

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

ANÁLISIS FUNCIONAL DE RapA2, UNA LECTINA SECRETADA POR *Rhizobium leguminosarum*, INVOLUCRADA EN LA FORMACIÓN DE BIOFILMS

Malori, María Soledad – LU: 126622
Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dra. Abdian, Patricia Lorena
Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET

Co-Tutor:

Dr. Prada, Federico
Universidad Argentina de la Empresa

Diciembre 5, 2017



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que hicieron posible la realización de este trabajo final.

A la Dra Patricia Abdian, mi tutora, gracias Patri por todo lo que hiciste, por tu entusiasmo, tu paciencia, tu enorme generosidad, por explicarme cada cosa con tanto amor, por haberte comprometido tanto con este trabajo. Por adaptarte a mis tiempos laborales y familiares.

En todo este tiempo compartido aprendí mucho de vos, no solo desde lo profesional sino también desde lo humano, sos una gran científica pero sobre todo una gran persona.

A Julio Caramelo, gracias por impulsarme a hacer la tesis en Leloir, gracias por tu confianza, por darme tanta libertad para trabajar, gracias por tu ayuda en los experimentos del CD.

A la Dra Ángeles Zorreguieta por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme realizar mi trabajo final allí. A todos los integrantes del laboratorio 204: Dani, Gaby, Julián, Maga, Tomy, Rodrigo, gracias por toda la ayuda que me dieron, por estar siempre dispuestos a darme una mano, por hacerme sentir siempre tan bien recibida y cómoda.

A todo el Instituto Leloir, en especial al Dr Luis Ielpi, a Marta Bravo, a Susana Raffo, a los que alguna vez pasaron por lab 207 (Isa, Meli, Sil, Estela, Celes, Guille), a los usuarios del HPLC y del secuenciador por el aliento y apoyo, a mantenimiento, lavadero y droguero.

A mis docentes en UADE por transmitirme el amor y la pasión por la ciencia y por ayudarme a confirmar que no me equivoque al cambiarme de carrera.

A mi familia, gracias Marce por ser mi compañero, por impulsarme, alentarme, sostenerme, por aguantarme, por ser incondicional. Sin vos concretar este sueño no hubiese sido posible.

A mis hijos Malena y Agustín por tolerar tantas ausencias por el estudio, su ansiedad y alegría por “tirarme huevos” fue mi impulso muchas veces.

Gracias mami, Ceci, Marcos, Lili, Alfredo, Martin por estar ahí en todo momento, por ayudarme con los nenes para que yo pueda cursar o estudiar. A mis tíos y primas.

A las amigas que encontré en UADE: Majo, Vero, Anita, Nadia por todo lo compartido.

A mis amigas de la vida, hermanas del alma: Naty, Clau; Marga, Ceci, Sole, las quiero tanto!.

A mis ahijados: Lucia, Juan Francisco, Luciano y Michy, a mi sobrina Guada.

A Kari Ledesma, Pablo Salerno y JuanMa Ribeiro por su acompañamiento, por sus palabras, por la escucha, por la oración, por estar siempre en especial en los momentos más difíciles.

A mi comunidad del Movimiento de la Palabra y a toda la familia del PCC, que sería de mi si no me hubieran alcanzado? Donde estaría hoy?.

*“Así, en lugar de dejarse estar perezosamente, imitaran el ejemplo de aquellos que
por la fe y la paciencia heredaran las promesas” Hebreos 6, 12*

1. RESUMEN

Entre la diversidad de microorganismos existentes en el suelo, las bacterias del género *Rhizobium* forman un grupo particularmente importante, debido a su capacidad de inducir la formación de nódulos en las raíces de leguminosas en cuyo interior ocurre la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Esta relación simbiótica tiene un efecto beneficioso sobre el crecimiento de la planta. *Rhizobium* posee además, la capacidad de formar biofilms, estructuras multicelulares en las que las células están inmersas en una matriz de biopolímeros autoproducidos. Los biofilms cumplen un rol importante ya que aseguran la supervivencia de los microorganismos en el suelo. La formación de biofilms es un proceso complejo, aunque se han hecho importantes avances en la identificación de los factores necesarios para su formación, los mecanismos que conducen al ensamblado de la matriz y el rol de las proteínas extracelulares todavía son poco conocidos. En estudios recientes se ha caracterizado la lectina RapA2 secretada por *Rhizobium leguminosarum*, que tiene un profundo impacto en la organización de la matriz de biofilm. Esta proteína interactúa específicamente con los exopolisacáridos ácidos (EPS / CPS) producidos por *R. leguminosarum* de una manera dependiente de calcio. RapA2 está compuesta por dos dominios homólogos Ra/CHDL que son similares a los dominios extracelulares de cadherinas eucariotas.

En este trabajo nos propusimos dividir a RapA2 en sus dos dominios y estudiarlos como proteínas individuales; evaluando su capacidad de unir calcio, sus características estructurales y si conservan la actividad lectina utilizando como sustrato el EPS. Los dominios fueron analizados estructuralmente por espectroscopia CD, y en un ensayo funcional de inhibición del *binding* (BIA) con el EPS. Además, obtuvimos una proteína de fusión con GFP de la proteína RapA2 completa, con el objetivo de desarrollar una herramienta que a futuro permita estudiar el desarrollo de la matriz durante la formación de biofilms. Nuestros resultados muestran que la actividad lectina se limita al dominio carboxilo terminal de RapA2, que contiene el sitio de unión a calcio y es capaz de unirse al EPS aunque con menor afinidad que la lectina RapA2 completa.

2. ABSTRACT

Among the wide range of microorganisms existing in the soil, bacteria belonging to the genus *Rhizobium* constitute a group of particular importance due to its ability to stimulate the development of nodules in legume roots, inside which biological nitrogen fixation takes place. This symbiotic relationship has a positive effect on plants growth. Furthermore, *Rhizobium* develop biofilms, multicellular structures in which cells are immersed in a self-produced polymeric matrix. Biofilms play an important role as they assure microorganisms survival in the soil. Biofilm formation is a complex process; although important advances have been achieved to identify the necessary factors for its development, there is still limited knowledge on the mechanisms towards matrix assembly and the role of extracellular proteins. Recent studies have characterized the RapA2 lectin, secreted by *Rhizobium leguminosarum*, which has profound impact on biofilm matrix organization. This protein interacts specifically with acidic exopolysaccharides (EPS/CPS) produced by *R. leguminosarum* in a calcium dependent manner. RapA2 is composed of two Ra/CHDL homologous domains that are similar to the extracellular domains of eukaryotic cadherins.

In this study we intend to divide RapA2 into its two domains and study them as individual proteins, assessing their calcium-binding ability, their structural characteristics, and whether they retain lectin activity using EPS as substrate. The structures of the domains were analyzed by CD spectroscopy, and in a functional *binding inhibition assay* (BIA) with EPS. Moreover, in order to develop a tool for future studies on matrix development during biofilm formation, we obtained a fusion protein with GFP of the complete RapA2 protein. Our results show that lectin activity is limited to the carboxy terminal domain of RapA2, which contains the calcium-binding site, and is able to bind to EPS although with lower affinity than the complete RapA2 lectin.

PRODUCCION CIENTIFICA

El trabajo desarrollado durante la presente tesis fue presentado en la Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología molecular (SAIB) que se llevó a cabo del 13 al 17 de Noviembre de 2017 en Buenos Aires.

Título: “Characterization of the CHDL domains of RapA, an extracellular lectin from *Rhizobium leguminosarum* involved in biofilm matrix assembly”

Autores: María Soledad Malori, Julio J. Caramelo, Ángeles Zorreguieta y Patricia L. Abdian.

CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	4
2. ABSTRACT	5
3. ABREVIATURAS	10
4. INTRODUCCIÓN	12
4.1. El suelo como hábitat.....	12
4.2. Interacciones biológicas de los microorganismos del suelo.....	12
4.3. Microorganismos benéficos para las plantas.....	13
4.3.1. Hongos Micorrízicos.....	14
4.3.2. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	14
4.3.3. Microorganismos fijadores de nitrógeno.....	15
4.4. Rizobios	15
4.5. El género <i>Rhizobium</i>	17
4.6. Fijación biológica de nitrógeno, importancia agro-económica	18
4.7. Interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosa. Mecanismos de infección y nodulación.....	19
4.7.1. Intercambio de señales moleculares.....	20
4.7.2. Adhesión de <i>Rhizobium</i> a la raíz.....	22
4.7.3. Proceso de infección de la raíz	25
4.8. Biofilms	26
4.8.1. Biofilms formados por rizobios	28
4.8.2. Composición y función de la matriz del biofilm	29
4.8.3. Matriz del biofilm en <i>R. leguminosarum</i>	31
4.9. GFP como herramienta de localización	38
5. HIPÓTESIS	42
6. OBJETIVOS	43
6.1. Objetivo General	43
6.2. Objetivos Específicos	43
7. MATERIALES Y METODOS	44

7.1.	Cepas bacterianas y plásmidos	44
7.2.	Medios y condiciones de cultivo	45
7.2.1.	Medios de cultivo	45
7.2.2.	Antibióticos	45
7.2.3.	Esterilización	45
7.2.4.	Conservación de cepas	46
7.2.5.	Inoculación y cultivo de microorganismos.....	46
7.3.	Amplificación de secuencias mediante PCR.....	46
7.3.1.	<i>Colony</i> PCR.....	47
7.3.2.	Oligonucleótidos.....	47
7.4.	Geles de agarosa.....	48
7.5.	Aislamiento, purificación y manipulación de ADN	49
7.5.1.	Obtención de ADN plasmídico.....	49
7.5.2.	Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	49
7.5.3.	Purificación de fragmentos de restricción	49
7.5.4.	Ligación de fragmentos de restricción	50
7.5.5.	Transformación bacteriana por electroporación	50
7.5.6.	Selección de células transformadas	51
7.5.7.	Secuenciación.....	51
7.6.	Expresión y análisis de proteínas recombinantes	51
7.6.1.	Preparación de extractos celulares	52
7.6.2.	Fraccionamiento subcelular.....	52
7.6.3.	Electroforesis de proteínas	52
7.6.4.	Western blot	53
7.7.	Purificación de N-ter Ra y C-ter Ra	53
7.7.1.	Cromatografía de afinidad por cationes divalentes.....	53
7.7.2.	Cromatografía de exclusión molecular	54
7.8.	Análisis de proteínas por Dicroísmo Circular (CD)	54
7.9.	Ensayos de <i>ELISA</i>	55
7.10.	Programas utilizados para el análisis de secuencias	56
8.	RESULTADOS	57
8.1.	Obtención de la proteína de fusión GFP-RapA2.....	57

8.1.1.	Diseño y obtención de la construcción para la sobreexpresión de la proteína de fusión.	57
8.1.2.	Estudio de la expresión de la proteína de fusión GFP-RapA2	65
8.2.	Estudio de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra.....	68
8.2.1.	Diseño y obtención de las construcciones para la sobreexpresión de los dominios amino y carboxilo terminal de RapA2.	68
8.2.2.	Expresión y localización subcelular de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra.....	70
8.2.3.	Purificación de los dominios Ra	72
8.2.4.	Análisis estructural por Dicroísmo Circular (CD)	77
8.2.5.	Ensayos de unión al polisacárido.....	80
9.	DISCUSIÓN.....	83
9.1.	Diseño y obtención de la proteína de fusión GFP-RapA2	83
9.2.	Estudio de los dominios Ra de RapA2	85
9.3.	Perspectivas futuras	87
9.4.	Conclusiones finales	88
10.	BIBLIOGRAFIA.....	89

3. ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
A 405	Absorbancia a 405 nm
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
<i>buffer</i>	Solución tampón
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
CD	Dicroísmo circular (<i>Circular dichroism</i>)
Da	Dalton
DO ₆₀₀	Densidad óptica determinada a 600 nanómetros
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EPS	Exopolisacárido
FIL	Fundación Instituto Leloir
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
g/l	Gramos por litro
6xHisTag	<i>Tag</i> de Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IMAC	Cromatografía de afinidad a metales divalentes (<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>)
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Milli Q®	Agua ultrapura Tipo 1
N-terminal	Extremo amino terminal
ON	Toda la noche (<i>Overnight</i>)

ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>).
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pRSETB-FUS	Construcción pRSETB- <i>gfp-rapA2</i>
rpm	revoluciones por minuto
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

4. INTRODUCCIÓN

4.1. El suelo como hábitat

El suelo es la capa más externa de la superficie terrestre, está formado por varios componentes: rocas, minerales, materia orgánica, agua y gases (dióxido de carbono, oxígeno y nitrógeno). No es un medio inerte y estable, sino que es el hábitat de innumerables seres vivos que son fundamentales para el desarrollo de la vida. En él se encuentran una gran diversidad de comunidades de microorganismos y microfauna, cada uno de ellos realiza una función específica, jugando un papel relevante en la formación del suelo y en la movilización de los nutrientes. La población microbiana del suelo es muy abundante y varía según las condiciones del medio y el alimento disponible, está formada por bacterias y actinomicetes, hongos, algas, protozoos y virus. Las bacterias constituyen el grupo más numeroso (98%) e importante, se estima que existen unas 30.000 especies bacterianas, aunque sólo se ha identificado aproximadamente el 8% (Rodas, 2006). En el perfil del suelo, los microorganismos se encuentran distribuidos según las condiciones ambientales y la disponibilidad de nutrientes. En los primeros centímetros del suelo donde existe mayor cantidad de restos orgánicos y oxígeno se disponen aquellos con metabolismos aeróbicos, mientras que a mayor profundidad, prevalecen microorganismos tolerantes a la falta de oxígeno con metabolismos anaeróbicos que degradan compuestos derivados de la actividad de los microorganismos más superficiales (Facultad de Ciencias Agropecuarias. UNC, 2014).

4.2. Interacciones biológicas de los microorganismos del suelo.

Los microorganismos del suelo interactúan entre sí y también lo hacen con organismos complejos. Con las plantas, en particular, establecen diversos tipos de relación que pueden ser: saprofítica (se alimentan de los residuos de las raíces), parásita (causan enfermedades) o simbiótica (proporcionan un beneficio a la planta a cambio de alimento) (LIFE, 2016). En las relaciones simbióticas, la planta huésped ofrece a la bacteria nutrientes y un ambiente protegido favorable al crecimiento. Para las plantas, las bacterias juegan un papel muy importante, ya que al asociarse con ellas les permiten, por una parte, aumentar su crecimiento (a través de la producción de hormonas y compuestos que promueven el desarrollo vegetal) y por otra, las protegen contra otros organismos del suelo causantes de enfermedades. La mayor

concentración de microorganismos del suelo se encuentra en la zona cercana a las raíces en lo que se conoce con el nombre de “rizosfera” (Hernández Montiel & Escalona, 2003). En 1904 Lorenz Hiltner introdujo el término al observar por primera vez la acumulación de microorganismos en las raíces de las plantas. La rizosfera se extiende hasta unos pocos milímetros de la superficie de la raíz y existe allí una abundante población microbiana que alcanza cifras de cientos de millones de células por cm^3 , densidad que resulta unas 10 a 1000 veces mayor que la presente en la parte no rizosférica del suelo (Álvarez *et al*, 2008). La comunidad bacteriana que coloniza la rizosfera se agrupa bajo el término “rizobacterias” (Schroth & Hancock, 1982).

La rizosfera provee un microambiente, donde las bacterias en asociación con las raíces forman comunidades únicas, con una interacción dinámica que se ve afectada por las sustancias liberadas al medio por las plantas y por la población microbiana. Los exudados radiculares incluyen sustancias muy diversas: aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenoles, azúcares, factores de crecimiento, vitaminas, etc. Estos crean alrededor de las raíces un ambiente nutricional que favorece el crecimiento bacteriano y además tienen gran importancia en la atracción de los microorganismos hacia la raíz. Las bacterias que se encuentran en las proximidades, detectan los compuestos exudados por las plantas iniciando el proceso de adhesión y posterior colonización de la raíz el cual es mediado por diversas proteínas (ricadhesinas, lectinas y flagelinas) y polisacáridos de la superficie bacteriana.

4.3. Microorganismos benéficos para las plantas

Cuando los microorganismos de la rizosfera establecen relaciones benéficas con las plantas, que ejercen un impacto positivo tanto en el crecimiento como en el desarrollo de la especie vegetal, se habla de “microorganismos promotores del crecimiento vegetal”. Jiménez *et al* (2001), distinguen entre ellos a tres grandes grupos:

- Hongos formadores de micorrizas,
- Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR),
- Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN).

4.3.1. Hongos Micorrízicos

Las raíces de los vegetales pueden ser colonizadas por un gran número de especies de hongos, tanto en superficie como en su interior. A la asociación entre un hongo filamentoso con la raíz de una planta se la denomina "micorriza". En esta asociación la planta mejora su capacidad para adquirir agua y nutrientes y su nivel de tolerancia a situaciones de estrés (sequía, presencia de patógenos), mientras que el hongo obtiene sustratos carbonados procedentes de la fotosíntesis y un ambiente protegido. El interés natural y económico de las micorrizas es muy grande, se ha comprobado que desempeñan un papel fundamental ayudando a la planta a superar situaciones de estrés en suelos degradados por procesos erosivos, incendios forestales, contaminación, sequía, salinización, etc (Pérez *et al*, 2013).

4.3.2. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Este grupo de bacterias es conocido habitualmente como PGPR (por sus siglas en inglés, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Kloepper, *et al* (1989) las definieron como las bacterias capaces de colonizar las raíces de las plantas y promover significativamente su crecimiento. Estas bacterias se encuentran libres en el suelo y son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizosfera, allí despliegan una serie de actividades biológicas que estimulan el crecimiento de la planta o contribuyen a mejorar su estado sanitario. Existen mecanismos directos de promoción del crecimiento, en los que las bacterias producen sustancias fisiológica y bioquímicamente activas: fitohormonas, citoquininas, auxinas, vitaminas, etc.; que producen en la planta efectos como la estimulación de la germinación de las semillas, aceleración del desarrollo y crecimiento de la planta, incremento del rendimiento de los cultivos, mejora en la nutrición mineral, en la utilización del agua por estimulación del sistema radicular, etc. En los mecanismos de promoción indirecta, las PGPR liberan metabolitos (antibióticos, enzimas líticas, etc.) que intervienen en procesos de control biológico, donde suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales (fitopatógenos) induciendo resistencia en las plantas (Glick, 1995). Por analogía de las funciones de las PGPR con los microorganismos que constituyen el microbioma intestinal humano, las PGPR también son consideradas actualmente "microorganismos probióticos vegetales" (Valverde, 2016).

4.3.3. Microorganismos fijadores de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para la vida, ya que forma parte de moléculas biológicas fundamentales: ácidos nucleicos, poliaminas, vitaminas, etc. Siendo un constituyente esencial de las proteínas, está involucrado en todos los procesos principales de desarrollo de las plantas. A pesar de su abundancia en la atmósfera, que es de aproximadamente del 80 % en su forma gaseosa (N_2), la mayoría de los organismos son incapaces de metabolizarlo y resulta prácticamente inerte y no aprovechable. Sólo un grupo altamente especializado de microorganismos es capaz de reducir el nitrógeno atmosférico hasta una forma utilizable, este proceso es conocido como “fijación biológica de nitrógeno”.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) son aquellas capaces de tomar nitrógeno del aire, reducirlo y convertirlo en compuestos utilizables como el amonio (NH_4^+) o iones nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). Este proceso puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas (Mayz-Figueroa, 2004).

Dentro de las bacterias simbióticas involucradas en la fijación biológica de nitrógeno encontramos dos grupos. El primer grupo está formado por Actinomicetos, bacterias Gram positivas que nodulan raíces de muchos árboles y arbustos. Al segundo grupo pertenecen bacterias móviles del suelo, que forman nódulos fundamentalmente en cultivos leguminosos, este grupo es denominado genéricamente como “Rizobios” (Calvo García, 2011).

4.4. Rizobios

Los Rizobios (del griego *rhiza*=raíz, *bios*=vida) constituyen un grupo de bacterias no taxonómico, muy amplio que engloba familias diferentes con características fenotípicas y moleculares muy distintas. El conocimiento de la existencia de estos microorganismos data de fines del siglo XIX. En 1888 Beijerinck fue el primero en obtener un cultivo bacteriano puro a partir de los nódulos de la raíz de una leguminosa, que llamó *Bacillus radicumicola*.

Posteriormente, en 1879 Frank propuso nombrar a esta bacteria *Rhizobium leguminosarum* e identificó otras especies pertenecientes al mismo grupo. Fue este nombre el que dio origen al genérico de “rizobio” para designar a todas las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. Inicialmente, la clasificación de los rizobios se basaba en la especificidad de los huéspedes, cada especie se componía de cepas que compartían la capacidad de nodular un grupo particular de leguminosas. Pero en 1944 Wilson desafió esta

forma de clasificación y reportó un gran número de nodulaciones que cruzaban las fronteras de las diferentes especies.

La taxonomía actual de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia. El establecimiento de una taxonomía bacteriana más sólida y el uso de técnicas de biología molecular más modernas, han permitido conocer con más profundidad la gran biodiversidad de rizobios. El análisis de secuencias de los genes 16S rRNA se ha convertido en uno de los principales criterios para la descripción de los géneros y las especies, en la actualidad se considera que las cepas cuyas secuencias del gen 16S rRNA son similares en un 97% o más, probablemente pertenecen a la misma especie (Wang *et al*, 2010). Sin embargo aún existen distintas opiniones sobre el tema: algunos autores consideran rizobios a todas aquellas bacterias capaces de nodular, de los que ya se han descrito unas 200 especies diferentes incluidas en, al menos, 20 géneros y distribuidas en dos clases, Alfaproteobacteria y Betaproteobacteria (Peix *et al*, 2015). Otros distinguen solo entre los “verdaderos rizobios” a aquellas bacterias pertenecientes a las α -Proteobacterias, incluidas hasta el momento en 13 géneros: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Cupriavidus*, *Devosia* y *Shinella* (Laranjo *et al*, 2014) (<https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>).

Es opinión generalizada entre los investigadores que este número seguirá en aumento, la evolución de nuevas cepas se atribuye a que en la mayoría de los rizobios la información genética necesaria para llevar a cabo la simbiosis se encuentra en plásmidos. Este material, en determinadas circunstancias, puede transferirse de una bacteria a otra (transferencia horizontal) y además expresarse, generando nuevas cepas capaces de fijar N₂ en simbiosis con leguminosas (Wang *et al*, 2010; Downie, 2010).

Entre sus características comunes, los rizobios son bacilos Gram negativos, aeróbicos, móviles mediante flagelos. Tienen tres diferentes estados de vida: uno dentro de los nódulos de las leguminosas, otro en suelo (tienen la capacidad de sobrevivir en el suelo durante largos períodos de tiempo, aun en ausencia de sus huéspedes) y otro dentro de plantas no leguminosas como endófitos (Wang *et al*, 2010).



Figura 1. *Rhizobium leguminosarum* en medio YMA (USAL, 2013)

4.5. El género *Rhizobium*

Este género comprende bacilos cuyo tamaño oscila entre 0.5-1.0 μm de ancho y 1.2-3.0 μm de largo. Se mueven por medio de 1 a 6 flagelos que pueden ser peritricos, polares o subpolares. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semitraslúcidas u opacas y mucilaginosas. Son generalmente de crecimiento rápido, sus colonias miden de 2 a 4 mm de diámetro después de 3 a 5 días de incubación en medio de cultivo YMA. El crecimiento en medio con carbohidratos generalmente está acompañado de una abundante producción de polisacáridos extracelulares. Hay nueve especies definidas hasta el momento: *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. mongolense* y *R. tropici*. (Wang *et al*, 2010).

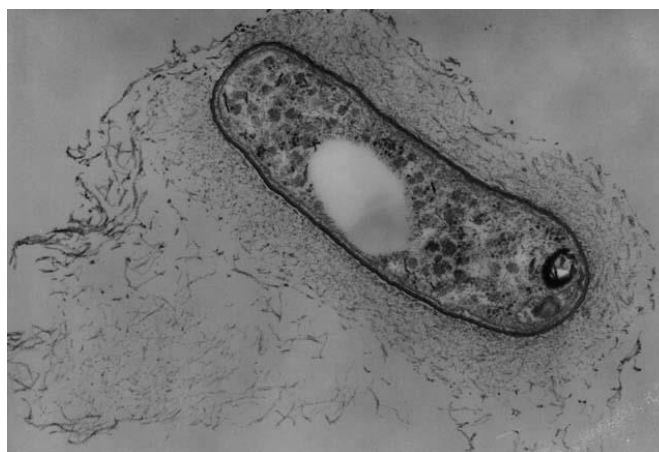


Figura 2. Imagen de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* obtenida por microscopía electrónica. Se aprecia el material capsular (CPS) rodeando la célula (Dazzo, 1995).

La especie *R. leguminosarum* posee dos biovares *trifolii* y *viciae*. Originalmente se incluía un tercer biovar en esta especie (*phaseoli*), recientemente asignado a una especie independiente estrechamente relacionada que se ha denominado *R. etli* (Ivashina & Ksenzenko, 2012).

4.6. Fijación biológica de nitrógeno, importancia agro-económica

Los rizobios cumplen un papel agronómico muy importante ya que intervienen en procesos como la nutrición y sanidad de las plantas, y también en la modificación de la estructura del suelo. Es por ello que poseen un gran potencial como agentes de biocontrol y como biofertilizantes. Se denomina biofertilizante a aquellos productos formulados con organismos vivos que se utilizan para favorecer la nutrición de las plantas. Se consideran fertilizantes no biológicos a los formulados con compuestos orgánicos (urea, compost, lombricompost, estiércol, abonos verdes, etc.) o inorgánicos (fosfato de amonio, nitrato de amonio, etc.) (Universidad Nacional de Córdoba, 2014).

