

Rol de los dos sistemas flagelares y los pili de *Bradyrhizobium diazoefficiens* durante la etapa inicial de la formación de *biofilm*

Autor: Ian Emilio

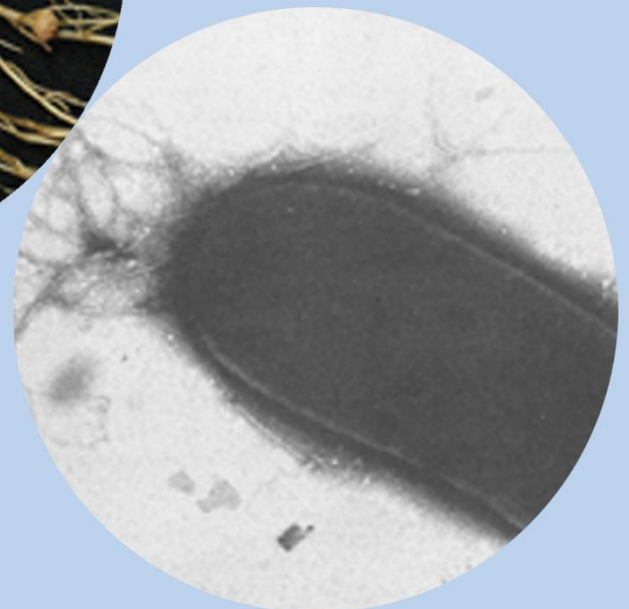
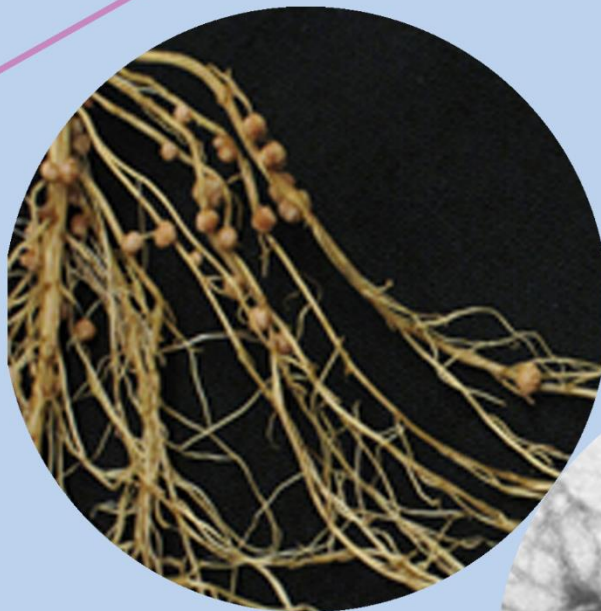
Director: Dr. Elías Mongiardini

Tutora: Rocío Balda


Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

Diciembre de 2020



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**



El siguiente trabajo fue realizado para la asignatura “Laboratorio de procesos biotecnológicos” de la carrera en Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular dependiente del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), el cual fue dirigido por el Dr. Elías J. Mongiardini, bajo el tutelaje de la Lic. Rocío Balda y realizado en el Laboratorio de Interacciones entre Rizobios y Soja (LIRyS) perteneciente al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), CCT La Plata – CONICET – UNLP.

Índice de contenido

1.INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1 SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA	- 1 -
1.2 USO DE <i>BRADYRHIZOBIUM DIAZOEFFICIENS</i> COMO BIOFERTILIZANTE	- 3 -
1.3 FORMAS DE VIDA LIBRE DE <i>B. DIAZOEFFICIENS</i>	- 4 -
1.4 FLAGELOS	- 6 -
1.4.1 ESTRUCTURA DE LOS FLAGELOS	- 6 -
1.4.2 ROL DE LOS FLAGELOS EN LA ADHESIÓN Y LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	- 7 -
1.6 PILI	- 9 -
1.6.1 ESTRUCTURA DE LOS PILI	- 9 -
1.6.2 ROL DE LOS PILI EN LA ADHESIÓN Y LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	- 12 -
1.6 OBJETIVOS	- 14 -
2. MATERIALES Y MÉTODOS	- 15 -
2.1 CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	- 15 -
2.2 PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS	- 15 -
2.2.1 MEDIOS DE CULTIVO	- 15 -
2.2.2 ANTIBIÓTICOS	- 17 -
2.2.3 CONSERVACIÓN DE CEPAS	- 17 -
2.2.4 EVALUACIÓN DE CAPACIDAD DE FORMAR <i>BIOFILM</i> EN VIDRIO	- 17 -
2.3 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS	- 18 -
2.3.1 OBTENCIÓN DE ADN MOLDE	- 18 -
2.3.2 PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	- 18 -
2.3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	- 18 -
2.3.4 TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL ADN	- 19 -
2.3.5 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	- 20 -
2.3.6 PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES. ELECTROTRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i>	- 20 -
2.3.7 CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES	- 21 -
2.4 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	- 22 -
2.4.1 BASES DE DATOS	- 22 -
2.4.2 BLAST	- 23 -
2.4.3 ALINEAMIENTO DE MÚLTIPLES SECUENCIAS (MSA)	- 23 -
3. RESULTADOS	- 24 -
3.1 ESTUDIOS BIOINFORMÁTICOS	- 24 -
3.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS <i>CLUSTERS</i> DE PILI TIPO IV DE <i>B. DIAZOEFFICIENS</i>	- 24 -
3.1.2 ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES MÁS IMPORTANTES QUE CONSTITUYEN LOS SISTEMAS DE PILI	- 29 -
1-ANÁLISIS DE LAS PROBABLES PILINAS ENCONTRADAS EN EL GENOMA DE <i>B. DIAZOEFFICIENS</i>	- 29 -
2- CARACTERIZACIÓN DE LAS PROBABLES ATPASAS	- 30 -
3-ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE PILZ	- 33 -
3.2 OBTENCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES PARA LAS MUTACIONES	- 35 -

3.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE FORMAR <i>BIOFILM</i> MEDIANTE LA MEDIDA DE ADHESIÓN A TUBO DE VIDRIO (OPTIMIZACIÓN DEL ENSAYO)	- 43 -
3.4 EVALUACIÓN DE FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> DE MUTANTES FLAGELARES	- 47 -
4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	- 50 -
BIBLIOGRAFÍA	- 52 -
AGRADECIMIENTOS	- 58 -
ANEXO	- 60 -

Tabla de figuras

Figura 1.1 Esquema de la señalización molecular involucrada en el proceso de nodulación

Figura 1.2 Etapas de formación de *biofilms*

Figura 1.3 Sistemas flagelares de *B. diazoefficiens*

Figura 1.4 Estructura del pili tipo IV

Figura 2.1 Esquema del clonado de los fragmentos en los vectores de clonado

Figura 3.1.1 Esquema de la organización genética de los *cluster* de pili tipo IV en *B. diazoefficiens*

Figura 3.1.2 Esquema de la organización genética del *cluster* 4 (*bsr066 a bli0667*) en *B. diazoefficiens*

Figura 3.1.3 Predicción de operón para el gen *bsr0662-blr0663* de Microbes Online

Figura 3.1.4 Esquema de la organización genética de los 4 *clusters* que codifican para genes de pili en *B. diazoefficiens* con su nombre en los distintos sistemas de nomenclatura

Figura 3.1.5 Estructura del pili tipo IV y la correspondencia de genes en *B. diazoefficiens*

Figura 3.1.6 Alineamiento de secuencias múltiples de genes que codifican para pilinas en *B. diazoefficiens*

Figura 3.1.7 Alineamiento de secuencias múltiples de ATPasas de *B. diazoefficiens* y otros microorganismos

Figura 3.1.8 Análisis de secuencias de proteínas con dominios PilZ

Figura 3.2.1 Entorno génico del gen *bll440*

Figura 3.2.2 Entorno génico del gen *blr3500*

Figura 3.2.3 Geles de agarosa con los plásmidos digeridos con las enzimas de restricción y el producto de PCR del fragmento

Figura 3.2.4 Resultados obtenidos en la *colony* PCR del fragmento *bll1440* en pK18mobSacB

Figura 3.2.5 Geles de agarosa con el plásmido pG18mob2 digerido con las enzimas de restricción y el producto de PCR del fragmento

Figura 3.2.6 Resultados obtenidos en la *colony* PCR del fragmento *blr3500*

Figura 3.2.7 Resultados del chequeo de los clones con distintas combinaciones de cebadores

Figura 3.3.1 Ensayos de formación de *biofilm* a alta y baja concentración de inóculo inicial utilizando arabinosa (0,5%) como fuente de carbono

Figura 3.3.2 Ensayos de formación de *biofilm* a alta y baja concentración de inóculo inicial utilizando manitol (0,5%) como fuente de carbono

Figura 3.3.3 Ensayos de formación de *biofilm* baja concentración de inóculo inicial utilizando arabinosa o manitol como fuente de carbono

Figura 3.4.1 Ensayos de formación de *biofilm* del mutante $\Delta fliC$ afectado en el flagelo subpolar y de la cepa salvaje

Figura 3.4.1 Ensayos de formación de *biofilm* del mutante $\Delta flbD$ afectado en el flagelo subpolar y de la cepa salvaje

Figura A1 Predicción de operón calculada en el servidor de en Microbes Online a partir de *bll1440*

Figura A2 Predicción de operón calculada en el servidor de en Microbes Online a partir de *blr3500*



INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO
UNO

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Simbiosis rizobio-leguminosa

Los procesos evolutivos llevaron a las plantas a adoptar diferentes estrategias con el fin de obtener los nutrientes esenciales para su desarrollo, entre los que se destacan los 4 elementos esenciales mayoritarios que componen la materia orgánica: el carbono (C), el hidrógeno (H), el oxígeno (O) y el nitrógeno (N). En especial, el N es encontrado en biomoléculas fundamentales para la vida, como las proteínas y los ácidos nucleicos, y es utilizado por los organismos en distintos estados de oxidación, gracias al ciclo del N, el cual consiste en una serie de procesos bioquímicos que permiten la transformación de este compuesto de una forma a otra. Entre las reacciones involucradas en este ciclo se incluye la incorporación del N molecular (N_2 , compuesto más abundante de la atmósfera), a través de su reducción enzimática a amonio para ser incorporado en moléculas orgánicas, mecanismo conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN). Este proceso es exclusivo de un grupo de bacterias fijadoras de N denominadas diazótrofos (Terpolilli *et al.*, 2012).

Las plantas sólo son capaces de asimilar nitrógeno en forma de iones amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), por lo que la simbiosis mutualista con microorganismos fijadores de nitrógeno resulta un proceso fundamental en su desarrollo y productividad (Mifflin *et al.*, 1976). Dentro de estos microorganismos que habitan el suelo se pueden encontrar a los rizobios (del griego *rizo*= raíz y *bios*= vida), bacilos gram negativos aeróbicos y/o microaeróbicos (Jordan *et al.*, 1984). Estas bacterias se encuentran dentro de las familias de las α y β -Proteobacterias y son capaces de establecer relaciones simbióticas con miembros de la familia *Fabaceae* (leguminosas).

La asociación simbiótica entre los rizobios y las plantas hospedadoras, como la establecida entre *Bradyrhizobium diazoefficiens* y la soja, se da de manera específica gracias a un proceso complejo de reconocimiento molecular que incluye un intercambio de señales entre ambos participantes. La planta, libera compuestos del tipo flavonoides en sus exudados radicales, los cuales pueden ser percibidos por el rizobio gracias a receptores específicos. Este reconocimiento activa la expresión de genes que codifican para la síntesis de unas moléculas denominadas factores *nod* (Giles *et al.*, 2008). Esta señal, ahora será reconocida por la planta también de forma muy específica (Giles *et al.*, 2008). La alta especificidad en el reconocimiento de ambos integrantes da cuenta de la exclusividad de la relación que se establece, que puede ser entre uno o unos pocos rizobios con una leguminosa en particular (Giles *et al.*, 2008).

Una vez que ocurre el reconocimiento rizobio-leguminosa, y posterior al proceso de adhesión de la bacteria sobre el pelo radical, se produce una curvatura de estos pelos rodeando al rizobio. Durante el enrollado la bacteria logra ingresar al pelo, desarrollando lo que se conoce como hilo de infección, una invaginación de la membrana de la célula vegetal en forma de canal que permite la llegada de las bacterias a las células corticales de la planta (Giles *et al.*, 2008). El proceso de infección culmina con la formación de una estructura llamada nódulo en la raíz de la planta, donde se producirá la FBN. Dentro del nódulo, la bacteria se diferencia a lo que se conoce como bacteroide, quedando rodeada por la membrana de la planta y actuando como una organela de la célula vegetal, ya que algunas funciones se vuelven fisiológicamente dependientes de la misma. Este proceso se encuentra resumido en el esquema de la Figura 1.1.

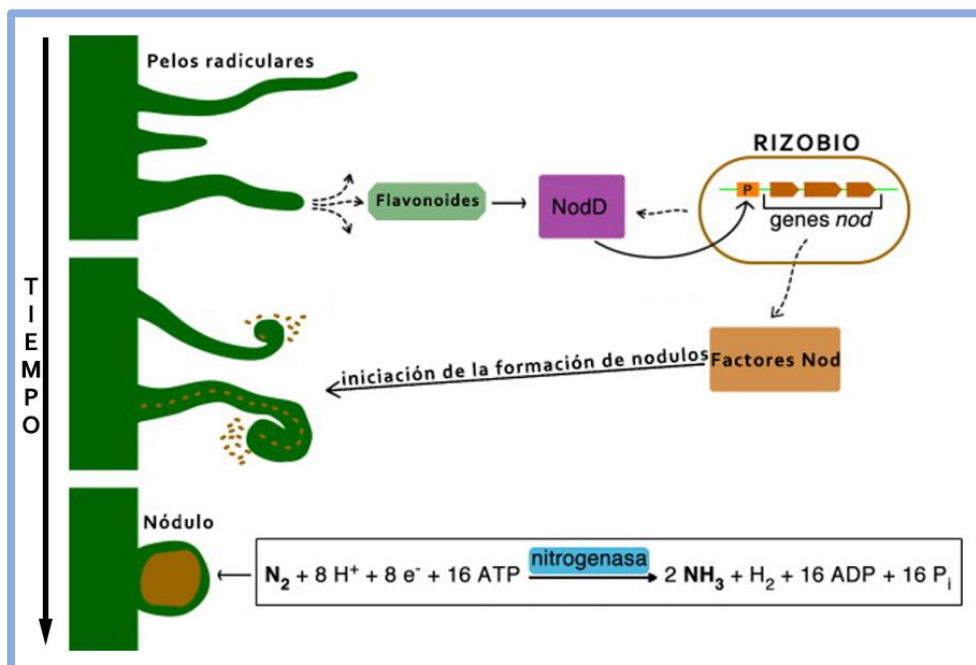


Figura 1.1: Esquema de la señalización molecular involucrada en el proceso de nodulación. Modificado de Laranjo *et al.*(2013)

La reducción del N_2 a NH_4^+ (amonio) es posible gracias a la presencia de la enzima nitrogenasa en los bacteroides en un proceso que requiere gran cantidad de energía, la cual es obtenida de la oxidación de moléculas orgánicas reducidas. Los microorganismos de vida libre podrán obtener dichos compuestos de otros organismos o de procesos fotosintéticos propios (si pueden realizar la fotosíntesis). Por su parte, los microorganismos asociados a plantas obtienen estos compuestos orgánicos de la planta hospedadora (Hubbell y Kidder *et al.*, 2009). El rol de la planta en esta relación simbiótica no solo radica en proveerle energía y nutrientes a la población bacteriana, sino que además le brinda un ambiente protector (Giles *et al.*, 2008).

1.2 Uso de *Bradyrhizobium diazoefficiens* como biofertilizante

Las necesidades de nitrógeno de los cultivos de leguminosas pueden ser cubiertas tanto por la captación y asimilación de compuestos nitrogenados solubles disponibles en el suelo, como por la interacción simbiótica entre la rizosfera natural y la planta. Esta interacción simbiótica es llevada a cabo, en el caso de la soja, por distintas especies de rizobios, entre los que destacan diversas especies de *Bradyrhizobium* (como *diazoefficiens*, *japonicum* o *elkanii*) y *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*) *fredii* (Delamuta *et al.*, 2013), que se utilizan en productos biotecnológicos, en general denominados inoculantes, como una alternativa para la incorporación de nitrógeno sustentable, permitiendo reemplazar o disminuir la utilización de fertilizantes químicos.

El uso continuo de estos productos ha ido modificando las poblaciones microbianas del suelo debido a la introducción de especies nuevas y al cambio que estas han ido sufriendo en el tiempo por deriva génica. La diversificación ha sido tal que hoy en día es muy difícil encontrar similitudes con las cepas utilizadas en los inoculantes originales (Covelli *et al.*, 2013). Estas bacterias, que hoy se encuentran en el suelo formando parte de la población autóctona, compiten en el proceso de nodulación con la cepa del inoculante introducido recientemente. Normalmente, la rizosfera es colonizada por 10^5 a 10^7 rizobios, pero sólo se forman 10^1 a 10^2 nódulos por planta (Reyes y Schmidt *et al.*, 1979; Moawad *et al.*, 1984). Por lo tanto, sólo el 0,01% de los rizobios que entran en contacto con la raíz llegan a ocupar los nódulos, situación que lleva a un proceso de competición entre los rizobios del inoculante y las poblaciones ya establecidas del suelo, donde estas últimas tienen una ventaja debido a la posición en que se encuentran respecto de las bacterias del inoculante que están depositadas sobre los tegumentos de las semillas. Es por esto que, en general, son capaces de ocupar una mayor proporción de nódulos (López García *et al.*, 2009), lo que genera que una proporción alta de nódulos este ocupada por bacterias que tiene capacidades fijadoras de nitrógeno muy variable, provocando una capacidad promedio de FBN inferior a la que podría esperarse si la ocupación fuera de manera mayoritaria por la cepa del inoculante. Como resultado de esta competición se ve limitada enormemente la tasa de fijación de N_2 de la planta (Provorov y Vorobyov *et al.*, 2000; Itakura *et al.*, 2009).

Lograr identificar las condiciones que son determinantes en la competitividad de los rizobios inoculados es fundamental para el mejoramiento en la formulación de los mismos. Como ya fue mencionado, la distribución de bacterias en el suelo es un factor importante a tener en cuenta. Esta distribución puede verse afectada por la movilidad de las bacterias. Sin embargo, la capacidad de moverse de los microorganismos en el suelo parece ser beneficiosa sólo en distancias cortas, como,

por ejemplo, para posicionarse en pelos inmaduros una vez que la zona de los pelos radicales ha sido colonizada. Debido a la porosidad del suelo, el movimiento propulsado por los sistemas flagelares es de una baja velocidad, similar a la velocidad de crecimiento de la raíz, lo cual deja poco tiempo para que los rizobios se adhieran a la superficie del pelo radicular, antes de que éste madure y ya no pueda ser infectado (Lodeiro *et al.*, 2015). Para la colonización de la rizosfera, los rizobios deberán desplazarse mucho más rápidamente y esto lo pueden hacer nadando por los macroporos que se forman en el suelo si está inundado, o por mecanismos pasivos, como la adhesión a superficies de lombrices o nematodos, aunque este tipo de transporte es poco efectivo para la infección de raíces, ya que la dirección será aleatoria (Althabegoiti *et al.*, 2011; Horuichi *et al.*, 2015). Se ha reportado que la movilidad por flagelos es importante en el proceso de nodulación cuando la cantidad de agua presente en el suelo es mayor a la capacidad de campo (Althabegoiti *et al.*, 2011).

