SOB se le agregaron 20 ml de una solución de glucosa 1M estéril.

### ***E. coli* de alta eficiencia para electroporación**

1. Se inocularon 25 ml LB con *E. coli* TG1, DH5 $\alpha$  ó S17 y se incubó ON a 37°C con agitación.
2. Se emplearon 5 ml del cultivo ON para inocular 500 ml de medio 2xYT y se incubó a 37°C.
3. Cuando DO<sub>600</sub>=0.5-0.6 (aproximadamente 3-4 hs.), se colocaron las bacterias en mamaderas de centrífuga pre-enfriadas y se incubó en hielo por 30 min. De aquí en adelante las células se mantuvieron en hielo todo el tiempo.
4. Se centrifugó a 4000 x g por 20 min. a 4°C en un rotor pre-enfriado. Se eliminó el sobrenadante.
5. Las células se resuspendieron suavemente en 500 ml de glicerol 10% frío y se incubó en hielo por 30 min.
6. Se repitieron los pasos 4 y 5 dos veces (en total tres lavados en glicerol 10%).
7. Se estimó el volumen del pellet y se resuspendió en el mismo volumen de glicerol 10% frío.
8. Inmediatamente se dividió en alícuotas de 50  $\mu$ l, que se colocaron en tubos estériles enfriados previamente.
9. Los tubos se congelaron en un baño de hielo seco-etanol y se conservaron a -80°C.

#### *comentarios*

Modificado de "Current Protocols in Molecular Biology".

Dos factores son importantes, mantener las células en hielo todo el tiempo y tratarlas suavemente (centrifugar sólo a 4000 x g y resuspenderlas con pipetas de vidrio o tips cortados. No usar vórtex).

Usando este procedimiento es posible obtener células que dan  $10^8$ - $10^{10}$  transformantes por  $\mu$ g de plásmido, cuando se usan 10 ng de ADN por transformación.

### **Curvas de crecimiento**

Se cultivaron las células en 50 ml de medio rico, de la forma antes descrita. Se tomaron alícuotas de 1 ml en forma estéril a intervalos regulares y se midió absorbancia de la suspensión bacteriana a 600 nm. En espectrofotómetro Ultrospec 1000. Se graficó la Densidad Óptica en función del Tiempo (DO<sub>600nm</sub> vs. T). Los resultados fueron semejantes en tres repeticiones independientes.

## **Cuantificación de la adhesión por cristal violeta**

La adhesión bacteriana a placas de poliestireno fue ensayada por el método de cristal violeta.

1. Se cultivó un pre-inóculo en medio Ty con agitación hasta llegar a una  $DO_{600}$  de aproximadamente 1.0.
2. Luego se realizó una dilución 1:1000 de este cultivo, que se inóculo en placas de 96 pocillos. La placa se incubó por horas o por 1, 2, 3 y 4 días para medir el progreso de la adhesión.
3. En cada tiempo se eliminó el medio de cultivo y las bacterias no ancladas fueron removidas mediante dos lavados con PBS.
4. Las bacterias adheridas fueron cuantificadas por tinción con 0.01 % (w/v) cristal violeta (Acros Organics, Geel, Belgium). Se agregaron 100  $\mu$ l de cristal violeta a cada pocillo y se incubó por 15 min. a TA, en oscuridad.
5. El exceso de cristal violeta fue removido por aspiración y luego se realizaron tres lavados sucesivos con 150  $\mu$ l de PBS.
6. El cristal violeta unido fue disuelto con 100  $\mu$ l de etanol absoluto y cuantificado por medición de la absorbancia a 595 nm utilizando por lo menos seis réplicas por muestra. Se empleó un lector de placas Beckman.

## **Secuenciación de ADN, análisis de secuencia**

En todos los casos, las muestras se secuenciaron con los *kits Big Dye Terminator Chemistry* (v1.0) de *Applied Biosystems*, en un secuenciador ABI 377.

Para el análisis por computadora de las trazas se empleó el programa Chromas Lite, versión 2.0 de Technelysium Pty Ltd.

## **Análisis filogenéticos**

Se emplearon métodos filogenéticos para estudiar posibles relaciones evolutivas entre moléculas.

En la construcción de alineamientos múltiples se empleó el programa ClustalW2, el cual es un programa general para alineamiento de múltiples secuencias de DNA o proteínas disponible para uso público en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.



## Búsqueda de promotores

El análisis de secuencias para identificar si existen posibles promotores fue realizado utilizando diversos recursos en línea:

- BPROM online (Softberry, <http://linux1.softberry.com/berry.phtml> )
- Predicción de promotor por red Neuronal [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)
- BIMAS (Sección Bioinformática y análisis molecular, NIH) <http://www-bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/proscan>
- Center for Biological Sequence Analysis (DTU) <http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>

## Ensayo autoagregación

1. Se preparó un cultivo ON, de DO estandarizada.
2. Se mezcló vigorosamente por 15 segundos en vortex y se mantuvo estático en ausencia de luz a 28°C.

A intervalos regulares de tiempo se tomaron fotografías para constatar la autoagregación de los cultivos.