El uso de biofertilizantes en agricultura tiene una gran importancia ecológica: en muchos casos los fertilizantes químicos se usan en forma excesiva, de modo que la parte no aprovechada por las plantas termina contaminando suelos, aguas subterráneas, ríos, lagos y océanos. Aun cuando se apliquen en forma moderada, solamente un mínimo porcentaje de los fertilizantes químicos es absorbido. En contraste, el nitrógeno fijado biológicamente por los microorganismos, se libera de manera gradual y el contacto con las plantas es tan estrecho que los nutrientes que liberan son rápidamente absorbidos por las raíces (UNAM, 2013).

Aunque la utilización de fertilizantes biológicos no es nueva, en la actualidad ha aumentado considerablemente su difusión debido al auge de la agricultura sustentable y los cultivos orgánicos, y a que los costos de producción son mucho menores. La mayoría de las investigaciones realizadas hasta el momento buscan entender de qué manera los microorganismos actúan en la promoción del crecimiento vegetal, con el propósito de aislar y seleccionar nuevas cepas que representen una fuente de inoculantes biológicos y permitan la elaboración de nuevos productos comerciales para la agricultura. Se han comenzado a producir cepas modificadas genéticamente para la elaboración de inoculantes cada vez más específicos, buscando obtener cepas cada vez más eficientes y competitivas, que sean buenas fijadoras de N₂. Así la utilización de microorganismos como una herramienta biotecnológica supone una alternativa en la agroindustria que permite aumentar los rendimientos de los

cultivos y disminuir el uso de fertilizantes químicos que deterioran el suelo y contaminan el ambiente. En nuestro país, la oferta comercial de inoculantes microbianos como biofertilizantes es muy variada, entre los microorganismos más utilizados se destacan por su efectividad: los rizobios (cultivos de soja y en mucha menor escala alfalfa y otras leguminosas forrajeras), *Azospirillum* spp (principalmente para cultivos de trigo y maíz) y las micorrizas.

El Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal del IMYZA-INTA Castelar, ofrece un Banco de cepas de microorganismos rizosféricos. Así se busca garantizar la pureza, viabilidad y estabilidad genética de la diversidad microbiana utilizada para la agricultura, asesorando al productor y a las empresas dedicadas a la formulación de inoculantes (INTA-Castelar, 2017).

4.7. Interacción *Rhizobium*-leguminosa. Mecanismos de infección y nodulación

Las leguminosas representan la tercera familia más grande de plantas con flor (denominada *Fabaceae*). Son tan diversas que entre sus miembros podemos encontrar desde hierbas, arbustos, enredaderas, hasta árboles gigantes y algunas plantas acuáticas. Después de los cereales, constituyen la segunda familia en importancia para la alimentación humana y animal. Sin embargo, en contraste con ellos, las leguminosas son capaces de crecer en suelos áridos, de escasa fertilidad, lo que se debe en gran medida a su capacidad para establecer simbiosis con los rizobios. Las principales leguminosas producidas en el mundo son: la soja, el maní, las judías, las arvejas, los garbanzos, las lentejas y aquellas que se utilizan como forraje para la nutrición de animales (trébol, arveja, alfalfa) (Andrews & Andrews, 2017; Ramirez *et al.*, 2016).

En condiciones de deficiencia de nitrógeno en el suelo, los rizobios establecen simbiosis con ciertas leguminosas, lo que conduce a la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos, que ofrecen a la bacteria un nicho donde tiene lugar la fijación de nitrógeno. La formación del nódulo fijador es un proceso complejo que comprende una serie coordinada de varias etapas (Coronado *et al.*, 1995), que se describen brevemente a continuación.

4.7.1. Intercambio de señales moleculares

En la primera etapa de la simbiosis, se produce un “diálogo” químico entre las bacterias y el hospedador, a través de una variedad de moléculas señal. La primera señal la liberan las plantas, las raíces comienzan a exudar compuestos orgánicos como carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, ácidos carboxílicos y derivados fenólicos. Estas moléculas varían en cantidad y composición, dependiendo de la especie vegetal de que se trate y hacen que los rizobios sean atraídos químicamente hacia la región apical (punta) de los pelos radicales. Los compuestos fenólicos (flavonoides, isoflavonoides y betaínas) son los más importantes desde el punto de vista simbiótico, los flavonoides actúan como quimioattractantes, atrayendo a las bacterias hacia los sitios de infección en la raíz (Perret *et al.*, 2000). En este proceso existe cierta especificidad, la composición de los flavonoides varía dependiendo de la planta que los produce atrayendo a rizobios específicos (Downie, 2010). La especificidad entre parejas planta-bacteria compatibles minimiza las posibilidades de infección por patógenos y la formación de asociaciones ineficaces que conducen a la formación de nódulos vacíos o no fijadores (Perret *et al.*, 2000).

Para que la simbiosis sea eficaz, la bacteria necesita poseer dos clases de genes principales: genes de fijación de nitrógeno (genes *nif* y *fix*) y genes de nodulación (*nod*). Aunque se los llama generalmente genes *nod*, los genes de la nodulación comprenden a un grupo de genes designados como *nod*, *nol* y *noe*. Estos genes se agrupan en plásmidos o en una región del cromosoma, los plásmidos que llevan los genes *nod* se llaman simbióticos o pSym (Wang *et al.*, 2010).

Los flavonoides exudados por las plantas pueden difundir pasivamente a través de la membrana bacteriana y en respuesta a esta señal, los rizobios responden sintetizando señales específicas, los factores Nod. Los genes *nod*, a excepción de *nodD*, no se expresan si no se encuentra la señal inductora adecuada de la planta. El gen *nodD*, en cambio, se expresa constitutivamente. Los flavonoides interactúan con la proteína NodD que, una vez activada, se une a los promotores bacterianos e induce la expresión del conjunto de genes *nod* (Wang *et al.*, 2010; Perret *et al.*, 2000). Los factores Nod constituyen una familia de lipoquitooligosacáridos (LCOs) que actuarán como moléculas señal sobre la planta.

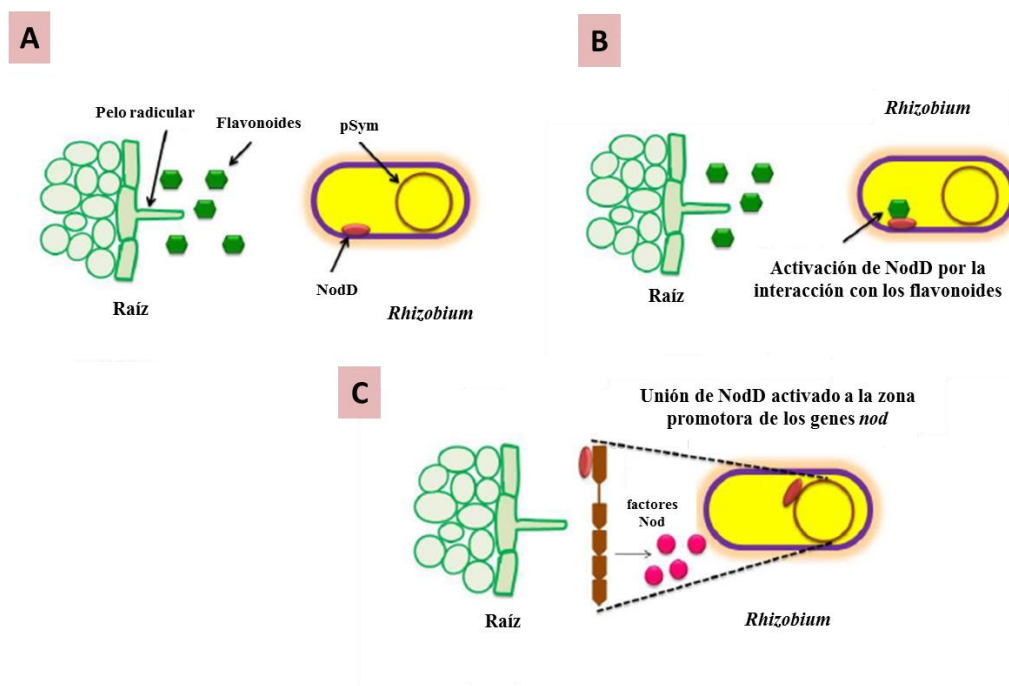


Figura 3. Resumen esquemático del proceso de señalización *Rhizobium*-leguminosa (A) Secreción de flavonoides por las raíces. (B) Ingreso de los flavonoides al citoplasma del rizobio, activación de los factores NodD. (C) Unión de NodD activado a la zona promotora de los genes *nod* e inducción de la expresión de las enzimas necesarias para la síntesis de los factores Nod (adaptada de Ahemad & Khan, 2013).

La planta posee en su membrana plasmática un conjunto de receptores específicos que reciben el nombre de NFR (del inglés, *Nod factor receptors*) (Miyata, 2016). Los factores Nod, una vez reconocidos por estos receptores, inducen una serie de transformaciones morfológicas y fisiológicas en la raíz. Dentro de las respuestas inducidas, se encuentran cambios en los niveles del flujo de ciertos iones como calcio, cloro, potasio y protones a través de la membrana del pelo radical. Estas modificaciones en los niveles iónicos de la célula son los responsables de inducir una despolarización de la membrana plasmática. Además, la magnitud y frecuencia de las “oscilaciones de calcio” citoplasmáticas son claves para disparar cascadas de señalización necesarias para la adhesión (Jones *et al*, 2007; Downie, 2010). También se han reportado cambios en el pH intracelular, el cual se hace más alcalino (Quinto & Cárdenas, 2007; Popp & Ott, 2011).

4.7.2. Adhesión de *Rhizobium* a la raíz

En la siguiente etapa, las células de *Rhizobium* se adhieren a los pelos radicales de las leguminosas, este es un proceso complejo de varios pasos. La adhesión es muy importante e influye en la eficiencia de la nodulación, en ella intervienen diversas moléculas, como proteínas secretadas, proteínas superficiales y polisacáridos secretados y de superficie (Ausmees *et al*, 2001; Downie, 2010). El proceso de adhesión deber ser preciso para que las bacterias accedan al lugar de la infección en el momento y lugar adecuados en competencia con otros microorganismos presentes en el suelo (Mongiardini *et al*, 2008).

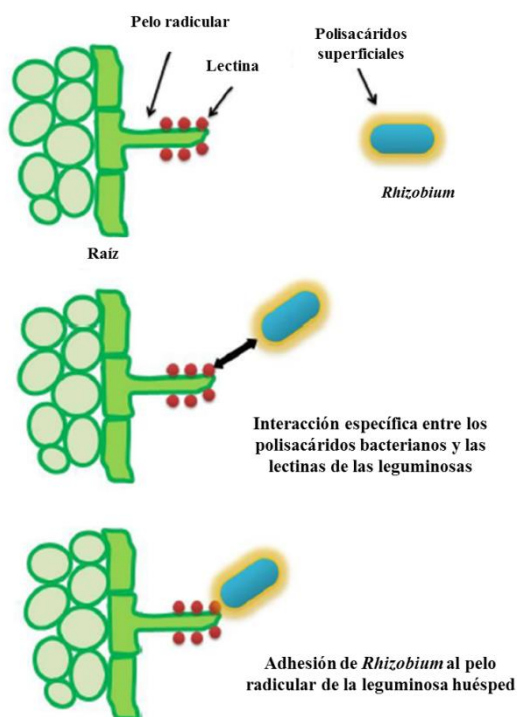


Figura 4. Representación esquemática de la adhesión de *Rhizobium* a los pelos radiculares de la leguminosa huésped. La adhesión es polar, la célula bacteriana se contacta con el pelo radical a través de uno de sus polos (Ahemad *et al*, 2013).

Dentro de las proteínas que están implicadas en el reconocimiento y adherencia planta-bacteria, las lectinas vegetales desempeñan un papel importante ya que sirven de receptores que interactúan con los polisacáridos superficiales bacterianos (Rodríguez-Navarro *et al*, 2007). Por otro lado, los rizobios también secretan proteínas que participan en la adhesión. La

rhicadesina es una proteína dependiente de calcio, que se localiza en la superficie de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y otros rizobios, y actúa como “puente” mediando la unión polar de las células a la superficie de la raíz (Smit *et al*, 1989; Dardanelli *et al*, 2003). Además de estas proteínas, los exopolisacáridos bacterianos cumplen un rol fundamental tanto en la adhesión como en la infección de las células vegetales.

Se ha propuesto que *R. leguminosarum* puede utilizar al menos dos mecanismos para la adhesión a raíz. El primero plantea que la fijación de los rizobios a los pelos radiculares estaría mediada por la interacción de las lectinas vegetales con el glucomanano bacteriano, un polisacárido de localización unipolar. En este modelo, las lectinas actúan como un puente entre las bacterias y la planta, se encargan de unir simultáneamente la pared celular de la planta y polisacáridos localizados en la membrana externa de los rizobios (Rodríguez-Navarro *et al*, 2007). El segundo modelo plantea que la rhiCADhesina, interviene en la adhesión de los rizobios a los pelos radiculares de las leguminosas. La presencia de iones de calcio facilitaría el anclaje de la rhiCADhesina a la superficie bacteriana (Smit *et al*, 1991; Laus *et al.*, 2006) y sería reconocida simultáneamente por algún receptor presente en la superficie de la raíz.

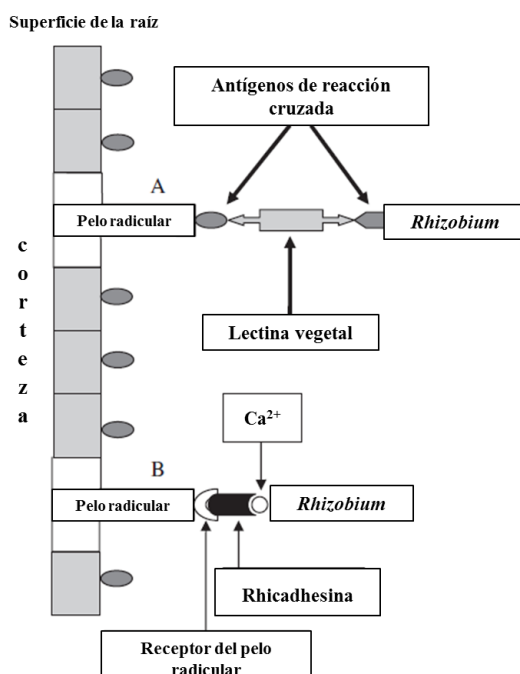


Figura 5. Modelos que se proponen para la fijación de *Rhizobium* a los pelos radiculares. A) Unión mediada por lectinas vegetales. B) Unión mediada por rhiCADhesinas (Rodríguez-Navarro *et al*, 2007).

Se demostró también que otros factores, como el pH, pueden influir en la funcionalidad de algunas de estas proteínas. Bajo condiciones ligeramente alcalinas (pH 7,4), las lectinas situadas en las puntas del pelo de la raíz se liberarían en la rizosfera como resultado de un aumento de su solubilidad. En estas circunstancias, la adhesión bacteriana se llevaría a cabo a través del mecanismo mediado por rihadhesina. Por el contrario, bajo condiciones ácidas (pH 5,6) las lectinas no serían solubles y se conservarían en la punta del pelo radicular mientras que el calcio no estaría disponible por lo que la rihadhesina estaría impedida en mediar la adhesión (Laus *et al*, 2006). Por consiguiente, los modelos de adhesión descritos serían mecanismos alternativos que operarían dependiendo de las condiciones de pH del medio.

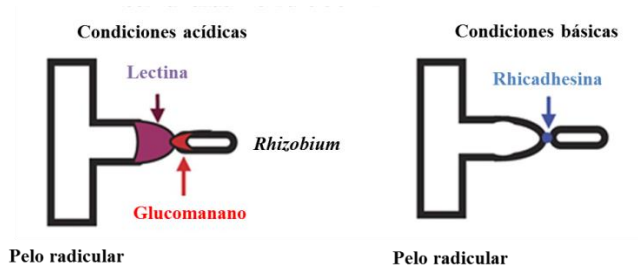


Figura 6. Modelos de adhesión al pelo radicular según el pH del medio (Downie, 2010).

El proceso de unión de *Rhizobium* a la raíz ocurre en dos etapas: una “temprana”, mediada por lectinas y/o rihadhesinas, que es una unión débil y reversible, seguida por una unión firme que requiere la síntesis de microfibrillas de celulosa bacterianas. Estas producen uniones estrechas, promoviendo la agregación bacteriana sobre el extremo del pelo radicular para dar lugar a una biopelícula o una cápsula, que recibe el nombre de “cap” (Laus *et al.*,2006).

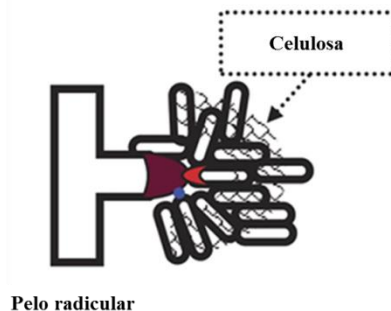


Figura 7. Formación del “cap” sobre el pelo radicular (Downie, 2010).

4.7.3. Proceso de infección de la raíz

Después de la adhesión se producen cambios en la fisiología de los pelos radiculares, promoviendo una deformación y posterior curvatura. Estos factores, estimulan el crecimiento del extremo apical del pelo que se enrolla sobre sí mismo atrapando a las bacterias en una estructura característica en la que las bacterias adheridas quedan atrapadas y siguen creciendo formando un foco de infección (Downie, 2010). La infección es un evento clonal que comienza con una hidrólisis localizada de la pared celular de la planta, la invaginación de la membrana plasmática del pelo, seguida por la penetración de la bacteria y la formación, de un canal conocido como “cordón o hilo de infección” que avanza por el pelo radical. A través de este canal, las bacterias penetran en el interior de la raíz (Wang *et al*, 2010). Una vez establecido el hilo de infección, las bacterias se desplazan hacia la raíz principal alcanzando las células corticales de la raíz, a partir de las cuales se desarrollará el nódulo radical.

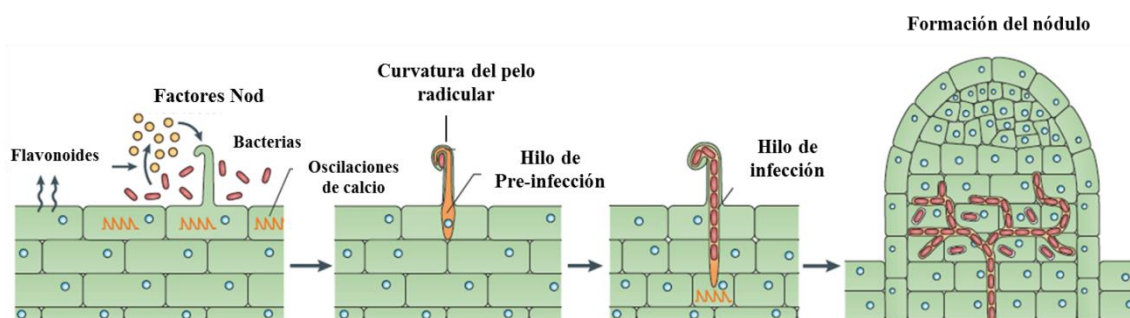


Figura 8. Infección de la raíz y formación del nódulo. Etapas del proceso de infección que muestran el enrollamiento del pelo radicular, la formación del hilo de infección y el posterior desarrollo del nódulo por activación de la división de las células del córtex (Oldroyd, 2013).

Las bacterias liberadas al citoplasma de las células vegetales quedan rodeadas y separadas por una membrana derivada de la planta hospedadora llamada “membrana peribacteroidal”. Al cesar la división de las bacterias éstas se diferencian en “bacteroides” e inician la expresión de los genes necesarios para la fijación de nitrógeno (genes *nif* y *fix*). El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta los nutrientes hacia y desde él (Downie, 2010; Wang *et al.*, 2010).



Figura 9. Fotografía de nódulos de arveja producidos por *Rhizobium*.
(<http://bibbiologia.usal.es/imagenes/picture.php?/1724>).

4.8. Biofilms

En ambientes naturales, la mayoría de las bacterias no viven en forma unicelular sino que se asocian entre sí formando biopelículas que comúnmente se denominan “biofilms” (Branda *et al*, 2005). Los biofilms se definen como comunidades microbianas sésiles, en las que las células están adheridas fuertemente a un sustrato, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y que exhiben diferencias en los patrones de transcripción génica respecto a las formas planctónicas (Donlan, 2002). A pesar de que los biofilms pueden estar formados por una o varias especies microbianas, los mismos presentan similitudes en su estructura y en su comportamiento. Los microorganismos pueden unirse a superficies muy variadas, como prótesis e implantes, superficies de tejidos en organismos vivos, tuberías de agua potable o drenajes industriales, sistemas acuáticos naturales o interfaces aire-líquido, entre muchas otras. Allí, los microorganismos se encuentran embebidos en una matriz autoproducida que brinda, entre otras cosas, integridad física a la estructura del biofilm. Los biofilms son estructuras heterogéneas, formadas en su interior por agregados o microcolonias encerradas en la matriz polimérica y separadas de otras microcolonias por espacios intersticiales por los que circulan agua y nutrientes. La proximidad de las células en la estructura del biofilm proporciona un entorno ideal para la formación de gradientes y el intercambio de nutrientes, agua, oxígeno, enzimas y señales de quorum sensing (Donlan, 2002).

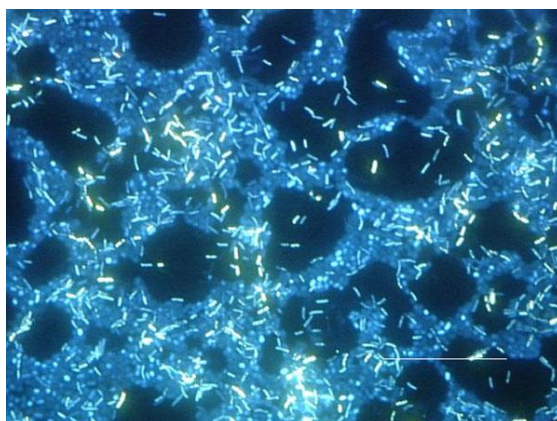


Figura 10. Biofilm polimicrobiano formado sobre una superficie de acero inoxidable, teñido con DAPI y visualizado por microscopía de fluorescencia (Donlan, 2002).

Los biofilms son sistemas biológicos complejos y dinámicos que requieren un sofisticado sistema de señales célula-célula y cierto grado de especialización celular (UNLP, 2017). En su formación se distinguen al menos cinco etapas:

- 1- Adhesión reversible de la bacteria a la superficie,
- 2- Unión irreversible y síntesis de la matriz,
- 3- Formación de microcolonias,
- 4- Maduración,
- 5- Dispersión y colonización

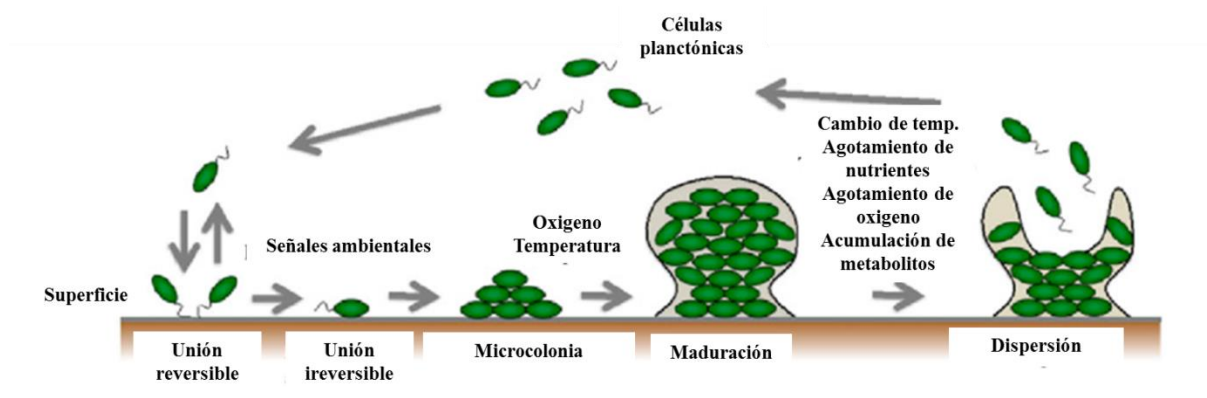


Figura 11. Etapas de la formación de un biofilm. (Toyofuku *et al*, 2015)

La adhesión a la superficie es una de las etapas más importantes porque representa un punto de inflexión entre el estado de vida planctónica y el modo biofilm (Toyofuku *et al*,

2015). La bacteria puede acercarse de diferentes formas a la superficie, por gravedad, difusión, quimiotaxis, arrastrada por una corriente de fluidos o por movilidad propia. La unión inicial, en la que intervienen fuerzas de Van der Waals, electrostáticas e interacciones hidrofóbicas; es un proceso rápido y reversible (UNLP, 2017). Posteriormente, la bacteria se adhiere al sustrato en forma permanente, por medio de proteínas de superficie y por la síntesis de exopolisacáridos que fortalecen la adhesión. En esta fase, comienza la división celular y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión formando microcolonias, que crecen y producen más matriz polimérica. Luego sigue el proceso de maduración, en donde el biofilm adopta una estructura organizada (Toyofuku *et al*, 2015). Finalmente, algunas células desarrollan apéndices locomotores y se liberan de la matriz en la etapa que se conoce como dispersión. La dispersión del biofilm permite a las bacterias colonizar otras superficies o sustratos, completando así un proceso de desarrollo secuencial (Bogino *et al*, 2013).