1.3 Formas de vida libre de *B. diazoefficiens*

Los rizobios existen en la naturaleza en dos estados: uno de vida libre y otro en asociación simbiótica con una planta huésped. A su vez, dichas bacterias en vida libre pueden encontrarse en forma planctónica o formando *biofilms* (también llamados biopelículas), constituyendo colonias de microorganismos sésiles sobre superficies. Sólo una pequeña fracción de las bacterias se halla en forma planctónica: se estima que el 99% de todas las bacterias en vida libre viven en comunidades de *biofilms*, y tan sólo el 1% restante se encuentra en estado planctónico (Scott *et al.*, 2003).

El estado planctónico se compone de microorganismos en forma libre, flotando y/o nadando en medio líquido, sin estar adheridos a superficies ni asociados entre sí de manera estrecha. Por el contrario, los *biofilms*, son sistemas biológicos con alto nivel de organización, donde los microorganismos forman comunidades estructuradas y coordinadas, adheridas irreversiblemente a una superficie biótica o abiótica. Esta cohesión se da por medio de sustancias poliméricas extracelulares de distinta composición, producida por ellos mismos y que forman lo que se conoce como la matriz del *biofilm*. Los microorganismos que conforman estas comunidades pueden adquirir una diferenciación fisiológica que les puede proveer una serie de ventajas comparado con el estado planctónico como, por ejemplo, una mayor resistencia a antimicrobianos, un mayor intercambio genético, crecimiento en bajos niveles de nutrientes, entre otras (Costerton *et al.*, 1999).

Durante la formación de un *biofilm* se pueden diferenciar al menos 4 etapas: adhesión a la superficie (puede ser reversible en primer lugar y luego volverse irreversible); crecimiento y formación de microcolonias (debido a la duplicación de las bacterias que permanecen adheridas en el mismo lugar), acompañada de la síntesis de exopolisacáridos (EPS); maduración (crecimiento del

biofilm y muchas veces diferenciación de las células que forman el mismo de acuerdo a su ubicación espacial) y finalmente senescencia y liberación de células en estado planctónico para favorecer la colonización de nuevas superficies (Figura 1.2) (Costerton *et al.*, 1999).

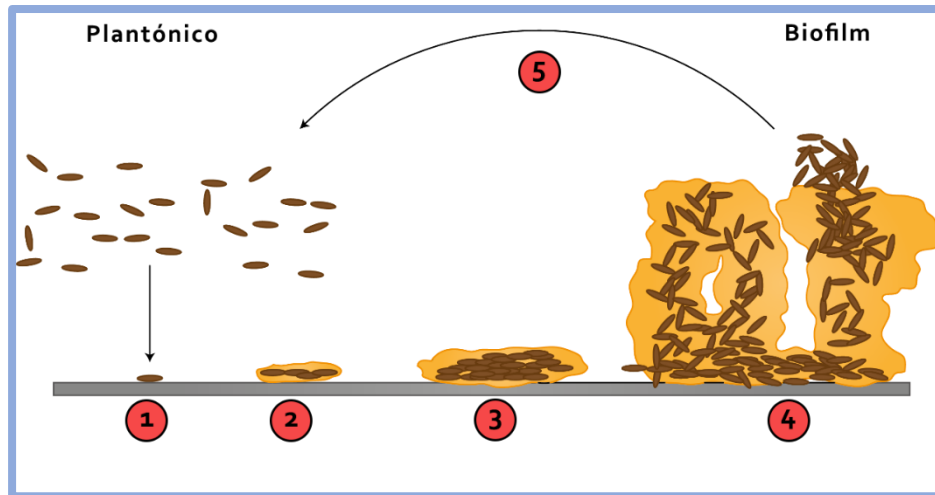


Figura 1.2 Etapas de formación de biofilms. 1: Células planctónicas se adhieren de forma reversible a una superficie. 2: Adhesión irreversible. 3: Crecimiento y formación de microcolonias, acompañada de la síntesis de EPS (exopolisacáridos). 4: Maduración y crecimiento de la estructura tridimensional del biofilm. 5: Liberación de células y colonización de nuevas superficies.

En este modelo, el más aceptado, diversas señales ambientales (como la presencia de nutrientes) pueden considerárselas desencadenantes del proceso de formación de *biofilm* (O'Toole y Kolter *et al.*, 1998a). Los flagelos bacterianos proporcionan el medio de locomoción y son los encargados del acercamiento hasta una superficie en etapas previas al inicio del proceso. Los primeros pasos de adhesión pueden estar mediados por los mismos flagelos y/o participar otros componentes superficiales de la bacteria, entre los que se encuentran fimbrias, pili o adhesinas. Luego de la adhesión irreversible la célula comienza a dividirse y da lugar a la formación de microcolonias. En este momento otras señales, como por ejemplo moléculas del tipo *quorum-sensing*, podrían ser requeridas para la posterior maduración del *biofilm* (Rinaudi *et al.*, 2009).

Dadas las características que el estado de *biofilm* otorga a las bacterias se podría pensar que el mismo podría aprovecharse durante el proceso de inoculación de semillas, ya que podría aumentar la sobrevivencia de las bacterias y la adhesión de éstas a los tegumentos (Jayasinghearachchi y Sereviratne *et al.*, 2004). Sin embargo, como mencionamos antes, el proceso de inoculación tiene como objetivo que los rizobios lleguen a ponerse en contacto con las raíces, las colonicen y las infecten, por lo cual una adhesión muy fuerte puede ser contraproducente y entorpecer la liberación temprana de rizobios a la rizosfera (Lodeiro *et al.*, 2015).

Como se presentó anteriormente, el proceso de adhesión inicial de la bacteria ya sea sobre la raíz para iniciar la infección, o sobre otra superficie para constituir un *biofilm*, requiere de ciertas estructuras y compuestos bacterianos como por ejemplo adhesinas proteicas, dentro de las que podríamos incluir flagelos y pili. Además, los polisacáridos de superficie y ciertas lectinas también podrían participar de estos procesos (Quelas *et al.* 2010; Mongiardini *et al.*, 2016). Por su parte, la planta puede secretar lectinas en sus exudados radicales capaces de reconocer los polisacáridos de la bacteria y actuar como puente entre éstas y la superficie radicular (Pérez Giménez *et al.*, 2009; Althabegoiti *et al.*, 2011). En nuestro microorganismo modelo, *B. diazoefficiens*, los mecanismos de formación de *biofilms* y los factores proteicos involucrados no han sido completamente descritos. Una profundización en su análisis puede ser relevante para comprender mejor los procesos que se dan durante la interacción de la bacteria con la planta y podrían contribuir a para mejorar los formulados de interés agronómico a futuro.

1.4 Rol de los flagelos en la formación de *biofilm*

1.4.1 Estructura de los flagelos

Una de las principales estructuras responsables de la movilidad de las bacterias son los flagelos, filamentos proteicos que se extienden hacia afuera de la membrana plasmática y de la pared celular. Son estructuras rígidas y delgadas, de unos 20 nm de diámetro y hasta 15-20 μm de largo, compuesto por tres partes principales: la parte más expuesta y larga es el filamento (formado por la polimerización de una proteína denominada flagelina), el cuerpo basal, que está inserto en las membranas de la célula, y un segmento curvado y corto llamado gancho, encargado de unir el filamento al cuerpo basal. Este último está formado por una serie de anillos embebidos en las membranas, asociados a otras proteínas que actúan como bombas de iones (H^+ y/o Na^+ según el microorganismo) desde el espacio intermembrana hacia el citoplasma pudiendo transformar esta energía potencial en energía mecánica que hace girar el filamento.

B. diazoefficiens en particular posee dos sistemas de flagelos, uno lateral, cuya expresión es inducible y otro subpolar de expresión constitutiva (Althabegoiti *et al.*, 2008). Los flagelos laterales se expresan de forma diferencial dependiendo de diversas señales como la composición del medio o su viscosidad. Esta bacteria es capaz de utilizar ambos sistemas para realizar natación, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las bacterias, lo que le permite generar patrones de natación particulares cuando el movimiento se da debido a al uso de uno o ambos sistemas al mismo tiempo (Quelas *et al.*, 2016). Además, ambos sistemas están involucrados en el movimiento de *swarming* (desplazamiento sobre superficies) (Covelli *et al.*, 2012), y parecen estar interconectados

transcripcionalmente, ya que cuando se produce una resistencia en el giro del filamento del sistema polar (ya sea por una mutación o por un aumento de la viscosidad del medio), esto se traduce en un aumento de la expresión del sistema lateral, lo que podría sugerir que este sistema actúe como sensor, además de ser utilizado para la natación (Dardis C., 2019; Mengucci *et al.*, 2020).

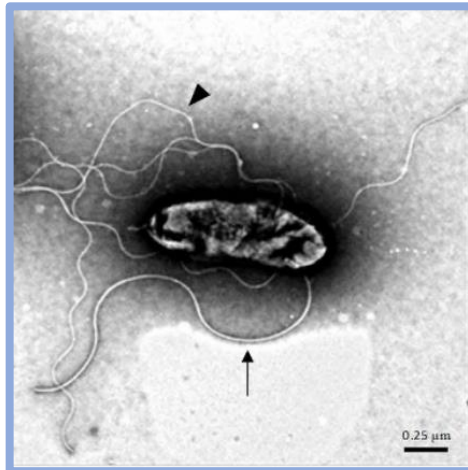


Figura 1.3 Sistemas flagelares de *B. diazoefficiens*. Micrografía de microscopio electrónico de transmisión de una célula planctónica crecida en medio AG líquido. Se indica con una flecha el sistema flagelar subpolar y con una punta de flecha los flagelos laterales. Extraído de Quelas *et al.* (2016).

1.4.2 Rol de los flagelos en la adhesión y la formación de *biofilm*

La movilidad mediada por flagelos es esencial para la patogénesis de muchas bacterias, incluyendo *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Bordetella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Borrelia burgdorferi* y *Treponema spp* (Josenhans y Suerbaum *et al.*, 2002). Además de contribuir a la patogénesis mediante la movilidad, el flagelo también tiene un rol central en otros procesos de infección como la adhesión, la formación de *biofilms* y modulación del sistema inmune (Duan *et al.*, 2013).

O'Toole y Kolter (1998b) sugirieron que la movilidad es importante en el contacto inicial de las bacterias con una superficie abiótica. El rol dentro de la formación de *biofilms* fue inicialmente estudiado en *Pseudomonas spp.* (Lawrence *et al.*, 1987), donde se sugirió que el flagelo participaba como una adhesina. Además, la movilidad que éstos proporcionan es requerida para llevar a la célula cerca de la superficie y superar las fuerzas repulsivas entre las bacterias y la misma, propiciando eventualmente la adhesión (Mills y Powelson *et al.*, 1996). Es posible que estas estructuras estén involucradas en ambos procesos. Sin embargo, en *Pseudomonas fluorescens*, se realizaron ensayos donde se observó que la presencia del flagelo era prescindible para la formación

de *biofilm* en superficies abióticas para determinadas condiciones de cultivo como el uso de una fuente de carbono en particular o ciertos micronutrientes (crecimiento en presencia de citrato, glutamato y o exceso de hierro exógeno) (O'Toole y Kolter *et al.*, 1998a).

Es posible que las células también se valgan de otro tipo de locomoción en respuesta a determinadas señales ambientales y en ausencia del flagelo, como la movilidad de tipo *twitching* utilizando sistemas de pili (Bradley *et al.*, 1980). Esta movilidad es importante en algunas bacterias durante la maduración del *biofilm*. En *Pseudomonas* la formación de estructuras tipo hongo depende de la funcionalidad de estos pili (Tolker-Nielsen *et al.*, 2003). Estudios en *Agrobacterium tumefaciens* utilizando mutantes en el flagelo sin filamento (en genes que codifican para la proteína que conforma el gancho del flagelo) y mutantes con el filamento completamente polimerizado, pero sin su capacidad de rotar (mutaciones en genes que codifican componentes del motor), mostraron una reducción en la capacidad de formación de *biofilm* en condiciones estáticas. Este resultado podría sugerir que la falta de filamento podría estar desencadenando una deficiencia en la adhesión. Sin embargo, como el mutante en el motor presenta también una deficiencia en la formación de *biofilm* esto estaría indicando la necesidad de un flagelo funcional para que el proceso se inicie, lo que sugiere un rol como mecanosensor (Merritt *et al.*, 2007). Por otro lado, cuando estos mutantes se ensayan en condiciones de cultivo continuo utilizando una cámara de crecimiento, donde se hace pasar medio fresco de manera continua generando una fuerza de roce, el mutante sin filamento pudo formar un *biofilm* (incluso más denso que en la condición estática). Una posible explicación de esta observación contrapuesta, podría ser el aumento en la frecuencia de contacto de las bacterias con la superficie debida al flujo de medio de cultivo, lo que podría favorecer las condiciones de adhesión. (Merritt *et al.*, 2007). Resultados similares han sido encontrado para *Listeria monocytogenes* (Lemon *et al.*, 2007). En contraste, estudios en *Aeromonas spp.* sugieren que el flagelo puede actuar como una adhesina favoreciendo la adhesión a las superficies (Kirov *et al.*, 2004).

Como nombramos previamente, durante la interacción con superficies los sistemas flagelares pueden actuar en la percepción de las mismas. Esta función como mecanosensor utiliza la rotación del filamento para detectar cambios cuando el giro del mismo se ve impedido. La aproximación a una superficie produce un choque del filamento con esta, generando una resistencia de giro sobre el motor. Esta señal podría ser detectada y transmitida al interior celular para iniciar la adhesión y posterior formación de un *biofilm* (Ellison *et al.*, 2015). Otra demostración de este mecanismo ha sido puesta de manifiesto en *Vibrio parahaemolyticus*, donde el incremento en la viscosidad del medio produce un aumento en la carga mecánica del flagelo y esto dispara la transcripción de genes involucrados en funciones asociadas a superficies, como el movimiento de

swarming y la expresión del flagelo lateral (McCarter *et al.*, 1988). Este tipo de regulación génica usando el flagelo como mecanosensor también fue encontrada en algunas cepas patogénicas de *Escherichia coli* (Laganenka *et al.*, 2020) y en otras especies bacterianas como *Caulobacter crescentus* (Hug *et al.*, 2017).

En *B. diazoefficiens* se ha reportado el rol de los sistemas de flagelos en eventos relacionados a la adhesión de superficies. Althabegoiti *et al.* (2008), demostraron que la sobreproducción del sistema lateral de manera continua genera un fenotipo con mayor adhesión a raíces de soja. Además, el uso de uno u otro sistema genera un fenotipo de adhesión diferencial a vidrio a tiempos cortos (de aproximadamente 2 horas). En particular, cuando la bacteria solo puede expresar el sistema subpolar presenta una capacidad aumentada de adhesión respecto a cuando usa solo el lateral o ambos. (Quelas *et al.*, 2016). Sin embargo, un análisis más detallado y en ensayos de mayor duración serán necesarios para poder evaluar la influencia de los flagelos en las diferentes etapas de la formación de *biofilm*.

1.6 Función de los pili en la formación de *biofilm*

1.6.1 Estructura de los pili

Los pili (o fimbrias) son estructuras filamentosas que protruyen de la superficie de la bacteria. Usualmente los filamentos se forman a partir de la polimerización de miles de monómeros de una proteína llamada de manera genérica pilina, que es transportada activamente a través de las membranas de la bacteria (Pelicic, 2008). Existe una gran diversidad de tipos de pili, que en general han sido clasificados de acuerdo al sistema de secreción que utilizan para transportar la pilina (Fronzes *et al.*, 2008). Los pili de tipo IV representan la clase más sofisticada y diversa de estos filamentos. Poseen muchas funciones incluyendo locomoción, adherencia a superficies y a células del huésped, incorporación de ADN y secreción de proteínas (Berenike *et al.*, 2015). Debido a la variabilidad que presentan y basados en evidencia genómica se han clasificado en tres tipos, designados IVa, IVb y IVc (Denise *et al.*, 2019).

Los miembros mayormente estudiados pertenecen al subgrupo IVa, maquinarias dinámicas que pueden elongar el filamento por polimerización o retraerlo por despolimerización. Este movimiento de extensión y retracción coordinada es el responsable de la movilidad por *twitching*, que permite a las células moverse y explorar su entorno (Giltner *et al.*, 2012). Cuando el pilus se adhiere a un objeto y luego retrae el filamento mediante su despolimerización, se aplica una fuerza considerable sobre el cuerpo de la bacteria, lo que da origen al movimiento bacteriano sobre esta superficie (Skerker *et al.*, 2001) permitiéndole explorar distancias considerables (Jin *et al.*, 2011).

Estos pili también son los responsables, en ciertos tipos bacterianos, de la adhesión por los polos (perpendicular a la superficie) y del movimiento de “caminata” que facilita la rápida exploración de áreas pequeñas (Wong *et al.*, 2015).

Los pili de tipo IV están ampliamente distribuidos entre las bacterias y archeas (Berry *et al.*, 2015). Los de tipo IVa representan una clase uniforme que es encontrada en patógenos humanos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *Nesisseria spp.*, así como también en bacterias ambientales como *Myxococcus xanthus* o *Shewanella putrefaciens*. El subtipo IVb es menos homogéneo y ha sido muy bien caracterizado para *E. coli* o *V. cholerae* (Tomich *et al.*, 2006). Recientemente, algunos miembros del subtipo IVb fueron reclasificados como subtipo IVc (Ellison *et al.*, 2017). Estos sistemas habían sido caracterizados previamente como tipo *tad* (por sus siglas en inglés *tight adherence*) en estudios de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Kachlany *et al.*, 2001a), y se los caracterizaba por tener pilinas de tamaño molecular pequeño (menos de 10 KDa), comparada con los otros dos subtipos. Sin embargo, luego de esta descripción, se observó que este tipo de pili estaba ampliamente distribuido en muchas especies (Tomich *et al.*, 2006). Un análisis comparativo genómico muestra que estos pili tienen similitud con aquellos previamente caracterizados en *Caulobacter crescentus*, para el cual se utilizó la nomenclatura *cpa*, también usada en *Ensifer meliloti* (Viollier *et al.*, 2017). En *A. tumefaciens*, también se caracterizó este sistema, pero se nombró con las siglas *ctp* (por la abreviatura en inglés *cluster of type IV pili*). Además, este sistema ha sido descrito en *Vibrio vulnificus* (Pu *et al.*, 2018) y en *Ralstonia solanacearum* (Wairuri *et al.*, 2011), en los cuales se lo nombró como tipo *tad*. Para todos estos casos, las diversas nomenclaturas corresponden a sistemas homólogos y en todos los casos codifican pili tipo IVc o *tad*.

Este sistema de pili comprende un sistema de proteínas embebidas en la membrana que facilitan el transporte de la pilina y permiten su polimerización. También se encuentra una ATPasa que entrega la energía al sistema y varias chaperonas que colaboran con el transporte de los componentes hacia su localización. Además, se requiere de una proteasa específica que procesa la pilina antes de su transporte. En otros organismos se han reportado algunos genes adicionales que codifican para otras proteínas accesorias (Merserau *et al.*, 1990).