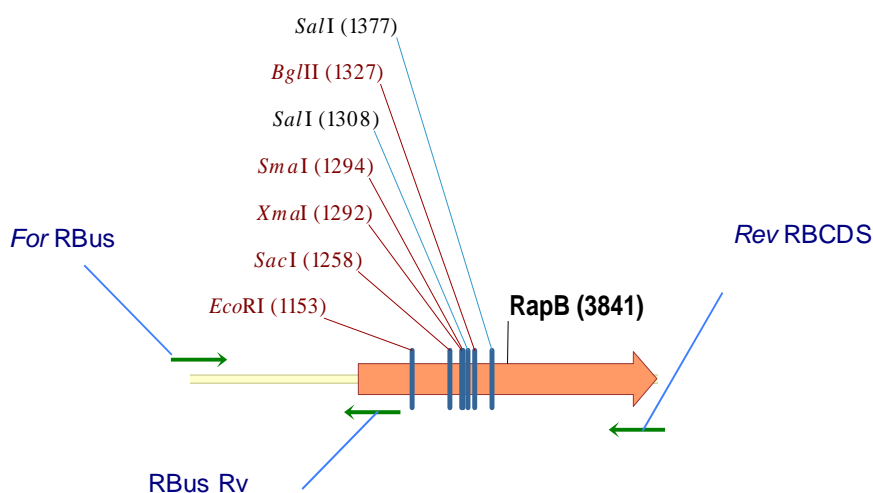
## Inmunofluorescencia, Microscopía de fluorescencia y confocal

Las células fueron cultivadas en cultivo líquido de 3 ml con antibióticos para permitir que las cepas mantengan plásmidos de expresión de GFP, empleando cepas capaces de expresar GFP. A los tiempos establecidos las células se centrifugaron a baja velocidad (6000rpm en centrífuga de mesada), se lavaron con PBS y se incubó por 45 min. con solución de bloqueo (BSA 0,5mg/ml en PBS), luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a cada caso (dil 1:150 en solución de bloqueo). Todas las centrifugaciones posteriores se realizan a 4500 rpm para evitar romper interacción con el anticuerpo. Se realizaron tres lavados centrifugando y resuspendiendo en PBS. Se incubó por 60 min. con el anticuerpo secundario (se empleó un anticuerpo comercial anti-conejo conjugado al fluoróforo Cy3 dil 1:250, Jackson ImmunoResearch). Luego se realizaron otros tres lavados con PBS y se montó en un portaobjetos cubierto de agarosa 2% o directamente sobre el portaobjetos con Mowiol 4-88 20% (Polysciences, Inc.) como protector de la fluorescencia (*antifade*). Se observó al microscopio.

Las muestras fueron observadas por microscopía de fluorescencia (Olympus BX-60) o por microscopía confocal (Zeiss LSM 510 Pascal) utilizando láseres de excitación de Argón (488nm) o Helio-Neón (543nm o 633nm).

### Obtención de mutantes por inserción: *rapB*

Los *primers* *ForRBus* y *RevRBCDS* fueron diseñados para amplificar un fragmento de ADN de 1321 pb, que contiene al gen *rapB* de *R. leguminosarum* y su zona río arriba (Fig.M). El oligonucleótido RBus Rv se diseño para lograr secuenciar completamente el fragmento mencionado anteriormente. Los *primers* RBCDS *Forward* y *Reverse* se emplearon, además, para amplificar un fragmento de ADN de 837 pb, que contiene al gen *rapB* de *R. leguminosarum* exclusivamente (Fig.M3).



**Fig.M3:** Esquema general, región amplificada de *rapB* con sus sitios de restricción, zonas de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados.

Un fragmento de ADN de 1321 pb, conteniendo al gen *rapB* de *R. leguminosarum* y su zona río arriba, fue amplificado con *primers* específicos y clonado en el vector pGEMT-easy. Se empleó la enzima de restricción *EcoRI* para introducir el *cassette* de resistencia a espectinomicina  $\Omega$  en medio del amplicón. La presencia de grandes porciones de ADN (más de 500 pb a cada lado del *cassette*) incrementa las posibilidades de que haya recombinación homóloga en estos sitios. Esta construcción fue subclonada en el vector suicida pJQ200 generándose la construcción pFC204, la cual fue transferida por

conjugación a *R. leguminosarum*. Se obtuvieron dobles recombinantes, que incorporaron la construcción al cromosoma.

El fragmento original de 1321 pb fue empleado en la construcción del plásmido capaz de complementar a la mutante *rapB* (pFC223). Y además se lo utilizó para medir el efecto de la expresión aumentada de RapB en células silvestres de *R. leguminosarum*

### Confirmación de la mutante *rapB* por PCR (*R. leguminosarum*)

Se utilizaron los *primers* internos (RBCDS *Forward* y *Reverse*) para determinar si se mantuvo una copia silvestre del gen *rapB*; lo cual podría haber ocurrido por ausencia de recombinación (manteniéndose el genotipo silvestre) o por recombinación simple (manteniéndose un alelo silvestre y uno interrumpido dentro del plásmido integrado). La amplificación de los fragmentos esperados confirma la presencia del *cassette*, interrumpiendo el gen *rapB* de *R. leguminosarum*. La selección en medio conteniendo sacarosa confirmó la ausencia del vector (y el evento de doble recombinación con la pérdida del gen silvestre).