El desarrollo de un biofilm puede ser beneficioso o perjudicial, dependiendo del entorno en el que se forma. En nuestro organismo podemos encontrar numerosas comunidades microbianas con funciones protectoras en las mucosas y superficies epiteliales. En la industria, comienzan a aplicarse biofilms en procesos de biorremediación y como biorreactores para la producción de compuestos. En otros ámbitos, la formación de biofilms trae consecuencias negativas, en medicina están implicados en infecciones crónicas y resistentes a antibióticos asociadas a su desarrollo sobre dispositivos como cánulas, catéteres, prótesis, marcapasos, implantes, etc. En la industria la formación de biofilms también ocasiona reducción del flujo de líquidos en cañerías, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de membranas, corrosión de metales, etc.

4.8.1. Biofilms formados por rizobios

Algunos investigadores sostienen que la formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que ofrece un ambiente óptimo donde sus miembros encuentran protección ante los entornos adversos y facilita su supervivencia. Las bacterias del suelo no son la excepción a este fenómeno, al igual que muchos otros entornos naturales el suelo es pobre en nutrientes y la formación de biofilms asegura la supervivencia de los rizobios por largos períodos de tiempo (Rinaudi *et al*, 2006). Sin embargo, los rizobios también forman biofilms en entornos favorables, como superficies vegetales y la rizosfera, donde existen humedad suficiente, exudados vegetales y abundancia de nutrientes (Rinaudi *et*

al, 2010). Se ha propuesto que los biofilms formados sobre raíces posicionarían a los rizobios sobre los tejidos del huésped susceptibles a la infección, aumentando el tamaño del inóculo y así, la posibilidad de establecer una nodulación efectiva (Downie, 2010). Sin embargo no existe evidencia que sostenga esta hipótesis y el rol de los biofilms en la simbiosis rizobio-leguminosa, sigue siendo controversial. Estas observaciones ponen en relieve la falta de conocimiento sobre las señales del entorno, que perciben los microbios del suelo e inducen el cambio hacia la vida en biofilms.

Rhizobium leguminosarum forma biofilms sobre superficies abióticas, partículas de suelo y raíces, lo que le permite sobrevivir en ambientales hostiles y establecer la simbiosis con la leguminosa huésped (Rinaudi & Giordano, 2010). Russo *et al* (2006) observaron que la cepa A34 de *R. leguminosarum* se adhiere firmemente a superficies inertes como el vidrio y el polipropileno; y que forma anillos de biofilm en la interfaz aire-líquido en cultivos con agitación en medio mínimo. Los biofilms evaluados mediante microscopía confocal, mostraron luego de 4 días un biofilm maduro, con una arquitectura tridimensional ordenada, prevalencia de uniones laterales entre células (tipo “panal de abejas”) y canales de agua entre las macrocolonias (Russo *et al*, 2006).

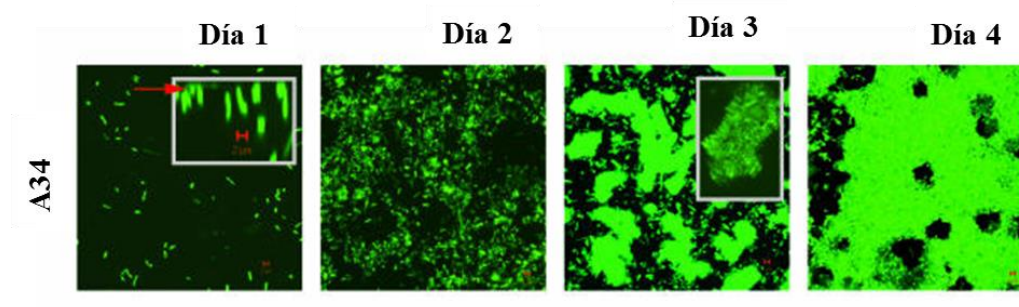


Figura 12. Progresión de la formación de biofilm sobre vidrio en *R. leguminosarum* A34. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. En el *inset* del día 3 se observa en detalle una microcolonia con la estructura característica de “panal de abejas” (Russo *et al*, 2006).

4.8.2. Composición y función de la matriz del biofilm

La matriz es el material extracelular, producido principalmente por los propios microorganismos, en el cual están inmersas las bacterias que componen el biofilm. Proporciona una barrera física que protege a las células contra agentes externos como: la

desecación, cambios de pH, estrés osmótico, agentes biocidas, antibióticos, cationes metálicos, radiación UV y defensas inmunitarias de la planta huésped. Además la matriz constituye un sistema degradativo externo, ya que en ella se encuentran múltiples enzimas asociadas responsables del reciclado y transformación de nutrientes y otros compuestos (Flemming & Wingender, 2010). La composición de la matriz del biofilm puede variar en función del sistema que se esté estudiando pero en general los componentes mayoritarios son agua (puede representar hasta un 97% del contenido total) y sustancias poliméricas extracelulares. Entre ellas se encuentran macromoléculas como exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y diversos productos de lisis que están distribuidos en forma heterogénea, creando regiones con propiedades diferentes en la matriz que afectan la función de las células próximas y las propiedades generales del biofilm (Branda *et al.*, 2005; Flemming & Wingender, 2010) (Figura 13).

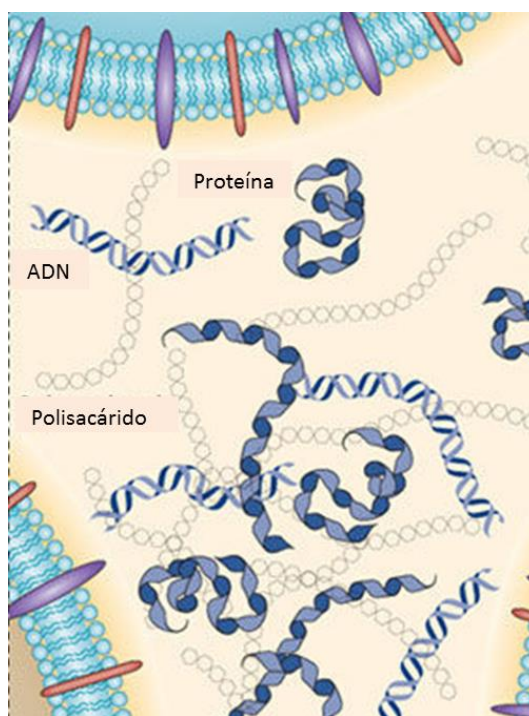


Figura 13. Representación esquemática de la distribución heterogénea de los componentes mayoritarios de la matriz del biofilm (Flemming & Wingender, 2010).

4.8.3. Matriz del biofilm en *R. leguminosarum*

La matriz del biofilm es un componente esencial para el funcionamiento de la comunidad microbiana. A pesar de su importancia, los mecanismos que llevan a la formación y ensamblado de la matriz son poco conocidos (Abdian & Zorreguieta, 2016). En el caso de los rizobios, se conocen varios de sus componentes a nivel molecular, ya que han sido estudiados en la adhesión al huésped, pero en el contexto de la interacción simbiótica. A continuación se describen algunos de los polímeros secretados al medio extracelular, principalmente polisacáridos y proteínas, que están involucrados en la formación de la matriz.

Exopolisacáridos - Las bacterias del género *Rhizobium* son bacterias Gram-negativas típicas, con una membrana citoplasmática compuesta de una bicapa de fosfolípidos y una membrana externa separadas por un espacio periplásmico. Los rizobios sintetizan diversos polisacáridos que cumplen múltiples funciones: (1) glucanos cíclicos (GC), que se encuentran principalmente en el espacio periplásmico, (2) exopolisacáridos, ligeramente asociados con la membrana externa (CPS) o totalmente liberados en el medio extracelular (EPS); (3) lipopolisacáridos (LPS), componentes estructurales de la membrana externa y (4) polisacáridos capsulares (KPS), que están normalmente unidos a la membrana externa.

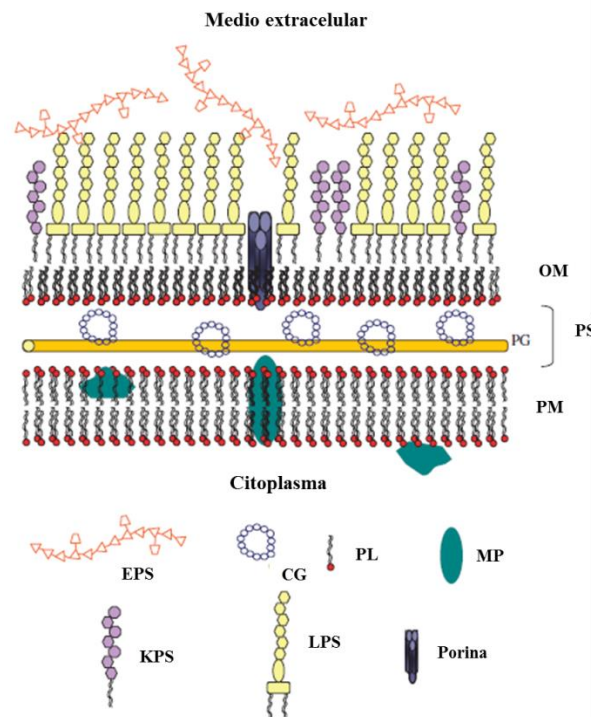


Figura 14. Esquema de polisacáridos de superficie de *Rhizobium*. OM, membrana externa; PS, espacio periplásmico; PG, capa de peptidoglicano; PM, membrana plasmática; EPS, exopolisacárido; CG, glucano cíclico; PL, fosfolípido; MP, proteína de membrana; KPS, polisacárido capsular; LPS, lipopolisacárido (Rodríguez Navarro *et al*, 2007).

Entre los polisacáridos mencionados anteriormente, los EPS ácidos desempeñan un papel fundamental en el establecimiento de la simbiosis y también en la formación de biofilms. El EPS que produce *R. leguminosarum* es un heteropolisacárido, compuesto por unidades repetitivas octasacarídicas (Fig. 15), que contienen glucosa, ácido glucurónico y galactosa en una relación molar de 5: 2: 1, adicionalmente modificadas por grupos piruvilo y O-acetilo. (Ivashina & Ksenzenko, 2012).

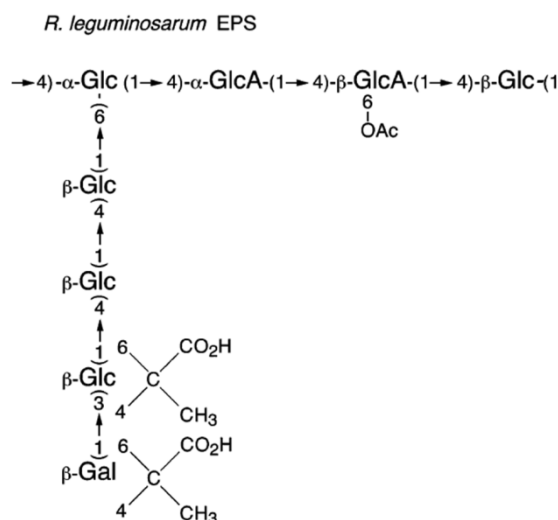


Figura 15. Estructura química de la unidad repetitiva del EPS de *R. leguminosarum*. Glc, glucosa; GlcA, ácido glucurónico, Gal, galactosa y Ac, acetilo (Skorupska *et al*, 2006).

La síntesis de EPS es un proceso muy complejo regulado a nivel transcripcional y post-transcripcional. La mayoría de los genes que participan de la biosíntesis conforman un grupo llamado *pss* (*polysaccharide synthesis*) y se encuentran en diferentes regiones cromosomales o en megaplásmidos. Entre éstos se encuentran genes que codifican enzimas indispensables para la síntesis de precursores, enzimas implicadas en el ensamblaje y modificación de las unidades repetitivas y proteínas responsables de la polimerización y

transporte de EPS fuera de la célula (Janczarek, 2011). Por ejemplo, el gen *pssA* se encuentra bajo estricta regulación ya que codifica para una poliprenolglucosil transferasa localizada en la membrana interna bacteriana que cataliza el primer paso en la biosíntesis de EPS (Janczarek & Rachwał, 2013). Ciertos factores ambientales, de estrés y nutrición pueden influir en la biosíntesis de EPS. Las condiciones del suelo, como la disponibilidad de nitrógeno, fosfato y azufre, y la presión osmótica afectan la producción y pueden modificar la cantidad y composición de EPS (Janczarek, 2011).

El EPS ácido que produce *R. leguminosarum* juega un papel importante en la formación de biofilm en las raíces de la planta huésped, siendo el componente principal de la matriz (Downie, 2010). Para analizar el papel del exopolisacárido ácido en la formación de biofilm que produce *R. leguminosarum in vitro*, Russo *et al* (2006) estudiaron una mutante en el gen *pssA*. Esta mutante carece de EPS y CPS, pero no afecta la producción de otros polisacáridos superficiales como por ejemplo el lipopolisacárido. La mutación en *pssA* provocó una drástica disminución de la formación del biofilm; ocasionalmente se observó la formación de una capa de bacterias sobre vidrio, que se dispersó fácilmente y que fue incapaz de desarrollar microcolonias. También analizaron el efecto de una mutación en la cepa *R. leguminosarum* A412 que bloquea el sistema de secreción PrsD-PrsE de tipo I, la interrupción de este gen condujo a una reducción en la formación del biofilm. La mutante desarrolló un biofilm inmaduro, sin las estructuras tridimensionales características. El conjunto de observaciones obtenidas sugieren que el exopolisacárido ácido (EPS/CPS) es esencial para la formación del biofilm y que al menos una o más proteínas secretadas por el sistema PrsD-PrsE tipo I están implicadas en el desarrollo del biofilm maduro en *R. leguminosarum* (Russo *et al*, 2006).

Proteínas extracelulares - Además de los factores Nod y los polisacáridos superficiales, varias cepas de *Rhizobium* secretan una serie de proteínas entre las que se destacan varias proteínas de unión a calcio: NodO, RapA, RapB, RapC y las glicanasas Ply; todas ellas secretadas por el sistema de tipo I PrsDE (Ausmees *et al*, 2001; Krehenbrink & Downie, 2008). PlyA y PlyB son dos glicanasas estrechamente relacionadas entre sí que cumplen un papel importante en la formación del biofilm y que además están implicadas en el procesamiento de los EPS bacterianos (Russo *et al*, 2006; Finnie *et al*, 1998).

NodO fue la primer proteína secretada para la cual se pudo demostrar su rol en la simbiosis. Esta proteína promueve la formación de canales en las membranas lipídicas del

huésped, estimulando el flujo de iones implicados en la simbiosis, y contribuyendo a la nodulación (Walker & Downie, 2000).

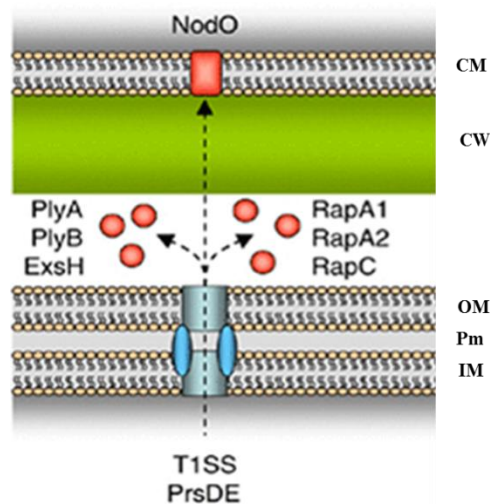
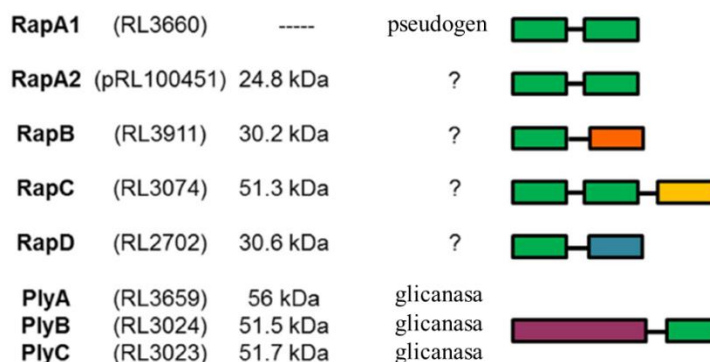


Figura 16. Esquema de las proteínas secretadas (NodO, PlyA, PlyB, ExsH, RapA1, RapA2 y RapC) por el sistema de secreción tipo I (T1SS). CM, membrana celular vegetal; CW, pared celular de la planta; IM, membrana interna bacteriana; OM, membrana externa bacteriana; Pm, periplasma (Fauvart & Michiels, 2008).

Como se mencionó anteriormente, las proteínas secretadas por *R. leguminosarum* juegan un papel muy importante en el proceso de adhesión a los pelos radiculares, especialmente la rihadhesina (Smit *et al.*, 1992). Ausmees *et al* (2001) se propusieron identificar y aislar el gen de la rihadhesina de *R. leguminosarum* utilizando la técnica de *phage-display*. Aunque no lograron aislar el gen, pudieron identificar una familia de proteínas con capacidad de unión a la superficie de *R. leguminosarum*, y decidieron llamarlas proteínas Rap (por *Rhizobial adhering proteins*). Estas proteínas además contienen uno o dos dominios conservados, al que denominaron dominio Ra (*Rhizobium- adhering*). Las glicanasas PlyA, PlyB y PlyC también poseen un dominio Ra en su estructura que está ubicado en el extremo carboxilo-terminal y, por tanto, pueden considerarse como miembros de la familia Rap (Ausmees *et al*, 2001; Abdian *et al*, 2013).

Familia de Proteínas de adhesión (Raps)



R. leguminosarum bv. *viciae* cepa 3841

 Dominio Ra/CHDL

Figura 17. Familia de proteínas Rap en *R.leguminosarum* bv. *viciae* 3841

(P. Abdian, no publicado).

La proteína RapA es la integrante más pequeña de la familia Rap (24 kDa), compuesta por dos dominios Ra, y posee al menos dos isoformas, RapA1 y RapA2. RapA1 fue identificada por Ausmees *et al* (2001) y caracterizada como una proteína capaz de unir calcio, con afinidad por la superficie de *R. leguminosarum* y *R. etli*. En ensayos de inmunofluorescencia revelaron que RapA1 se localiza sobre la superficie de la bacteria, predominantemente en uno de sus polos (Ausmees *et al*, 2001). El gen *rapA1* se encuentra próximo al *cluster* de genes implicados en la biosíntesis de EPS, lo que hace suponer una relación entre el EPS y RapA1. En ensayos preliminares utilizando esferas recubiertas con RapA, se pudo comprobar que la preincubación de las esferas con preparaciones crudas de EPS, impedía la aglutinación de células de *Rhizobium*. Por lo tanto, se sugirió que el receptor de RapA1 en la superficie celular podría estar vinculado con el EPS (Ausmees *et al*, 2001).

Por otro lado, Mongiardini *et al* (2008) estudiaron el efecto de la sobreexpresión de RapA1 en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* R200 sobre la adhesión a la raíz del trébol rojo. En este trabajo, pudieron observar que la expresión aumentada de RapA1 favorece la adhesión a la raíz, aunque no se observaron cambios en la nodulación. Estos resultados sugieren que la función principal de RapA1 está relacionada con la adhesión, especialmente en la etapa temprana y la colonización de la raíz.

Curiosamente, el dominio carboxilo terminal (C-terminal) Ra de RapA1 ha sido identificado como un dominio del tipo cadherina (CHDL por *cadherin like*, 110 aminoácidos) presente en una gran variedad de proteínas de superficie no caracterizadas, que podrían estar vinculadas a procesos de adhesión. Las cadherinas son una familia de proteínas de origen eucariota, cuyo dominio extracelular contiene secuencias repetitivas características y son responsables de la adhesión célula-célula a través de un mecanismo dependiente de calcio (Cao *et al*, 2005).

Debido a la similitud estructural entre los dominios Ra/CHDL y al rol que cumplen las cadherinas en procesos de adhesión, Abdian *et al* (2013) investigaron la posibilidad de que RapA mediara interacciones entre células, con un mecanismo similar al descrito para las cadherinas eucariotas. Como modelo de estudio se utilizó RapA2 de *R. leguminosarum bv. viciae* 3841, la única isoforma activa en esta cepa. En este estudio se demostró que RapA2 es estructuralmente similar a las cadherinas y se extendió el número de proteínas con dominios Ra/CHDL a más de 400 proteínas anotadas como posibles proteínas extracelulares o de superficie provenientes de diversos grupos taxonómicos. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que RapA2 no participa en las uniones intercelulares como las cadherinas, sino que esta proteína es una lectina altamente específica que reconoce al exopolisacárido ácido, ya sea como cápsula (CPS) o como exopolisacárido (EPS). Además se comprobó que el calcio modula tanto el plegamiento de RapA2 a su forma nativa, como su capacidad de unión al EPS (Abdian *et al*, 2013).

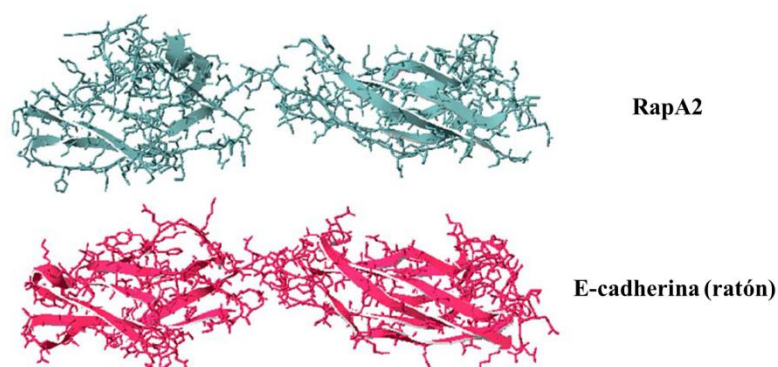


Figura 18. Modelo de la estructura tridimensional de RapA2 basado en el alineamiento estructural con cadherinas eucariotas (Abdian *et al*, 2013).

En un estudio reciente, Vozza, Abdian *et al* (2016) profundizaron en el estudio de RapA e intentaron determinar el rol que cumple durante el desarrollo de la matriz del biofilm. Para ello, estudiaron el efecto que causa una mutación en el gen *rapA2* sobre la matriz de EPS, y también el efecto de la sobreexpresión de la proteína introducida en un plásmido. Observaron diferencias fenotípicas muy evidentes en las colonias sobre medio sólido, lo que sugiere cambios significativos en la organización del biofilm y la matriz. Los biofilms fueron analizados por SEM (*Scanning Electronic Microscopy*) (Fig. 19) lo que permitió observar no sólo la matriz sino también la organización de las células en la estructura del biofilm. La cepa 3841 salvaje desarrolló microcolonias bien organizadas, en las cuales las bacterias se interconectan por una red de matriz extracelular fibrosa. En cambio, las células de la cepa mutante en *rapA2* formaron estructuras compactas y escasa matriz alrededor de las bacterias. Las células que sobreexpresan RapA2, presentaron una estructura de biofilm desorganizada, con espacios intercelulares aumentados y un material de matriz denso y abundante. Los resultados obtenidos revelan que la lectina RapA influye en el ensamblado de la matriz y en la organización de la estructura del biofilm. Este efecto de RapA2 sobre la matriz del biofilm que produce *R. leguminosarum* se debería en principio al efecto que causa la proteína sobre el balance en la producción de EPS/CPS y sobre el perfil de tamaños del EPS (Vozza, Abdian *et al*, 2016).

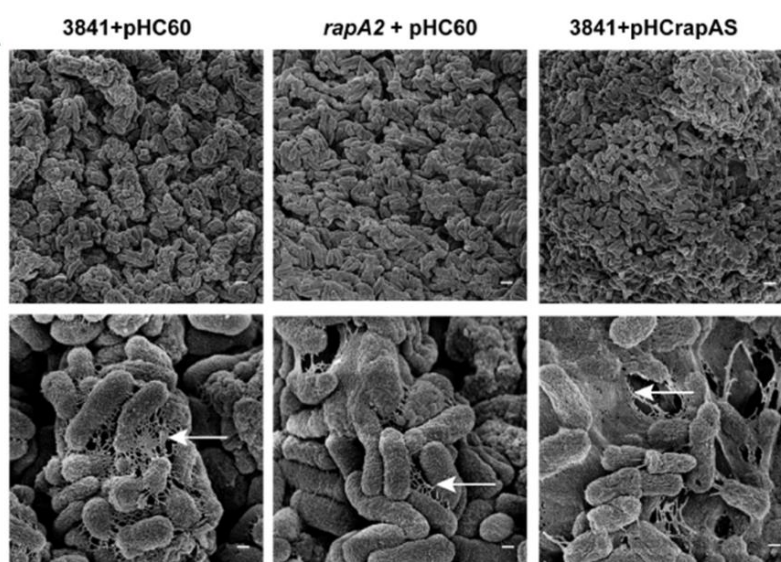


Figura 19. Análisis de biofilms de *R. leguminosarum* por *Scanning Electronic Microscopy* (SEM). De izquierda a derecha; cepa salvaje, mutante en *rapA2*, cepa

que sobreexpresa RapA2. La flecha señala el material de matriz entre las células (Vozza, Abdian *et al*, 2016).

4.9. GFP como herramienta de localización

En 1962 Shimomura y Johnson consiguieron aislar y purificar una proteína bioluminiscente que en presencia de calcio emitía luz azul y decidieron llamarla “aequorina”, nombre derivado de la medusa *Aequorea victoria* con la que trabajaban. Este resultado fue inesperado, ya que la bioluminiscencia de *A. victoria* es verde (Fig. 20) lo que les llevó a identificar una segunda proteína que decidieron llamar “proteína verde”. Profundizando estos estudios pudieron determinar que la proteína verde convertía la emisión azul de la aequorina en verde brillante mediante un proceso de transferencia de energía, sin emisión y reabsorción de radiación (Shimomura *et al*, 1962). En 1969 Hastings y Morin renombraron a la aequorina como "proteína verde fluorescente" o GFP (por *Green Fluorescent Protein*). Más tarde se descubrió que la capacidad de emitir luz verde de la GFP era intrínseca a su estructura y ocurría sin necesidad de factores adicionales (Shimomura, 2005).