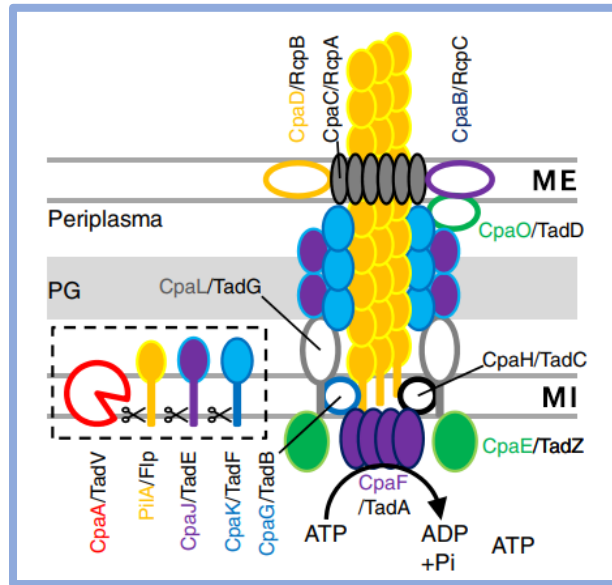


Figura 1.4 Estructura del pili tipo IV. ME: Membrana externa; MI: Membrana interna; PG: Peptidoglicano. Se indica la ubicación celular de cada proteína y su función. Las equivalencias de la nomenclatura Tad/Rcp y Cpa están indicadas. Tomado de Viollier et al. (2017).

En la Figura 1.4 se muestra un esquema de los principales componentes involucrados en las diferentes funciones descritas y utilizadas por estos sistemas tipo *tad* o Ivc. La ATPasa (TadA/CpaF/CtpG) aporta la energía al sistema acoplado la hidrólisis de ATP al sistema de secreción de los componentes. Diversas proteínas estructurales como TadB/CpaG/CtpH y TadC/CpaH/CtpI constituyen el andamio a la membrana citoplasmática interna (Bhattacharjee MK *et al.*, 2001). TadZ/CpaE/CtpF son proteínas citoplasmáticas que se asocian con la maquinaria Tad/Cpa anclada a la membrana, y son requeridos para el ensamblaje del canal de secreción RcpA/CpaC/CtpD (Viollier *et al.*, 2002) y para la localización efectiva de la ATPasa TadA/CpaF/CtpG (Perez *et al.*, 2012). Las prepilinas Flp/PilA/CtpA son insertadas en la membrana citoplasmática, maduras por la peptidasa TadV/CpaA/CtpB (Tomich *et al.*, 2006) y ensambladas en fibras poliméricas a través del canal de secreción RcpA/CpaC/CtpD (Haase *et al.*, 1999). Las pseudopilinas TadE/CpaJ y TadF/CpaK son procesadas también por la peptidasa TadV/CpaA/CtpB y son requeridas para la extrusión de la pilina de la superficie celular (Merserau *et al.*, 1990), aunque no son fundamentales en la composición de la fibra del pili (Tomich *et al.*, 2006). La proteína de membrana TadG/CpaL se encarga de mediar las interacciones proteína-proteína entre la fibra de pilina polimerizada y componentes de la envoltura celular, posiblemente con el fin de conectar el pili al peptidoglicano (Wang *et al.*, 2005). Finalmente, podemos encontrar a la proteína TadD/CpaO, la cual media la asociación de subunidades de RcpA y actúa como un factor de ensamblaje para la inserción de RcpA en la membrana externa (Clock *et al.*, 2008).

1.6.2 Rol de los pili en la adhesión y la formación de *biofilm*

La movilidad sobre superficies, del tipo *twitching*, está mediada por la extensión y retracción de los pili (Skerker *et al.*, 2003). O'Toole y Kolter (1998b) sugirieron que los pili de tipo IV tienen un rol directo en la estabilización de las interacciones con una superficie abiótica (que pueden haberse iniciado con la movilidad mediada por flagelos, como fue mencionado previamente) y también de las interacciones célula-célula requeridas para la formación de microcolonias (segunda etapa de formación de *biofilms*).

Esta movilidad de tipo *twitching* mediada por los pili de tipo IV puede también ser necesaria para la migración de las células a través de la superficie para formar agregados multicelulares (Schembri *et al.*, 2002). Este proceso fue detallado para *Xylella fastidiosa* donde, en mutantes que carecían de su sistema de pili tipo IV, no se observaba este fenómeno de autoagregación, concluyendo que su presencia es necesaria para que dicho fenómeno suceda (Li *et al.*, 2007). También se ha demostrado que las proteínas PilA2 y PilC (propias de sistemas de pili tipo IV), se expresaban abundantemente tanto en la etapa temprana de adhesión como en la etapa tardía de dispersión, reafirmando así su importancia en la adhesión, así como el rol de la movilidad por *twitching* durante la formación del *biofilm* (Caserta *et. al*, 2010).

Mientras que la superficie bacteriana es, en general, hidrofílica, los pili normalmente tienen un alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos en su estructura (Wadstorm *et al.*, 1983). Este carácter hidrofóbico puede aportar una gran contribución a la adhesividad de estos pili (Hermodson *et al.*, 1978). En particular, para *B. diazoefficiens* se ha determinado la participación de un pili (de alto peso molecular) en la interacción con superficies hidrofóbicas, mostrando un aumento variable en la adhesión, dependiente del estado de crecimiento de la bacteria y de las cepas ensayadas (Vesper y Bauer *et al.*, 1986). Sin embargo, para este sistema no se hallaron evidencias genéticas que corroboren su presencia y funcionamiento.

Como fue mencionado previamente, las lectinas tienen un rol importante en la adhesión. En *B. diazoefficiens* se ha reconocido que la expresión de una lectina, denominada BJ38 (posteriormente renombrada como TadG), que posee la capacidad de unirse a lactosa y galactosa, se relaciona con el proceso de adhesión de las bacterias a raíces (Mongiardini *et al.*, 2016; Lodeiro y Favelukes *et al.*, 1999). La expresión de esta lectina estaría influenciada también por la presencia de flavonoides específicos del hospedante, reforzando la idea de la participación de dichas estructuras en las etapas tempranas de la interacción rizobio-leguminosa (Loh *et al.*, 1994).

Además de su rol en la adhesión y movilidad, los sistemas de pili tipo IV han sido descritos como mecanosensores en *Caulobacter crescentus* y *P. aeruginosa*, los cuales pueden percibir el

contacto con la superficie y, por ende, son claves en la transición de un estado planctónico a un estilo de vida multicelular en *biofilm* (Skerker *et al.*, 2001; Persat *et al.*, 2015).

El locus *tad* fue caracterizado como fundamental para la formación de *biofilm* por primera vez para el patógeno *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, y posteriormente se determinó su presencia en muchos otros patógenos (Kachlany *et al.*, 2001a). El requerimiento de los pili de tipo IV para la formación de *biofilm* en superficies abióticas tiene una implicancia adicional, ya que han sido reportados como un factor importante en la adhesión bacteriana a células eucariotas y su patogénesis (Woods *et al.*, 1980). Esto podría sugerir un rol durante la etapa inicial de la formación de *biofilm*.

Si bien en *B. diazoefficiens* se ha realizado una caracterización parcial de algunos sistemas de pili presentes en esta bacteria, todavía no se ha profundizado en el estudio de sus posibles funciones ya sea en la formación de *biofilm* o en su relación con su simbionte. Es por esto que en este trabajo hemos planteado una caracterización bioinformática detallada de estos sistemas e iniciado algunos estudios mediante mutagénesis que podrán esclarecer estas cuestiones.

1.6 Objetivos

Objetivos generales:

El laboratorio donde se ha realizado este trabajo estudia diversos factores implicados en la adhesión de *B. diazoefficiens* USDA 110 a una superficie. Estos mecanismos de reconocimiento que la bacteria utiliza para percibir una superficie pueden darse cuando la misma interacciona con una superficie abiótica para iniciar la formación de un *biofilm* o cuando entra en contacto con la raíz de la planta para iniciar el proceso simbiótico. El trabajo se enfocará en la caracterización de la función de dos estructuras filamentosas que sintetiza la bacteria, los flagelos y los pili, durante la formación de *biofilm*.

Además, el otro objetivo general de este trabajo es contribuir a la formación del alumno Ian Emilio en las prácticas de laboratorio e introducirlo en comprender el razonamiento científico necesario para la investigación científica.

Objetivos específicos:

- Caracterización mediante análisis bioinformáticos de los distintos cúmulos de genes que codifican para posibles pili en *B. diazoefficiens* USDA 110.
- Evaluar la posible función de los flagelos durante el proceso de adhesión a superficies abióticas y su influencia en la formación del *biofilm*
- Construcción de mutantes en genes que codifican para componentes del sistema de pili de *B. diazoefficiens* USDA 110.



MATERIALES Y
MÉTODOS

CAPÍTULO
DOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados durante este trabajo se detallan en las Tablas 2.1 y 2.2 respectivamente junto a sus principales características

Tabla 2.1: Cepas bacterianas

Cepas bacterianas	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>recA</i> , Δ <i>lacU169</i> , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15	Bethesda Res. Lab.
<i>B. diazoefficiens</i>		
USDA 110	Cepa salvaje <i>Nod</i> ⁺ <i>Fix</i> ⁺ <i>Cm</i> ^R	Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA)
USDA 110 Δ<i>fliC</i>	Mutante delecional derivado de USDA 110	Mengucci <i>et al.</i> , 2020cita
USDA 110 Δ<i>fliB</i>	Mutante delecional derivado de USDA 110	Dardis C., 2019

Tabla 2.2: Plásmidos

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pK18mobSacB	Vector suicida en rizobios, <i>Mob</i> ⁺ , <i>Km</i> ^R , <i>SacB</i> ⁺	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK18mobSacB-1440	Vector derivado de pK18mobSacB conteniendo el gen <i>bll1440</i>	Este trabajo
pG18mob2	Vector suicida en rizobios, <i>Mob</i> ⁺ , <i>Gm</i> ^R	Kirchner y Tauch <i>et al.</i> , 2003
pG18mob2-3500	Vector derivado de pG18mob2 conteniendo el gen <i>blr3500</i>	Este trabajo

2.2 Procedimientos microbiológicos

2.2.1 Medios de cultivo

- Para el cultivo de *Escherichia coli* se utilizó el medio Luria-Bertani (LB, Sambrook *et al.*, 1989) cuya composición es:

Componente	Cantidad
Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l
Glucosa	1 g/l
Agua (desionizada)	1000 ml

Para medios sólidos se agregó agar 15 g/l y, cuando fue necesario, se agregó X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido) a una concentración final de 40 μ g/ml.

- Para el cultivo de *B. diazoefficiens* se utilizó:
 - Medio extracto de levadura-manitol (YEM, Vincent *et al.*, 1970) cuya composición es:

Componente	Cantidad
Manitol	10 g/l
Extracto de levadura	0,4 g/l
NaCl	0,1 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
Agua (desionizada)	1000 ml

Para medio sólidos se agregó agar 15 g/l y rojo Congo en una concentración de 2,5 g/l

- Medio HM (Mengucci *et al.*, 2020)

Componente	Cantidad
Na ₂ HPO ₄	0,125 g/l
Na ₂ SO ₄	0,25 g/l
NH ₄ Cl	0,32 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,18 g/l
FeCl ₃	0,04 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,013 g/l
L-arabinosa	5 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
HEPES	1,3 g/l
MES	1,1 g/l

- Medio AG

Componente	Cantidad
Extracto de levadura	0,1% g/l
L-arabinosa	0,1% g/l
Gluconato de sodio	0,1% g/l
Ca ²⁺	20-25 g/l
Mg ²⁺	10-12,5 mg/l
Agua (desionizada)	1000 ml

2.2.2 Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en agua bidestilada a una concentración de 1000x y se esterilizaron por filtración por membrana (filtros Milipore de 0,22 μm). Las concentraciones finales de antibióticos en los medios de cultivo se listan abajo ($\mu\text{g/ml}$).

E. coli: gentamicina (10), kanamicina (25)

B. diazoefficiens: kanamicina (150), cloranfenicol (20)

2.2.3 Conservación de cepas

Para la conservación de cepas a largo plazo, las mismas se crecieron previamente hasta fase logarítmica tardía en YEM o LB según fuesen *B. diazoefficiens* o *E. coli* respectivamente, y se suplementaron con glicerol al 25% (v/v) para almacenarlas a -20°C . Para su uso rutinario, alícuotas de estas reservas se hicieron crecer en YEM o LB sólido con los antibióticos correspondientes y se mantuvieron a 4°C por períodos que no excedieron los 60 días.

2.2.4 Evaluación de capacidad de formar *biofilm* en vidrio

Para la evaluar la formación y adhesión de *biofilms* a tubos de vidrio, se utilizaron cultivos starter de *B. diazoefficiens* en medio AG con manitol o arabinosa como fuente de carbono al 0,1%. Los cultivos fueron incubados en agitación (180 rpm) durante 3 días hasta alcanzar una densidad óptica a 500 nm (DO_{500}) cercano a 3 unidades. Se realizaron diluciones seriadas con medio de cultivo HM fresco hasta llegar a una DO_{500} de 0,1 unidades (concentración alta) y 0,01 unidades (concentración baja). Se incubó 4 ml de las diluciones resultantes en tubos de ensayo por cuadruplicado por un máximo de 21 días a 28°C sin agitación, utilizando como control negativo medio de cultivo sin inocular.

Se cuantificó la formación de *biofilms* en los tubos de ensayo utilizando un método semicuantitativo. Se descartó el cultivo y se realizaron lavados consecutivos con 5 ml de agua destilada. Posteriormente, se secaron en estufa de 65°C y se agregaron 5 ml de colorante Cristal Violeta 1% en agua durante 15 minutos. Pasado dicho tiempo, se volvieron a realizar lavados con agua destilada y se secaron nuevamente en estufa a 65°C . Finalmente se disolvió el colorante adherido al tubo con ácido acético 33% (v/v) y se cuantificó la cantidad de *biofilm* formado midiendo la absorbancia en espectrofotómetro a 595nm (Abs_{595}).

2.3 Técnicas de Biología Molecular y oligonucleótidos utilizados

2.3.1 Obtención de ADN molde

Obtención por calentamiento: las células de los cultivos crecidos en medio sólido fueron resuspendidas en 50 µl de agua bidestilada estéril. La suspensión se calentó a 100°C por 10 minutos y se centrifugó a 14000 xg durante 10 minutos. Un volumen de 3 µl de los sobrenadantes obtenidos fueron usados como molde para las reacciones de PCR.

Preparación de ADN con resina: a partir de una estría de un cultivo bacteriano de medio sólido, se hizo una resuspensión de la misma en 300 µl de NaCl 1M. Se incubó a temperatura ambiente por 2 horas y se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm. El pellet se lavó con 300 µl de agua bidestilada y se centrifugó nuevamente. Se agregó 150 µl de resina Chelex (6%) (Sigma^R) en agitación, se mezcló y se dejó incubar durante 20 minutos a 56°C. Finalmente se incubó durante 8 minutos a 99°C y se separó por centrifugación. El sobrenadante obtenido se usó como molde en las reacciones de PCR requeridas.

2.3.2 Preparación de ADN plasmídico

Los plásmidos de *E. coli* fueron preparados por la técnica de lisis alcalina descrita por Sambrook *et al.* (1989). Brevemente, se suspendieron bacterias crecidas en medio sólido en una solución Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH=8.0. Se agregó luego una solución de NaOH 0,2 M, SDS 1% y se mezcló por inversión suave. Finalmente, se agregó una solución de acetato de potasio (KAc) 3M, pH=4.8 mezclando suavemente. Luego se centrifugó la mezcla a 14000 xg durante 15 minutos a 4°C y se agregó 15 µl de una suspensión de óxido de silicio en agua bidestilada (45 g/L). Se centrifugó a 14000 xg y se lavó el sedimento tres veces con una solución de NaCl 50 mM, Tris 10 mM, pH=7,5, EDTA 2,5 mM y etanol 50%. Posteriormente se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada, se incubó durante 5 minutos a 65°C, se centrifugó a 14000 xg y se tomó el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico.

2.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico BioRad MyCycler o similar. La composición de las mezclas de reacción utilizada fue: Tris-HCl 50 mM, pH=8,3, DMSO, MgCl₂ 3 mM; dNTPs 200 µM; 2 U Taq ADN polimerasa (Promega Corp.) o Pfx (Hifi, Promega Corp.), y cada uno de los cebadores para PCR producidos por Tecnolab.

En la tabla 2.3 se encuentran los cebadores usados para amplificar los fragmentos de ADN.

Tabla 2.3: Cebadores

Cebador	Características	Secuencia	Referencia
M13Fw	Cebadores estándar, para control de presencia de inserto	GTAAAACGACGGCC AGT	Genéricos
M13Rv	Cebadores estándar, para control de presencia de inserto	GCGGATAACAATTC ACACAGG	Genéricos
Fw1440-EcoRI	Para amplificación del fragmento <i>bll1440</i> , con sitios de corte para la enzima EcoRI (subrayado)	CTTGAATTCGGCGAC CAGCACATCCTT	Este trabajo
Rv1440-HindIII	Para amplificación del fragmento <i>bll1440</i> , con sitios de corte para la enzima HindIII (subrayado)	CCTAAGCTTAGCGGC ATTCCCTATGGC	Este trabajo
Fw3500-BamHI	Para amplificación del fragmento <i>blr3500</i> , con sitios de corte para la enzima BamHI (subrayado)	ATCGGATCCAGCACC GTTGCGAAAGGA	Este trabajo
Rv3500-HindIII	Para amplificación del fragmento <i>blr3500</i> , con sitios de corte para la enzima HindIII (subrayado)	TGCAAGCTTCCGGCG ATTGCAAAGCTC	Este trabajo

2.3.4 Tratamientos enzimáticos del ADN

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y buffers propuestos por los proveedores, y las recomendaciones descritas en Sambrook *et al.* (1989). Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5 – 5 µg de ADN y 0,5 – 1 unidad de la enzima a utilizar en el buffer correspondiente, en volúmenes finales de 10 – 25 µl. Estas reacciones se prepararon incubando las mezclas de reacción a la temperatura indicada por el fabricante durante un período de tiempo de al menos 12 horas.

Las ligaciones de los productos de las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron utilizando la enzima DNA Ligasa T4 de NEB y su respectivo buffer. Se realizó una solución *mix*, se incubó *overnight* a 16°C y luego se inactivó la enzima 15 minutos a 65°C. La solución *mix* está compuesta generalmente por 11 µl de inserto, 6 µl del plásmido digerido, 2 µl de buffer y 1 µl de ligasa.

2.3.5 Electroforesis de ácidos nucleicos

Las preparaciones plasmídicas, de ADN total, los productos de digestión y de PCR fueron separados en geles de agarosa al 0,8 o 1% según el tamaño del fragmento a separar, conteniendo 0,5 µg de bromuro de etidio por mililitro de agarosa y utilizando TBE (Trisborato 45 mM, EDTA 1mM pH=8) como buffer de corrida. Como marcador de peso molecular fue utilizado el Ladder 100 (Promega Corp.). Como buffer de siembra se usó azul de bromofenol 0,25%. El perfil de bandas obtenido fue fotografiado usando una cámara digital Kodak modelo DC 120 bajo iluminación de luz ultravioleta.