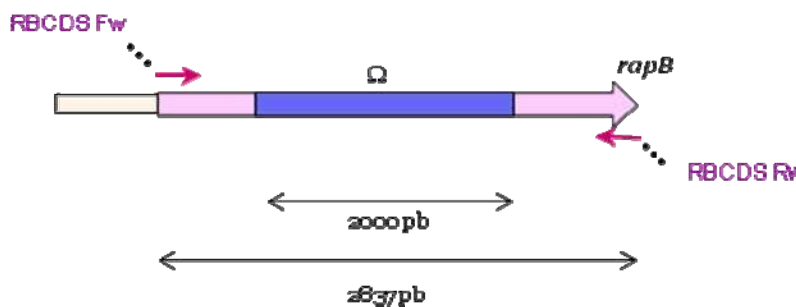
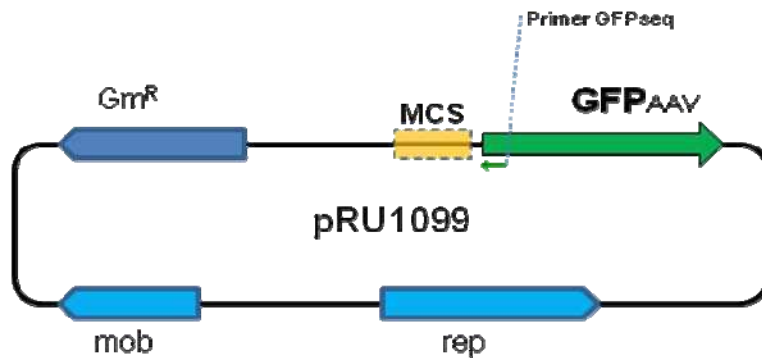


Fig.M4: zona de apareamiento de los oligonucleótidos empleados y amplicones esperados.

### Construcción de fusiones de región regulatoria y GFP

Se realizaron construcciones génicas para evaluar la actividad promotora de las regiones río arriba de los genes *rapA2* y *pssA* de *R. leguminosarum*. Se amplificaron tales regiones utilizando los oligonucleótidos RA2us (*Forward* y *Reverse*) y PssAus (*Forward* y *Reverse*) (ver tabla 3). Estas regiones fueron clonadas en el vector pRU1099 (Fig. M5) que posee un alelo inestable de GFP a continuación del MCS, utilizando los sitios de corte para las enzimas de restricción BamH1 y XbaI presentes en los oligos utilizados para amplificar RA2US. El amplicón PssAUS fue clonado en el vector pGEMT-easy y luego subclonado en pRU1099 utilizando las enzimas SphI y SpeI. Esto permite observar en tiempo real y por fluorescencia o microscopía la expresión de la región clonada en el MCS.

Las construcciones fueron confirmadas mediante secuenciación utilizando el oligonucleótido GFPseqUS, que aparea en la hebra complementaria, en la región 5' dentro de la zona codificante del gen de GFP y se usa para secuenciar fragmentos clonados río arriba del ORF de GFP. La direccionalidad del clonado se aseguró mediante la inclusión de sitios de restricción en los amplicones.



**Fig.M5:** esquema del vector pRU1099 y sus características principales. Sitios únicos en el MCS: HindIII, ClaI, SalI, BamHI, ApaI, KpnI, StuI, SpeI

## Cultivo de biofilms en sistema de flujo continuo

Se utilizó el procedimiento estándar descrito por Weiss-Nielsen y col. (2011)[31]; con modificaciones para el cultivo de rhizobium.

De acuerdo al esquema presentado en “resultados” (Fig R). Se utilizó una bomba peristáltica Watson-Marlow de 12 canales con la que se han podido alimentar hasta 4 celdas distintas de 3 canales cada una. Se monta el sistema de acuerdo al esquema y se hace fluir H<sub>2</sub>O a máxima velocidad para comprobar el correcto sellado de las conexiones. Luego se esteriliza haciendo fluir Hipoclorito de Sodio 5% durante 2 horas a baja velocidad. Posteriormente se lava el sistema haciendo fluir H<sub>2</sub>O destilada estéril durante 4 horas.

Cuando el medio a utilizar contiene fuentes de carbono hidrofóbicas, se hace fluir medio estéril durante 2-3 horas para saturar el sistema. A continuación se procede a inocular con una jeringa estéril de 1ml. Esto se realiza inoculando la manguera de acceso a cada canal de la celda con la cepa a estudiar (aprox. 0.5 ml) en cantidades de DO estandarizadas. Esto se realiza con el tubo de alimentación estrangulado para que no haya migración de las bacterias hacia la trampa de burbujas y el resto del sistema. Luego de la inoculación, el sitio de punción se sella con goma de silicona y las celdas

(con las mangueras aún cerradas) se colocan con el vidrio hacia abajo para permitir la adhesión de las bacterias al mismo. Esto se mantiene así durante 1 o 2 horas. Luego se liberan las mangueras y se da inicio al flujo.

El efluente es colectado en un botellón que contiene Cetyl al 2% o hipoclorito de sodio, para eliminar las bacterias.

Las observaciones se realizan con un microscopio confocal de observación directa con el sistema corriendo. Según el microorganismo, el biofilm puede tardar 24hs a 4 días. Nuevas botellas de medio pueden agregarse si el medio resulta insuficiente.

Al finalizar el experimento, H<sub>2</sub>O destilada se hace correr a máxima velocidad (con el botellón de descarte colocado) para eliminar los biofilms. El material de tubos, trampas y celdas es autoclavable.

### **Observación por Microscopía electrónica de barrido**

Preparación de las muestras:

Se prepararon muestras para la observación por microscopía electrónica por el método de “secado de punto crítico” (realizado en el servicio de microscopía del Museo de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”). Para someter las muestras a secado de punto crítico se incubaron cepas de *R. leguminosarum* en cultivos líquidos en presencia de cubreobjetos de borosilicato durante 24 horas para permitir la adherencia de las células al vidrio. Luego se sometieron los cubreobjetos a etapas de deshidratación secuencial colocándolos en soluciones con porcentaje creciente de etanol (Etanol:Agua 60%, 70%, 80%, 90% y etanol absoluto) durante períodos de 5 min.

Luego del secado por punto crítico, se realizó la preparación (metalización) y observación de las muestras en el Centro de Microscopías Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN- UBA).