Figura 20. Fotografía de medusas *Aequorea* (Shimomura, 2005)

Fue Martín Chalfie quien comprendió que la capacidad de GFP de fluorescer en forma independiente podría usarse para monitorear la expresión de genes y la localización de proteínas en organismos vivos (Fig.21). Chalfie observó que la GFP conservaba su propiedad fluorescente incluso dentro de organismos distintos a la medusa y se convirtió en el primero

que logro expresar con éxito el gen *gfp* tanto en procariontas (*Escherichia coli*) como en eucariotas (*Caenorhabditis elegans*) (Chalfie *et al*, 1994).

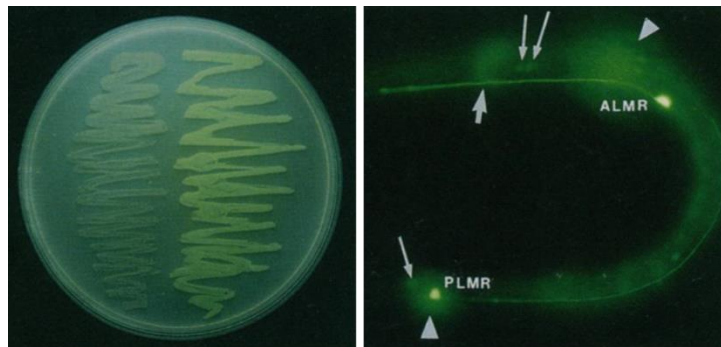


Figura 21. Expresión de GFP en *E. coli* (izquierda) y en *C. elegans* (derecha) (Chalfie *et al*, 1994).

Paralelamente, se estudió como la estructura de la GFP producía fluorescencia verde, profundizando en el conocimiento de sus propiedades y desarrollando numerosas variantes de esta proteína que emitían a distintas longitudes de onda. Así lograron obtener marcadores de distintos colores (Tsien, 1998). Por estos descubrimientos Shimomura, Chalfie, y Tsien fueron galardonados con el Premio Nobel de Química 2008, otorgado en partes iguales a los tres (Pérez Millán & Becu-Villalobos, 2009).

La GFP es una proteína de 238 aminoácidos que forma una estructura de barril beta (Fig. 22). Este barril está formado por 11 cadenas β y una hélice α central que lo atraviesa en toda su longitud. En esta hélice hay tres aminoácidos consecutivos que forman un cromóforo natural, así cuando la GFP es iluminada con luz ultravioleta, emite fluorescencia verde. Es una proteína muy resistente a la desnaturalización y su estructura tridimensional, y consecuentemente la fluorescencia, se mantienen en un amplio intervalo de pH, temperatura y concentración salina.

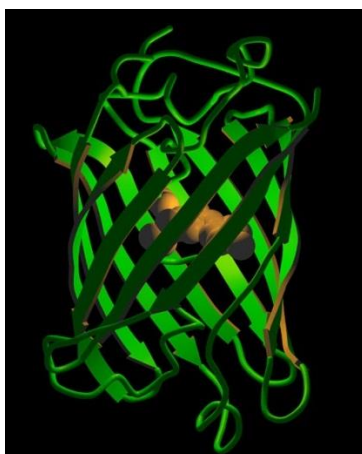


Figura 22. Esquema de la estructura nativa de GFP. Se observan las hojas β (color verde) dispuestas diagonalmente para formar la estructura cilíndrica y el cromóforo en el centro del barril (color naranja) (<http://www.tsienlab.ucsd.edu>).

El descubrimiento de la GFP convirtió a esta proteína en una herramienta fundamental en diversos campos como la microbiología, la ingeniería genética y la fisiología. Una de sus aplicaciones más importante es su utilización como marcador de proteínas. Se demostró que es posible fusionar el gen *gfp* al gen de otra proteína y expresarla en una célula u organismo de interés, obteniendo una proteína de fusión que mantiene las funciones de la proteína original pero también posee una etiqueta fluorescente. Esto hace posible el seguimiento de la proteína en el interior de la célula y su visualización en los procesos biológicos en los que interviene (Wang & Hazelrigg, 1994). Estas fusiones pueden realizarse tanto en el extremo N-terminal o C-terminal de la proteína de interés y generalmente no se comprometen las propiedades fluorescentes de GFP (Tsien, 1998).

Sin embargo, en ocasiones, no es posible realizar la fusión directa de la proteína de interés con GFP ya que puede dar lugar a resultados indeseables, incluyendo mal plegamiento, bajo rendimiento en la expresión, deterioro de las actividades biológicas, etc. En estos casos, para resolver el problema es necesario añadir una secuencia que actúe de nexo o espaciador entre la proteína y GFP (Prescott *et al*, 1999). Estos espaciadores o *linkers* son secuencias de aminoácidos cortas creadas para separar los dominios de la proteína de fusión evitando interacciones no deseadas. La longitud y secuencia del *linker* pueden afectar a la funcionalidad y estabilidad de la proteína de fusión, por lo tanto, su diseño y optimización es un factor a tener en cuenta para preservar la actividad biológica de las proteínas individuales

en el complejo fusionado (Zhang *et al*, 2009). En líneas generales, la longitud puede variar entre 2 y 31 aminoácidos, dependiendo de la construcción en estudio, de modo que el *linker* no imponga ninguna restricción en la conformación y no establezca interacciones con las proteínas involucradas (Reddy Chichili *et al*, 2013). En la actualidad se han desarrollado herramientas bioinformáticas para ayudar al diseño de proteínas de fusión y la selección del *linker* apropiado. Una de estas herramientas es LinkerDB (George & Heringa, 2002), una base de datos de *linkers* extraídos de proteínas naturales que proporciona secuencias candidatas a través de una interfaz de consulta definida por el usuario con respecto a un banco de datos de proteínas (PDB). Otra herramienta, más actualizada que la anterior, es SynLinker (<http://synlinker.syncti.org/>) que contiene cerca de 2150 *linkers* naturales y alrededor 110 espaciadores artificiales (Liu *et al*, 2015).

5. HIPÓTESIS

Habiéndose determinado la función bioquímica de RapA2 y su importancia en la formación de biofilms (Abdian *et al*, 2013; Vozza, Abdian *et al*, 2016) resulta de interés la obtención de una variante de esta proteína marcada con GFP ya que podría ser utilizada como herramienta en el estudio de la formación de los biofilms que desarrolla *R. leguminosarum*. La lectina RapA2 de *R. leguminosarum* es una proteína de 24 kDa, constituida por dos dominios Ra homólogos entre sí, y que muestra una alta especificidad de unión al exopolisacárido ácido que produce esta bacteria. Su plegamiento y su función son dependientes de la unión de calcio. El estudio de los dominios Ra permitirá conocer más en detalle aspectos de la estructura y función de esta lectina. Se intentará localizar el sitio de unión de calcio, que no pudo ser identificado en estudios anteriores (Abdian *et al*, 2013). Una posibilidad es que se localice en alguno de los dominios Ra; o bien se pierda al separar ambos dominios. También es de interés determinar si ambos dominios Ra son necesarios para el reconocimiento y unión al exopolisacárido, o si existe una unidad mínima que conserva las propiedades de la proteína RapA2 completa.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo fue profundizar en el estudio de las propiedades de adhesión de una lectina bacteriana utilizando técnicas bioquímicas y biofísicas, y generar a partir de ella una proteína de fusión que permita su utilización como herramienta para la investigación en la formación de biofilms bacterianos.

6.2. Objetivos Específicos

- Obtener una proteína de fusión con GFP de la proteína RapA2 (pRL100451) de la cepa 3841 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.
- Clonar, sobre-expresar y purificar los dominios Ra (N-ter Ra y C-ter Ra) de la lectina RapA2.
- Evaluar la capacidad de reconocimiento y unión al exopolisacárido ácido (EPS) producido por *R. leguminosarum* de los dominios Ra, utilizando un método de ELISA modificado (BIA).
- Realizar un análisis espectroscópico de los dominios Ra por dicroísmo circular (CD) con el fin de determinar la capacidad de unión de iones calcio y si esto genera un cambio conformacional.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla I.

TABLA I: cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Cepas	Características relevantes	Origen o referencia
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Invitrogen
Plásmidos		
pBT	Vector de clonado; lleva un origen de replicación p15A; codifica proteína lambda-cl bajo promotor <i>lac</i> -UV5, inducible de IPTG; Cam ^R .	Agilent Technologies
pET-22b(+)	Promotor T7; 6X His tag; Amp ^R	Novagen
pET-22b(+) <i>rapA2</i>	Derivado de pET-22b(+) que expresa la proteína RapA2	(Abdian <i>et al</i> , 2013)
pGEM-T Easy®	Vector de clonado T. Amp ^R .	Promega
pHC60	Derivado del pSW213; contiene el gen que codifica <i>gfp</i> ; secuencia estabilizadora RK2; Tet ^R .	(Cheng y Walker, 1998)
pRSET B	Promotor T7; 6X His-tag; epítopo Xpress; sitio de corte de enteroquinasa (EK); Amp ^R	Invitrogen
pTYB11	Vector de clonado y expresión. Amp ^R .	NEB

7.2. Medios y condiciones de cultivo

7.2.1. Medios de cultivo

Las células de *E. coli* fueron cultivadas en medio LB (Luria-Bertani) (Sambrook *et al.*, 1989) a 37 °C, las incubaciones se realizaron durante 12 a 24 horas (salvo cuando se indique de otro modo) y con una agitación de 200 rpm. La composición del medio de cultivo LB se detalla en la Tabla II.

TABLA II: composición de medio de cultivo

Medio LB (g/l)	
Triptona bacteriológica	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	5

LB agar: el medio LB líquido se suplementó con 16 g/l de agar bacteriológico (para el crecimiento bacteriano en medio sólido).

7.2.2. Antibióticos

Cuando fue necesario, los medios de cultivo fueron suplementados con diferentes antibióticos. En la tabla III se encuentra el listado de antibióticos utilizados junto con las concentraciones empleadas.

TABLA III: antibióticos

Antibiótico	Solvente	Concentración	
		Stock (mg/ml)	Final (µg/ml)
Ampicilina (Amp)	Agua	200	200
Cloranfenicol (Cam)	Metanol	25	50
Tetraciclina (Tc)	Etanol 50 %	5	10

7.2.3. Esterilización

Los medios de cultivo, el material de vidrio y de plástico y algunas de las soluciones utilizadas fueron esterilizados en autoclave (30 minutos a 121 °C). Las soluciones que no

podían ser esterilizadas de esta forma fueron esterilizadas por filtración a través de membranas estériles con un diámetro de poro de 0.22 μm (Millipore).

7.2.4. Conservación de cepas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se mantuvieron viables a través de dos métodos, por sembrado en sus correspondientes medios sólidos y conservándolos a 4 °C y por congelamiento de una suspensión de bacterias en glicerol estéril 20% (v/v). Estos *stocks* se conservaron en criotubos a -80 °C.

7.2.5. Inoculación y cultivo de microorganismos

Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y DH5 α se incubaron en placas con medio LB agar a 37 °C. Se inocularon en medio LB líquido estéril con el agregado del antibiótico correspondiente y se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar la DO deseada.

7.3. Amplificación de secuencias mediante PCR

Para los clonados, las secuencias de interés fueron amplificadas mediante PCR. Se utilizaron oligonucleótidos ya existentes en el laboratorio y otros diseñados específicamente para este trabajo. Tanto la enzima *Taq* polimerasa, como la enzima *Pfu* polimerasa fueron provistas por el servicio de Biología Molecular de la Fundación Instituto Leloir (FIL). Todas las amplificaciones fueron realizadas en microtubos de 0.2 ml, en un volumen final de 50 μl . La composición de la mezcla de reacción se muestra en la tabla IV:

TABLA IV: Master Mix PCR

	Volumen (μL)
ADN molde*	2
<i>Buffer</i> 10X	5
dNTPs (10 mM)	1
MgCl ₂ (50 mM)	2,5
<i>Primer</i> For* (10 μM)	1
<i>Primer</i> Rev * (10 μM)	1
<i>Taq/ Pfu</i> polimerasa	1
H ₂ O (MilliQ)	necesaria para

	llevar a volumen
Vol. final	50

* Variaron de acuerdo a la reacción.

Se utilizó un termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer). El programa básico utilizado fue el siguiente:

95 °C	desnaturalización inicial	5'	} 30 ciclos
95 °C	desnaturalización	30''	
56 °C	hibridación	30''	
72 °C	extensión	2'	
72 C	extensión final	5'	

La temperatura de hibridación varió según el par de *primers* utilizado en cada reacción.

7.3.1. Colony PCR

Para el chequeo de los clonados por *colony*-PCR se empleó como molde ADN total proveniente de la lisis de colonias seleccionadas al azar, que fue preparado de la siguiente manera:

- Se picaron colonias con un tip estéril
- Se resuspendieron las bacterias en 50 µl de H₂O Milli Q estéril.
- Se incubaron durante 10 min a 95 °C.

Se utilizaron 2 µl del lisado de células como molde para la reacción de PCR.

7.3.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados se encuentran detallados en la Tabla V. Estos fueron provistos por la empresa Genbiotech SRL (Argentina) y por Invitrogen Life Technologies (USA). Las secuencias reconocidas por enzimas de restricción están subrayadas.

TABLA V: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Primer	Secuencia (5' - 3')	Sitio de restricción
GFP Not For	AAGCGGCCGCAACGGTTTCCTCTAGAAATAATTTTG	<i>NotI</i>
GFP Not Rev	AAGCGGCCGCTGCGCAGCCGGATCCTTTGTATAGTTC	<i>NotI</i>
RapA2 pBT-Xho	AAATCTCGAGAATGGCTTCGCCGATACATGCAACTG	<i>XhoI</i>
FUS For	AAAGGTACCATGGCTAGCAAAGGAGAAG	<i>KpnI</i>
FUS Rev	AAAAGCTTCCTCGAGAGCGTCGGTGCCTG	<i>HindIII</i>
RapA2 For NdeI	GAGGAGAGTCATATGGCTTCGCC	<i>NdeI</i>
Ra1 XhoI Rev	GACCTCGAGTACGCCTTGGATGTTTCAGG	<i>XhoI</i>
Ra2 NdeI For	ATTCATATGACCCAGGTCAAGCCGATCG	<i>NdeI</i>
RapA2 Rev XhoI	GCTGATCACTCGAGAGCGTCGGTGC	<i>XhoI</i>
REVp TrcHisA	GATTTAATCTGTATCAGG	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7t	CTAGTTATTGCTCAGCGG	

7.4. Geles de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (0,8 ó 1,5% p/v), conteniendo 1 µg/ml de Bromuro de Etidio y utilizando como *buffer* de corrida TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA1 mM, pH 8,3) y como *buffer* de siembra (Tris-HCl 20 mM, pH 8; EDTA 2 mM, sacarosa 60% y punta de espátula de colorante Orange G). Los marcadores de peso molecular utilizados fueron provistos por el servicio de Biología Molecular de la FIL (1 kb Móvil y pUC 19/*MspI*). Las electroforesis se realizaron a voltaje constante (100 V). Los fragmentos de ADN fueron observados bajo luz ultravioleta en transiluminador y fotografiados con un sistema digital de adquisición de imágenes acoplado al equipo (White Ultraviolet transilluminator - UVP).

7.5. Aislamiento, purificación y manipulación de ADN

7.5.1. Obtención de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico se utilizó el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las indicaciones suministradas por el proveedor.

7.5.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción (Promega) utilizadas se detallan en la tabla VI:

TABLA VI: Enzimas de Restricción

Enzima	Sitio de Restricción	buffer (10X)
<i>EcoRI</i>	GAATTC	H
<i>HindIII</i>	AAGCTT	MultiCore buffer
<i>KpnI</i>	GGTACC	MultiCore buffer
<i>NdeI</i>	CATATG	D
<i>NotI</i>	GCGGCCGC	D
<i>XbaI</i>	TCTAGA	D
<i>XhoI</i>	CTCGAG	D

Las digestiones se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima de restricción siguiendo las recomendaciones del proveedor. En general, las digestiones se incubaron durante tres horas a 37°C, para asegurar la digestión total. En todos los casos se utilizaron los *buffers* suministrados por el fabricante. En las digestiones dobles se incubaron las enzimas en simultáneo utilizando el *buffer* recomendado.

7.5.3. Purificación de fragmentos de restricción

Después de separar los productos de restricción por electroforesis en gel de agarosa, se visualizaron los fragmentos obtenidos con luz UV en un transiluminador. Con un bisturí se realizó el corte del gel de agarosa, extrayendo los fragmentos de ADN de interés.

Para la purificación de los fragmentos se utilizó el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Se agregaron 10 µL de *Membrane Binding Solution* por

cada 10 mg de corte de gel y se continuó con el protocolo según las indicaciones del fabricante.

7.5.4. Ligación de fragmentos de restricción

Las reacciones de ligación se efectuaron utilizando una relación molar vector/inserto 1:10. El volumen final de la reacción fue de 20 μ L. Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Promega) y el buffer indicado por el proveedor. Se incubó ON en baño de hielo.

Para el clonado de GFP en el vector pGEM-T Easy (Promega) se utilizó el kit comercial *Rapid DNA Ligation Kit* (Promega). Este kit de ligación rápida de ADN contiene todos los reactivos necesarios para realizar el clonado, no se requieren reactivos ni aditivos adicionales. El resultado obtenido de la ligación se puede usar directamente en una transformación convencional. La composición de la mezcla de reacción se muestra en la tabla VII.

TABLA VII: mezcla de reacción del *Rapid DNA Ligation Kit*

Componente	Volumen (μ L)
Rapid Ligation Buffer (2X)	5
Vector DNA (pGEM-T)	1
Insert DNA (producto PCR / GFP)	5
Quick Ligase	1

7.5.5. Transformación bacteriana por electroporación

Para la transformación se mezclaron 50 μ L de células electrocompetentes de *E. coli* con 2 μ L del ADN a introducir. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (BioRad) estéril de 2 mm y se incubó durante unos minutos en hielo. El electroporador utilizado fue el *Gene Pulser Transfection System* (Bio Rad) y las condiciones de electroporación para *E. coli* fueron las siguientes:

Resistencia	200 Ω
Capacitancia	25 μ F
Voltaje	2,5 Kv

Luego de la electroporación, las células fueron resuspendidas en 800 μ L de medio LB estéril e incubadas durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas, se plaqueó en medio selectivo con el antibiótico correspondiente y se incubó a 37 °C, ON.

7.5.6. Selección de células transformadas

Después de la incubación de las células transformadas en medio selectivo, se eligieron 20 clones al azar de placas con colonias bien aisladas. Se repicaron los clones en placas de LB agar suplementado con el antibiótico correspondiente y en simultáneo de esos mismos clones se prepararon templados de ADN para el análisis por *colony* PCR. La identificación de los clones positivos fue realizada a través del análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa, en donde dependiendo del tamaño del producto obtenido se corroboró el clonado del inserto de interés. Algunos de estos clones fueron luego confirmados por secuenciación.

7.5.7. Secuenciación

Se obtuvieron muestras de ADN plasmídico que luego fueron precipitadas con polietilenglicol (PEG) 6%, lavadas con etanol 70% y finalmente resuspendidas en agua. Se midió su concentración en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Las muestras fueron secuenciadas utilizando el kit *BigDye* terminator 3.1 (Applied Biosystems) en un secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems), por el servicio de secuenciación de la FIL.

7.6. Expresión y análisis de proteínas recombinantes

Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con las construcciones pET22b-N-ter Ra, pET22b-C-ter Ra o pRSET-FUS fueron cultivadas en 5 ml de medio LB estéril con Amp, a 37 °C ON. Se inocularon 3 ml de estos pre-cultivos en 250 ml de medio LB con Amp. Los cultivos fueron incubados a 37 °C, con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. Luego se realizó la inducción con el agregado de IPTG a una concentración final de 5 mM. La DO₆₀₀ de los cultivos se midió en un espectrofotómetro Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech). Las células fueron cosechadas por centrifugación (3.000 rpm durante 15 min). La presencia de las proteínas se avalúo por SDS-PAGE seguido por tinción con *Coomassie blue*.

7.6.1. Preparación de extractos celulares

Para la obtención de extractos celulares, se procedió a la lisis de los cultivos inducidos como se describió en el apartado anterior. Para ello, las células fueron re-suspendidas en 2 ml de *buffer* de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 0,5 M; imidazol 10 mM; PMSF 1mM). Se realizaron 3 pasajes del cultivo a través de una French press (SLM AMINCO) a 20.000 psi. El extracto se obtuvo por centrifugación del lisado a 5.000 rpm durante 15 min, a 4 °C.

7.6.2. Fraccionamiento subcelular

Para obtener las fracciones subcelulares, los extractos obtenidos por ruptura en French Press fueron centrifugados sucesivamente a 5.000, 12.000 y 45.000 rpm, durante 30 min o 1 h. El sobrenadante obtenido de la última centrifugación corresponde a la fracción soluble de *E. coli*. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C. Muestras de cada fracción (pellet y sobrenadante) fueron resuspendidas en *loading buffer* (Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 4%; Glicerol 20%; DTT 0,2 M; Azul de Bromofenol 0.02%) y analizadas por SDS-PAGE.

7.6.3. Electroforesis de proteínas

Para el análisis de proteínas se utilizó un sistema de geles desnaturante (SDS-PAGE) (Laemmli UK, 1970). Las muestras fueron resuspendidas en *loading buffer* y calentadas a 100 °C por 5 min, luego fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en un equipo Mini PROTEAN® System (Bio-Rad). La composición de los geles se describe a continuación (Tabla VIII):

Tabla VIII: composición de geles SDS PAGE

Solución stock	stacking	separador
Tris HCl 3M pH=8,45	–	1,66 ml
Tris HCl 0,41 M pH= 7,5	0,77 ml	–
Acrilamida	0,25 ml	1 ml
Glicerol	–	0,66 ml
SDS 10 %	30 µL	50 µL
H ₂ O MQ	1,92 ml	1,61 ml
TEMED	1,5 µl	2,5 µl

PSA 10 %	15 μ L	25 μ L
Volumen final	3 ml	5 ml

La composición del *buffer* de corrida fue: 3 gr de Tris; 14,4 gr de glicina; 1,0 gr de SDS por litro. Para la tinción se incubó el gel en una solución de *Coomassie brilliant blue* R250 0,1 %, y ácido acético 10 %. Los geles fueron desteñidos mediante lavados sucesivos con una solución de ácido acético al 7 %.

7.6.4. Western blot

Las proteínas previamente separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de PVDF (Amersham) por electrotransferencia en buffer CAPS 50 mM con metanol al 10%, utilizando un equipo de transferencia semi-seca (Hoeffer). Luego, del bloqueo con BSA 5% en TBST (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; Tween-20 0.05%), las proteínas fueron reveladas por el agregado del anticuerpo comercial anti-6xHistag (SIGMA).

7.7. Purificación de N-ter Ra y C-ter Ra

Para la purificación de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra se partió de los sobrenadantes de 45.000 rpm (fracción soluble) obtenidos de cultivos celulares (250 ml) de las cepas BL23(DE3)/pET22b-N-terRa o BL23(DE3)/pET22b-C-terRa. La purificación de los dominios Ra se realizó en dos pasos de purificación que se describen a continuación.

7.7.1. Cromatografía de afinidad por cationes divalentes

Las fracciones solubles de cultivos de *E. coli* BL21(DE3) que sobreexpresan los dominios Ra fueron sembradas en columnas Ni-NTA HiTrap Chelating column (GE Healthcare) de 1ml acopladas a un equipo de HPLC (Jasco). Las columnas fueron equilibradas con *buffer* A (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 0,5 M, Imidazol 10 mM), hasta alcanzar línea de base estable. Se inyectaron 2 ml de muestra, luego, las proteínas fueron eluidas con un gradiente continuo de 0 a 100% de *buffer* B (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 0,5 M; Imidazol 500 mM), en 40 minutos. La inyección se realizó a un flujo de 0,5 ml/min, mientras que el lavado y el gradiente a un flujo de 1 ml/min. La elución de las proteínas fue monitoreada por absorbancia a 280 nm.

7.7.2. Cromatografía de exclusión molecular

Las muestras correspondientes a los dominios N-ter Ra o C-ter Ra eluidas de IMAC fueron concentradas por ultrafiltración (10,000 MWCO Amicon Ultra, Millipore) hasta obtener un volumen de 500 μ L. Luego se inyectaron en una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences) acoplada a HPLC, equilibrada previamente con *buffer* (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 150 mM). La elución de las proteínas fue monitoreada por absorbancia a 280 nm.

Las fracciones colectadas de ambos pasos de purificación fueron analizadas por SDS-PAGE, seguido por tinción con *Coomassie blue*, como se describió.

Para los ensayos de dicroísmo circular (CD) fue necesario realizar un paso adicional de purificación. Con el objetivo de eliminar trazas de calcio que pudieran interferir en el ensayo de CD, se procedió a incubar 500 μ L de las proteínas N-ter Ra y C-ter Ra purificadas, con EGTA a una concentración final de 10 mM durante 1½ hora en hielo. Luego fueron re-purificadas en Superdex S-75.

7.8. Análisis de proteínas por Dicroísmo Circular (CD)

Se realizaron medidas de CD en el UV lejano de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra purificados, en presencia de distintas concentraciones de calcio. Las mediciones se realizaron en un espectropolarímetro (CD spectrometer, Jasco J-815) equipado con un sistema Peltier de control de temperatura. Se utilizaron cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 mm, todos los espectros se registraron a una temperatura de 25 °C. Las mediciones se realizaron en buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0; con el agregado de CaCl₂ a las concentraciones indicadas. Las proteínas fueron diluidas hasta una concentración de 25 μ M. Primero, se midieron los espectros entre 195 y 250 nm, en ausencia y presencia de calcio 1 mM. Luego, se realizaron titulaciones con el agregado de concentraciones crecientes de calcio a una longitud de onda fija de 208 nm. Cada espectro o cada medición es el promedio de siete registros para reducir el ruido.