2.3.6 Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de *E. coli*

Para la preparación de células electrocompetentes se siguió la técnica de Tung y Chow (1995). Se inocularon 500 ml de medio LB sin el agregado de NaCl con 1 ml de cultivo de la cepa de *E. coli* de interés, crecida *overnight*. El cultivo fue incubado a 37°C y agitado vigorosamente hasta que la densidad óptica a 500 nm (DO₅₀₀) llegó a 0,8 unidades. Las células fueron centrifugadas a 4000 xg por 15 minutos a 4°C y se lavaron dos veces con 200 ml de glicerol 10% a 4°C. Luego, las células se suspendieron suavemente en baño de agua-hielo en 0,5 ml de GYT (glicerol 10%, extracto de levadura 0,125% y triptona 0,25%) y se fraccionaron en alícuotas de 100 µl. Las mismas se conservaron congeladas a -80°C hasta su utilización.

Las electrotransformaciones fueron utilizadas para introducir los vectores plasmídicos construidos en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α. Estas fueron llevadas a cabo usando un equipo Gene Pulser provisto por BioRad en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 µF, 200 Ω, 2,5 kV). En ellas, se dispusieron 100 µl de *E. coli* electrocompetentes y 2 µl de plásmido a utilizar. Si el plásmido provenía de una ligación previa, se dializó la muestra para eliminar las sales presentes. Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente a las células 1 ml de medio LB y la mezcla se incubó aproximadamente 1 hora a 37°C para permitir que la información contenida en el ADN introducido se expresara.

Posteriormente las bacterias fueron plaqueadas en medio LB sólido con los antibióticos adecuados e incubadas durante toda la noche a 37°C.

En los casos en que fuera necesario se utilizó la selección por X-Gal. El fundamento de esta herramienta, llamada α-complementación, consiste en que la enzima β-galactosidasa está formada por dos productos codificados genéticamente denominados *lacZ*Ω y *lacZ*α. Este último se encuentra

delecionado en la bacteria hospedante (DH5 α) pero será otorgado por el plásmido adquirido. De esta manera, en presencia de *lacZ* α se genera la β -galactosidasa y el compuesto X-gal es hidrolizado y convertido en otro compuesto insoluble de color azul. Así, aquellas colonias que hayan adquirido un plásmido con inserto, tendrán interrumpido el gen *lacZ* α plasmídico y no se producirá compuesto coloreado, por lo que la colonia será blanca.

2.3.7 Construcción de mutantes

La construcción de mutantes se llevará a cabo siguiendo la metodología aplicada con éxito en el laboratorio (Mongiardini E.J., 2008; Althabegoiti M.J., 2008; Dardis C., 2019). La mutación sitio-específica por intercambio alélico entre el gen de interés y un gen de resistencia a antibiótico se realizará como se detalla a continuación. Fragmentos específicos de ADN que flanqueen el gen a mutagenizar (Up y Dw) se amplificarán mediante PCR. Los cebadores para las reacciones específicas de PCR se diseñarán con sitios de restricción que faciliten el clonado en el vector no replicativo en *B. diazoefficiens* que se utilizará para la recombinación. En nuestro caso los vectores utilizados para las construcciones fueron pK18mobSacB (Km^R) y pG18mob2 (Gm^R).

Una de las estrategias de mutagénesis utilizada consiste en la inserción de un *cassette* que contenga una resistencia a un determinado antibiótico, lo cual impedirá la expresión de todos los genes que se encuentren río abajo en el operón en el cual se encuentre ese gen. Así, los transformantes serán seleccionados por las resistencias a los antibióticos presentes en el plásmido y el gen de resistencia que interrumpe los fragmentos específicos (Up y Dw). Los mutantes que hayan sufrido el proceso de recombinación doble deberán presentar un fenotipo con la resistencia de este antibiótico y ser sensibles al antibiótico que lleva el vector.

Para la estrategia de mutagénesis deletional, los insertos serán clonados en el plásmido pK18mobSacB para la posterior delección de un fragmento del mismo, mediante el uso de enzimas de restricción. En este caso, el plásmido pK18mobSacB, expresa un gen de toxicidad para la bacteria en presencia de sacarosa, que permite hacer una contraselección de transconjugantes para obtener los mutantes deseados. En esta técnica se selecciona en primer lugar recombinantes simples, resistentes al antibiótico que lleva el vector y que por lo tanto que haya incorporado el plásmido al cromosoma. Finalmente, se busca la resolución de dichos recombinantes mediante la selección con sacarosa que permitirá encontrar genotipos que hayan eliminado el fragmento deseado (mutantes deletionales) o hayan resuelto al genotipo salvaje eliminando el plásmido completo. La verificación entre ambos genotipos se realizará mediante PCR específicas.

Ambas estrategias se encuentran representadas en la figura 2.1.

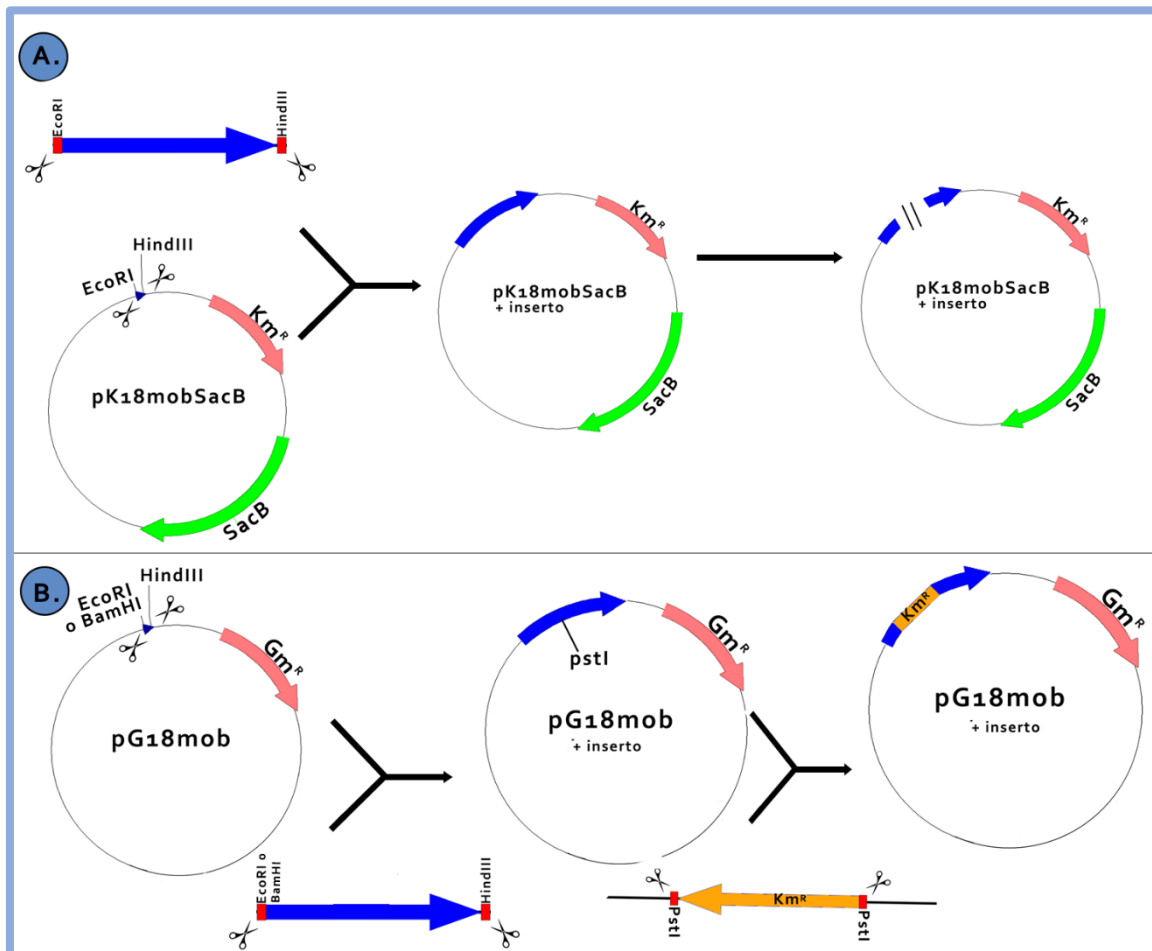


Figura 2.1 Esquema del clonado de los fragmentos en los vectores de clonado. A: esquema del clonado delecional. Se esquematiza al plásmido pK18mobSacB en el cual se puede ver su región de múltiple clonado mostrando los sitios de corte para las enzimas EcoRI y HindIII y el fragmento obtenido en la PCR realizada con cebadores conteniendo los sitios de corte para las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. En la derecha se aprecia una representación del plásmido luego de la inserción del fragmento. **B:** esquema del clonado insercional. Se esquematiza en la izquierda al plásmido pG18mob pK18mobSacB en el cual se puede ver su región de múltiple clonado mostrando los sitios de corte para las enzimas EcoRI/BamHI y HindIII y el fragmento obtenido en la PCR realizada con cebadores conteniendo los sitios de corte para las enzimas de restricción. En el medio se observa un esquema del resultado de la ligación del plásmido con el inserto, donde se observa el sitio de corte para PstI; y el cassette de kanamicina con los sitios de corte para PstI. En la derecha se esquematiza la construcción final, con el inserto interrumpido por el cassette de kanamicina. **C:** Gel de agarosa de las minipreparaciones de ambos plásmidos de entrada.

Los probables mutantes obtenidos se confirmarán mediante PCRs específicas utilizando pares de cebadores externos a los sitios de recombinación.

2.4 Herramientas bioinformáticas

2.4.1 Bases de datos

NCBI e Integrated Microbial Genomes & Microbiomes (IMG/M). El NCBI es el Centro Nacional para la Información Biotecnológica y es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de los

Estados Unidos. En éste se almacena y se actualiza constantemente la información referente a secuencias genómicas, artículos científicos referidos a biomedicina, biotecnología, bioquímica, genética y genómica, además de otros datos biotecnológicos de relevancia en diversas bases de datos.

El IMG/M contiene la anotación y análisis de genomas y conjuntos de datos microbianos secuenciados en el Joint Genome Institute (JGI).

2.4.2 BLAST

Es una herramienta de búsqueda por similitud entre una secuencia problema y las secuencias disponibles en una base de datos.. BLAST puede hacer búsquedas en una base de datos no redundante (*nr*), la cual tiene los registros entre las dos bases de datos principales a nivel mundial: GenBank en EE.UU. y EMBL (European Molecular Biology Laboratories) en Europa.

En este trabajo se utilizó BLAST-P, la cual compara una secuencia de aminoácidos contra la base de datos de secuencias de proteínas depositada en NCBI.

2.4.3 Alineamiento de múltiples secuencias (MSA)

El alineamiento de múltiples secuencias (MSA, por sus siglas en inglés) es el alineamiento de tres o más secuencias biológicas (proteínas o nucleótidos) utilizando un algoritmo de comparación. En este trabajo se utilizaron las herramientas Clustal Omega y T-Coffee, del servicio online que brinda el EBI (European Bioinformatics Institute).



R E S U L T A D O S

C A P Í T U L O
T R E S

3. RESULTADOS

3.1 Estudios bioinformáticos

3.1.1 Caracterización de los *clusters* de pili tipo IV de *B. diazoefficiens*

En muchas bacterias se han identificado y caracterizado los principales componentes del sistema de pili tipo IVc. Dentro del genoma de *B. diazoefficiens* USDA 110 se han encontrado tres *clusters* de genes que podrían estar involucrados en la formación de uno o varios sistemas de este tipo (Mongiardini, 2008, tesis).

Previamente en el laboratorio se caracterizó el rol de uno de estos *clusters* compuesto por tres genes denominados *tadGEF*, que podrían codificar algunos componentes de un pili tipo IVc en *B. diazoefficiens* (Mongiardini *et al.*, 2016) Este *cluster* fue identificado mediante homología de secuencia parcial entre el gen que codifica para la lectina BJ38 descrita previamente en *B. diazoefficiens* (Ho *et al.*, 1990; Loh *et al.*, 1994) y el gen *tadG* (*blr3941*). Un mutante en este *cluster* mostró un defecto en la competición para la nodulación, sin embargo, no se pudo observar un efecto en la adhesión a raíces de soja ni una alteración en la producción de pili (Mongiardini *et al.*, 2016). Durante ese estudio se encontraron, por similitud de secuencia aminoacídica, otros dos probables *cluster* que podrían ser los responsables de codificar para estructuras del pili tipo IVc relacionadas al *cluster tadGEF*, sin embargo, no se profundizó en el tema.

En este trabajo se realizó una caracterización más exhaustiva de los otros 2 *clusters* previamente hallados, con el fin de asignar funciones a cada uno de los genes que los constituyen y determinar duplicaciones y/o falta de función o de algún gen estructural. Además, analizamos los genes que codifican para las funciones principales en este tipo de sistema de secreción (Figura 3.1.1).

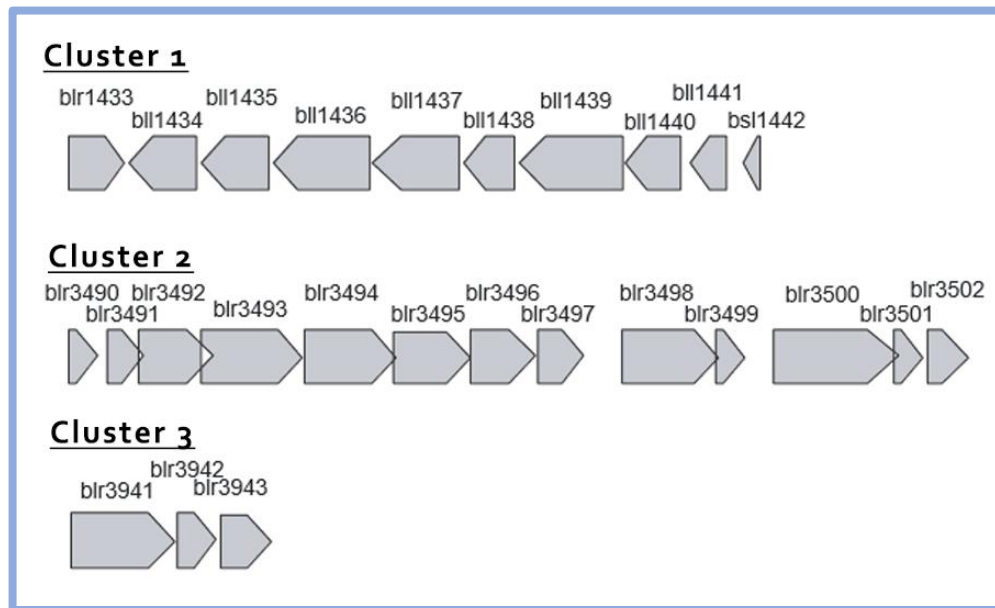


Figura 3.1.1: Esquema de la organización genética de los cluster de pili tipo IV en *B. diazoefficiens*

Como mencionamos en la introducción, estos sistemas de pili tipo IVc han sido estudiados de forma exhaustiva en diversos microorganismos. Desde la primera descripción del sistema a la fecha, su estudio se ha ampliado a diversas especies (Pu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014; Bernard *et al.*, 2009; Kachlany *et al.*, 2001; Zatakia *et al.*, 2014; Viollier *et al.*, 2018; Wairuri *et al.*, 2011). Con el fin de hacer una asignación de función basada en similitud de secuencia utilizando la información que ha surgido en los últimos años, se realizó una comparación sobre múltiples bacterias caracterizadas utilizando la herramienta Blast-P (Altschul *et al.*, 1997). Para esto se utilizaron los genomas de *C. crescentus* NA1000 (txid: 565050); *Agrobacterium fabrum* C58 (txid: 176299) (Wang *et al.*, 2014); y *Sinorhizobium ensifer* 2011 (antes *melitoti*) (txid: 1286640) (Zatakia *et al.*, 2014), para los cuales, estos sistemas de pili han sido estudiados experimentalmente. Además, se buscaron parálogos utilizando la propia secuencia de *B. diazoefficiens* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002) y como control para corroborar las búsquedas hechas previamente. También se incluyó *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cepa HK1651 (txid: 272556), ya que fue uno de los primeros organismos modelo donde se describió este sistema tipo *tad* (Kachlany *et al.*, 2001). En el capítulo Anexo se muestran los resultados obtenidos para estas comparaciones entre los genes de cada uno de los clusters (*blr1433- bsl1442* (Tabla A.3), *blr3490-blr3502* (Tabla A.4) y *blr3941-blr3943* (tabla A.5)) de *B. diazoefficiens*. En cada tabla se detallan el o los genes parálogos encontrados en *B. diazoefficiens* y los homólogos para cada uno de los microorganismos elegidos, junto con los porcentajes de identidad y similitud para cada gen.

Podemos observar que, en estas búsquedas, se encontraron genes con alto número de identidad/positividad al compararlos con los genes de *B. diazoefficiens* USDA 110. Este es un primer indicio de que este tipo de sistema está presente en nuestra cepa de estudio. Para hacer una primera posible asignación de función para cada uno de los genes, se utilizaron estos resultados de las comparaciones de secuencia y a partir de los genes homólogos hallados se realizó una búsqueda bibliográfica para cada uno. De esta manera obtuvimos las tablas que se muestran en el capítulo Anexo (Tablas 3.2, 3.4 y 3.6) donde se hizo una posible asignación de función para cada gen que conforman los *clusters* 1, 2 y 3. A partir del análisis de estas comparaciones podemos obtener varios resultados:

1) En primer lugar, pudimos asignar posibles funciones a la mayoría de los genes de cada *cluster* en base a similitud de secuencia aminoacídica con los sistemas previamente descritos (Anexo, Tablas 3.4 a 3.6). Sin embargo, para el *cluster* 2 encontramos dos genes que codifican para proteínas hipotéticas (*blr3490* y *blr3501*) y de los cuales no se encontraron parálogos en *B. diazoefficiens* ni homólogos en los microorganismos con los que se comparó. Además, en este *cluster* también encontramos un gen que codifica para una posible proteína similar a una S-isoprenilcisteína metiltransferasa (*blr3497*), para la cual podríamos inferir, por su posible función, que no estaría relacionada con la biosíntesis del pili. Las S-isoprenilcisteína metiltransferasas catalizan la metilación dependiente de S-adenosil-L-metionina del grupo carboxilo de las proteínas, las cuales han sido descritas para *Saccharomyces cerevisiae* (Romano y Michaelis *et al.*, 2001), en la ruta de síntesis de DMS (dimetilsulfuro), un quimioatrayente que puede jugar un papel considerable en la estructuración de comunidades bacterianas (Raina *et al.*, 2010).

2) Los *clusters* 1 y 2, compuestos por un mayor número de genes parecerían codificar para todos los componentes necesarios para sintetizar un sistema de pili completo. En la figura 3.1.5 se muestra un resumen de este resultado con los genes en amarillo asociados a cada posible función/estructura. Esto parece indicar que en *B. diazoefficiens* USDA 110 este sistema estaría duplicado, como sucede en otras bacterias como *Vibrio vulnificus* (Pu *et al.*, 2018) y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Planet *et al.*, 2003). Dicha duplicación parece repetirse en diversas especies bacterianas debido al requerimiento de estos loci en la colonización de superficies o su virulencia (Pu *et al.*, 2018).