### **Preparación de fracción de vesículas de membrana**

A partir de 25ml de cultivos en etapa exponencial tardía (DO=0,75) en medio rico se centrifugaron las células (9000xg durante 1 hora; rotor SS34, Centrífuga Sorvall), luego se separó el sobrenadante y se repitió la centrifugación para eliminar completamente células de la preparación. Posteriormente se filtró el sobrenadante de cada cepa en filtros de 0.45 m de tamaño de poro y se ultracentrifugó el sobrenadante a 100.000xg durante 4 horas. Se obtuvo el “pellet” y se resuspendió en 1 ml de “buffer” salino (PBS). Para analizar la composición de proteínas de la muestra, se concentró la muestra en “speed-vac” (por vacío) hasta un volumen de 50 ul y se sembró una alícuota en un gel de poliacrilamida desnaturizante.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Ettema, T. J. G. and Andersson, S. G. E. (2009) The  $\alpha$ -proteobacteria : the Darwin finches of the bacterial world P < P Subject collections The  $\alpha$ -proteobacteria : the Darwin finches of the bacterial world. *Society*. DOI: 10.1098/rsbl.2008.0793
- 2 Bentley, S. D. *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*. 417, 141-7
- 3 McLeod, M. P. *et al.* (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103, 15582-7
- 4 Schmeisser, C. *et al.* (2009) *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Applied and environmental microbiology*. 75, 4035-45
- 5 Young, J. P. W. *et al.* (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome biology*. 7, R34
- 6 González, V. *et al.* (2006) The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103, 3834-9
- 7 Reeve, W. *et al.* (2010) Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers. *Standards in genomic sciences*. 2, 347-56
- 8 Galibert, F. *et al.* (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science (New York, N.Y.)*. 293, 668-72
- 9 Hooper, S. D. and Berg, O. G. (2003) On the nature of gene innovation: duplication patterns in microbial genomes. *Molecular biology and evolution*. 20, 945-54
- 10 Bratlie, M. S. *et al.* (2010) Gene duplications in prokaryotes can be associated with environmental adaptation. *BMC Genomics*. 11, 588
- 11 Sawada, H. *et al.* (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of general and applied microbiology*. 49, 155-79
- 12 Fred, E. B. *et al.* (1937) CONCERNING FOSSIL REMAINS OF LEGUMINOUS PLANTS. *Science (New York, N.Y.)*. 85, 45
- 13 Gnanamickan, S. (2007) *Plant-Associated Bacteria*,
- 14 Pueppke, S. G. and Broughton, W. J. (1999) *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* 12, 293-318

- 15 Broughton, W. J. (2003) Roses by other names: taxonomy of the Rhizobiaceae. *Journal of bacteriology*. 185, 2975-9
- 16 Young, J. M. *et al.* (2003) Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 53, 1689-95
- 17 Poole, P. S. *et al.* (2008) Physiology of Root-nodule Bacteria. In *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses* (Dilworth, M. J. *et al.*, eds), pp. 241-276, Springer
- 18 Lodwig, E. M. *et al.* (2003) Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature*. 422, 722-6
- 19 Poole, P. and Allaway, D. (2000) Carbon and nitrogen metabolism in Rhizobium. *Advances in microbial physiology*. 43, 117-63
- 20 Jensen, J. B. *et al.* (2002) Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*. 184, 2978-86
- 21 Primrose, S. B. and Ronson, C. W. (1980) Polyol metabolism by *Rhizobium trifolii*. *Journal of bacteriology*. 141, 1109-14
- 22 Boussau, B. *et al.* (2004) Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 9722-7
- 23 Johnston, A. W. B. *et al.* (2007) Living without Fur: the subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium *Rhizobium* and other alpha-proteobacteria. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 20, 501-11
- 24 Olson, J. W. and Maier, R. J. (2000) Dual roles of *Bradyrhizobium japonicum* nickel protein in nickel storage and GTP-dependent Ni mobilization. *Journal of bacteriology*. 182, 1702-5
- 25 Brito, B. *et al.* (2010) *Rhizobium leguminosarum* hupE encodes a nickel transporter required for hydrogenase activity. *Journal of bacteriology*. 192, 925-35
- 26 Allaway, D. *et al.* (2001) Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environmental microbiology*. 3, 397-406
- 27 Guillén-Navarro, K. *et al.* (2005) Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia. *FEMS microbiology letters*. 246, 159-65
- 28 Karunakaran, R. *et al.* (2006) Thiamine is synthesized by a salvage pathway in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain 3841. *Journal of bacteriology*. 188, 6661-8
- 29 Graham, P. H. and Vance, C. P. (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*. 131, 872-7

- 30 Graham, P. H. and Vance, C. P. (2003) Update on Legume Utilization Legumes : Importance and Constraints to Greater Use. *Society*. 131, 872-877
- 31 Spaink, H. P. (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual review of microbiology*. 54, 257-88
- 32 Brencic, A. *et al.* (2005) Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Society*. 69, 155-194
- 33 Downie, J. A. (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS microbiology reviews*. 34, 150-70
- 34 Gage, D. J. (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*. 68, 280-300
- 35 Oldroyd, G. E. D. and Downie, J. A. (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual review of plant biology*. 59, 519-46
- 36 Murray, J. D. (2011) Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* 24, 631-9
- 37 Dilworth, M. J. *et al.* (2008) *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, Springer.
- 38 Maunoury, N. *et al.* (2008) Cell Biology of Nodule Infection and Development. In *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses* (Dilworth, M. J. *et al.*, eds), Springer
- 39 Rodríguez-Navarro, D. N. *et al.* (2007) Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS microbiology letters*. 272, 127-36
- 40 Dazzo, F. B. *et al.* (1984) Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Applied and environmental microbiology*. 48, 1140-50
- 41 van Eijdsden, R. *et al.* (1995) Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant molecular biology*. 29, 431-9
- 42 van Rhijn P *et al.* (1998) *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *The Plant cell*. 10, 1233-50
- 43 Hamblin, J. and Kent, S. P. (1973) Possible role of phytohaemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. *Nature: New biology*. 245, 28-30
- 44 Bohlool, B. B. and Schmidt, E. L. (1974) Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. *Science (New York, N.Y.)*. 185, 269-71
- 45 Dazzo, F. B. and Hubbell, D. H. (1975) Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. *Applied microbiology*. 30, 1017-33