7.9. Ensayos de *ELISA*

La unión de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra al exopolisacárido se caracterizó a través de un método de *ELISA* modificado (Abdian *et al* 2013). Previamente fue necesario poner a punto las condiciones de la prueba, se ensayaron distintas concentraciones de EPS inmovilizado en la placa (100, 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$) y en las pre-incubaciones. Se determinó una concentración óptima de EPS inmovilizado en placa de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Se utilizaron placas *multiwell* de 96 pocillos (Microlon 600, Greiner bio-one). Como control positivo se utilizó la lectina RapA2 pre-incubada o no con el EPS ácido que produce *R. leguminosarum* 3841. Como control negativo las proteínas fueron preincubadas con xantano (polisacárido extracelular ácido producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* B-1459). También se realizaron controles sin el agregado del anticuerpo primario. Como blanco de reacción se realizaron incubaciones sin el agregado de proteína (dominios Ra o lectina RapA2). En las pre-incubaciones, el EPS y el xantano se ensayaron en diluciones seriadas al décimo, partiendo de una concentración inicial de 100 $\mu\text{g/ml}$. Se realizaron dos ensayos independientes, ambos por triplicado.

Para la inmovilización el EPS resuspendido en *buffer* carbonato (50 mM carbonato de sodio, pH 9,7) fue incubado en los pocillos de una placa *multiwell* a 4 °C, ON. Los lavados se efectuaron con PBS o PBST, y el bloqueo con PBS-BSA 1%, durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se agregaron 100 μl /pocillo de la proteína a evaluar (pre-incubada con el exopolisacárido o no, según corresponda). Como anticuerpo primario se utilizó Anti-6xHistag producido en ratón (SIGMA) diluido 1/4.000 en PBST. El anticuerpo secundario fue Anti-mouse IgG conjugado a fosfatasa alcalina (SIGMA), diluido 1/30.000 en PBS-T. Para el revelado, se agregaron 100 μl de solución de 4-nitrophenil fosfato (1 mg/ml) en *buffer* (Tris-HCL 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM; pH 9,5). La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de *ELISA* (Microplate Reader, BioRad Modelo 550). En la Figura 23 se muestran los esquemas de las incubaciones en placas de *ELISA*, realizadas para la medición del *binding* a EPS.

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																						
A	N-ter Ra con EPS											Sin																						
B												N-ter Ra con xantano											r											
C																							RapA2 con EPS											o
D																																		RapA2 con xantano
E	N-ter Ra sin pre incubación						N-ter Ra sin anticuerpo 1rio																											
F	C-ter Ra sin pre incubación						RapA2 sin pre incubación																											
G																																		
H																																		

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12											
A	C-ter Ra con EPS											Sin											
B												C-ter Ra con xantano											r
C																							RapA2 con EPS
D												RapA2 con xantano											
E	C-ter Ra sin pre incubación						C-ter Ra sin anticuerpo 1rio																
F	C-ter Ra sin pre incubación						RapA2 sin pre incubación																
G																							
H																							

Figura 23: Esquemas de las incubaciones realizadas en las placas de ELISA para los dominios A) N-ter Ra y B) C-ter Ra.

7.10. Programas utilizados para el análisis de secuencias

Las secuencias de los genes a clonar se obtuvieron de bases de datos disponibles en la web (Kegg genome, <http://www.genome.jp/kegg>).

Las secuencias de ADN fueron almacenadas y analizadas utilizando el programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen Life Technologies). Este programa se utilizó para evaluar sitios de corte para enzimas de restricción, diseño de *primers* específicos, y para realizar las predicciones de productos y condiciones óptimas para PCR.

Para el análisis de los resultados de secuenciación se utilizó el programa Chromas Lite 2.1, y el programa ClustalW 2.1 (<http://www.clustal.org/>) se utilizó para obtener alineamientos múltiples. Los análisis estadísticos se hicieron utilizando el programa Sigma Plot 11.0.

8. RESULTADOS

8.1. Obtención de la proteína de fusión GFP-RapA2

8.1.1. Diseño y obtención de la construcción para la sobreexpresión de la proteína de fusión.

El primer objetivo que nos propusimos en este trabajo fue obtener una proteína de fusión con GFP de la lectina RapA2 con el fin de generar una herramienta para la visualización de la matriz de los biofilms que desarrolla la cepa 3841 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Para lograrlo, nos planteamos una estrategia en varios pasos. El primero fue la amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína GFP utilizando como molde el plásmido pHC60 y *primers* específicos con sitios de corte para la enzima *NotI* (Fig. 24).

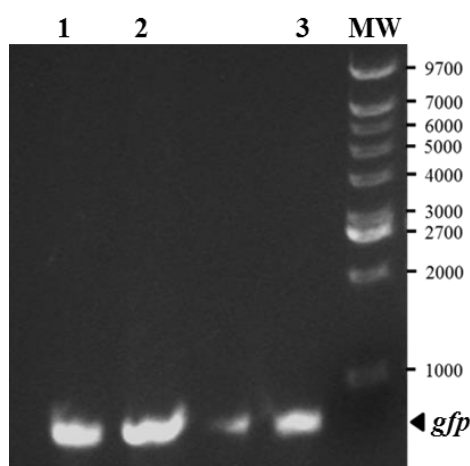


Figura 24. Amplificación del gen *gfp* por PCR. Calles 1, 2 y 3; 5 μ l del producto de PCR. MW, marcador de peso molecular

El siguiente paso fue subclonar la secuencia de *gfp* amplificada en un plásmido (pTYB11) que aporte una secuencia espaciadora y que haga de *linker* entre GFP y RapA2, para que ambas proteínas puedan plegarse a su forma nativa de manera independiente. De esta manera se intenta minimizar la interacción entre las proteínas, ya que esto podría afectar negativamente la actividad de lectina de RapA2 y/o la fluorescencia de GFP.

La banda correspondiente a *gfp* fue cortada del gel y purificada con un kit comercial tal como se describió en Materiales y Métodos. Luego de varios intentos fallidos por clonar directamente *gfp* en el sitio *NotI* del plásmido pTYB11, el gen fue subclonado en el vector

pGEM-T-Easy. Células de *E. coli* DH5 α fueron transformadas con el producto de la ligación. Para la selección de los clones positivos se prepararon placas con medio selectivo conteniendo IPTG y X-Gal. Aproximadamente el 50 % de los clones obtenidos fueron positivos (colonias blancas). Dos de estas colonias se inocularon en medio LB con ampicilina para su preservación en glicerol y posterior extracción del plásmido utilizando un kit comercial. La presencia del inserto *gfp* fue comprobada por digestión del ADN plasmídico con la enzima *NotI*. La enzima *NotI* posee dos sitios de corte situados uno a cada lado del sitio de inserción en pGEM-T Easy. Por lo tanto, como producto de la digestión se espera obtener dos bandas: una de aproximadamente 3 kb correspondiente al vector y otra de 839 pb correspondiente al inserto *gfp* liberado (Fig. 25). Por otro lado se efectuó la digestión del plásmido pTYB11 con la enzima *NotI*, que posee un solo sitio de corte para esta enzima, obteniendo una banda de 7.4 kb (Fig. 25).

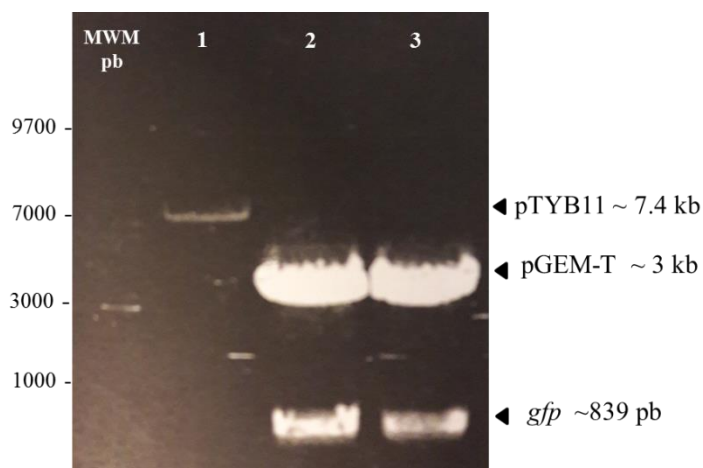


Figura 25. Productos de digestión con la enzima *Not I* para el clonado de *gfp* en pTYB11. MW, marcador de PM; calle 1, digestión del plásmido pTYB11; calles 2 y 3, digestión de la construcción pGEMT Easy-*gfp*

La banda correspondiente a *gfp* fue cortada y purificada del gel. Con los productos obtenidos se efectuó la ligación entre *gfp* y pTYB11. El producto de la ligación fue introducido en bacterias electrocompetentes *E. coli* DH5 α .

Para la selección de los clones positivos se prepararon placas con medio selectivo y se plaquearon diluciones seriadas de las células transformadas. Luego, de las placas que resultaron en colonias aisladas se seleccionaron 20 clones al azar que se analizaron por *colony*-PCR para identificar los clones positivos que contienen la construcción pTYB11-*gfp*

utilizando los *primers* específicos que amplifican la secuencia de *gfp*. En la Figura 26 se muestra el resultado de la *colony*-PCR. Se obtuvieron cuatro clones positivos (clones 2, 7, 12 y 14). Como control positivo se utilizó el plásmido pHC60 que contiene a *gfp* y sirvió de templado y como control negativo no se adicionó templado. Es importante señalar que los clones positivos fueron seleccionados por la intensidad de la banda correspondiente al producto amplificado ya que, como producto de la reacción de PCR, se obtuvo en todos los clones (incluido el control negativo) otro producto inespecífico del mismo tamaño que el producto *gfp* amplificado (~800 pb) (Fig. 26). Su aparición probablemente se deba a la contaminación del agua o de alguno de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción.

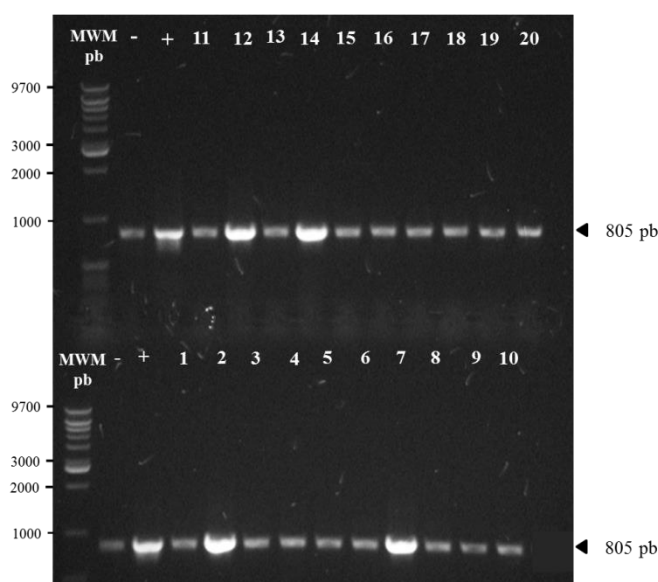


Figura 26. Chequeo del clonado de *gfp* en pTYB11. MW, marcador de PM 1 kb Móvil, (-) control negativo, (+) control positivo, 1 a 20, clones analizados por *colony* PCR.

Con el objetivo de chequear la correcta orientación del inserto *gfp* en el vector pTYB11 las colonias positivas correspondientes a los clones #7 y #14 se inocularon en medio LB con antibiótico, se extrajo el ADN plasmídico y se digirió con la enzima *Xba*I. Si el inserto *gfp* está orientado en la dirección correcta se espera obtener dos bandas: una de 6548 pb y la otra de 1666 pb, mientras que de lo contrario, el producto de la digestión con *Xba*I, dará dos fragmentos, uno de 5800 pb y otro de 2400 pb.

En la Figura 27 se muestra el resultado obtenido, donde puede observarse que en los dos clones analizados (#7 y #14), la digestión de la construcción con *XbaI* resultó en dos fragmentos de 6,5 y 1,6 kb por lo que en ambos clones el inserto está orientado correctamente.

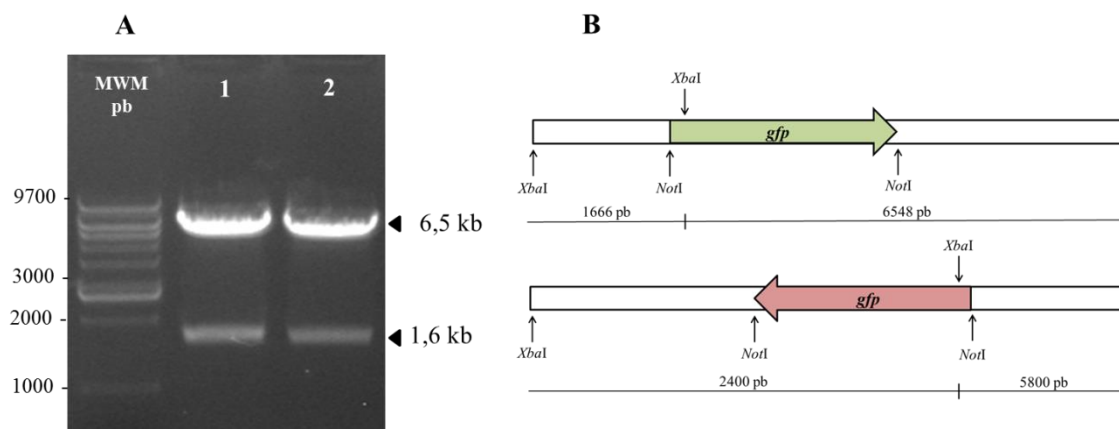


Figura 27. Chequeo de la orientación del inserto en la construcción pTYB11-*gfp*. A) Gel de agarosa con productos de digestión con *XbaI* de los plásmidos obtenidos de los clones #7 (calle 1) y #14 (calle 2). MWM) Marker 1kb Móvil. B) Esquema de los fragmentos esperados luego de la digestión con la enzima *XbaI*, según la orientación del inserto.

Dado que la secuencia de *gfp* amplificada posee sitios de corte para la enzima *NotI* y que el plásmido pGEMT Easy donde se subclonó aporta sitios de corte para esta enzima, fue necesario secuenciar la construcción pTYB11-*gfp* para asegurarnos que la digestión de pGEMT Easy-*gfp* para liberar el inserto haya sido total, ya que si el inserto liberado incluyera uno o ambos sitios *NotI* del pGEMT Easy, se cambiaría el marco de lectura. La secuenciación de pTYB11-*gfp* con los primers T7t y REVp TrcHisA, mostró que el inserto *gfp* no contiene secuencias remanentes del plásmido donde fue subclonado, que no hay errores en la secuencia y que el inserto *gfp* está en fase con la secuencia del *linker* que se pretende introducir.

Luego de chequear la construcción en pTYB11, se procedió a la amplificación por PCR de *rapA2* con primers específicos que contienen sitios de corte para la enzima *XhoI* (RapA2 rev *XhoI* y RapA2 pBT-*Xho*) utilizando la enzima *Pfu* polimerasa. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa (Fig. 28), se cortaron las bandas correspondientes al producto amplificado y se purificaron con un kit comercial.

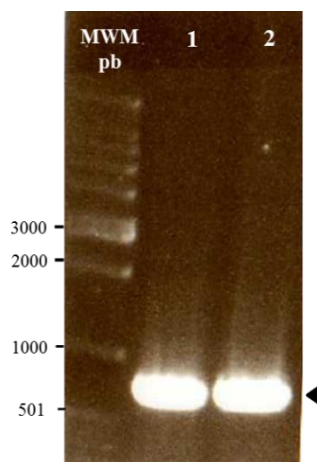


Figura 28. Amplificación de la secuencia de *rapA2* por PCR. MW Marker 1kb Móvil y pUC 19/MspI, calles 1 y 2, siembra de 5 μ l de producto de amplificación. La punta de flecha indica el tamaño del producto esperado.

Una vez purificado el producto *rapA2* amplificado, se realizaron las digestiones de la construcción parcial pTYB11-*gfp* y del inserto *rapA2* con la enzima *Xho*I. Con los productos de digestión se efectuó la ligación con la enzima T4 DNA ligasa ON, tal como se describió en Materiales y Métodos. Los productos de la ligación fueron introducidos en bacterias *E. coli* DH5 α electrocompetentes. Luego se plaquearon diluciones seriadas de las células transformadas en medio selectivo LB agar con antibiótico, se seleccionaron 20 clones al azar y se analizaron por *colony*-PCR, utilizando los primers RapA2 rev *Xho*I y RapA2 pBT-*Xho*. Se realizó un control negativo en el que el templado fue reemplazado por agua, y un control positivo utilizando como templado el cósmido pLAFR3-prom-RapA2 (Vozza, Abdian *et al*, 2016) que contiene la secuencia del gen *rapA2*. De los 20 clones analizados se obtuvo sólo un clon positivo (#20) (Fig. 29).

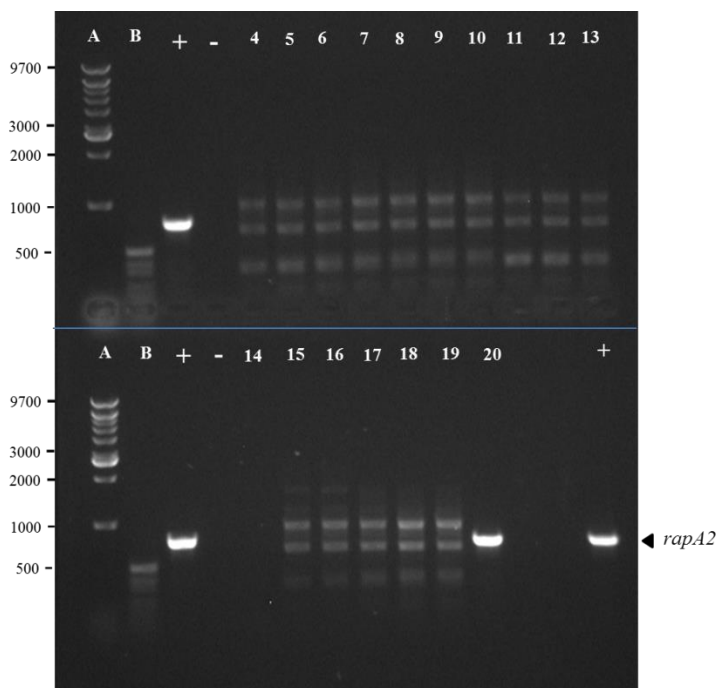


Figura 29. Chequeo del clonado de *rapA2* en la construcción parcial pTYB11-*gfp*. (A) Marker 1kb Móvil, (B) Marker pUC 19/*MspI*, (-) control negativo, (+) control positivo, calles 4 a 20 *colony*-PCR de los 20 clones analizados.

La colonia positiva correspondiente al clon #20 se inoculó en medio LB con antibiótico y se extrajo el ADN plasmídico. Posteriormente, se efectuó una digestión con la enzima *EcoRI* con el objetivo de chequear la correcta orientación del inserto *rapA2* en la construcción. Como producto de esta digestión se espera obtener dos fragmentos, uno de 577 pb y otro de 6800 pb, si el inserto está bien orientado, mientras que en caso contrario, sólo se obtendrá un fragmento de 7,4 kb. En la Figura 30 se puede observar una banda intensa que corresponde a ADN plasmídico no digerido y justo por debajo, una fragmento de entre 6 y 7 kb y otro fragmento de aproximadamente 570 pb. Por lo tanto, el inserto *rapA2* se encuentra en la orientación correcta en la construcción pTYB11-*gfp-rapA2*.

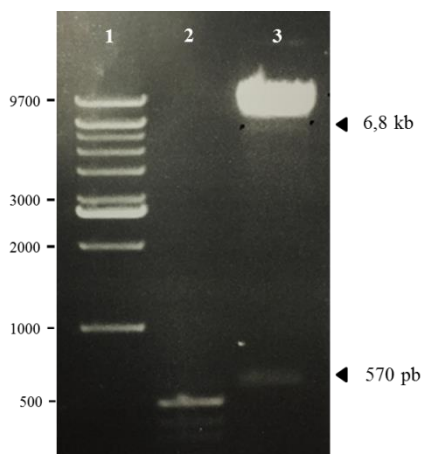


Figura 30. Producto de la digestión de la construcción pTYB11-*gfp-rapA2* con *EcoRI* para chequeo de orientación del inserto *rapA2*. (1) Marker 1kb Móvil, (2) Marker pUC/19 *MspI*. (3) digestión de la construcción pTYB11-*gfp-rapA2*. Las flechas indican el tamaño de los fragmentos obtenidos.

Una vez obtenida la fusión entre GFP y RapA2 con la secuencia *linker* que provee el plásmido pTYB11, se prosiguió al último paso en la obtención de la construcción para la expresión de la proteína de fusión. Utilizando como templado la construcción pTYB11-*gfp-rapA2* se amplificó por PCR la secuencia que codifica para la fusión utilizando la enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase y los primers específicos FUS for y FUS rev que contienen sitios de corte para las enzimas *KpnI* y *HindIII* respectivamente. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1%, y se obtuvieron bandas de 1490 pb, acorde al tamaño esperado (Fig. 31).

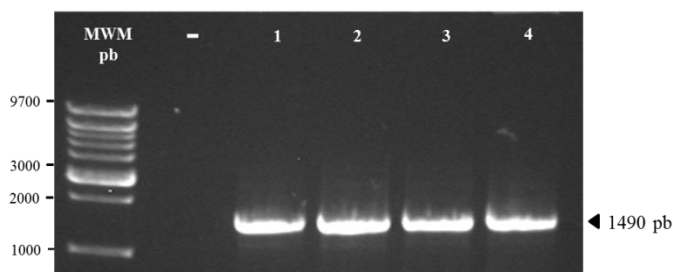


Figura 31. Amplificación de la fusión *gfp-linker-rapA2* utilizando como templado la construcción en pTYB11. MW, Marker 1kb Móvil, (-) control negativo, calles 1 a 4, productos de PCR.

Posteriormente, las bandas de interés fueron cortadas del gel y purificadas con un kit comercial. Con el empleo de las enzimas de restricción *Hind*III y *Kpn*I, se realizó la digestión del fragmento *gfp-linker-rapA2* y del plásmido pRSET-B. Luego se precipitó el ADN digerido y se efectuó la ligación ON. Al día siguiente los productos de la ligación fueron introducidos por electroporación en *E. coli* DH5 α . Luego se plaqueó en medio LB agar con ampicilina, se seleccionaron 15 clones que se analizaron por *colony*-PCR, utilizando los primers FUS for y FUS rev. En la Figura 32 puede observarse que se obtuvieron bandas del tamaño esperado (1500 pb) en la mayoría de los clones analizados.

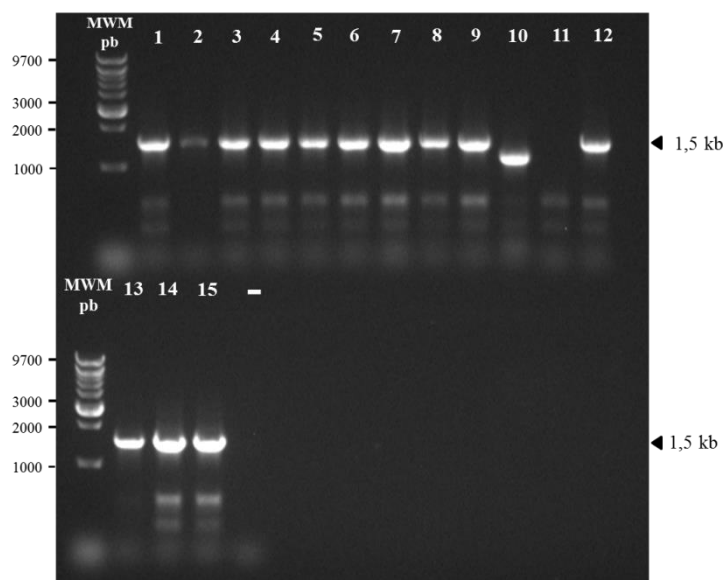


Figura 32. Clonado de la fusión *gfp-linker-rapA2* en el vector de expresión pRSET-B. MW, Marker 1kb Móvil, (-) control negativo, calles 1 a 15 clones analizados. Las flechas indican el tamaño esperado para la fusión.

Las colonias positivas correspondientes al clon #1 y al clon #4 se inocularon en medio LB con antibiótico y se extrajo el ADN plasmídico. Los clones fueron secuenciados con los primers T7 y T7t, confirmando la secuencia correcta en el ORF completo de la proteína de fusión. Con la construcción pRSET-B-*gfp-rapA2* obtenida de los clones #1 y #4 se transformaron bacterias *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes, se realizaron diluciones seriadas de las células transformadas y se cultivaron en placas en medio selectivo con el antibiótico correspondiente a 37 °C, ON.

En la Figura 33 se muestra el esquema final de la construcción del vector de expresión pRSETB-GFP-RapA2 o pRSET-B-FUS obtenido.

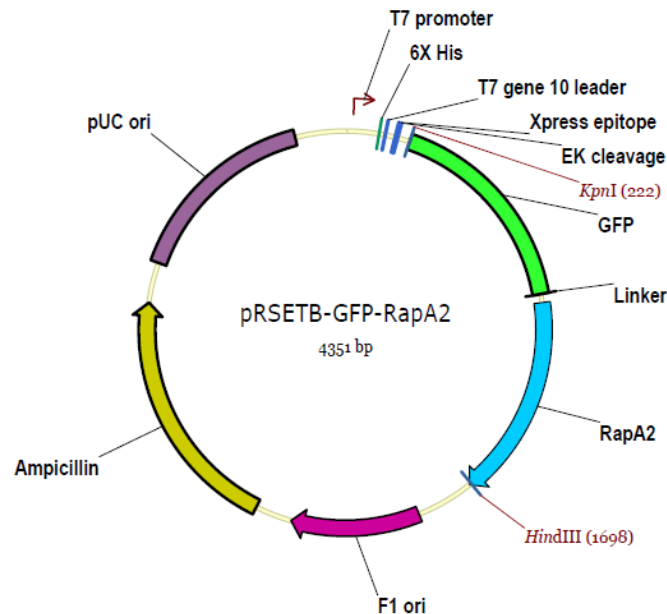


Figura 33. Construcción para la expresión de la proteína de fusión GFP-RapA2 en el vector pRSET-B.