3) En las búsquedas realizadas aparecen nuevos genes que codifican para posibles proteínas con funciones relacionadas a estructuras que podrían formar parte de sistemas de pili tipo IVc y que no habían sido encontrados en las búsquedas previas (Mongiardini *et al.*, 2016). Estos genes se agrupan en un nuevo *cluster*, que nombraremos como *cluster* 4, y está formado por los genes

codificados en los loci *bsr0662* a *bII0667*. En la figura 3.1.2 se muestran los genes hallados y la organización de los mismos. Con el fin de hacer una identificación se repitió el análisis previo que se hizo para los *clusters* anteriores. El resultado de similitud y asignación de funciones se muestra en las Tabla A.7 y A.8 del capítulo Anexo. En la figura 3.1.5 se pueden ver las posibles funciones para las cuales estarían codificando estos genes marcado en verde. Como se puede observar, este *cluster* no codifica para todos los componentes de un pili tipo IVc y podría tratarse de una duplicación parcial de algo de los otros *clusters*, y/o complementar funciones de alguno de ellos (figura 3.1.4).

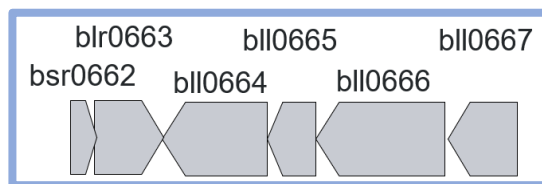


Figura 3.1.2 Esquema de la organización genética del cluster 4 (*bsr0662* a *bII0667*) en *B. diazoefficiens*

4) En estas búsquedas, se identificaron varias copias del gen *pilA/ctpA*, que codificarían para posibles pilinas. Llamativamente solo una de estas copias (*bsl1442*) se encuentra codificada dentro de uno de los *clusters* (el *cluster* 1) (figura 3.1.4). Este resultado podría sugerir que el único *cluster* funcional fuera aquel que pueda codificar para esta pilina. Sin embargo, esta observación se repite en otras bacterias. En *A. tumefaciens* se halló una copia extra para otra pilina fuera del *cluster* del pili y ambos genes son funcionales e intercambiables funcionalmente (Wang *et al.*, 2014). Es por esto que no debería descartarse la posibilidad que algunas de las copias halladas por fuera de los *clusters* sean funcionales. Un análisis más detallado de estos genes se describe más adelante.

5) Otra particularidad hallada en este análisis corresponde al gen ubicado en el *cluster* 4 delante de *blr0663* (*tadD*). Este gen, *blr0662*, no presenta similitud con ningún componente de los sistemas de pili tipo IVc, sin embargo, podríamos considerarlo parte del *cluster*, ya que parece estar en operón con el gen contiguo de acuerdo a la predicción de operón que se muestra en la figura 3.1.3.

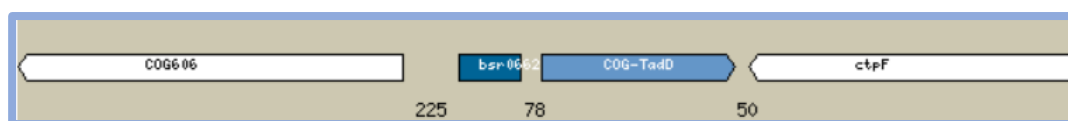


Figura 3.1.3 Predicción de operón para el gen *bsr0662-blr0663* de *Microbes Online* (Alm *et al.*, 2015)

El análisis por similitud de secuencia de este gen coincide con una proteína con dominio PilZ. Esto resulta muy interesante ya que este tipo de dominios está relacionado a mecanismos regulatorios asociados al segundo mensajero c-di-GMP. Este hallazgo podría dar indicios de los mecanismos regulatorios involucrados en la expresión de estos pili en *B. diazoefficiens*.

Este análisis nos ha permitido tener un conocimiento más detallado de los genes que codifican para posibles pili en *B. diazoefficiens*, pudiendo asignarles nombre y función a casi todos los genes distribuidos entre los cuatro clusters (figura 3.1.4). Esto facilitará el diseño experimental necesario para poder realizar estudios experimentales mediante mutagénesis.

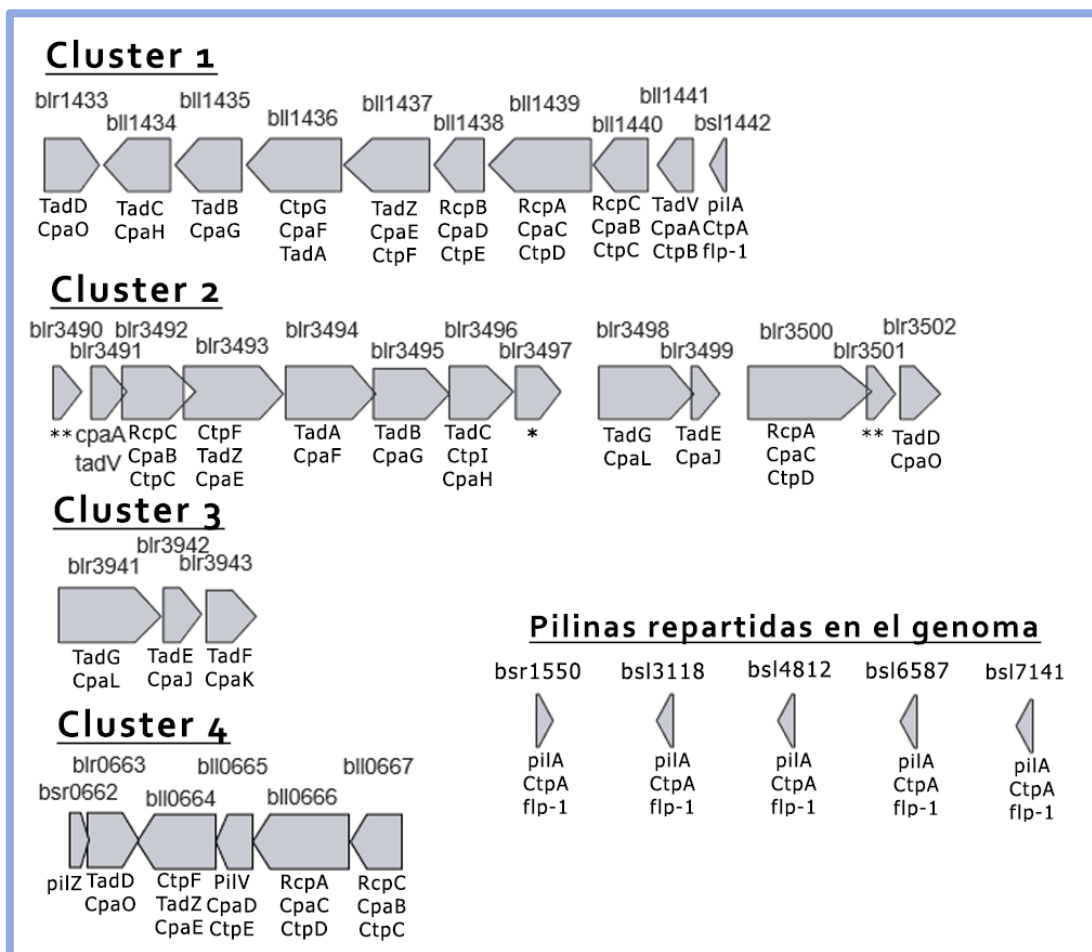


Figura 3.1.4 Esquema de la organización genética de los 4 clusters que codifican para genes de pili en *B. diazoefficiens* con su nombre en los distintos sistemas de nomenclatura. *: Proteína-S-isoprenilcisteína metiltransferasa, no involucrada en el pili. **: proteína hipotética.

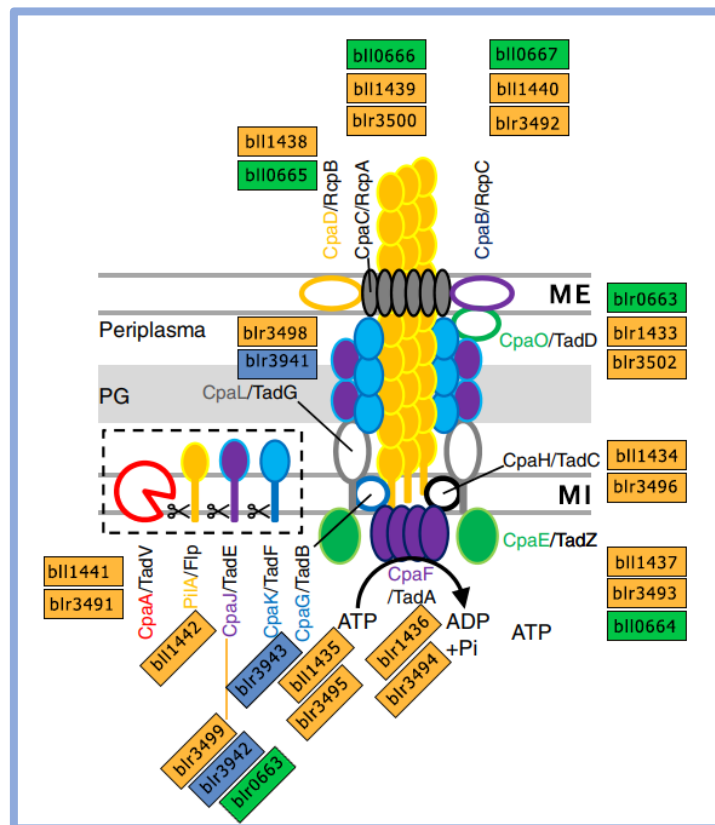


Figura 3.1.5 Estructura del pili tipo IV y la correspondencia de genes en *B. diazoefficiens*. ME: Membrana externa; MI: Membrana interna; PG: Peptidoglicano. Se indica la ubicación celular de cada proteína y su función. Las equivalencias de la nomenclatura Tad/Rcp y Cpa están indicadas. Se señala en recuadros naranjas los genes que codifican para cada proteína en los clusters mayores 1 y 2 (blr1433-blr1442 y blr3490-blr3502), en azul para el cluster 3 (blr3941-blr3943) y en verde el nuevo cluster 4 (bsr0662-blr0667). Modificado de Viollier et al., 2018.

3.1.3 Análisis de los componentes más importantes que constituyen los sistemas de pili

1 -Análisis de las probables pilinas encontradas en el genoma de *B. diazoefficiens*

Como se mencionó previamente, el análisis anterior nos permitió encontrar seis genes que codifican para posibles pilinas: una dentro del *cluster 1* (*bsl1442*) y otras cinco ubicadas al azar en el cromosoma, y sin tener una relación funcional directa con los genes vecinos: *bsr1550* (41/46); *bsl3118* (34/37); *bsl4812* (42/45); *bsl6587* (41/46); *bsl7141* (52/53) (entre paréntesis se indica la identidad/positividad comparada con *bsl1442*).

Un análisis inicial de las secuencias aminoacídicas (mediante un alineamiento múltiple de secuencias) de las pilinas muestra que 2 de ellas presentan una secuencia amino terminal más larga que las demás y que las caracterizadas en otros microorganismos. Sin embargo, una observación detallada muestra que esto podría deberse a una anotación errónea de los ORFs (marcos de lectura abiertos, o del inglés, **Open Reading Frames**), ya que para ambas secuencias se encuentra una

metionina ubicada en una posición conservada respecto de las otras pilinas, que podría corresponder a un inicio alternativo de la traducción (Figura 3.1.6).

Las pilinas de los sistemas de pili tipo *tad* comparten 3 características estructurales: una región amino terminal líder, veinte aminoácidos hidrofóbicos y un carboxilo terminal variable. También se encuentra una glicina conservada precediendo al sitio de corte del péptido líder; y un glutamato exactamente a cinco aminoácidos de distancia del extremo amino terminal del péptido maduro (Kachlany *et al.*, 2001). En la figura 3.1.6 se muestra el alineamiento de estas secuencias aminoacídicas con estas características resaltadas. La alta similitud de secuencia y la presencia de los dominios característicos estarían indicando que efectivamente se trata de posibles pilinas, a pesar de su ubicación en el cromosoma.



Figura 3.1.6 Alineamiento de secuencias múltiples de genes que codifican para pilinas en *B. diazoefficiens*. Se observan diversas características conservadas en los 6 genes: una región hidrofóbica (amarillo), donde se destacan los sitios de clivaje (flecha negra) del péptido líder (sombreado en azul) y un glutamato a 5 aminoácidos de distancia del extremo amino terminal del péptido maduro (E). En la mayoría hay también un residuo de tirosina (Y) invariable que sucede a este glutamato conservado. Luego de esta región hidrofóbica se encuentra una región carboxi-terminal (sombreada en rojo). Subrayadas se muestran las metioninas correspondientes a posibles inicios alternativos de la traducción de la cadena polipeptídica.

2- Caracterización de las probables ATPasas

Los sistemas de pili requieren de un componente encargado de aportar energía a través de la hidrólisis de ATP y que actúa como motor facilitando la polimerización de las subunidades de pilina, logrando la extensión del filamento. Asimismo, la retracción de estas fibras es crucial para su función, la cual ha sido descrita para los filamentos de algunos sistemas de pili tipo IV, tipo II y los pili de competencia de bacterias Gram positivas (Ellison *et al.*, 2019). En general esta función de

retracción es llevada a cabo por otra ATPasa específica para la retracción (Ellison *et al.*, 2019). El funcionamiento coordinado de estos componentes permite el desplazamiento de la bacteria sobre una superficie mediante un movimiento conocido como *twitching* (Jin *et al.*, 2011).

En las bacterias con sistemas que expresan ATPasas específicas, como *Pseudomonas*, se supone que la ATPasa encargada de la retracción (llamada en general PilT) derivada de la duplicación temprana del gen de la ATPasa encargada de la extensión (en general denominada PilB) (Denise *et al.*, 2019). En general estos sistemas de tipo IVa codifican para las dos ATPasas homóloga encargadas de funciones contrapuestas (Solanki *et al.*, 2018).

Los sistemas de pili tipo IVc y algunos sistemas de tipo IVb codifican para una sola ATPasa que estaría encargada, en un principio, de la función de extensión. Es por esto que durante mucho tiempo se supuso que estos tipos de pili solo podían extender y por lo tanto no estaban asociados a movilidad sino a mecanismos adhesivos exclusivamente. (Skerker y Berg *et al.*, 2001). Sin embargo, recientemente se ha descrito que el filamento del pili de *C. crescentus* (sistema de pili tipo IVc) tiene la capacidad de realizar ambos movimientos de extensión y retracción (Ellison *et al.*, 2019), lo que llevó a la caracterización de la ATPasa del sistema como una proteína bifuncional (CpaF) ya que es capaz de realizar ambas funciones (Ellison *et al.*, 2019).

En este trabajo identificamos dos ATPasas asociadas a cada uno de los *cluster* mayoritarios (*clusters* 1 y 2) codificadas en los genes, *bll1436* y *bll3494* (sección 3.1.1). Dada la similitud de secuencia que presentan con la proteína CpaF previamente caracteriza en *C. crescentus* como bifuncional, es probable que estas también presenten esta misma característica. Un alineamiento múltiple de estas con otras presentes en los microorganismos estudiados (*Ralstonia solanacearum* cepa UW551 (id: 342110), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cepa HK1651 (taxid:272556), *Ensifer meliloti* (antes *Sinorhizobium meliloti*) 2011 (taxid:1286640), *Agrobacterium fabrum* cepa C58 (taxid:176299), *Caulobacter crescentus* cepa NA1000 (taxid:565050) y *Vibrio vulnificus* cepa CMCP6 (taxid:216895)) se muestra en la figura 3.1.7. Este alineamiento muestra la presencia de motivos altamente conservados, Walker A y B, Asp box, His box, dedos de arginina y glutamato catalítico (Solanki *et al.*, 2018). Esto indicaría que las ATPasas presentes en *B. diazoefficiens* podrían ser bifuncionales, como la caracterizada en *C. crescentus* (Ellison *et al.*, 2019).

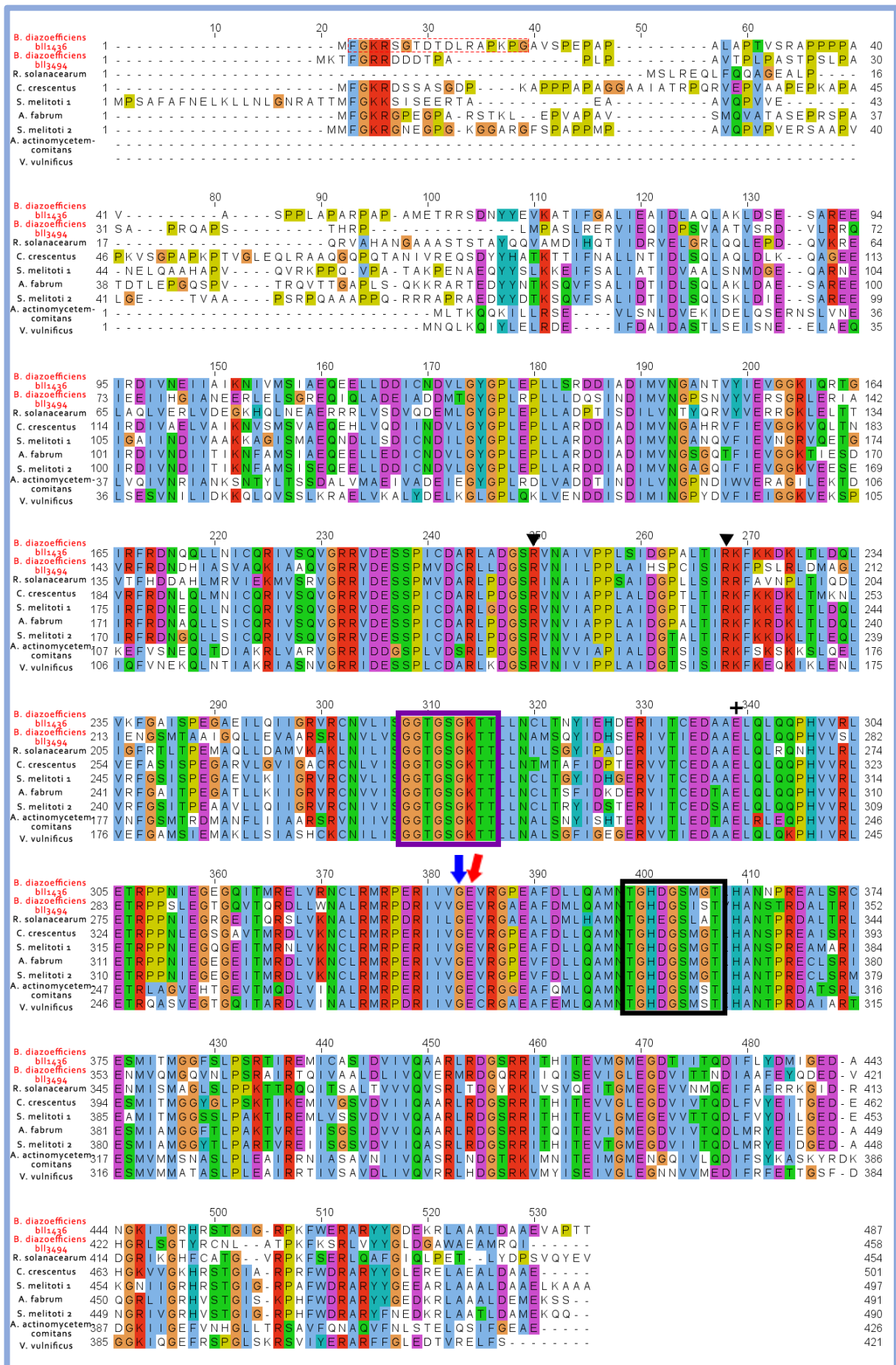


Figura 3.1.7 Alineamiento de secuencias múltiples de ATPasas de *B. diazoefficiens* y otros microorganismos. Se observan diversos motivos conservados en los 9 genes analizados y una alta similitud entre las secuencias. Cuadro violeta: Walker A. Cuadro negro: His box. Flecha roja: glutamato catalítico. Flecha azul: Walker B. +: Asp box. Triángulos negros: dedos de arginina.