- 46 Smit, G. *et al.* (1992) Molecular mechanisms of attachment of Rhizobium bacteria to plant roots. *Molecular microbiology*. 6, 2897-903
- 47 Lodeiro, A. R. *et al.* (1995) Early Interactions of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli and Bean Roots: Specificity in the Process of Adsorption and Its Requirement of Ca(sup2+) and Mg(sup2+) Ions. *Applied and environmental microbiology*. 61, 1571-9
- 48 Smit, G. *et al.* (1989) Purification and partial characterization of the Rhizobium leguminosarum biovar viciae Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family Rhizobiaceae to plant root hair tips. *Journal of bacteriology*. 171, 4054-62
- 49 Finnie, C. *et al.* (1997) The Rhizobium leguminosarum prsDE genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen fixation and exopolysaccharide modification. *Mol Microbiol*. 25, 135-46
- 50 Finnie, C. *et al.* (1998) Characterization of Rhizobium leguminosarum exopolysaccharide glycanases that are secreted via a type I exporter and have a novel heptapeptide repeat motif. *Journal of bacteriology*. 180, 1691-9
- 51 Ausmees, N. *et al.* (2001) A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of Rhizobium-adhering proteins (Rap) in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. *Microbiology (Reading, England)*. 147, 549-59
- 52 Oldroyd, G. E. D. and Downie, J. A. (2004) Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5, 566-76
- 53 Ho, S. C. *et al.* (1994) Carbohydrate binding activities of Bradyrhizobium japonicum. III. Lectin expression, bacterial binding, and nodulation efficiency. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 5, 873-84
- 54 Laus, M. C. *et al.* (2006) A novel polar surface polysaccharide from Rhizobium leguminosarum binds host plant lectin. *Mol. Microbiol*. 59, 1704-1713
- 55 Williams, A. *et al.* (2008) Glucomannan-mediated attachment of Rhizobium leguminosarum to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *Journal of bacteriology*. 190, 4706-15
- 56 Ausmees, N. *et al.* (1999) Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. *Microbiology (Reading, England)*. 145 ( Pt 5, 1253-62
- 57 Laus, M. C. *et al.* (2005) Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of Vicia sativa roots. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*. 18, 1123-9
- 58 Van Workum, W. and Slageren, S; Van Brussel, A A N; Kijne, J. W. (1998) Role of exopolysaccharides of Rhizobium leguminosarum bv. viciae as host plant-specific

- molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1233-1241
- 59 Djordjevic, S. P. *et al.* (1987) Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *Journal of bacteriology*. 169, 53-60
  - 60 González, J. E. *et al.* (1996) Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93, 8636-41
  - 61 Pellock, B. J. *et al.* (2000) Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of bacteriology*. 182, 4310-8
  - 62 Fraysse, N. *et al.* (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*. 270, 1365-1380
  - 63 D'Haese, W. and Holsters, M. (2004) Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends in microbiology*. 12, 555-61
  - 64 Skorupska, A. *et al.* (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fact*. 5, 7
  - 65 van Workum, W. A. *et al.* (1997) Cloning and characterization of four genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* involved in exopolysaccharide production and nodulation. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* 10, 290-301
  - 66 O'Neill, M. A. *et al.* (1991) The degree of esterification and points of substitution by O-acetyl and O-(3-hydroxybutanoyl) groups in the acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae*, *trifolii*, and *phaseoli* are not related to host range. *The Journal of biological chemistry*. 266, 9549-55
  - 67 Canter Cremers, H. C. *et al.* (1991) Unusual structure of the exopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain 248. *Carbohydrate research*. 218, 185-200
  - 68 Krehenbrink, M. and Downie, J. A. (2008) Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *BMC genomics*. 9, 55
  - 69 Linhartová, I. *et al.* (2010) RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS microbiology reviews*. 34, 1076-112
  - 70 Henderson, I. R. *et al.* (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 68, 692-744
  - 71 Thanassi, D. G. and Hultgren, S. J. (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Current opinion in cell biology*. 12, 420-30