8.1.2. Estudio de la expresión de la proteína de fusión GFP-RapA2

La cepa BL21(DE3) es capaz de expresar genes regulados por el promotor T7, y además contiene el lisógeno del bacteriófago lambda DE3 que codifica para la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. El promotor *lacUV5* es inducible por IPTG, sin embargo debido a la actividad extremadamente alta de la ARN polimerasa T7, puede darse cierta expresión a nivel basal del gen de interés en células no inducidas (Manual Thermo Fisher Scientific, 2010). En la Figura 34 se muestra una placa con colonias de los clones 1 y 4 de la cepa BL21(DE3)/pRSET-B-FUS, donde puede verse que las células del clon #1 poseen una coloración verdosa probablemente debido a la expresión basal de la proteína verde fluorescente, aun en ausencia de IPTG. Esta observación sugiere que la GFP en la proteína de fusión que expresa el clon #1 es capaz de plegarse a su forma nativa y mantiene su capacidad de fluorescer.



Figura 34. Expresión basal a partir de pRSET-B-FUS en *E. coli* BL21 (DE3).

Con los clones #1 y #4 se inició el estudio de la expresión de la proteína de fusión GFP-RapA2. En un principio se probaron condiciones estándar de crecimiento (medio LB líquido, 37 °C, 200 rpm), pero en dos oportunidades se observó crecimiento lento y muerte celular en ambos clones, por lo que concluimos que la proteína de fusión es tóxica para la bacteria, incluso cuando es producida a niveles muy bajos (previo a la inducción). Luego de probar distintas temperaturas de crecimiento, se determinó que ambos clones son capaces de crecer a 28 °C, alcanzando una DO₆₀₀ de 0,6-0,7 luego de 6 hs de cultivo. Posteriormente, se continuó el cultivo de los clones #1 y #4 a 20 °C y 28 °C y se indujeron con IPTG 0,5 mM ON a dichas temperaturas. En la Figura 35 se muestran células del clon #1 incubadas a 20 °C y 28 °C luego de la inducción con IPTG, ON. Se puede observar que a diferencia de las células inducidas a 28 °C, las células inducidas a 20 °C presentan coloración verdosa intensa.

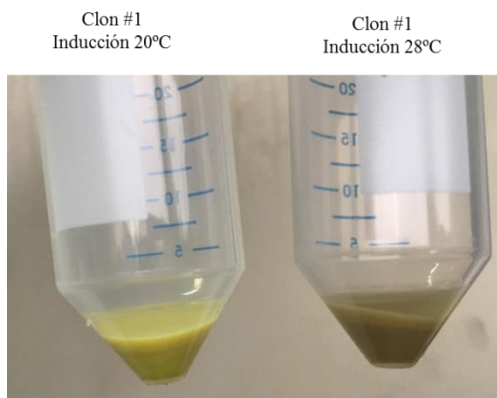


Figura 35. Células del clon #1 de BL21(DE3)/pREST-B-FUS inducidas con IPTG e incubadas a 20 °C y 28 °C.

Se tomaron muestras antes y después de la inducción y se analizó el patrón de proteínas totales por SDS-PAGE y posterior tinción con *Coomassie blue*. La cantidad de proteína total sembrada en cada calle se normalizó por DO₆₀₀. En la Figura 36 se observa la presencia de una banda de sobreexpresión en los cultivos inducidos a ambas temperaturas, el tamaño de esta banda coincide con el esperado para la proteína de fusión GFP-RapA2 (~50 kDa).

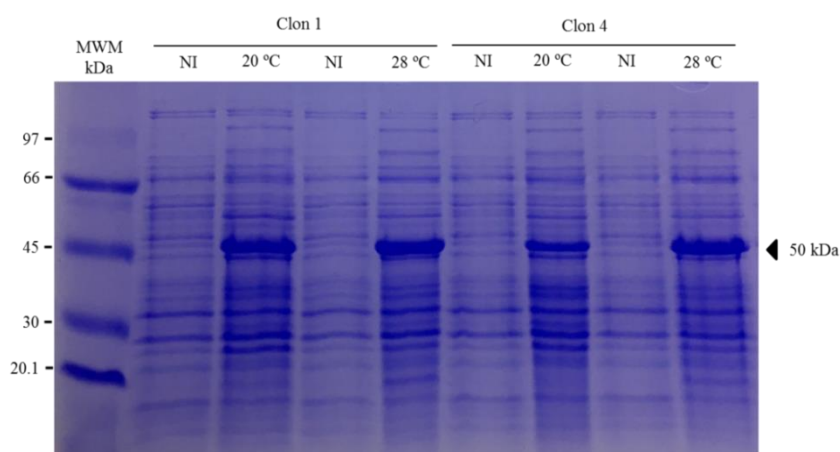


Figura 36. Inducción de la expresión de la proteína de fusión GFP-RapA2 en BL21(DE3). SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*; MW, marcador de peso molecular GE; NI, no inducido; 20 °C, inducción a 20 °C ON; 28 °C inducción a 28 °C ON.

Como la proteína de fusión posee una marca de 6xHis en su extremo amino terminal, se verificó su presencia por western blot. Las mismas muestras que se analizaron por SDS-PAGE (Fig. 36), se sembraron en un gel a una concentración 10 veces menor. El gel fue transferido a PVDF y luego revelado con el Ab-6xHistag (SIGMA) (Fig. 37).

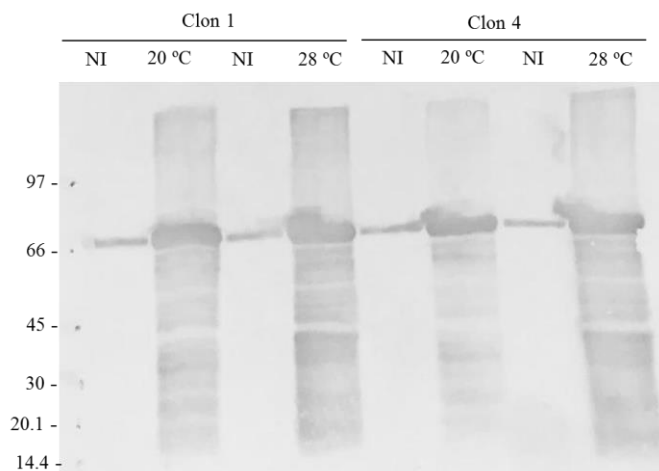


Figura 37. Detección de la proteína de fusión GFP-RapA2 con anticuerpo anti-6xHistag.

La Figura 37 muestra que tanto el clon #1 como el #4 expresan la proteína de fusión con la marca de 6xHis. Incluso en el western blot se detecta la presencia de la proteína en las muestras no inducidas, lo que concuerda con la observación previa de su presencia en los cultivos antes del agregado de IPTG (Figs. 34 y 35). Este resultado además confirma la toxicidad de la proteína de fusión, ya que las células que la expresan a nivel basal estuvieron afectadas en su tasa de crecimiento a 37 °C.

8.2. Estudio de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra

8.2.1. Diseño y obtención de las construcciones para la sobreexpresión de los dominios amino y carboxilo terminal de RapA2.

Uno de los objetivos que nos planteamos en este trabajo fue clonar y sobreexpresar los dominios N-terminal y C-terminal de la lectina RapA2. El propósito de obtener y estudiar los dominios por separado es determinar sus propiedades (por ej., capacidad de unión de iones calcio y de interacción con el EPS, propiedades estructurales) para profundizar en el conocimiento de esta lectina y a la vez establecer si es posible utilizar un fragmento de menor tamaño que sirva como biosensor en el estudio de la formación de biofilms *in vivo*. Para lograrlo, se determinó la extensión de ambos dominios basándose en estudios anteriores (Abdian *et al.*, 2013) y se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar ambos

extremos de la proteína. El dominio amino terminal (N-ter Ra) comprende los aminoácidos 1-118 mientras que el dominio carboxilo terminal (C-ter Ra), los aminoácidos 119-235. Los *primers* fueron diseñados con sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *XhoI* que proporcionaron los extremos requeridos para clonar en el vector pET-22b. Este vector de expresión tiene varias características de interés. Entre ellas, permite producir una proteína recombinante unida por su extremo C-terminal a un péptido de seis histidinas (6xHistag), que facilita su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad por cationes divalentes.

Como templado en las reacciones de PCR se utilizó la secuencia del gen *rapA2* clonado en el vector pET-22b(+) (Abdian *et al*, 2013). Como producto de la amplificación se obtuvieron fragmentos de 350 pb, que coincidieron con el tamaño de los productos esperados (Fig. 38).

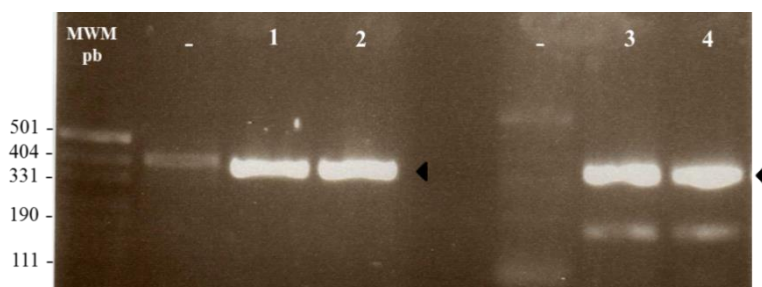


Figura 38. Amplificación por PCR de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra. MW, Marker Móvil pUC19/*MspI*; (-) control negativo; calles 1 y 2, amplificación del dominio N-ter Ra; calles 3 y 4, amplificación del dominio C-ter Ra.

Las bandas correspondientes a los productos amplificados fueron cortadas del gel, purificadas con un kit comercial y clonadas en el vector pET22b. Luego de transformar células *E. coli* DH5 α electrocompetentes con los productos de las ligaciones, se plaqueó en medio selectivo y se comprobó la presencia de los insertos mediante *colony*-PCR, utilizando los primers RapA2 for *NdeI*/Ra1 *XhoI* rev para amplificar N-ter Ra; y Ra2 *NdeI* for/RapA2 rev *XhoI* para amplificar C-ter Ra. En el control positivo se utilizó como templado el ADN plasmídico pET-22b(+)-*rapA2*. En la Figura 39 se observan en ambos geles bandas de 350 pb acorde al tamaño de producto esperado.

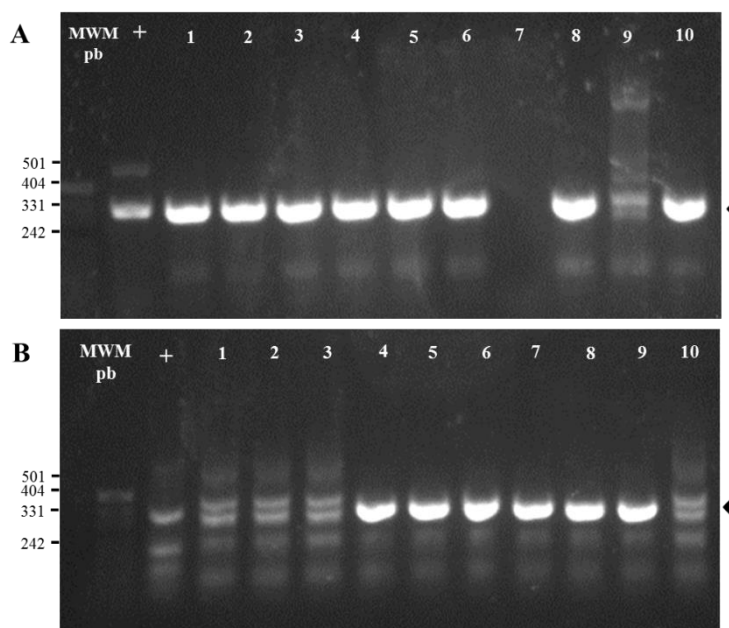


Figura 39. Clonado de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra en pET-22b. **A)** Clones 1 a 10, chequeo del clonado del dominio N-ter Ra. **B)** Clones 1 a 10, chequeo del clonado del dominio C-ter Ra. MW, Marker Móvil 19/*Msp*I; (+) control positivo. La punta de flecha indica el tamaño de los fragmentos esperados en los clones positivos.

Las colonias positivas correspondientes al clon #1 de N-ter Ra y al clon #5 de C-ter Ra se inocularon en medio LB con ampicilina para la posterior extracción de ADN plasmídico y chequeo del ORF completo por secuenciación. Se emplearon los *primers* T7 y T7t provistos por el servicio de secuenciación de la FIL. El análisis se realizó con el programa ClustalW, haciendo un alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia pública de *rapA2* (pRL100451, http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rle:pRL100451). De esta manera se comprobó que las secuencias de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra clonados en pET22b, muestran una correspondencia perfecta con las secuencias correspondientes de pRL100451.

8.2.2. Expresión y localización subcelular de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra.

Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con las construcciones que codifican para ambos dominios de RapA2 fueron cultivadas en medio LB a 37 °C. Al alcanzar la fase de

crecimiento exponencial ($DO_{600} \sim 0.6$) la expresión de los dominios fue inducida mediante el agregado de IPTG a una concentración de 0,5 mM. Se tomaron muestras antes del agregado de IPTG y durante distintos tiempos de inducción, y se analizaron por SDS-PAGE y tinción con *Coomassie blue*. En la Figura 40 se muestra el efecto del tiempo de inducción sobre expresión. Se observan elevados niveles de expresión de ambos dominios a partir de las 2 hs de inducción con IPTG.

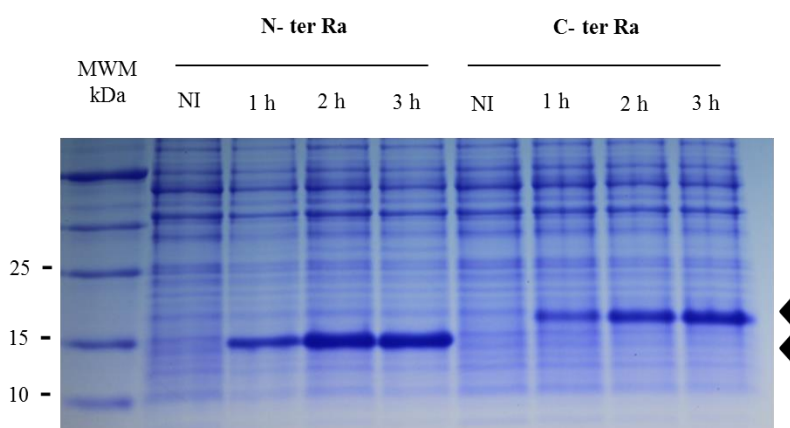


Figura 40. Expresión de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra en *E. coli* BL21(DE3) transformadas con las construcciones pET22b-N-terRa y pET22b-C-terRa . MW, Marcador de peso molecular; NI, no inducido; 1 a 3 h, horas de incubación luego del agregado de IPTG.

Es importante señalar que el dominio C-ter Ra migra en el gel desnaturizante como una proteína de tamaño ligeramente mayor al esperado (13 kDa). Esta diferencia puede deberse a que la proteína no se encuentra totalmente desnaturizada en el gel, siendo éste un comportamiento típico de proteínas que unen calcio (Malhotra & Sahal, 1996).

Luego, se analizó la localización subcelular de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra en la cepa *E. coli* BL21(DE3). Las fracciones resultantes se analizaron por SDS-PAGE (Fig. 41), donde se observó que ambos dominios se localizan mayoritariamente en la fracción soluble.

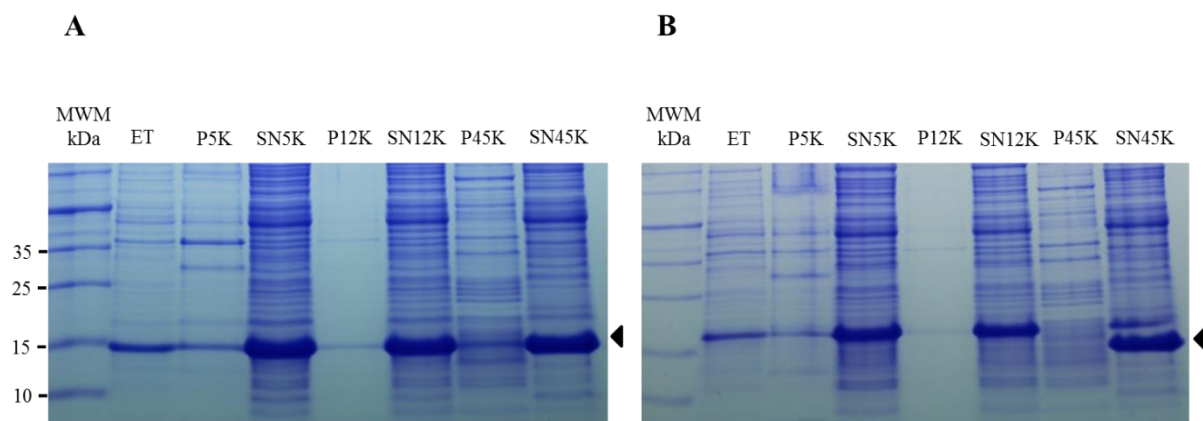


Figura 41. Fraccionamiento y localización (subcelular). **(A)** Domino N-ter Ra. **(B)** Domino C-ter Ra. MWM, Marcador de peso molecular; ET, extracto total; P, pellet; SN, sobrenadante de la centrifugación. 5, 12 ó 45 K corresponden a las velocidades de centrifugación (5000, 12000 ó 45000 rpm). La punta de flecha indica la posición de N-ter Ra y C-ter Ra.

8.2.3. Purificación de los dominios Ra

Los dominios N-ter Ra y C-ter Ra se purificaron en dos pasos: el primero consistió en una cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados (IMAC) y el segundo en una cromatografía de exclusión molecular (S-75) (Figs. 42 y 44), siguiendo el mismo protocolo utilizado para la purificación de la proteína RapA2 completa (Abdian *et al*, 2013). Cabe señalar que debido a que las proteínas presentaban inestabilidad y tendencia a agregar al almacenarlas a 4 °C, fue necesario realizar las purificaciones en varias oportunidades para contar siempre con stocks de las proteínas íntegras para los ensayos estructurales y de actividad posteriores.

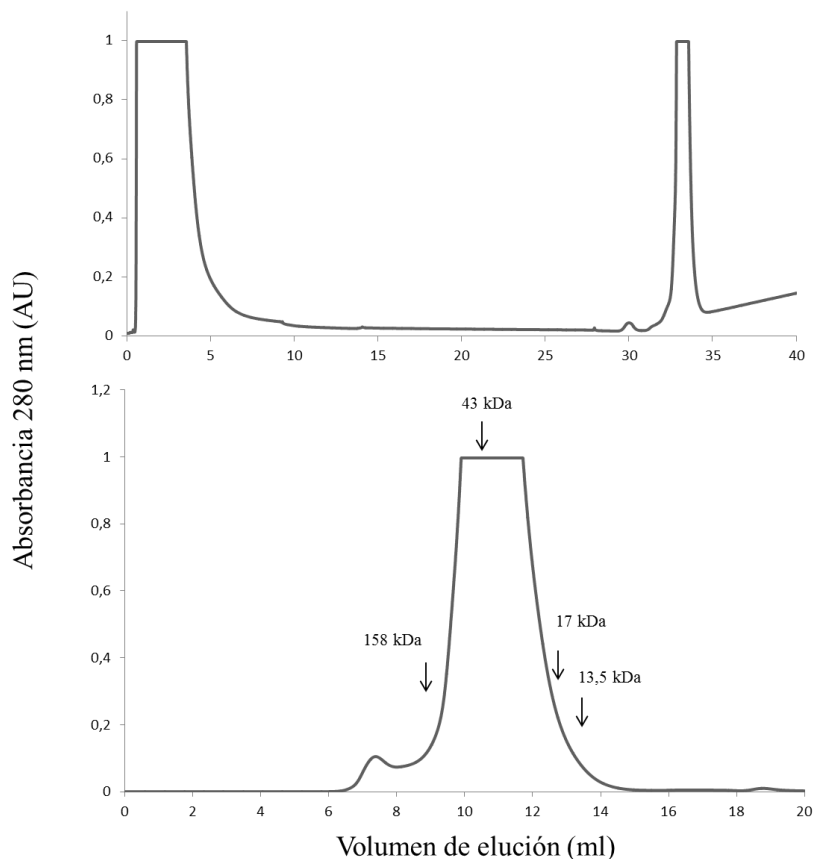


Figura 42. Perfiles de elución del dominio N-ter Ra en el esquema de purificación, IMAC (arriba) y S-75 (abajo). Las flechas en el perfil de cromatografía de exclusión indican posiciones de elución de proteínas marcadoras de peso molecular.

El dominio N-ter Ra eluyó de la columna de afinidad a una concentración de imidazol de 145 mM, mientras que en la columna de exclusión eluyó con un tiempo de retención de 26,6 minutos. Este valor corresponde a una proteína de 43 kDa, según la calibración de la columna con estándares de peso molecular. Sin embargo, el PM predicho para el dominio N-ter Ra es de 13 kDa. Esta diferencia de tamaño podría deberse a que el dominio no se comporta como una proteína globular en la filtración en gel. Las fracciones obtenidas en los pasos de purificación fueron analizadas por SDS-PAGE (Fig. 43).

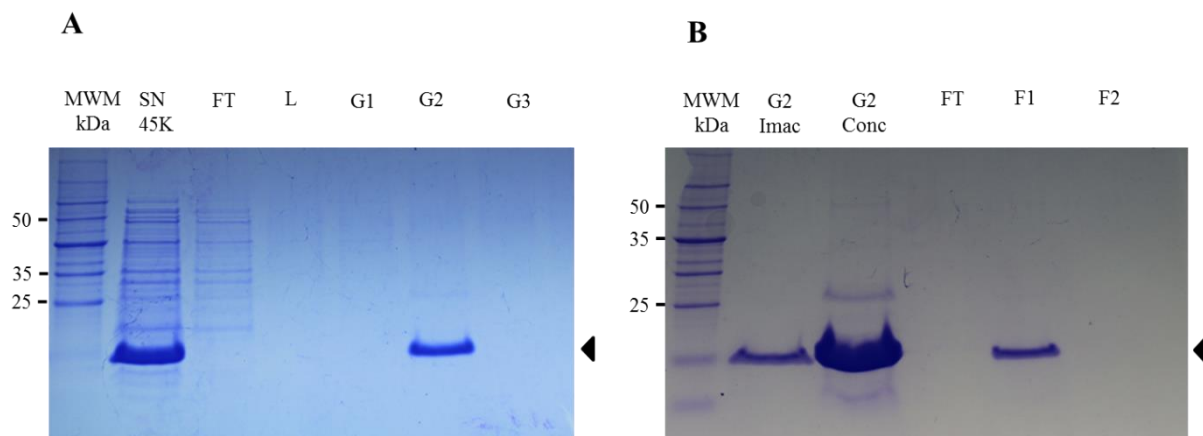


Figura 43. Análisis del esquema de purificación del dominio N-ter Ra por SDS-PAGE. **(A)** IMAC. MWM, Marcador de peso molecular; SN, sobrenadante de centrifugación a 45.000 rpm; FT, *flow through*; L, lavado, G1-G3, fracciones del gradiente con imidazol. **(B)** Filtración en gel por S-75. G2 Imac, fracción del gradiente obtenida por purificación con IMAC; G2 Conc, fracción G2 Imac concentrada 8X; FT, volumen de exclusión; F1 y F2, fracciones eluidas de S-75.

El dominio C-ter Ra fue purificado siguiendo el mismo esquema. Eluyó de IMAC a una concentración de imidazol de 155 mM. Luego esta fracción fue concentrada y purificada en una columna S-75, de la que eluyó mayoritariamente en la fracción F2 (tiempo de retención 28,2 minutos) que corresponde a un PM de 33 kDa (Figura 44). El PM obtenido para el dominio C-ter Ra también difiere del teórico. Como se señaló anteriormente, esta diferencia de tamaño puede atribuirse a que el dominio no se comporte como una proteína globular en la filtración en gel.

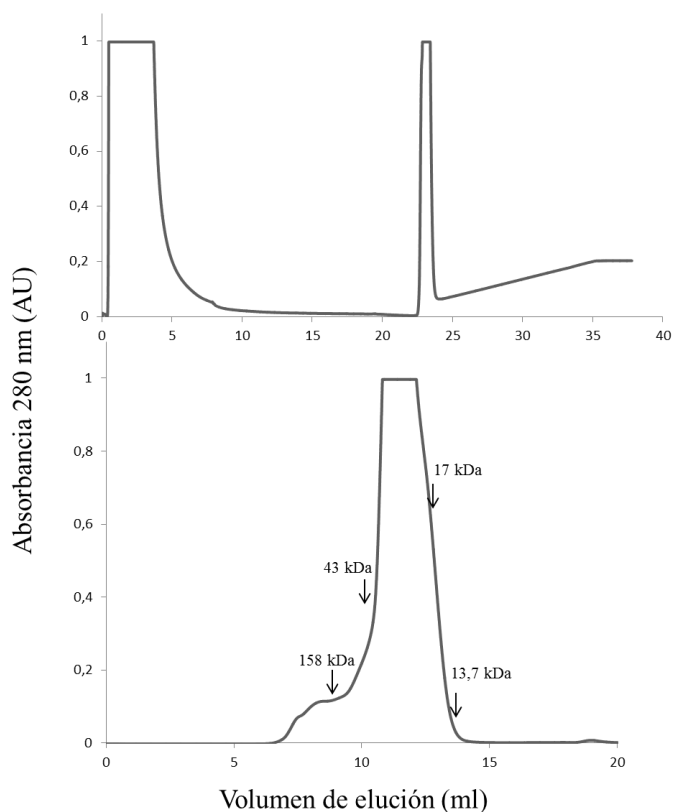


Figura 44. Perfiles de elución del dominio C-ter Ra en el esquema de purificación, IMAC (arriba) y S-75 (abajo). Las flechas en el perfil de cromatografía de exclusión indican posiciones de elución de proteínas marcadoras de peso molecular.