3.1.2 Análisis y caracterización de pilZ

En el *cluster 4 (bsr0662-bll0667)* analizado en la sección anterior llama la atención la proteína PilZ que aparece al inicio del mismo y que parece transcribirse en operón con el gen *blr0663 (tadD)*. Este resultado hace suponer que esta PilZ podría estar relacionada funcionalmente a estos sistemas de pili, implicada en algún mecanismo regulatorio.

Como ya fue descrito en la introducción, los sistemas de pili tipo IV tienen un rol fundamental en la etapa de adhesión y de formación de microcolonias durante la formación de *biofilms* y estos procesos están controlados mediante el segundo mensajero c-di-GMP. Es por esto que el gen *bsr0662* que podría tener la capacidad de unir esta molécula podría intermediar en estos mecanismos regulatorios.

A lo largo de los años se han caracterizado distintos dominios estructurales PilZ y proteínas que lo contienen. El análisis de sus secuencias y estructuras permitieron la identificación de elementos conservados entre estos dominios y su posterior clasificación en tres clases: proteínas multidominio con PilZ canónicas; PilZ tetraméricas; y proteínas con un dominio relacionado a PilZ cuyo extremo N-terminal se encuentra fusionado al extremo C-terminal de una PilZ canónica (divergentes). Entre las canónicas se destacan los motivos conservados de unión a c-di-GMP RXXXR y [D/N]XSXXG. Se cree que la presencia de estas tres clases de PilZ está ligada a tres rutas evolutivas distintas, las cuales podrían significar la pérdida de estos motivos de unión a c-di-GMP (Galperin *et al.*, 2020). Para identificar a cuál de estas clases pertenece la proteína codificada en *bsr0662*, se realizó un alineamiento múltiple de esta secuencia con las utilizadas para describir la clasificación anterior (Galperin *et al.*, 2020). Los resultados se muestran en la figura 3.1.8. Aquí podemos observar que el dominio PilZ presente en Bsr0662 contiene el motivo conservado de unión a c-di-GMP RXXXR, aunque no el dominio [D/N]XSXXG, representativo de las llamadas PilZ canónicas.

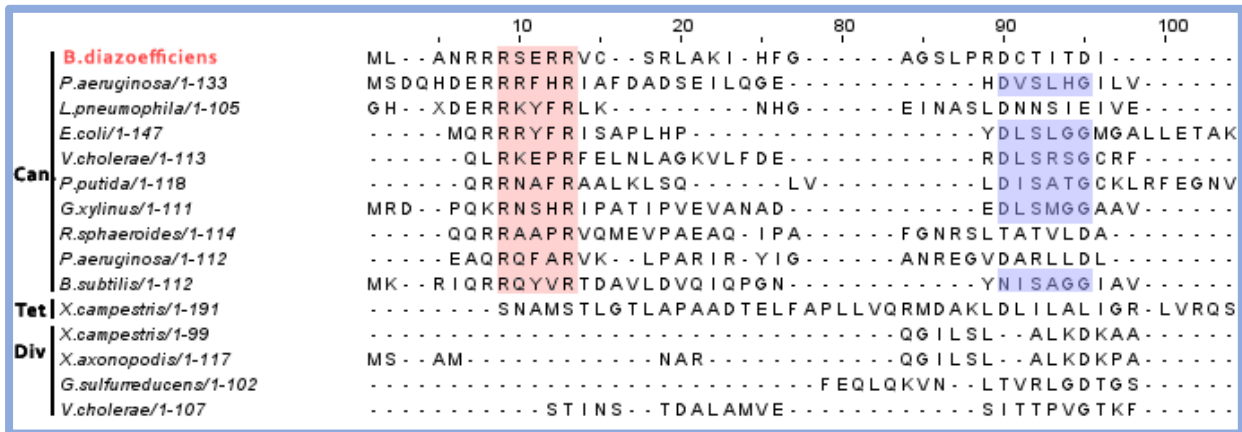


Figura 3.1.8 Análisis de secuencias de proteínas con dominios PilZ. Los motivos conservados de unión a c-di-GMP RXXXR se encuentran destacados en rojo y los dominios [D/N]XSXXG en violeta. Can: canónicas. Tet: tetraméricas. Div:divergentes

De acuerdo con la similitud de secuencia observada y la presencia de al menos uno de los motivos de unión a c-di-GMP, no induce a suponer que Bsr0662 podría clasificarse dentro de las PilZ canónicas. A partir de estas observaciones será posible, en un futuro, realizar estudios más profundos, por ejemplo, haciendo alguna mutagénesis en los dominios mencionados, para comprender mejor y confirmar la hipótesis acerca de la relación que poseen con c-di-GMP en *B. diazoeficiens* y su influencia en la biosíntesis del pili.

3.2 Obtención de las construcciones para las mutaciones

A partir del análisis bioinformático y asignación de función de los distintos *clusters* que codifican para los componentes del sistema de pili tipo IVc en *B. diazoefficiens*, se decidió profundizar el estudio de estos sistemas mediante la utilización de distintas estrategias de mutagénesis, con el fin de corroborar la funcionalidad de éstos en los procesos de adhesión y formación de *biofilms*.

En el genoma de *B. diazoefficiens* se hallaron cuatro *clusters* con componentes claves en la biosíntesis de estos sistemas de pili, además de varios genes que codifican para probables pilinas, fuera de los arreglos de cúmulos. Debido a esto, se encontraron muchos genes parálogos, lo que conlleva a una posible redundancia de funciones y complica el estudio mediante la generación de mutantes. Por lo tanto, la estrategia ideal a utilizar debía ser aquella que impedía la expresión génica de los cuatro *clusters* (o al menos los dos mayoritarios, que codifican para todas las funciones proteicas), ya que, al tener genes duplicados, la mutagénesis de un único *cluster* podría no afectar la expresión de aquellos genes que se encuentren en otros. Previamente en nuestro laboratorio, se realizaron mutantes del *cluster 3 (blr3941-blr3943)*, por lo que este trabajo se focalizó en la generación de mutantes de los otros tres *clusters* restantes. Como no podemos predecir cuál podría ser funcional o no, se diseñaron estrategias para la mutagénesis de cada uno de manera individual, como primera aproximación al estudio de estos sistemas.

Para diseñar estas estrategias se estudiaron de manera detallada la organización de *clusters*, las enzimas de restricción presentes en las diversas secuencias y las posibilidades de generar mutaciones polares que eliminen funciones río abajo de la mutación de manera de afectar varias funciones en una sola mutación. De esta manera se seleccionaron los genes candidatos para realizar dichas mutaciones.

Intuitivamente, se pensó en seleccionar como candidato a mutar los genes que codifican para las pilinas, ya que es un componente fundamental en la estructura del sistema de pili de tipo IVc, por lo que su falta afectaría a la síntesis de toda la maquinaria y, por consiguiente, generaría una pérdida total de sus funciones. Sin embargo, se encontraron seis copias de dicho gen repartidos en todo el genoma, y por lo tanto debían realizarse mutantes en cada una de estas seis copias, lo cual resultaba más complejo, aunque podría plantearse para un trabajo futuro. Una posible estrategia de mutación que se diseñó en este trabajo es la realización de una inserción en un gen ubicado al inicio de los *clusters*, de forma que se bloquee la transcripción de todos los genes que se encuentren río abajo del gen elegido. Para esto se realizó un análisis más profundo de estas secuencias para los dos

cluster más grandes (1 y 2), candidatos a ser mutagenizados ya que codifican para los sistemas completos.

De acuerdo a la organización que se mostró previamente del *cluster* 1 (figura 3.1.4), y a partir de una predicción de operones del mismo (Anexo Figura A1), parece estar compuesto por un operón largo que inicia en *ctpB* e incluye todos los genes hasta *ctpI*. Por lo tanto, una mutación insercional en cualquiera de los genes del inicio del operón podría eliminar las funciones de los genes río abajo. Así, un análisis más detallado de los genes que se encuentran al inicio del operón muestra 2 sitios *Sall* ubicados en el gen *bll1440* que podrían utilizarse para realizar una delección de ese fragmento y una inserción en su lugar de un *cassette* de resistencia a kanamicina (Figura 3.2.1). Este fragmento entonces podría ser utilizado para cualquiera de las dos estrategias explicadas en Materiales y Métodos, ya sea que se clone en pG18mob2 (inserción de Km^R) o pK18mobSacB (delección limpia).

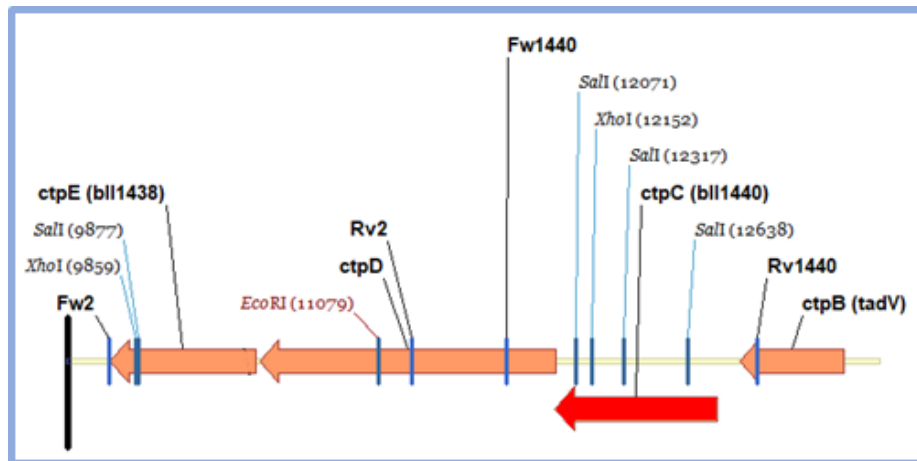


Figura 3.2.1 Entorno génico del gen *bll1440*. Se observan los genes que acompañan a *bll1440* en el comienzo de su operón, junto a sus sitios de restricción correspondientes.

Por otro lado, la organización del *cluster* 2 (*blr3490-blr3502*) es diferente. La predicción de operones del mismo muestra que *blr3490* sería una unidad transcripcional independiente, mientras que de *blr3491* a *blr3497*, *blr3498* a *blr3499* y *blr3500* a *blr3502* podrían transcribirse en tres operones independientes (Anexo Figura A2). Esto trae aparejado un nivel de complejidad superior ya que la mutagénesis de este *cluster* debería hacerse completa, amplificando un fragmento al inicio y otro al final del *cluster*, para poder eliminarlo por completo por recombinación homóloga limpia o intercambio alélico con un *cassette* de resistencia a un antibiótico. Dado que el laboratorio cuenta con datos de proteómica de la bacteria en estudio, una revisión de estos resultados detectó la presencia de la proteína Blr3500, pero no de componentes expresados en los otros dos operones. Por este motivo se decidió, como primera aproximación, ir por una estrategia de mutagénesis

inercial para este gen. En figura 3.2.2 se muestra de manera detallada el operón 3500 y algunas enzimas que podrían ser útiles para el diseño de la estrategia de clonado. Para esta mutación se amplificó un fragmento que contenga el sitio PstI que se encuentra en el medio del gen *blr3500*. Este fragmento se podrá clonar en el plásmido pG18mob2 y luego en el sitio PstI se podrá insertar un *cassette* de resistencia a Km.

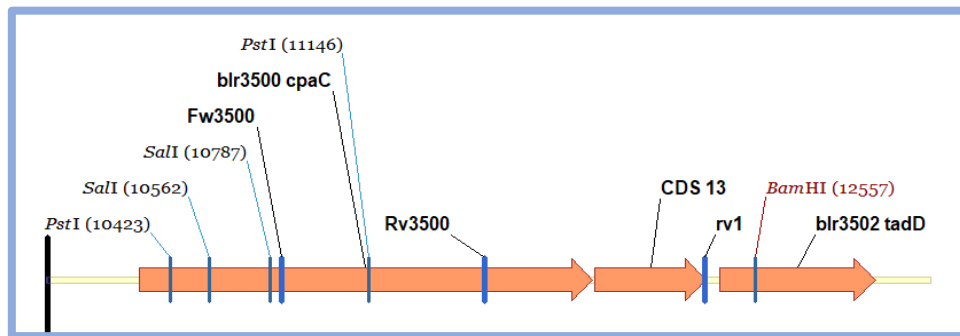


Figura 3.2 Entorno génico del gen *blr3500*. Se observan los genes que acompañan a *blr3500* en el comienzo de su operón, junto a sus sitios de restricción correspondientes.

Por lo tanto, se prosiguió de la siguiente manera: para el *cluster 1* (*blr1433-bsl1442*) se eligió una mutación por inserción y una por delección limpia en el gen *bll1440*; para el *cluster 2* (*blr3490-blr3502*) se pensó en una inserción en el gen *blr3500* de un *cassette* de resistencia. En este trabajo se inició con la obtención de las construcciones necesarias para llevar a cabo estas estrategias de mutaciones.

Para el gen *bll1440* (*ctpC*) se diseñaron *primers* que reconocen secuencias fuera de los sitios *SalI* ubicados dentro del mismo, lo suficientemente alejados como para que la región entre el sitio de reconocimiento del *primer* y el sitio de corte de la enzima permita una buena frecuencia de recombinación homóloga al momento de la obtención del mutante (ver Materiales y Métodos). Los *primers* obtenidos se muestran en la tabla 2.3. A estos *primers* se le añadieron las secuencias que son reconocidas por las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* que permitirán su clonado en los vectores necesarios. Con estos *primers* se amplificó el fragmento a partir de ADN genómico de *B. diazoefficiens* USDA 110. Este fragmento se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, al igual que los plásmidos pG18mob2 y pK18mobSacB (Figura 3.2.3).

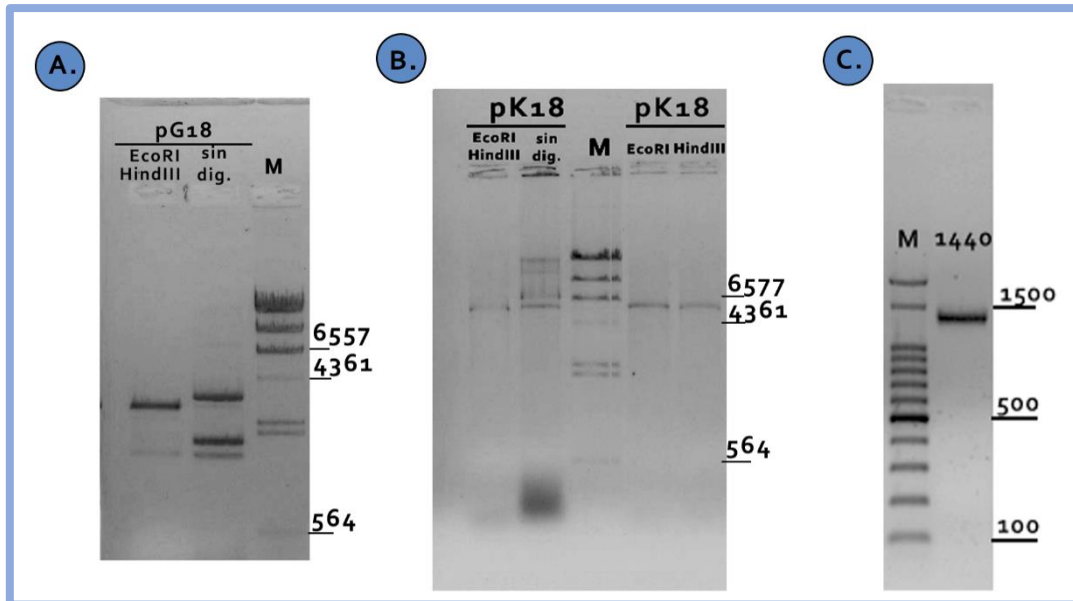


Figura 3.2.3 Geles de agarosa con los plásmidos digeridos por las enzimas de restricción y el producto de PCR del fragmento. **A:** Gel de agarosa mostrando el resultado de la digestión del plásmido pG18mob2 con las enzimas de restricción (EcoRI y HindIII) y sin digerir (sin dig.). M: marcador de peso molecular (fago lambda digerido con HindIII). **B:** Gel de agarosa mostrando el resultado de la digestión del plásmido pK18mobSacB con las enzimas de restricción (EcoRI y HindIII), con cada una por separado, y sin digerir (sin dig.). M: marcador de peso molecular (fago lambda digerido con HindIII). **C:** Gel de agarosa del producto de la PCR realizada con cebadores específicos del fragmento bll1440, conteniendo los sitios de restricción para las enzimas EcoRI y HindIII. M: marcador de peso molecular (Ladder 100).

Luego se realizó la ligación del fragmento junto con los plásmidos (una mezcla de ligación para cada plásmido) durante toda la noche a 16°C. La mezcla de ligación se desaló por diálisis y se transformó en *E. coli* DH5α electrocompetentes. Las bacterias transformadas se plaquearon en medio sólido LB suplementado con kanamicina y X-gal. Para la ligación del fragmento con pK18mobSacB se obtuvieron colonias blancas y azules. Sin embargo, para la ligación de pG18mob2 no se registró la aparición de ninguna colonia. Por lo tanto, continuamos el clonado con el primer plásmido y repetimos la ligación para el segundo. Esta última repetición no pudo finalizarse por falta de tiempo. La confirmación de los clones obtenidos de la ligación con el plásmido pK18mobSacB se realizó mediante *colony PCR*. Para esto se tomaron tres colonias blancas y una azul (como control negativo) y se realizó una amplificación usando cebadores universales M13Fw y M13Rv (las secuencias se muestran en la tabla 2.3 en la sección de Materiales y Métodos) y como molde el ADN obtenido por calentamiento de una muestra de bacteria a 100°C por 5 minutos. El resultado de estas PCRs se muestra en la figura 3.2.4 A. Para los tres clones blancos se obtuvo el fragmento de tamaño esperado de 1344 pb. Una segunda corroboración de identidad del inserto se realizó utilizando cebadores específicos del fragmento. El resultado se muestra en la Figura 3.2.4 B. Para esta PCR se obtuvieron también los fragmentos de tamaño esperado (1299 pb).