- 72 So, S. S. K. and Thanassi, D. G. (2006) Analysis of the requirements for pilus biogenesis at the outer membrane usher and the function of the usher C-terminus. *Molecular microbiology*. 60, 364-75
- 73 Finlay, B. B. and Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 61, 136-69
- 74 Schmidt, H. and Hensel, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*. 17, 14-56
- 75 Kubori, T. *et al.* (1998) Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science (New York, N.Y.)*. 280, 602-5
- 76 Cornelis, G. R. and Van Gijsegem, F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annual review of microbiology*. 54, 735-74
- 77 Viprey, V. *et al.* (1998) Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in Rhizobium. *Molecular microbiology*. 28, 1381-9
- 78 Kambara, K. *et al.* (2009) Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Molecular microbiology*. 71, 92-106
- 79 Kwok, T. *et al.* (2007) Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*. 449, 862-6
- 80 Boschiroli, M. L. *et al.* (2002) The Brucella suis virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99, 1544-9
- 81 Cascales, E. and Christie, P. J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology*. 1, 137-49
- 82 Sandkvist, M. (2001) Biology of type II secretion. *Molecular microbiology*. 40, 271-83
- 83 Jacob-Dubuisson, F. *et al.* (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Molecular microbiology*. 40, 306-13
- 84 Bingle, L. E. *et al.* (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Current opinion in microbiology*. 11, 3-8
- 85 Williams, S. G. *et al.* (1996) Vibrio cholerae Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA. *Infection and immunity*. 64, 283-9
- 86 Purcell, M. and Shuman, H. A. (1998) The Legionella pneumophila icmGCDJBF genes are required for killing of human macrophages. *Infection and immunity*. 66, 2245-55
- 87 Roest, H. P. *et al.* (1997) A Rhizobium leguminosarum biovar trifolii locus not localized on the sym plasmid hinders effective nodulation on plants of the pea cross-inoculation group. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* 10, 938-41

- 88 Bladergroen, M. R. *et al.* (2003) Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* 16, 53-64
- 89 Cascales, E. (2008) The type VI secretion toolkit. *EMBO reports*. 9, 735-41
- 90 Ding, Z. and Christie, P. J. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion. *Journal of bacteriology*. 185, 760-71
- 91 Mougous, J. D. *et al.* (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science (New York, N.Y.)*. 312, 1526-30
- 92 Delepelaire, P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et biophysica acta*. 1694, 149-61
- 93 Koronakis, V. *et al.* (2004) Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annual review of biochemistry*. 73, 467-89
- 94 Masi, M. and Wandersman, C. (2010) Multiple signals direct the assembly and function of a type 1 secretion system. *Journal of bacteriology*. 192, 3861-9
- 95 Létouffé, S. *et al.* (1996) Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. *The EMBO journal*. 15, 5804-11
- 96 Bleuel, C. *et al.* (2005) TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 187, 6701-7
- 97 Akatsuka, H. *et al.* (1995) The three genes lipB, lipC, and lipD involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide. *Journal of bacteriology*. 177, 6381-9
- 98 Létouffé, S. *et al.* (1990) Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *The EMBO journal*. 9, 1375-82
- 99 Economou, A. *et al.* (1990) The *Rhizobium* nodulation gene nodO encodes a Ca<sup>2+</sup>(+)-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. *The EMBO journal*. 9, 349-54
- 100 Sutton, J. M. *et al.* (1994) The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91, 9990-4
- 101 Binet, R. *et al.* (1997) Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. *Gene*. 192, 7-11

- 102 Finnie, C. *et al.* (1997) The *Rhizobium leguminosarum* prsDE genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen fixation and exopolysaccharide modification. *Mol. Microbiol.* 25, 135-146
- 103 Russo, D. M. *et al.* (2006) Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of bacteriology.* 188, 4474-86
- 104 Zorreguieta, A. *et al.* (2000) Extracellular glycanases of *Rhizobium leguminosarum* are activated on the cell surface by an exopolysaccharide-related component. *J. Bacteriol.* 182, 1304-1312
- 105 Król, J. and Skorupska, A. (1997) Identification of genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii whose products are homologues to a family of ATP-binding proteins. *Microbiology (Reading, England)*. 143 ( Pt 4, 1389-94
- 106 Fraiberg, M. *et al.* (2010) Discovery and characterization of cadherin domains in *Saccharophagus degradans* 2-40. *Journal of bacteriology.* 192, 1066-74
- 107 Fraiberg, M. *et al.* (2011) Cadherin domains in the polysaccharide-degrading marine bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40 are carbohydrate-binding modules. *Journal of bacteriology.* 193, 283-5
- 108 Bittinger, M. a and Handelsman, J. (2000) Identification of genes in the RosR regulon of *Rhizobium etli*. *Journal of bacteriology.* 182, 1706-13
- 109 Keller, M. *et al.* Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti* mucR gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 8, 267-77
- 110 Cooley, M. B. and Kado, C. I. (1991) Mapping of the ros virulence regulatory gene of *A. tumefaciens*. *Molecular & general genetics* : MGG 230, 24-7
- 111 Janczarek, M. and Skorupska, A. (2007) The *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii RosR: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 20, 867-81
- 112 Mongiardini, E. J. *et al.* (2008) The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation. *FEMS microbiology ecology.* 65, 279-88
- 113 Davey, M. E. and O'toole, G. A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 64, 847-67
- 114 Morris, C. E. and Monier, J.-M. (2003) The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual review of phytopathology.* 41, 429-53
- 115 Donlan, R. M. and Costerton, J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews.* 15, 167-93

- 116 Lewis, K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45, 999-1007
- 117 Jefferson, K. K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS microbiology letters*. 236, 163-73
- 118 Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current opinion in biotechnology*. 14, 255-61
- 119 Karatan, E. and Watnick, P. (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 73, 310-47
- 120 Moreau-Marquis, S. *et al.* (2008) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 21, 595-9
- 121 Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*. 11, 1034-43
- 122 O'Toole, G. A. and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology*. 28, 449-61
- 123 Li, G. *et al.* (2011) Surface contact stimulates the just-in-time deployment of bacterial adhesins. *Molecular Microbiology*. 83, no-no
- 124 Davies, D. G. *et al.* (1993) Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*. 59, 1181-6
- 125 Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*. 8, 623-33
- 126 Tolker-Nielsen, T. and Molin, S. (2000) Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microbial ecology*. 40, 75-84
- 127 Stoodley, P. *et al.* (1994) Liquid flow in biofilm systems. *Applied and environmental microbiology*. 60, 2711-6
- 128 Purevdorj, B. *et al.* (2002) Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 68, 4457-64
- 129 Davies, D. G. *et al.* (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (New York, N.Y.)*. 280, 295-8
- 130 Sauer, K. *et al.* (2004) Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of bacteriology*. 186, 7312-26