Luego las fracciones eluidas de ambos pasos de purificación del dominio N-ter Ra fueron analizadas por SDS-PAGE y tinción con *Coomasie blue* (Fig. 45).

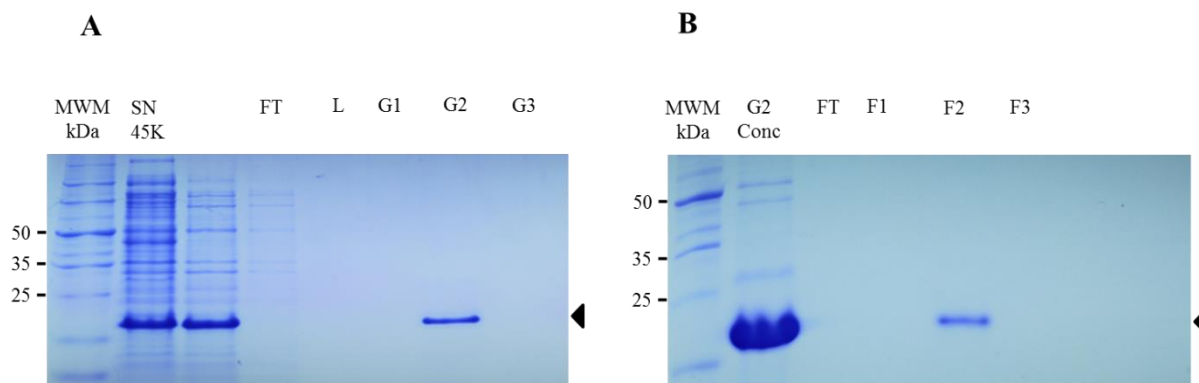


Figura 45. Análisis del esquema de purificación del dominio C-ter Ra. A) IMAC. MWM, Marcador de peso molecular; SN, sobrenadante de centrifugación a 45.000 rpm; FT, *flow*

through; L, lavado, G1-G3, fracciones del gradiente con imidazol. **B)** Filtración en gel por S-75: G2 Conc, fracción G2 Imac concentrada 8X; FT, volumen de exclusión; F1-F3, fracciones eluidas de S-75.

Como ya se indicó en Materiales y Métodos, previo a los ensayos de titulación y diroísmo circular (CD) fue necesario realizar un paso adicional de purificación. Para ello, las fracciones de las proteínas N-ter Ra y C-ter Ra purificadas, fueron incubadas con EGTA con el fin de eliminar de las muestras el calcio residual. Luego fueron re-purificadas por filtración en gel (Fig. 46).

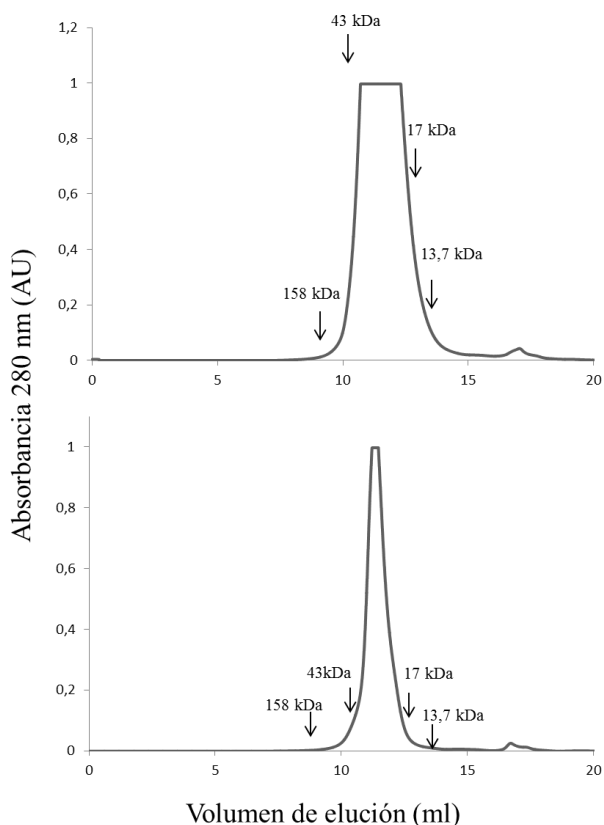


Figura 46. Perfiles de elución en S-75 de N-ter Ra (arriba) y C-ter Ra (abajo) luego de la incubación con EGTA. Las flechas en el perfil de cromatografía de exclusión indican posiciones de elución de proteínas marcadoras de peso molecular.

El domino N-ter Ra eluyó con un tiempo de retención de 27 min que corresponde a un PM de 39 kDa mientras que C-ter Ra eluyó con un tiempo de retención de 28 min que

corresponde a un PM de 34 kDa. Nuevamente puede advertirse que los PM obtenidos para ambos dominios difieren con el teórico de 13 kDa (Fig. 46). Sin embargo, es interesante notar que luego de remover el calcio remanente de las proteínas purificadas, ambos dominios igualan su PM medido, lo que sugiere un cambio conformacional que afectaría el radio hidrodinámico.

Para comprobar la presencia de la marca de 6xHistag en los dominios N-ter Ra y C-ter Ra se realizó un western blot. Se sembraron 2 μ L de las proteínas re-purificadas después del tratamiento con EGTA, el gel fue transferido a PVDF y luego revelado con el anticuerpo comercial Ab-6xHistag (SIGMA) (Fig. 47).

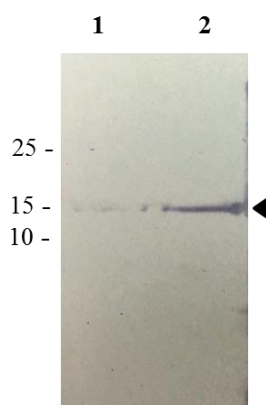


Figura 47. Análisis por western blot de los dominios N-ter Ra (calle 1) y C-ter Ra (calle 2).

El western blot muestra que luego del tratamiento con EGTA ambos dominios corren a un peso molecular similar. Además se confirma la presencia de la etiqueta de poli-histidina, ya que es reconocida por el anticuerpo específico en ambos dominios.

8.2.4. Análisis estructural por Dicroísmo Circular (CD)

El dicroísmo circular (CD) es una técnica espectroscópica de absorción electrónica, que provee información acerca de la estructura de macromoléculas biológicas. Es una de las técnicas más sensibles para determinar las estructuras secundarias de las proteínas y para detectar cambios conformacionales inducidos por las condiciones físico-químicas de la solución (pH, temperatura, presencia o ausencia de un ligando, etc). En las proteínas, el cromóforo que absorbe en el UV lejano (180 a 250 nm) es el enlace peptídico y refleja el

contenido de estructura secundaria. La estructura de hélice α , presenta espectros característicos con dos mínimos a 222 nm y 208 nm, y un máximo intenso a 191 nm. Por otra parte, las proteínas con estructura secundaria β presentan un máximo a 195 nm y un mínimo a 217 nm. En las proteínas que son mezcla de dominios α y β , los espectros son más difíciles de interpretar, mientras que las proteínas sin estructura ordenada presentan de manera característica un mínimo intenso a 200 nm y puede haber algunos máximos o mínimos débiles por encima de 210 nm (Mata Martínez, 2013).

Anteriormente se informó que el plegamiento de la proteína RapA2 y su función, son dependientes de la unión de iones calcio (Abdian *et al*, 2013). Con el fin de determinar si los dominios Ra conservan la capacidad de unir calcio y si éste induce cambios conformacionales en la estructura secundaria, se registraron los espectros de CD en el UV-lejano de los dominios proteicos purificados en presencia y ausencia de calcio (Fig. 48). Los dominios Ra se midieron a una concentración de 25 μ M, estas concentraciones ofrecieron una intensidad adecuada y una buena relación señal/ ruido en las condiciones de medición. Todos los espectros se registraron a temperatura ambiente.

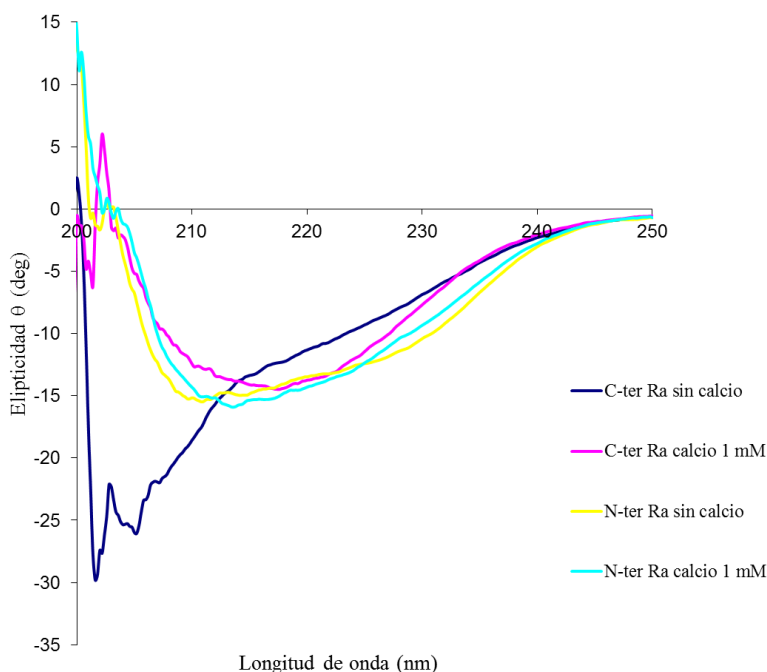


Figura 48. Efecto del calcio sobre la estructura secundaria de los dominios Ra. Superposición de los espectros de CD de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra en el UV-lejano, en ausencia o presencia de calcio 1 mM.

En la Figura 48 se observa que en ausencia de calcio, el dominio C-ter Ra presenta espectros de CD con características similares a los de proteínas desnaturalizadas, con un mínimo cercano a ~201 nm. (Fig. 48, línea azul.). Sin embargo, el agregado de calcio, provoca un cambio pronunciado en el espectro. La proteína presenta un mínimo cercano a ~216 nm lo que indica claramente la adopción de estructura secundaria del tipo β (Fig 48, línea rosa). Este comportamiento del dominio C-ter Ra es idéntico al observado para la proteína RapA2 completa (Abdian *et al*, 2013). Por otro lado, en ausencia de calcio, el espectro de CD del dominio N-ter Ra presenta características de glóbulo fundido (*molten globule*) (Fig. 48, línea amarilla). El glóbulo fundido es un estado intermedio en el proceso de plegamiento de las proteínas que se sitúa entre el estado nativo y el desnaturalizado. En este caso, la adición de calcio no induce un cambio estructural importante, observándose un pequeño corrimiento del espectro, lo que sugiere que la proteína adopta una estructura semi-plegada independientemente de la presencia de calcio en el medio (Fig. 48, línea celeste).

El análisis estructural comparado de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra en presencia y ausencia de calcio sugiere que ambos dominios conservan la capacidad de unir calcio, aunque de forma muy distinta. La unión de calcio no produce un cambio conformacional significativo del dominio N-ter Ra. En cambio, los resultados muestran que la unión del catión induce un cambio conformacional importante en la estructura secundaria de C-ter Ra, adoptando estructura de tipo β . Por lo tanto, el dominio C-ter Ra presenta un comportamiento casi idéntico al de la lectina RapA2 completa en respuesta a la adición de iones calcio.

A continuación, se realizó la titulación de los dominios N-ter Ra y C-ter Ra con el agregado de concentraciones crecientes de calcio, a una longitud de onda fija de 208 nm, con el fin de estimar las constantes de unión. La titulación de los dominios con calcio se comenzó con concentraciones de calcio de orden μM . Sin embargo pronto se advirtió que para poder detectar un cambio en la elipticidad del dominio N-ter Ra serían necesarias concentraciones de calcio de un orden de magnitud superior (mM). Los datos medidos se graficaron y de las curvas se determinaron los valores de las constantes de disociación aparentes (K_D), obteniéndose 67,4 μM y 19,6 μM para los dominios N-ter Ra y C-ter Ra, respectivamente.

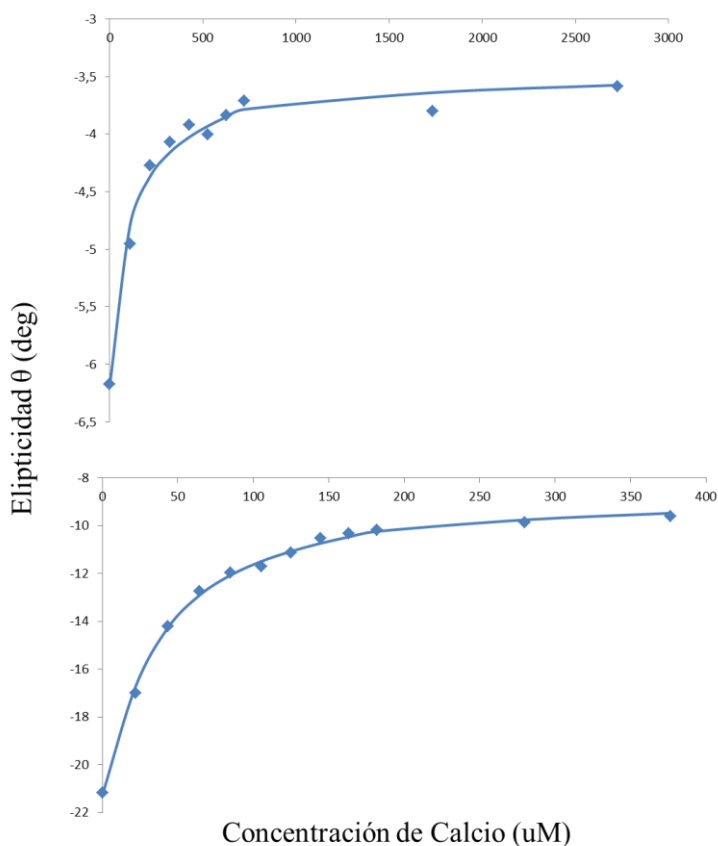


Figura 49. Variación de la elipticidad a 208 nm para N-ter Ra (arriba) y para C-ter Ra (abajo) en función de la concentración de calcio.

Los valores de K_D obtenidos confirman una diferencia en la afinidad por calcio de los dos dominios. Dado que anteriormente se demostró que RapA2 posee un único sitio de unión de calcio y que C-ter Ra mostró una mayor afinidad por este ión, es posible que el sitio de unión de calcio esté localizado en este dominio.

8.2.5. Ensayos de unión al polisacárido

El ensayo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) es una técnica bioquímica utilizada principalmente en inmunología para detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno en una muestra. En términos simples, en ELISA, un antígeno es inmovilizado sobre una fase sólida, luego se aplica un anticuerpo específico sobre la superficie para que pueda unirse al antígeno. Este anticuerpo está ligado a una enzima. Las etiquetas enzimáticas más utilizadas son peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (AP). En la etapa final

se añade un sustrato que la enzima puede convertir a alguna señal detectable, más comúnmente un cambio de color, que puede ser medido espectrofotométricamente. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra analizada (Cultek, 2006). En la Figura 50 se muestra un esquema de los pasos esenciales de un protocolo de ELISA.

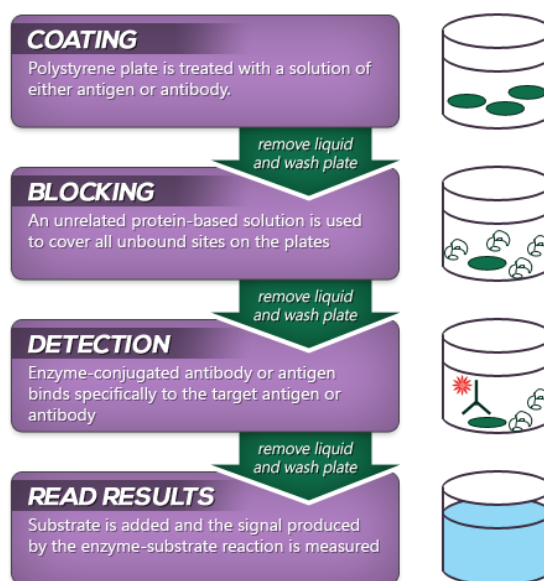


Figura 50. Esquema de un protocolo de ELISA convencional (Boster Biological Technology, 2017).

En este trabajo hemos utilizado una variante de la técnica de ELISA (Abdian *et al*, 2013) para determinar la capacidad de *binding* entre el exopolisacárido ácido (EPS) y los dominios Ra purificados, y en caso de que los dominios presenten actividad lectina, compararla con la actividad de la proteína RapA2 completa. El ensayo BIA (*binding inhibition assay*) consiste en la medición de la unión al EPS inmovilizado en el pocillo de una placa *multiwell*, de la lectina remanente luego de ser incubada con diluciones seriadas del EPS en solución (Fig. 51 A). Para la detección de la lectina unida al EPS inmovilizado, se utilizó el anticuerpo comercial Ab-6xHistag conjugado a AP, y luego de la incubación con el sustrato p-nitrofenil-fosfato, se midió la absorbancia a 405 nm.

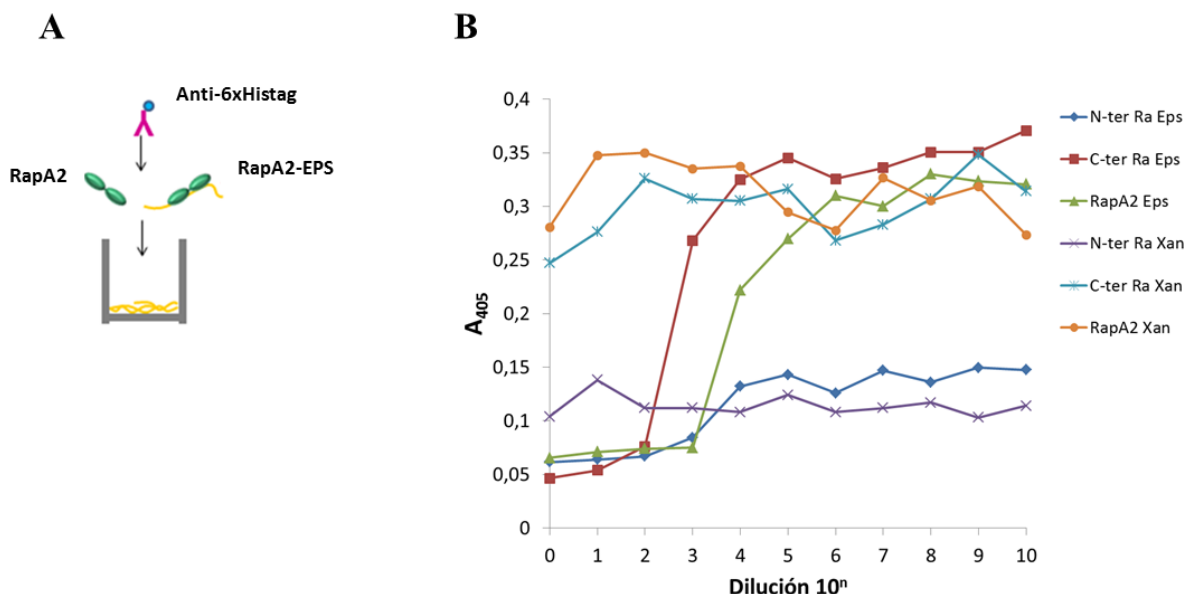


Figura 51. **A)** Esquema del ensayo de inhibición del *binding* (BIA) en el pocillo de una placa *multiwell*. Las hebras en amarillo representan al EPS; la proteína RapA2 con sus dos dominios Ra, en verde; el anticuerpo Ab-6xHistag, en rosa. **B)** Ensayos BIA de los dominios N-ter Ra, C-ter Ra y la proteína RapA2 con diluciones seriadas de EPS y xantano.

Según los resultados obtenidos, se observa que el EPS en solución inhibe la unión del dominio C-ter Ra y de la proteína RapA2 al EPS fijado en el pocillo, esta inhibición es dependiente de la concentración. Aunque ambos se comportan de forma similar, el dominio C-ter Ra presenta un cambio de afinidad en el *binding* a EPS, con un orden de magnitud de diferencia respecto a la lectina completa. Por otro lado, el dominio N-ter Ra no se une al EPS, ni tampoco al xantano utilizado como control negativo. El xantano, otro heteropolisacárido ácido, no es reconocido ni por C-ter Ra, ni por RapA2; lo que confirma la especificidad ya demostrada de RapA2 por el EPS que produce *R. leguminosarum* (Abdian *et al*, 2013) e indica que el dominio C-ter Ra presenta un comportamiento muy similar al de la proteína completa.

9. DISCUSIÓN

9.1. Diseño y obtención de la proteína de fusión GFP-RapA2

En este proyecto nos propusimos obtener una proteína de fusión con GFP de la lectina RapA₂ con el fin de utilizarla como herramienta en el estudio del desarrollo de los biofilms formados por *R. leguminosarum*. Siendo el EPS el componente principal de la matriz del biofilm que producen estas bacterias, la lectina acoplada a GFP servirá para visualizar el EPS/CPS a medida que se va desarrollando el biofilm, desde la adhesión inicial y formación de las microcolonias, hasta la producción de matriz y la constitución del biofilm maduro.

Ciertas lectinas comerciales como la Concanavalina A, la aglutinina de maní (PNA), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), aglutinina de soja (SBA), y otras; han sido utilizadas con éxito en la identificación de glicoconjugados presentes en la matriz de biofilms (Zippel *et al*, 2011) y también en el estudio de la arquitectura del biofilm (Peltola *et al*, 2008). Sin embargo, una desventaja en estos estudios es la baja especificidad de gran parte de las lectinas utilizadas. Por el contrario, la lectina RapA₂, es una lectina dependiente de calcio que interactúa de manera específica con los exopolisacáridos ácidos (EPS/CPS) producidos por *R. leguminosarum*, reconociendo residuos de ácido glucurónico (GlcA) en los polisacáridos (Abdian *et al*, 2013). Ensayos de inhibición del binding de RapA₂ al EPS mostraron que RapA₂ es una lectina específica, ya que es incapaz de unirse a otros polisacáridos de estructura similar, entre ellos el xantano, un heteropolisacárido ácido que contiene residuos GlcA en su unidad repetitiva (Ielpi *et al*, 1993). La especificidad en el reconocimiento del sustrato, es una característica distintiva que le confiere a RapA₂ un valor agregado como herramienta para el estudio de biofilms tanto *in vitro* como *in vivo*.

Para obtener la fusión GFP-RapA₂ se desarrolló una estrategia de clonado en varias etapas, que resultó en una construcción en la que GFP está distanciada de RapA₂ por la inserción de un *linker* de siete aminoácidos. Además la proteína de fusión posee una etiqueta de 6xHis en el extremo amino terminal que facilita la posterior purificación de la proteína por HPLC. Una vez obtenida la construcción, se inició el estudio de la expresión de la proteína de fusión GFP-RapA₂. En condiciones estándar de crecimiento se observó crecimiento lento y muerte celular, lo que sugiere que la proteína podría ser tóxica para la bacteria incluso en ausencia de IPTG, cuando es producida a niveles basales. Después de probar distintas

temperaturas de crecimiento, se determinó que los clones transformados con la construcción son capaces de crecer a 20 °C y 28 °C. La disminución de temperatura, disminuyó la tasa de crecimiento, favoreciendo la expresión de la proteína de fusión (Fig. 35). La observación de un color verdoso en células de la cepa BL21(DE3)/pRSET-B-FUS luego de la inducción con IPTG (Fig. 34) sugiere que la GFP en la proteína de fusión es capaz de plegarse a su forma nativa y de mantener su capacidad de fluorescer, cuando los cultivos son incubados a 20 °C. Por lo tanto, ésta sería la temperatura de elección para producir la proteína de fusión fluorescente.

Con el fin de una eventual purificación de la proteína GFP-RapA2 se verificó la presencia de la etiqueta de 6xHis en el extremo amino terminal por western blot. Además se detectó la presencia de la proteína en las muestras no inducidas, confirmando así la toxicidad de la proteína de fusión, ya que las células que la expresan a nivel basal estuvieron afectadas en su tasa de crecimiento a 37 °C.

Si bien los resultados obtenidos son muy prometedores, consideramos que sería necesario realizar más ensayos para optimizar las condiciones de expresión de RapA2 fusionada a GFP e intentar posteriormente su purificación por HPLC. En futuros estudios podrían realizarse ensayos utilizando otras cepas para la expresión de la proteína de fusión, por ejemplo *E. coli* BL21(DE3)/pLysS que, a diferencia de la cepa BL21(DE3), lleva el gen que codifica la lisozima T7 en el plásmido pLysS. La lisozima T7 reduce el nivel de expresión basal del gen de interés bajo el control del promotor T7, pero no interfiere con el nivel de expresión obtenido tras la inducción por IPTG.