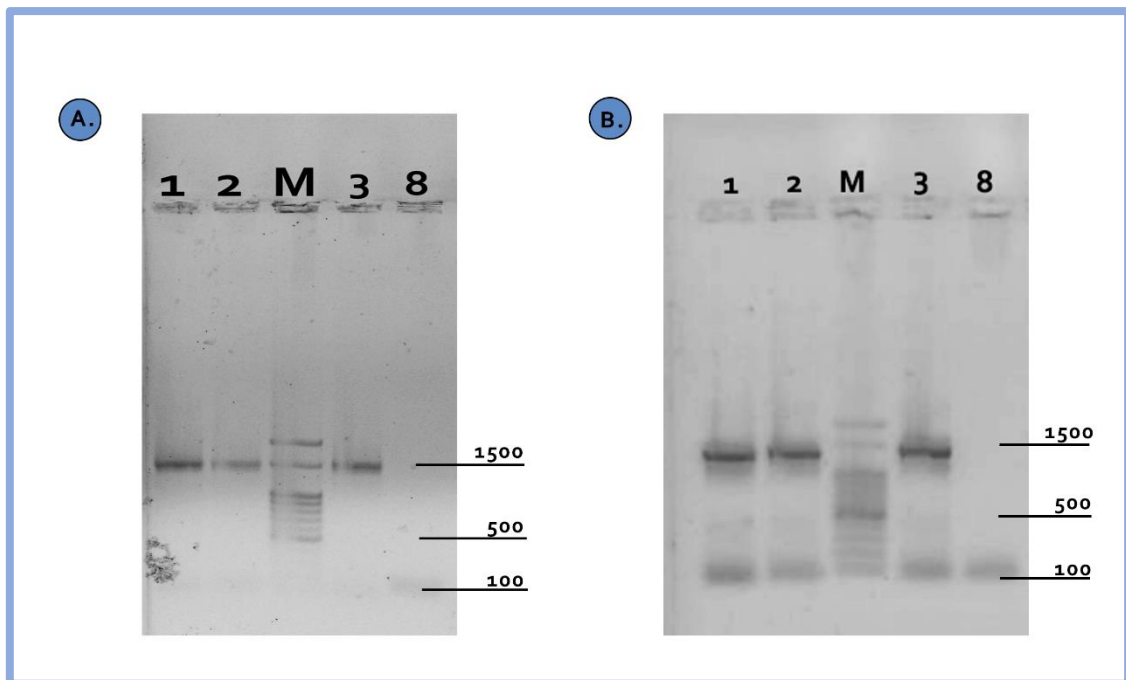


Figura 3.2.4 Resultados obtenidos en la colony PCR del fragmento *bll1440* en *pK18mobSacB*. **A:** Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación de 3 colonias blancas (1, 2 y 3) y una azul (8), utilizando los cebadores universales M13Fw y M13Rv. M: marcador de peso molecular (Ladder 100). **B:** Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación de 3 colonias blancas (1, 2 y 3) y una azul (8), utilizando los cebadores universales Fw1440-Eco y Rv1440-Hind. M: marcador de peso molecular (Ladder 100).

Para la mutación del gen *blr3500* se diseñaron *primers* alrededor de los sitios PstI que se encuentran en la mitad del gen. A la secuencia de los *primers* se agregaron los sitios de restricción en los extremos 5', BamHI y HindIII, necesarios para el clonado. El producto de amplificación de este fragmento se muestra en la figura 3.2.5 A (amplicón de 758 pb). El fragmento correspondiente a *blr3500* se purificó y luego se digirió con las enzimas correspondientes. El vector de clonado, *pG18mob2*, se obtuvo por miniprep y se digirió usando las enzimas de restricción correspondientes (Figura 3.2.5 B). Luego se realizó la ligación del fragmento y el plásmido durante toda la noche a 16°C. La mezcla de ligación se desaló por diálisis y se transformó en *E. coli* DH5α electrocompetentes. Las bacterias transformadas se crecieron en placas LB con gentamicina y X-gal.

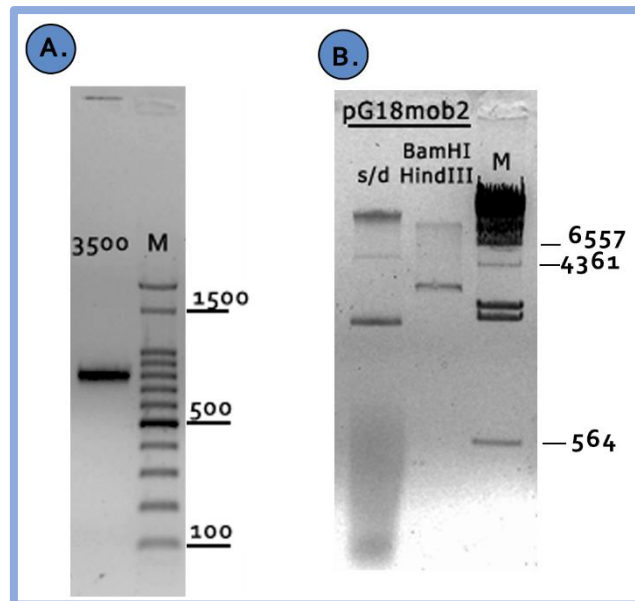


Figura 3.2.5 Geles de agarosa con el plásmido pG18mob2 digerido con las enzimas de restricción y el producto de PCR del fragmento A: Gel de agarosa del producto de la PCR realizada con cebadores específicos del fragmento blr3500, conteniendo los sitios de restricción para las enzimas BamHI y HindIII. M: marcador de peso molecular (Ladder 100). **B:** Gel de agarosa mostrando el resultado de la digestión del plásmido pG18mob2 con las enzimas de restricción (BamHI y HindIII) y sin digerir (s/d.). M: marcador de peso molecular (fago lambda digerido con HindIII).

Para las colonias blancas obtenidas se confirmó la presencia de inserto mediante *colony PCR*. Como se obtuvieron muchas colonias blancas se hizo un primer *screening* haciendo grupos (preparación de ADN molde de varias colonias en un mismo tubo). Para esto se tomaron las colonias de las placas con las bacterias transformadas en el paso anterior, se dividieron en 5 grupos (A, B, C, D y E) y se realizó una amplificación usando *primers* universales M13Fw y M13Rv y como molde el ADN liberado por las bacterias calentadas a 100°C por 5 minutos (figura 3.2.6 A). Se observó la amplificación esperada (855 pb) en los grupos B, C, D y E. A partir de estos resultados, se seleccionaron colonias individuales de los grupos positivos C y D. Cada una de estas colonias se testeó por *colony PCR*, pero utilizando *primers* específicos (Fw3500 y Rv3500) para el fragmento (se observó la amplificación esperada en las colonias 6, 7, 8 y 9 de 758 pb) (figura 3.2.6 B).

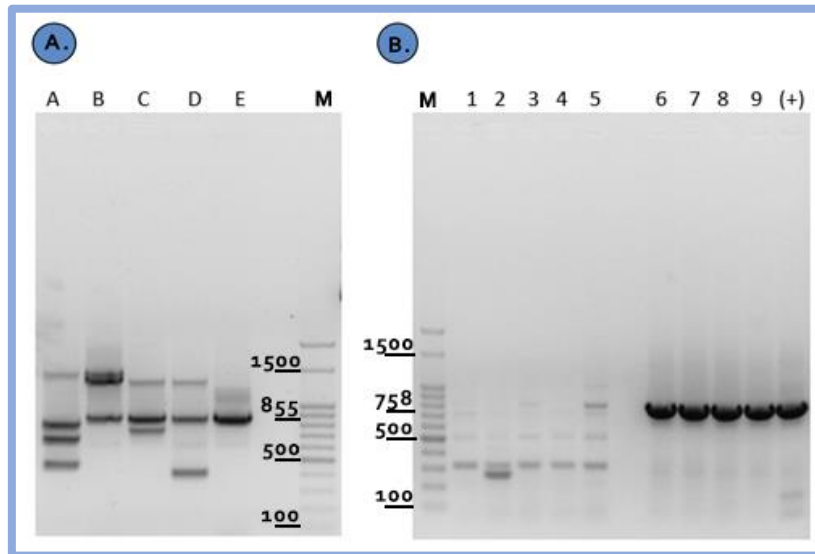


Figura 3.2.6 Resultados obtenidos en la colony PCR del fragmento blr3500. A: Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación de los 5 grupos de colonias luego de la transformación de células con el plásmido pG18mob2 con el fragmento blr3500 clonado. M: marcador de peso molecular (Ladder 100). B: Gel de agarosa mostrando los productos de amplificación de las colonias individuales de los grupos que amplificaron el fragmento en la colony PCR anterior. 1, 2 y 3 corresponden al grupo C; 4, 5 y 6 al grupo D; y 7, 8 y 9 al grupo E. +: control positivo. M: marcador de peso molecular (Ladder 100).

Finalmente, se seleccionaron los clones 6 y 7, para los cuales se realizó una verificación mediante combinaciones de *primers* específicos del fragmento y universales (M13) para verificar su identidad y orientación. Para todas las mezclas de *primers* posibles se obtuvieron los tamaños de fragmentos esperados. Para el chequeo de orientación, se esperaba un fragmento de 785 pb para la combinación de *primers* Fw3500 y M13rv; y un fragmento de 828 pb para M13fw y Rv3500. En esta misma PCR se corrieron los pares de *primers* M13 (855 pb) y específicos (758 pb) como control. El resultado obtenido se muestra en la figura 3.2.7 A. La verificación por digestión no dio un resultado claro ya que no se pudieron observar con buena definición las bandas esperadas (figura 3.2.7 B).

Lamentablemente, no se pudieron finalizar las construcciones necesarias para obtener los mutantes debido a que los laboratorios de investigación se cerraron desde marzo de 2020.

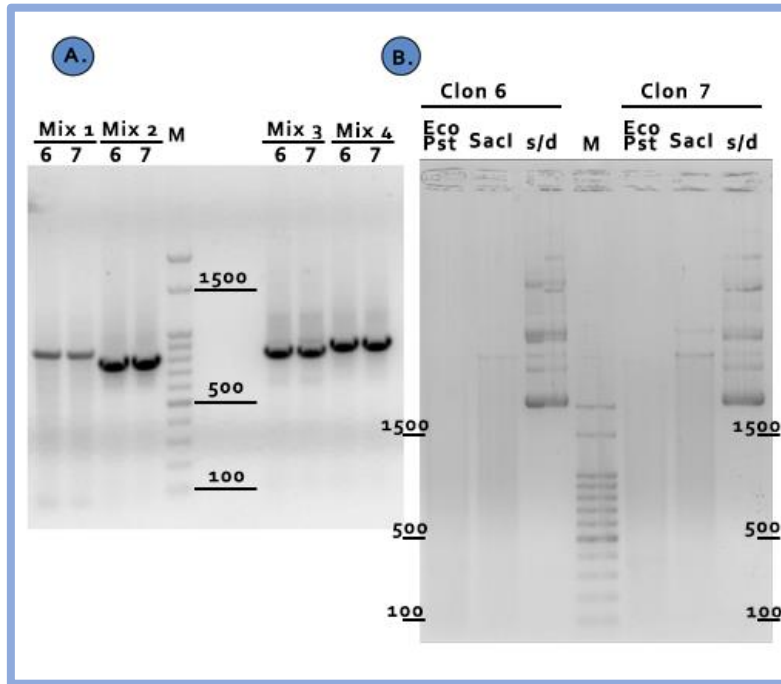


Figura 3.2.7 Resultados del chequeo de los clones con distintas combinaciones de cebadores. **A:** Gel de agarosa de los clones 6 y 7 utilizando distintas combinaciones de cebadores específicos y genéricos. Mix1: Fw3500 y M13Rv. Mix2: Fw3500 y Rv3500. Mix3: M13Fw y Rv3500. Mix4: M13Rv y M13Rv. M: marcador de peso molecular (Ladder 100). **B:** Gel de agarosa del chequeo de los clones 6 y 7 mediante digestión con distintas enzimas. Eco: EcoRI. Pst: PstI. s/d: sin digerir.

3.3 Determinación de la capacidad de formar *biofilm* mediante la medida de adhesión a tubo de vidrio (optimización del ensayo)

Previamente en el laboratorio hemos realizado diversos ensayos de *biofilm* utilizando la medida de adhesión a diferentes materiales y determinación por colorimetría por tinción con cristal violeta. Esta determinación indirecta de la capacidad de formar un *biofilm* por parte de una bacteria es la más usada desde su publicación (O'Toole y Kolter *et al.*, 1998b) y se realiza en placas multipocillo de PVC o poliestireno. Para nuestra bacteria, hemos podido probar previamente este ensayo con placas de 96 pocillos de polipropileno (Perez Gimenez *et al.*, 2008) y si bien permite obtener buenos resultados tiene algunas desventajas. Este material muestra una capacidad de adhesión de la bacteria poco elevada por lo que las medidas colorimétricas al final del ensayo tampoco suelen ser altas (baja sensibilidad). Por este motivo da buenos resultados cuando se comparan fenotipos muy marcados y por lo tanto se logran apreciar las diferencias en el ensayo. Además, el tamaño de pocillo pequeño no permite cultivos de gran volumen y el tiempo prolongado de incubación de la bacteria debido a su crecimiento lento muchas veces genera alta variabilidad debido a la deshidratación diferencial de los pocillos de acuerdo con su ubicación en la placa.

Recientemente hemos determinado que la expresión diferencial de uno u otro sistema de flagelos produce una adhesión diferencial a vidrio a tiempos cortos (Quelas *et al.*, 2015). Además, se ensayaron medias a tiempos más largos en tubo de vidrio, pero con agitación constante (Dardis, 2019, tesis). Debido a que la agitación favorece el contacto de las bacterias contra la superficie del vidrio esta condición no sería ideal para determinar el rol de los flagelos en la formación de *biofilm*. Es por esto que en este trabajo iniciamos la optimización del ensayo de medida de *biofilm* mediante adhesión a vidrio en condiciones sin agitación.

Con el fin de realizar ensayos de formación de *biofilm* que abarquen todos los estadios del desarrollo del mismo fue necesario realizar previamente una puesta a punto del ensayo, estandarizando medio de cultivo, fuente de carbono, concentración de inóculo inicial y frecuencia de muestreo. La concentración del inóculo inicial podría afectar la fase inicial de adhesión modificando los tiempos a los cuales se comienza a desarrollar el *biofilm* y por lo tanto los tiempos a los cuales se deben tomar las muestras. Como *B. diazoefficiens* es una bacteria de crecimiento lento, se intentó probar si la concentración de inóculo inicial permite acortar los tiempos de ensayo sin perder las diferentes etapas de la formación del *biofilm*. Como fuente de carbono, elegimos dos compuestos previamente caracterizados en el laboratorio, D-manitol y la L-arabinosa. Estas dos fuentes de carbono son utilizadas por *B. diazoefficiens* de manera diferencial para obtener energía (Cogo *et al.*, 2018). Además, actúan como señal diferencial respecto de la expresión del flagelo lateral. Cuando la

bacteria crece en arabinosa, el sistema lateral se encuentra sin reprimir y el *swimming* en medio líquido se realiza utilizando ambos sistemas flagelares. En cambio, en manitol como fuente de carbono solo se encuentra expresado el sistema subpolar (Althabegoiti *et al.* 2008; Quelas *et al.*, 2016). Por lo tanto, estas dos fuentes de carbono permiten evaluar el efecto de uno o los dos sistemas en la misma cepa. Además, y de acuerdo con los resultados obtenidos para estas dos fuentes de carbono, tenemos planificado evaluar otras dos, glicerol, que es utilizado por la industria en la producción de inoculantes; y succinato, donde parecería que ambos sistemas flagelares están reprimidos (Mongiardini, sin publicar). De esta forma, tendríamos un espectro amplio de condiciones donde la bacteria parece tener fenotipos diferentes, al menos respecto de la expresión de los sistemas flagelares.

Se realizó un primer ensayo donde se evaluó la formación de *biofilms* a los 7, 14 y 21 días luego de la inoculación utilizando una concentración inicial de inóculo 0,1 unidades de DO_{500} (alta concentración) y 0,01 unidades de DO_{500} (baja concentración). El ensayo se realizó de acuerdo con la descripción presentada en Materiales y Métodos. Como medio de cultivo se utilizó HM base suplementado con arabinosa (0,5% P/V) como fuente de carbono.

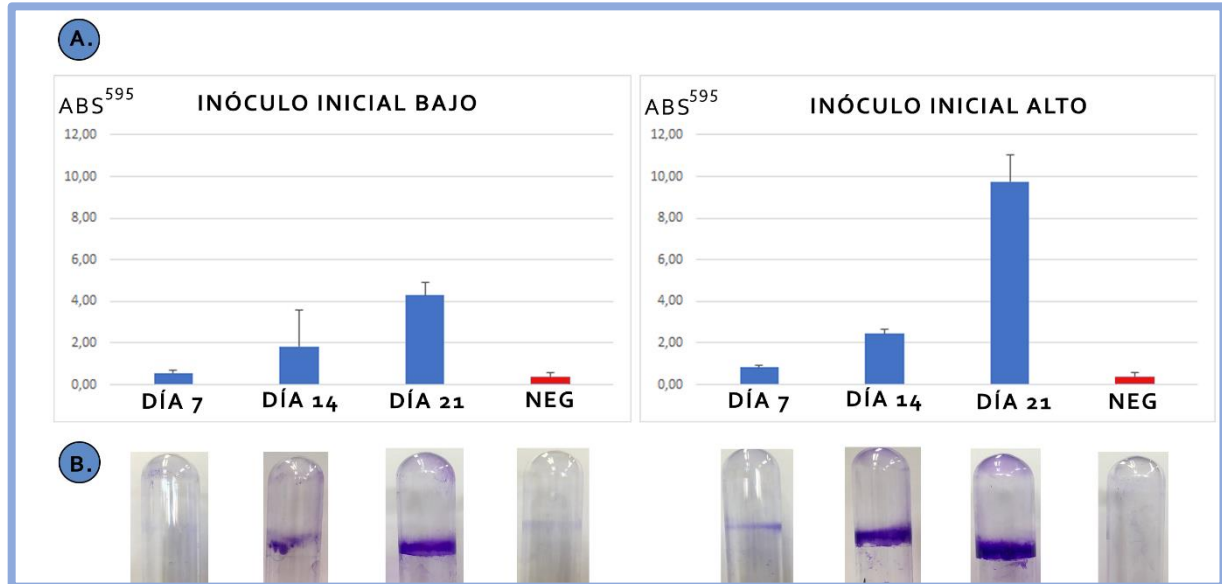


Figura 3.3.1 Ensayos de formación de biofilm a alta y baja concentración de inóculo inicial utilizando arabinosa (0,5%) como fuente de carbono. **A:** Cinética de formación del biofilm a lo largo de 21 días de incubación, realizada mediante la medición de Abs_{595} de los halos de biofilm teñidos con cristal violeta. **B:** Fotografías de los halos de biofilm teñidos con cristal violeta 5%.

Posteriormente se realizó el mismo ensayo con las mismas condiciones utilizando manitol como fuente de carbono, pero al observar que los resultados en el ensayo de arabinosa no eran suficientes se decidió agregar un día de muestreo extra, tomando ahora muestras los días 7, 14, 18 y 21 de comenzado el crecimiento del cultivo inicial (figura 3.3.2).