- 131 Yildiz, F. H. (2008) Cyclic dimeric GMP signaling and regulation of surface-associated developmental programs. *Journal of bacteriology*. 190, 781-3
- 132 Whiteley, M. *et al.* (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 413, 860-4
- 133 Beloin, C. and Ghigo, J.-M. (2005) Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in microbiology*. 13, 16-9
- 134 O'Toole, G. *et al.* (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology*. 54, 49-79
- 135 Rau, M. H. *et al.* (2010) Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. *Environmental microbiology*. 12, 1643-58
- 136 Parsek, M. R. and Tolker-Nielsen, T. (2008) Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Current opinion in microbiology*. 11, 560-6
- 137 Rani, S. A. *et al.* (2007) Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *Journal of bacteriology*. 189, 4223-33
- 138 Stewart, P. S. and Franklin, M. J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 199-210
- 139 Boles, B. R. *et al.* (2004) Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 16630-5
- 140 Chai, Y. *et al.* (2008) Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*. 67, 254-63
- 141 Soto, G. E. and Hultgren, S. J. (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of bacteriology*. 181, 1059-71
- 142 Korea, C.-G. *et al.* (2011) The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: Multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33, 300-11
- 143 Nenner, A. A. *et al.* (2011) CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation. *Molecular microbiology*. 81, 486-99
- 144 Mhedbi-Hajri, N. *et al.* (2011) Adhesion mechanisms of plant-pathogenic Xanthomonadaceae. *Advances in experimental medicine and biology*. 715, 71-89

- 145 Benz, I. and Schmidt, M. A. (2011) Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *International journal of medical microbiology* : IJMM 301, 461-8
- 146 Coutte, L. *et al.* (2001) Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *The EMBO journal*. 20, 5040-8
- 147 Posadas, D. M. *et al.* (2012) BmaC, a novel autotransporter of *Brucella suis*, is involved in bacterial adhesion to host cells. *Cellular microbiology*. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01771.x
- 148 Lasa, I. and Penadés, J. R. (2006) Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in microbiology*. 157, 99-107
- 149 Hinsa, S. M. *et al.* (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular microbiology*. 49, 905-18
- 150 Yousef-Coronado, F. *et al.* (2008) Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS microbiology letters*. 288, 118-24
- 151 Tambalo, D. D. *et al.* (2010) Characterization and functional analysis of seven flagellin genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Characterization of *R. leguminosarum* flagellins. *BMC microbiology*. 10, 219
- 152 Tambalo, D. D. *et al.* (2010) Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *FEMS microbiology letters*. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.01982.x
- 153 Fujishige, N. a *et al.* (2006) Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS microbiology ecology*. 56, 195-206
- 154 Sutherland, I. W. (2001) The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*. 9, 222-7
- 155 Flemming, H.-curt and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Microbiology*. DOI: 10.1038/nrmicro2415
- 156 Branda, S. S. *et al.* (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*. 13, 20-6
- 157 Tielen, P. *et al.* (2005) Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research*. 160, 165-76
- 158 Ryder, C. *et al.* (2007) Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in microbiology*. 10, 644-648
- 159 Yang, L. *et al.* (2011) Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental microbiology*. 13, 1705-17



- 160 Pratt, L. A. and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*. 30, 285-93
- 161 Prigent-Combaret, C. *et al.* (2000) Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental microbiology*. 2, 450-64
- 162 Vallet, I. *et al.* (2001) The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, 6911-6
- 163 Mora, P. *et al.* (2008) *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium. *Archives of microbiology*. 189, 519-24
- 164 Tielker, D. *et al.* (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology (Reading, England)*. 151, 1313-23
- 165 Ma, L. *et al.* (2009) Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS pathogens*. 5, e1000354
- 166 Beech, I. B. *et al.* (2005) Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. 8, 157-68
- 167 Whitchurch, C. B. *et al.* (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science (New York, N.Y.)*. 295, 1487
- 168 Fuxman Bass, J. I. *et al.* (2010) Extracellular DNA: a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184, 6386-95
- 169 Steinberger, R. E. and Holden, P. A. (2005) Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 71, 5404-10
- 170 Jurcisek, J. a and Bakaletz, L. O. (2007) Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *Journal of bacteriology*. 189, 3868-75
- 171 Vilain, S. *et al.* (2009) DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 75, 2861-8
- 172 Harmsen, M. *et al.* (2010) Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*. 76, 2271-9
- 173 Lappann, M. *et al.* (2010) A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of *Neisseria meningitidis*. *Molecular microbiology*. 75, 1355-71