Como resultado del proyecto hemos logrado obtener una nueva herramienta, mediante una construcción que permite la sobreexpresión de la proteína de fusión GFP-RapA2. Los estudios preliminares, sobre la expresión de esta proteína presentados aquí, sugieren que GFP conserva sus propiedades bajo ciertas condiciones de crecimiento del cultivo y probablemente ocurra lo mismo con la actividad lectina de RapA2. Esto último deberá comprobarse en ensayos futuros con la proteína GFP-RapA2 purificada. Se espera que la proteína de fusión obtenida pueda servir como biosensor para el desarrollo de biofilms sobre distintas superficies y para estudios relacionados al ensamblado de la matriz del biofilm que produce *R. leguminosarum*

9.2. Estudio de los dominios Ra de RapA2

R. leguminosarum necesita de la síntesis del exopolisacárido ácido (EPS) y de varias proteínas secretadas por el sistema tipo I PrsDE para desarrollar una estructura de biofilm maduro. Entre ellas RapA2, que reconoce específicamente al EPS ácido y está involucrada en el ensamblado de la matriz del biofilm (Abdian *et al*, 2013; Vozza, Abdian *et al*, 2016). Esta lectina pertenece a la familia de proteínas Rap y como tal, presenta dos dominios Ra/CHDL. En estudios anteriores, se ha demostrado que RapA2 requiere de la unión de iones calcio para su plegamiento y función (Abdian *et al*, 2013). Se determinó por ITC que la proteína posee un sitio único de unión de calcio. Por su semejanza estructural con los dominios extracelulares de cadherinas eucariotas, una posibilidad es que éste se localice en un *loop* entre los dos dominios Ra/CHDL (Fig. 18). Sin embargo, el sitio de unión a calcio no pudo ser identificado por mutagénesis sitio-dirigida de los residuos que podrían estar implicados en la unión. Por otro lado, se había informado que la delección de 34 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la isoforma RapA1 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, anula la capacidad de unir iones calcio (Ausmees *et al*, 2001). Basándonos en estos resultados, nos planteamos la posibilidad de dividir a RapA2 en sus dos dominios constituyentes Ra/CHDL, y estudiarlos como proteínas individuales evaluando la capacidad de unir calcio, sus características estructurales y si conservan la actividad lectina, utilizando como sustrato el EPS.

La obtención de las construcciones para la sobreexpresión de los dominios Ra individuales y su purificación se logró con un protocolo similar al utilizado anteriormente para la proteína RapA2 completa (Abdian *et al*, 2013). Dado que RapA2 adopta una estructura de hebras beta y que su plegamiento depende de la unión de calcio (Abdian *et al*, 2013), los dominios N-ter Ra y C-ter Ra purificados fueron también analizados por difracción circular (CD) en presencia y ausencia de calcio (Fig. 48). Se pudo comprobar que el calcio provoca un cambio pronunciado en el espectro del dominio C-ter Ra, indicando que la proteína desnaturalizada pasa a adoptar estructura secundaria del tipo β , con un comportamiento idéntico al observado para la proteína RapA2 completa. Por el contrario, la adición de calcio al dominio N-ter Ra no induce un cambio estructural importante, la proteína se encuentra en un estado semi-plegado, incluso antes de la adición de calcio. A pesar de ello, se pudo determinar que este dominio posee cierta capacidad de unir calcio. Los valores de las

K_D determinadas por titulación con calcio y medición de la señal de CD, fueron de 67,4 μM y 19,6 μM para los dominios N-ter Ra y C-ter Ra, respectivamente. Comparando con una K_D de 40 μM estimada para RapA2, no se observan diferencias marcadas entre los valores medidos.

Dado que mediante la técnica de ITC se determinó que RapA2 posee un único sitio de unión de calcio (Abdian *et al*, 2013) y que los resultados obtenidos en este proyecto sugieren que el dominio C-ter Ra posee mayor afinidad por calcio, aún más que la proteína entera, proponemos que el sitio de unión de calcio está localizado en este dominio.

Por último, la actividad lectina de ambos dominios se evaluó utilizando su forma purificada en un ensayo de ELISA modificado (BIA) (Abdian *et al*, 2013). El propósito de estos ensayos fue determinar la capacidad de *binding* entre el exopolisacárido y los dominios Ra aislados, para así determinar si la actividad lectina se restringe a un dominio particular o son necesarios ambos dominios para el reconocimiento y unión al sustrato. En los ensayos realizados se observó que el dominio C-ter Ra conserva la capacidad de unión al EPS, aunque con una afinidad un orden de magnitud menor al de la proteína RapA2 completa. Por el contrario, los resultados muestran que el dominio N-ter Ra, no posee capacidad de unión al EPS por sí mismo. Antes de comenzar este trabajo, nuestra hipótesis era que los dominios N-ter Ra y C-ter Ra de la proteína RapA2, que comparten una homología del 66 %, serían ambos capaces de actuar como lectina reconociendo al EPS como sustrato. Contrariamente, los resultados obtenidos en este proyecto, muestran que el dominio N-ter Ra no se une al EPS, y que la actividad lectina de RapA2 está confinada en el dominio carboxilo terminal. Una posibilidad es que el extremo amino terminal posea capacidad de unión a algún otro polisacárido de superficie. De ser así, RapA2 podría actuar como proteína de anclaje del CPS a la cubierta celular. De hecho, hasta el presente, no se conoce la forma en que el CPS se mantiene unido a la superficie de *R. leguminosarum*.

Dada la amplia distribución de los dominios Ra/CHDL, que no se encuentran exclusivamente en proteínas de la familia Rap de *R. leguminosarum*, sino también en otras proteínas provenientes de diversos grupos taxonómicos, sería interesante intentar obtener una proteína de fusión entre el dominio C-ter Ra y GFP. Esta proteína de fusión podría ser utilizada como alternativa al uso de la fusión con la proteína completa, quizás facilitando la marcación de la matriz debido a su menor tamaño. También podría constituir una herramienta valiosa para el estudio de la formación de biofilms en otros microorganismos además de

Rhizobium, o bien ser de utilidad en la detección de ciertos polímeros en la matriz de biofilms polimicrobianos.

9.3. Perspectivas futuras

En vista de los resultados obtenidos y de los objetivos a futuro (planteados en la secciones 9.1 y 9.2), se prevee continuar con el estudio de la proteína de fusión RapA2 y además generar una fusión del dominio C-ter Ra con GFP. Para ello será necesario:

- Obtener una fusión del dominio C-ter Ra con GFP siguiendo una estrategia similar a la utilizada para la fusión de la proteína completa.
- Sobre-expresar y purificar ambas proteínas de fusión en forma soluble.
- Evaluar el requerimiento de calcio y la estabilidad de las proteínas purificadas en ensayos de CD.
- Determinar la fluorescencia de las fusiones y la capacidad de reconocer al sustrato (EPS) mediante ensayos BIA.
- Poner a punto un método para la marcación de la matriz con las proteínas fluorescentes obtenidas en distintos estadios de la formación de biofilms sobre vidrio utilizando como modelo *R. leguminosarum* 3841, y visualizarlos por microscopía confocal.
- Desarrollar un método para la marcación con la/s proteína/s de fusión con GFP de biofilms de *R. leguminosarum* formados sobre partículas de suelo.

Dado que *R. leguminosarum* es un rizobio de interés agronómico y se utiliza en la formulación de inoculantes, es de relevancia estudiar la formación de biofilms y la persistencia en el suelo de esta bacteria. Los resultados obtenidos en esta tesis inician un camino hacia la utilización de una herramienta biotecnológica que podría ser de utilidad en el sector agrícola, así como también en estudios de la biodiversidad en suelos.

9.4. Conclusiones finales

En el presente trabajo hemos logrado:

- Generar una nueva herramienta para el estudio de biofilms, mediante la obtención de una proteína de fusión con GFP de la lectina RapA2.
- Clonar, sobre-expresar y purificar los dominios amino y carboxilo terminal de RapA2, permitiendo así profundizar el estudio de propiedades estructurales y funcionales de RapA2.
- Evaluar la capacidad de reconocimiento y unión al exopolisacárido ácido (EPS) producido por *R. leguminosarum* de los dominios Ra, utilizando un método de ELISA modificado.
- Realizar un análisis espectroscópico de los dominios Ra por dicroísmo circular (CD) determinando la capacidad de unión de iones calcio y su efecto sobre la estructura secundaria.

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que la proteína de fusión GFP-RapA2 obtenida parece conservar la fluorescencia de GFP, por lo que eventualmente, de confirmarse la actividad lectina, podría ser utilizada para la marcación y visualización de la matriz del biofilm. Además hemos determinado que la actividad de la lectina RapA2 se limita al dominio carboxilo terminal, el cual contiene el sitio de unión a calcio y conserva la capacidad de reconocimiento y unión al EPS, aunque con menor afinidad que la lectina RapA2 completa.

10. BIBLIOGRAFIA

ABDIAN, P. L.; CAMELO, J. J.; AUSMEES, N.; ZORREGUIETA, A. RapA2 Is a Calcium-binding Lectin Composed of Two Highly Conserved Cadherin-like Domains That Specifically Recognize *Rhizobium leguminosarum* Acidic Exopolysaccharides. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013, 288 (4), p. 2893–2904.

ABDIAN P. L. y ZORREGUIETA A. “Extracellular factors involved in biofilm matrix formation by Rhizobia”. En: *The Perfect Slime: Microbial extracellular polymeric substances (EPS)*”. Chapter 12, pp. 227-242. Editores: Hans-Curt Flemming, Thomas R. Neu, Jost Wingender. IWA Publishing Group, Londres. Sep 15, 2016

AHEMAD M, KHAN M. Pesticides as Antagonists of Rhizobia and the Legume-Rhizobium Symbiosis: a Paradigmatic and Mechanistic Outlook. [en línea]. 2013. [consulta 17 jul 2017]. <https://www.researchgate.net/publication/259503288_Pesticides_as_Antagonists_of_Rhizobia_and_the_Legume-Rhizobium_Symbiosis_a_Paradigmatic_and_Mechanistic_Outlook>

ÁLVAREZ T., DÍAZ M. Las Rizobacterias, Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) en la agricultura. [en línea]. © 2008 [consulta 16 julio 2017]. <http://www.actaf.co.cu/revistas/revista_ao_95-2010/Rev%202008-3/21-Rizobacterias.pdf>

ANDREWS, M y ANDREWS, ME. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal Molecular Sciences*. 2017. 18(4), p. 705

AUSMEES N., JACOBSSON K. , LINDBERG M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of Rhizobium-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. *Microbiology*. 2001, 147, p. 549–559

BEIJERINCK, M. W. Cultur des *Bacillus radicola* aus den Knöllchen. *Bot Ztg*. 1888, 46, p. 740–750.

BOGINO P. C., OLIVA M., SORROCHE F.G, GIORDANO W. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14(8), p.15838-15859.

BOSTER BIOLOGICAL TECHNOLOGY. [en línea]. © 1993-2017. [consulta 09 junio. 2017]. <<https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>>

BRANDA S. S., VIK S., FRIEDMAN L. y KOLTER R. Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS in Microbiology*. 2005, Vol.13 No.1, p. 20-26.

CALVO GARCÍA, Sergio . “Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno”. Universidad de Salamanca [en línea].2011.[consulta 20 julio 2017]
<<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3761553>.>

CAO L, YAN X, BORYSENKO CW, BLAIR HC, WU C, YU L. CHDL: a cadherin-like domain in Proteobacteria and Cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, 251 (2), p. 203–209.

CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994, 263 (5148), p.802-805.

CHENG, H.-P. y WALKER, G. C. Succinoglycan Is Required for Initiation and Elongation of Infection Threads during Nodulation of Alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. 1998, 180(19), p. 5183–5191.

CORONADO C, ZUANAZZI J, SALLAUD C, *et al*. Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated. *Plant Physiology*. 1995, 108(2), p. 533-542.

CULTEK. [en línea]. © 2006. [consulta 09 junio. 2017].
<http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?opc=introduccion&p=Aplicacion_Elisa>

DARDANELLI M., ANGELINI J. and FABRA A. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Can J Microbiol*. 2003, 49, 399–405.

DONLAN RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002, 8(9), p. 881-890.

DOWNIE, J. Allan. Functions of rhizobial nodulation genes. The rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria. *Springer Netherlands*. 1998, p. 387–402. ISBN: 978-0-7923-5180-1

DOWNIE, J. Allan. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol*. 2010, Vol 34 (2), p. 150-170.

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS. Universidad Nacional de Córdoba. Microbiología del suelo. [en línea]. 2014 [consulta 04 julio 2017].

< <http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/unidad-4-ecologia.pdf>>

FARAG MA, ZHANG H, RYU C-M. Dynamic Chemical Communication between Plants and Bacteria through Airborne Signals: Induced Resistance by Bacterial Volatiles. *Journal of Chemical Ecology*. 2013, 39(7), p.1007-1018.

FAUVART M. Y MICHIELS J. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium–legume symbiosis, *FEMS Microbiology Letters*. 2008, 285 (1), p. 1–9.

FINNIE et al, 1998 JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Apr. 1998, 180, 7, p. 1691–1699.

FLEMMING H.C. y WINGENDER J. The biofilm matrix. *Nature Reviews*. 2010, 8, p. 623-633.

FRANK, B. Ueber die Parasiten in den Wurzelan-schwillungen der Papilionaceen. *Botanische Zeitung*. 1879, 37:376-387, 394-399.

FRAYSSE, N., COUDERC, F. y POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the Rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem*. 2003, 270, p. 1365-1380.

GEORGE R.A.y HERINGA J. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Eng*. 2002, 15, p.871–879.

GHOSH P. K.y MAITI T. K. Structure of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Rhizobia and their Functions in Legume–Bacteria Symbiosis: — A Review. *Achievements the Life Sciences*. 2016, 10 (2), p. 136-143.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol*. 1995, 41, p. 109–117.

GLICK, B.R., PATTEN, C.L., HOLGUIN, O. y PENROSE, D.M.. Biocontrol Mechanism. In Biochemical and genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria. *Imperial Collage Press*. 1999, p. 215-248.

HASTINGS J.W. y MORIN J.G. Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the ctenophore, Mnemiopsis and the coelenterates *Aequorea*, *Obelia*, *Pelagia* and *Renilla* .*Biological Bulletin*. 1969, Vol. 137, No. 2, p. 402.

HERNÁNDEZ MONTIEL, L. y ESCALONA AGUILAR, M. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. Revista de divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad de Veracruzana. 2003, Vol XVI, N° 1.

HILTNER, Lorenz. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderden berucksichtigung und Brache. *Arb. Dtsch. Landwirtsch. Gesellschaft*. 1904, 98, p. 59–78.

IELPI, L., R. O. COUSO, y M. A. DANKERT, Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.* 1993. 175(9): p. 2490-2500.

INTA-CASTELAR. Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. [en línea]. 2017. [consulta 17 julio 2017]. <http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp_inta_la_coleccin_de_cultivos_del_inta_y_sus_cepas_par.pdf>.

IVASHINA, Tanya V. y KSENZENKO Vladimir N. Exopolysaccharide Biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*: From Genes to Functions. En KARUNARATNE, D. N. , *et al.* "The Complex World of Polysaccharides" *InTech*. 2012. Cap 4, ISBN 978-953-51-0819-1.

JANCZAREK, Monika .Environmental Signals and Regulatory Pathways That Influence Exopolysaccharide Production in Rhizobia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, 12(11), p. 7898-7933.

JANCZAREK, M., y RACHWAŁ, K. Mutation in the *pssA* Gene Involved in Exopolysaccharide Synthesis Leads to Several Physiological and Symbiotic Defects in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14(12), p. 23711–23735.

JANCZAREK M., RACHWAŁ K., CIEŚLA J., GINALSKA G., BIEGANOWSKI A. Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. *Plant and Soil*. 2015, 388, p. 211–227

JIMÉNEZ, R., VIRGEN, G., TABARES,S. Y OLALDE V. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. *Avance y Perspectiva*. 2001, Vol. 20,p. 395-400.

JONES KM, KOBAYASHI H, DAVIES BW, TAGA ME, WALKER GC. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature reviews Microbiology*. 2007, 5(8), p. 619-633.

KAMILOVA F., VALIDOV S. , AZAROVA T., MULDER I. y LUGTENBERG B. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environmental Microbiology*. 2005, 7(11), p. 1809 – 1817.

KLOEPPER JW, LIFSHITZ R y ZABLOTOWICZ RM. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol*. 1989, 7, p. 39–43.

KREHENBRINK, M y DOWNIE, JA. Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *BMC Genomics*. 2008, 9:55.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 . *Nature*. 1970, 227 (5259), p. 680-685.

LARANJO, Marta, ALEXANDRE, Ana y OLIVEIRA, Solange. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research*. 2014, 169, p. 2– 17.

LAUS M.C., LOGMAN T.J., LAMERS G.E., VAN BRUSEL AAN, CARLSON R. y KIJNE J.W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Molecular Microbiology*. 2006, 59, p. 1704–1713.

LIFE: EUROPEAN COMMISSION ENVIRONMENT LIFE PROGRAMME. Microorganismos del suelo y biofertilización. [en línea].2016 [consulta 04 julio. 2017]. <http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.showFile&rep=file&fil=CROPS-FOR-BETTER-SOIL_formation-5.pdf >

LIU C., CHIN J X y LEE Dong-Yup. SynLinker: an integrated system for designing linkers and synthetic fusion proteins. *Bioinformatics*. 2015, 31(22), p.3700–3702.

MALHOTRA, M. y SAHAL, D. Anomalous mobility of sulfitylised proteins in SDS-PAGE. Analysis and applications. *Int. Pept. Protein Res*. 1996, 48, 3, p: 240-248.

MANUAL THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. [en línea] © 2010.[consulta 11 julio 2017] User Manual.One Shot® BL21(DE3)

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshotbl21_man.pdf>

MATA MARTÍNEZ, Esperanza. Dicroísmo Circular. Instituto de Biotecnología-UNAM [en línea]. © 2013. [consulta 28 junio 2017].

<<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/dicroismocircular2013.pdf>>

MAYZ-FIGUEROA, J. Biological Nitrogen Fixation. [en línea]. 2004. Revista UDO Agrícola, N°4, p 1-20. [consulta 21 julio 2017].

<<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2221548.pdf>>

MIYATA Kan, *et al.* Evaluation of the Role of the LysM Receptor-Like Kinase, OsNFR5/OsRLK2 for AM Symbiosis in Rice. *Plant and Cell Physiology*. 2016, 57(11), p. 2283–2290.

MONGIARDINI E. J., AUSMEES N., *et al.* The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation. *FEMS Microbiology Ecology*. 2008, Vol 65, Issue 2, p. 279–288.

NEW ENGLAND BIOLABS [en línea]. ©2017. [consulta 09 junio 2017]

<https://www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/Tools%20and%20Resources/Interactive%20Tools/DNA%20Sequences%20and%20Maps/pTYB12_map.pdf>

OLDROYD, Giles E.D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*. 2013, 11 (4), p. 252-263

PATTEN CL y GLICK BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol*. 2002, 68, p. 3795–3801.

PEIX, A. ; RAMÍREZ, M. H.; VELÁZQUEZ, E. y BEDMAR, E. J. Bacterial Associations with Legumes. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*. 2015, 34, p. 17-42.

PELTOLA, M., NEU, T. R., RAULIO, M., Kolari, M. y SALKINOJA-SALONEN, M. S. Architecture of *Deinococcus geothermalis* biofilms on glass and steel: a lectin study. *Environmental Microbiology*. 2008, Vol 10 (7), p. 1752–1759

PEREZ, M.; GOMEZ, M.A. y SALERNO, C.M. *Microbiología del suelo*. AGA, revista Asociación de Ganaderos y Agricultores. [en línea]. 2013 [consulta 03 julio. 2017]

<https://www.researchgate.net/publication/263927401_Microbiologia_del_suelo>

PEREZ MILLAN, M y BECU-VILLALOBOS, D. La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. *MEDICINA*. 2009, Volumen 69, N° 3.

PERRET X, STAEHELIN C y BROUGHTON W.J. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000, 64(1), p.180-201.

POPP, Claudia y OTT, Thomas. Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. 2011, 14, p. 458–467.

PRESCOTT, M., NOWAKOWSKI, S., NAGLEY, P. y DEVENISH, R.J. The length of polypeptide linker affects the stability of green fluorescent protein fusion proteins. *Analytical Biochemistry*. 1999, 273(2), p. 305-307.

PROMEGA CORPORATION. Technical Manual: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. [en línea]. © 2015. [consulta 22 marzo. 2017] <<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>>

QUINTO, Carmen y CÁRDENAS, Luis. “Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol” en: López-Munguía, A. Una ventana al quehacer científico, UNAM, 25 aniversario, cap 24, pags. 273-280. [en línea]. © 2007. [consulta 22 agosto. 2017] <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_24.pdf>

RAMÍREZ-BAHENA, M.; PEIX, Á.; VELÁZQUEZ, E. y BEDMAR, E.J. Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica. *Arbor*. 2016, 192 (779), a319. [en línea]. © 2016. [consulta 01 agosto. 2017] <<http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2016.779n3009>>

REDDY CHICHILI VP, KUMAR V y SIVARAMAN J. Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. *PROTEIN SCIENCE* . 2013, Vol 22, p. 153—167.

RINAUDI L, FUJISHIGE NA, HIRSCH AM, BANCHIO E, ZORREGUIETA A y GIORDANO W. Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Res Microbiol*. 2006, 157, p.867–875.

RINAUDI L.V., GIORDANO W. “An integrated view of biofilm formation in rhizobia” *FEMS Microbiol Lett*, 2010. 304:1-11.

RODAS PINOCHET, A. La Agricultura y Microorganismos [en línea]. 2006. [consulta 17 julio. 2017] <<https://www.engormix.com/agricultura/articulos/la-agricultura-y-microorganismos-t26746.htm>>

RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; DARDANELLI, M. S. y RUIZ-SAINZ, J. E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, Vol 272, Issue 2, p. 127–136.

RUSSO, Daniela M., *et al.* 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*. 2006, 188(12), p. 4474-4486.

SAMBROOK, J.; FRITSCH E. F. y MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCHROTH, M.N. y HANCOCK, J.G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*. 1982, 216, p. 1376–81.

SHIMOMURA O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc.* 2005, 217 (1), p. 1-15.

SHIMOMURA O, JOHNSON F.H., SAIGA Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*. 1962, 59, p. 223-239.

SKORUPSKA A. , JANCZAREK M. ; MARCZAK M. ; MAZUR A. , KRÓL J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories*. 2006, 5:7.

SMIT G, LOGMAN TJ, BOERRIGTER ME, KIJNE JW, LUGTENBERG BJ. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Ca²⁺-dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family Rhizobiaceae to plant root hair tips.” *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 1989, Vol 171, p. 4054-4062.

SMIT G, SWART S., LUGTENBERG B. J. J. y KIJNE J. W. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Molecular Microbiology*. 1992, 6(20), p. 2897-2903

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC [en línea] © 2011.[consulta 26 junio 2017]

<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/1602127_Assay_Dev_HB_v2_INTL.pdf>

TOYOFUKU M., INABA T., KIYOKAWA T., OBANA N., YAWATA Y. y NOMURA N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2015, Vol. 80 (1), p. 7-12.

TSIEN, Roger Y. The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry*. 1998, 67:1, p. 509-544.

TSIEN, Roger. Imágenes: esquema estructura terciaria de la proteína nativa GFP. [en línea] 2014 [consulta 28 de agosto 2017] <<http://www.tsienlab.ucsd.edu>>.

UNAM- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. Manual teórico-práctico: Los Biofertilizantes y su uso en la Agricultura. 2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA. Facultad de Ciencias Agrarias. “*Fertilizantes Biológicos*”. [en línea] 2014 [consulta 17 julio 2017]

<<http://agro.unc.edu.ar/~microbiologia/wp-content/uploads/2014/04/unidad-9-Fertilizantes-biologicos.pdf>>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA. Repositorio Institucional. “Descripción de biofilms, desarrollo e importancia de su estudio.” [en línea] © 2003-2017 [consulta 13 sep 2017].<http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2685/1_-_Descripci%C3%B3n_de_biofilm_desarrollo_e_importancia_de_su_estudio._Impacto_de_las_t%C3%A9cnicas_de_micro-nanofabricaci%C3%B3n_en_sistemas_biol%C3%B3gicos.pdf?sequence=6>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS. Biblioteca digital [en línea].2013 [consulta 28 junio. 2017]. <<http://bd.unsl.edu.ar/download.php?id=1884>>

VALVERDE, Claudio. Microorganismos PGPR. Laboratorio de Biología de Suelos. Universidad Nacional de Quilmes. [en línea]. 2016. <<http://2016.congresoaaapresid.org.ar/wp-content/uploads/2016/08/Valverde-Claudio-acta.pdf>>

VOZZA NF, ABDIAN PL, RUSSO DM, MONGIARDINI EJ, LODEIRO AR, MOLIN S y ZORREGUIETA A . A *Rhizobium leguminosarum* CHDL- (Cadherin-Like-) Lectin

Participates in Assembly and Remodeling of the Biofilm Matrix. *Front. Microbiol.* 2016, 7:1608.

WALKER, S.A. y DOWNIE, J.A. Entry of *Rhizobium leguminosarum bv.viciae* into root hairs requires minimal Nod factor specificity, but subsequent infection thread growth requires nodO or node. *Molecular Plant Microbe Interact.* 2000, 13(7), p. 754-762.

WANG S. y HAZELRIGG T. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*, 1994. 369, p. 400 – 403.

WANG T.; ROMERO, J.; LÓPEZ LARA, I “*Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas “ [en línea].© 2010 [consulta 01 agosto. 2017]

WILSON, J. K. Over five hundred reasons for abandoning the cross-inoculation groups of the legumes, *Soil Sci.*, 1944, 58:61.

ZHANG, J., YUN, J., SHANG, Z., ZHANG, X., y PAN, B. Design and optimization of a linker for fusion protein construction. *Progress in Natural Science.* 2009, 19(10), p.1197-1200.

ZIPPEL B. y NEU T. R. Characterization of Glycoconjugates of Extracellular Polymeric Substances in Tufa-Associated Biofilms by Using Fluorescence Lectin-Binding Analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2011, 77 (2), p: 505-516