- 174 Kulp, A. and Kuehn, M. J. (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual review of microbiology*. 64, 163-84
- 175 Schooling, S. R. and Beveridge, T. J. (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of bacteriology*. 188, 5945-57
- 176 Mashburn, L. M. and Whiteley, M. (2005) Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*. 437, 422-5
- 177 Schaar, V. *et al.* (2010) Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. *Cellular Microbiology*. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01546.x
- 178 Bauman, S. J. and Kuehn, M. J. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells. *BMC Microbiology*. 12, 1-12
- 179 Yonezawa, H. *et al.* (2009) Outer Membrane Vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are Involved in Biofilm Formation. *BMC Microbiology*. 12, 1-12
- 180 Danhorn, T. and Fuqua, C. (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual review of microbiology*. 61, 401-22
- 181 Walker, T. S. *et al.* (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant physiology*. 132, 44-51
- 182 Tomlinson, A. D. and Fuqua, C. (2009) Mechanisms and regulation of polar surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. *Current opinion in microbiology*. 12, 708-14
- 183 Walker, T. S. *et al.* (2004) *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant physiology*. 134, 320-31
- 184 Espinosa-Urgel, M. *et al.* (2002) Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology (Reading, England)*. 148, 341-3
- 185 Combes-Meynet, E. *et al.* (2011) The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 24, 271-84
- 186 Vanderlinde, E. M. *et al.* (2010) Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. *FEMS microbiology ecology*. 71, 327-40
- 187 Cheng, H. P. and Walker, G. C. (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180, 5183-5191
- 188 Friedman, L. and Kolter, R. (2004) Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol.* 51, 675-690

- 189 Römling, U. *et al.* (1998) Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular microbiology*. 28, 249-64
- 190 Breedveld, M. W. *et al.* (1993) Influence of growth conditions on production of capsular and extracellular polysaccharides by *Rhizobium leguminosarum*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 64, 1-8
- 191 Christensen, B. B. *et al.* (1999) Molecular tools for study of biofilm physiology. *Methods in enzymology*. 310, 20-42
- 192 Weiss Nielsen, M. *et al.* (2011) *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells. *Journal of visualized experiments* : JoVE DOI: 10.3791/2383
- 193 Heydorn, a *et al.* (2000) Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology (Reading, England)*. 146 ( Pt 1, 2409-15
- 194 Rinaudi, L. *et al.* (2006) Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Research in microbiology*. 157, 867-75
- 195 Dazzo, F. B. *et al.* (1982) Alteration of the Trifoliin A-Binding Capsule of *Rhizobium trifolii* 0403 by Enzymes Released from Clover Roots. *Applied and environmental microbiology*. 44, 478-90
- 196 Sherwood, J. E. *et al.* (1984) the capsule of *Rhizobium trifolii* . Development and Trifoliin A-Binding Ability of the Capsule of *Rhizobium trifolii*. *Microbiology*. 159, 145-152
- 197 Ellis, T. N. *et al.* (2010) Naturally Produced Outer Membrane Vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* Elicit a Potent Innate Immune Response via Combined Sensing of Both Lipopolysaccharide and Protein Components . *Society*. 78, 3822-3831
- 198 Mcbroom, A. J. and Kuehn, M. J. (2007) Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology*. 63, 545-558
- 199 Carlson, R. W. (1984) Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *Journal of bacteriology*. 158, 1012-7
- 200 Kannenberg, E. L. *et al.* (1992) Molecular dissection of structure and function in the lipopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841 using monoclonal antibodies and genetic analysis. *Molecular microbiology*. 6, 2477-87
- 201 Karunakaran, R. *et al.* (2005) A family of promoter probe vectors incorporating autofluorescent and chromogenic reporter proteins for studying gene expression in Gram-negative bacteria. *Microbiology (Reading, England)*. 151, 3249-56
- 202 Quandt, J. and Hynes, M. F. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*. 127, 15-21

- 203 Shaner, N. C. *et al.* (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*. 22, 1567-72
- 204 Huang, C. T. *et al.* (1998) Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. *Applied and environmental microbiology*. 64, 1526-31
- 205 Lenz, A. P. *et al.* (2008) Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and environmental microbiology*. 74, 4463-71
- 206 Beringer, J. E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of general microbiology*. 84, 188-98
- 207 Robertsen, B. K. *et al.* (1981) Host-Symbiont Interactions : V. THE STRUCTURE OF ACIDIC EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES SECRETED BY RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM AND RHIZOBIUM TRIFOLII. *Plant physiology*. 67, 389-400
- 208 Brown, P. J. B. *et al.* (2012) Polar growth in the Alphaproteobacterial order Rhizobiales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 1697-701
- 209 Mateos, P. F. *et al.* (1992) Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Applied and environmental microbiology*. 58, 1816-22
- 210 Jimenéz-Zurdo, J. *et al.* (1996) Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. *Soil Biology and Biochemistry*. 28, 917-921
- 211 York, G. M. and Walker, G. C. (1998) The succinyl and acetyl modifications of succinoglycan influence susceptibility of succinoglycan to cleavage by the *Rhizobium meliloti* glycanases ExoK and ExsH. *Journal of bacteriology*. 180, 4184-91
- 212 York, G. M. and Walker, G. C. (1998) The *Rhizobium meliloti* ExoK and ExsH glycanases specifically depolymerize nascent succinoglycan chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 4912-7
- 213 Downie, J. A. *et al.* (1983) Cloning of the symbiotic region of *Rhizobium leguminosarum*: the nodulation genes are between the nitrogenase genes and a *nifA*-like gene. *The EMBO journal*. 2, 947-52
- 214 Johnston, A. W. and Beringer, J. E. (1975) Identification of the rhizobium strains in pea root nodules using genetic markers. *Journal of general microbiology*. 87, 343-50
- 215 Sherwood, M. T. (1970) Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *The Journal of applied bacteriology*. 33, 708-13
- 216 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-5

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Genética y bioquímica de Rhizobacterias de la Fundación Instituto Leloir, bajo la dirección de la Dra. Angeles Zorreguieta.

Fue finalizada en Marzo de 2012

Nicolás F. Vozza

Angeles Zorreguieta