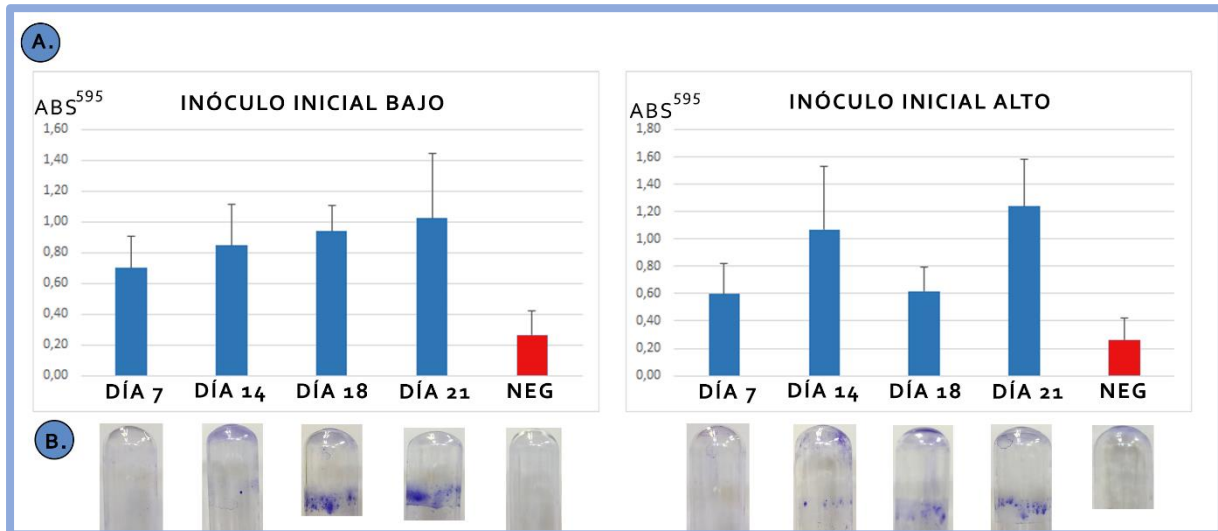


Figura 3.3.2 Ensayos de formación de biofilm a alta y baja concentración de inóculo inicial utilizando manitol (0,5%) como fuente de carbono. A: Cinética de formación del biofilm a lo largo de 21 días de incubación, realizada mediante la medición de Abs₅₉₅ de los halos de biofilm teñidos con cristal violeta. B: Fotografías de los halos de biofilm teñidos con cristal violeta 5%.

A partir de estos ensayos, se observó que los cultivos con inóculo de concentración alta presentaban una formación de halo de *biofilm* irregular, acompañado de una alta sedimentación bacteriana en el fondo de los tubos, lo cual se vio reflejado en las mediciones de la absorbancia a 595 nm utilizando el método de cristal violeta, las cuales no fueron representativas de la cantidad de halo formado.

De acuerdo a estos resultados se decidió repetir el ensayo utilizando ambas fuentes de carbono con el inóculo inicial con concentración baja, modificando la concentración de la fuente de carbono (ahora 0,1% p/v). Además, se modificaron los días de muestreo, donde ahora se tomó la primera muestra el día 11 en lugar del día 7, ya que se observaba poco crecimiento al día 7 en los ensayos anteriores. Los resultados se muestran en la figura 3.3.3, mostrando una de las dos repeticiones para cada condición.

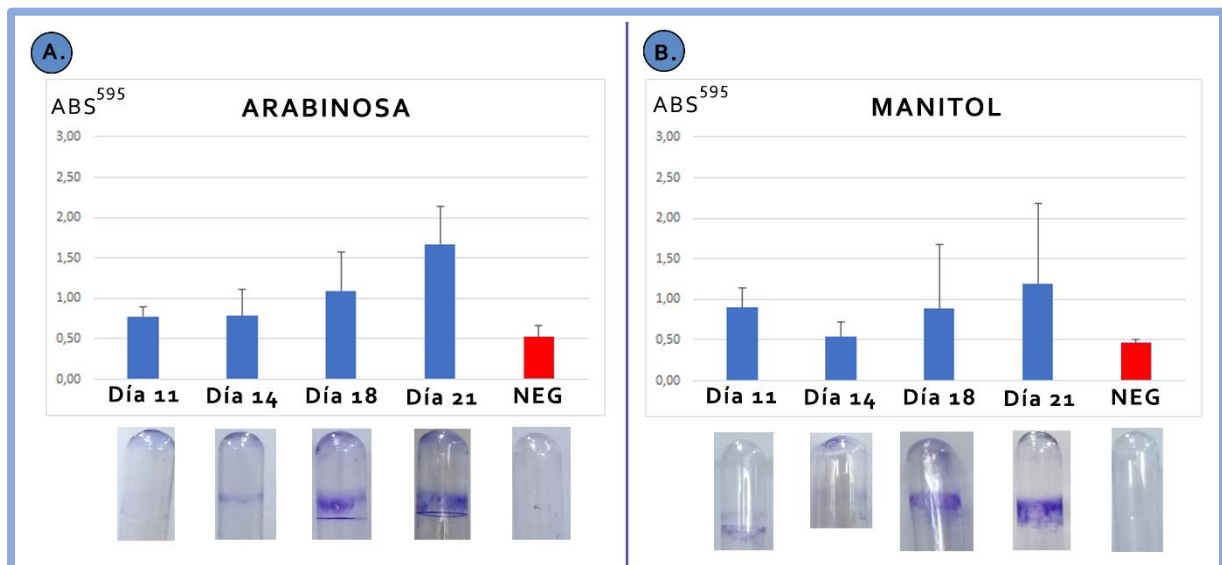


Figura 3.3.3 Ensayos de formación de biofilm baja concentración de inóculo inicial utilizando arabinosa o manitol como fuente de carbono. A: Abajo: Fotografías de los halos de biofilm usando arabinosa como fuente de carbono teñidos con cristal violeta. Arriba: Cinética de formación del biofilm a lo largo de 21 días de incubación utilizando arabinosa como fuente de carbono, realizada mediante la medición de Abs₅₉₅ de los halos de biofilm teñidos con cristal violeta. B: Abajo: Fotografías de los halos de biofilm usando manitol como fuente de carbono teñidos con cristal violeta. Arriba: Cinética de formación del biofilm a lo largo de 21 días de incubación utilizando arabinosa como fuente de carbono, realizada mediante la medición de Abs₅₉₅ de los halos de biofilm teñidos con cristal violeta.

Se observó en este último ensayo un crecimiento irregular al usar manitol como fuente de carbono, con mucha sedimentación en los tubos en lugar de formar halos bien definidos, por lo que la medición de la DO₅₉₅ con cristal violeta no fue representativa del halo de formación de *biofilm*. Además, como ya fue descrito al comienzo de este capítulo, el uso de manitol como fuente de carbono limita la expresión del flagelo lateral, por lo que al utilizarla no se podría analizar correctamente el funcionamiento de ambos sistemas flagelares (lateral y subpolar) en conjunto. Es por eso que en los siguientes ensayos de evaluación de formación de *biofilm* de mutantes flagelares se procedió a utilizar arabinosa como fuente de carbono.

3.4 Evaluación de formación de *biofilm* de mutantes flagelares

La optimización mostrada en la sección anterior nos permitió hacer una aproximación de cómo debería planificarse un ensayo de adhesión a tubo de vidrio sin agitación para distintas fuentes de carbono y concentración de inóculo. Si bien estos ensayos deberían repetirse para corroborar las tendencias y definir los parámetros más adecuados de medida, realizamos un ensayo para evaluar distintos mutantes en los sistemas de flagelos con el fin de obtener un resultado preliminar. Como el objetivo del estudio es comprender el rol de los sistemas flagelares en las diferentes etapas de la formación de *biofilms*, se utilizaron mutantes delecionales que ya habían sido obtenidos en el laboratorio. Para este ensayo usamos el mutante $\Delta fliC$, el cual carece del filamento del flagelo subpolar (Mengucci *et al.*, 2020), y otro, $\Delta flbD$, donde se delecionó un regulador de la síntesis del flagelo (FlbD), que participa en el control de la transcripción de los genes que codifican los componentes de la parte media de la estructura de dicho flagelo y, además, se encuentra involucrado en la coordinación de la síntesis entre ambos sistemas flagelares (Dardis *et al.* 2019).

Se realizaron ensayos por duplicado con estos dos mutantes y en paralelo con la cepa salvaje, donde se evaluó la formación de *biofilm* a 10, 14, 18 y 21 días a 65°C sin agitación en medio HM utilizando arabinosa (0,1 % p/v) como fuente de carbono y con una concentración de inóculo inicial de 0,01 unidades de DO_{500} .

Los resultados obtenidos para el mutante flagelar $\Delta fliC$ se muestran en la figura 3.4.1, donde se observa un crecimiento mucho menor en los días 18 y 21 comparado con la cepa salvaje. Es posible que la mutación $\Delta fliC$ conlleve a la pérdida total de la función del flagelo subpolar como adhesina y su rol en la movilidad, ya que el filamento flagelar del cual carece este mutante es un componente fundamental este sistema de flagelos y su mutación incide en la correcta biosíntesis del mismo. Se observa una formación de *biofilm* considerable ya que dicha mutación solo afecta a uno de los dos sistemas flagelares, por lo que el halo de *biofilm* observado se puede atribuir a la adhesión mediada por el sistema de flagelos laterales.

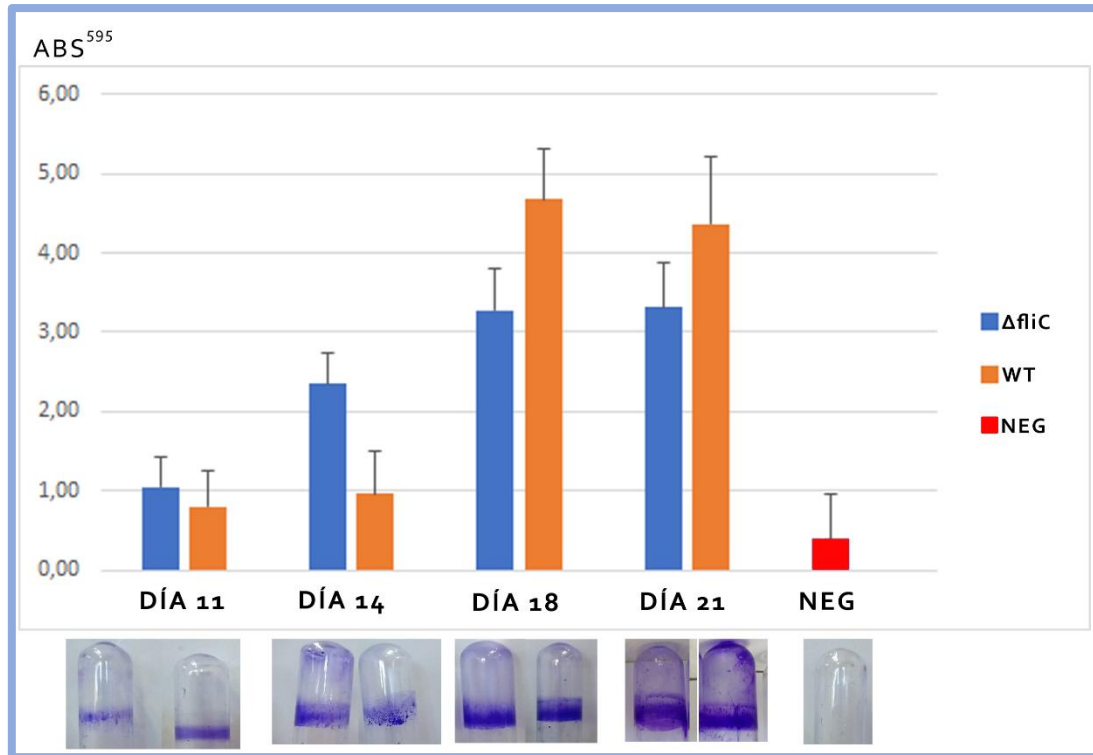


Figura 3.4.1 Ensayos de formación de biofilm del mutante flagelar Δ fliC afectado en el flagelo subpolar y de la cepa salvaje. Abajo: Fotografías de los halos de biofilm usando arabinosa como fuente de carbono teñidos con cristal violeta 5% del mutante Δ fliC y de la cepa salvaje (WT). Arriba: Cinética de formación del biofilm a lo largo de 21 días de incubación utilizando arabinosa como fuente de carbono, realizada mediante la medición de Abs₅₉₅ de los halos de biofilm teñidos con cristal violeta del mutante Δ fliC y de la cepa salvaje (WT)

En paralelo se realizaron los mismos ensayos comparativos de la formación de *biofilm* a 21 días entre la cepa salvaje y el mutante Δ flbD, utilizando las mismas condiciones que para el mutante Δ fliC. Los resultados se muestran en la figura 3.4.2.

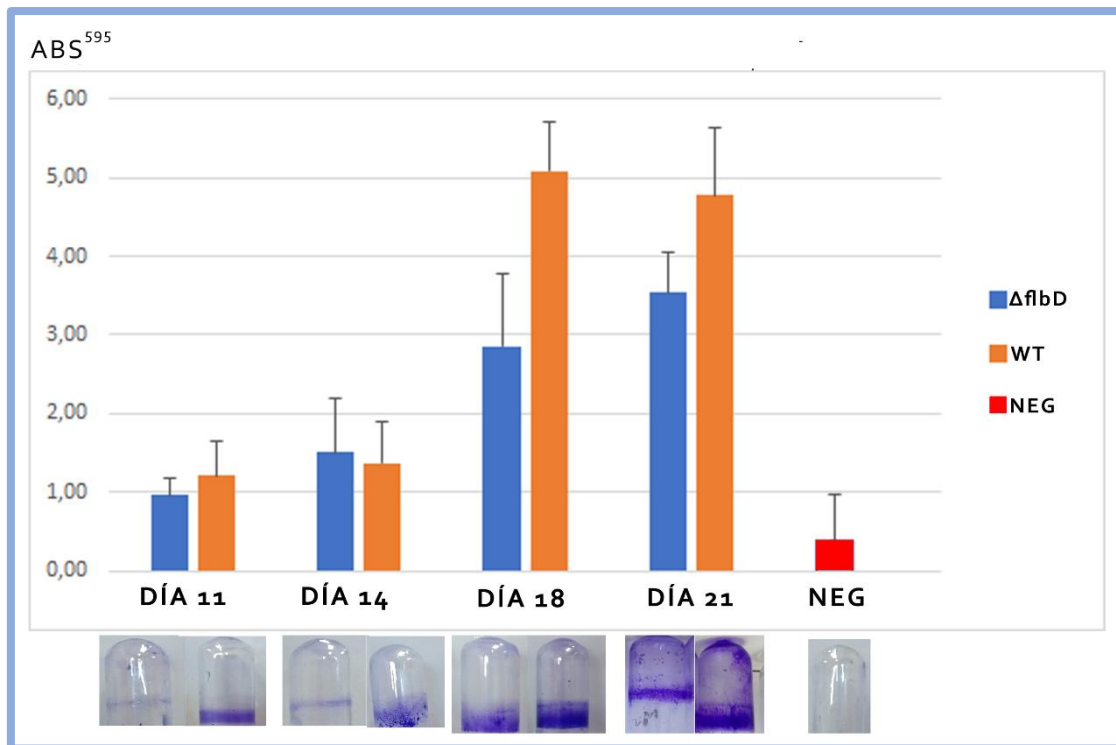


Figura 3.4.2 Ensayos de formación de biofilm del mutante flagelar $\Delta fIBD$ afectado en el flagelo subpolar y de la cepa salvaje. Abajo: Fotografías de los halos de biofilm usando arabinosa como fuente de carbono teñidos con cristal violeta 5% del mutante $\Delta fIBD$ y de la cepa salvaje (WT). Arriba: Cinética de formación del biofilm a lo largo de 21 días de incubación utilizando arabinosa como fuente de carbono, realizada mediante la medición de Abs_{595} de los halos de biofilm teñidos con cristal violeta del mutante $\Delta fIBD$ y de la cepa salvaje (WT)

La comparación entre la cinética de crecimiento del mutante comparado con la cepa salvaje refleja una disminución considerable en las últimas dos mediciones (día 18 y día 21) al mutar este gen. Estos pueden ser análogos a los observados para el mutante $\Delta fliC$ (Figura 3.4.1) ya que, al ser *fIBD* un regulador de la transcripción de componentes del flagelo subpolar, la mutación de dicho gen da como resultado una pérdida parcial de la capacidad de adhesión a *biofilm* al alterar uno de los dos sistemas flagelares. Sin embargo, se observa cierta formación de halo de *biofilm* al ser funcional aún el flagelo lateral. El rol de dicho gen en la coordinación de la síntesis encontrado por Dardis *et al.* (2019) entre ambos sistemas flagelares no se vería, en un principio, reflejado en la formación de *biofilm*, aunque serían necesarios estudios más profundos.



CONCLUSIONES
Y
PERSPECTIVAS

CAPÍTULO
CUATRO

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se ha realizado un análisis bioinformático sobre el genoma de *B. diazoefficiens*, el cual nos permitió inferir posibles funciones para la mayoría de los genes que forman parte de los 3 *clusters* del sistema de pili tipo IVc previamente encontrados. Con este análisis pudimos encontrar un nuevo *cluster* de genes que codificaría de manera parcial para algunos componentes de un sistema de pili tipo IVc, aunque con este análisis no podemos predecir si estaría asociado o no, a algunos de los otros dos *clusters* grandes. Además, con este mismo análisis pudimos observar la duplicación en los genes que codifican para la pilina, que forma el filamento. Estos genes excepto uno, están ubicados fuera de los *clusters* anteriormente mencionados. Sin embargo, mostraron alta similitud de secuencia entre sí y todos presentaban los dominios y restos aminoacídicos característicos de estas proteínas. Por esto se hace difícil predecir cual de todos podría ser funcional y a cuál de los *clusters* podrían aportar su función. Por último, se identificó un gen con un dominio pilZ, ubicado en el *cluster* 4. Este hallazgo resulta muy interesante ya que estas proteínas, que tienen capacidad de unir el segundo mensajero c-di-GMP, están implicadas en la regulación de la transición de las células del estado planctónico al de biofilms. Por lo tanto, esto podría sugerir la existencia de un mecanismo regulatorio mediado por c-di-GMP, a través de esta proteína PilZ, implicado en el control de alguno de estos pili tipo IVc. Esta hipótesis se explorará en el futuro en el laboratorio.

Estos resultados sugieren que los dos *clusters* mayoritarios (1 y 2) podrían ser funcionales ya que codifican para todos los componentes de los sistemas de pili IVc (en el caso del *cluster* 2 la pilina podría ser aportada por cualquiera de las copias ubicadas por afuera del mismo). Además, encontramos un indicio que podría dar origen a estudios del mecanismo regulatorio mediado por c-di-GMP implicado en estos sistemas. Por todo esto, un estudio por mutagénesis de estos sistemas requeriría una estrategia de mutaciones múltiples sobre varios de los genes de los diferentes *clusters*. Con esta idea, se seleccionaron los genes *bll1440*, *blr3500* y *bsr0662* como candidatos para poder construir mutantes delecionales y/o insercionales. En relación con esto, pudimos obtener las construcciones intermedias que serán utilizadas posteriormente para obtener los mutantes.

Además, pudimos iniciar las tareas de puesta a punto de un ensayo de biofilm para esta bacteria en tubo de vidrio sin agitación por tinción con cristal violeta. Pudimos encontrar los días adecuados para obtener una cinética representativa de la formación de biofilm para esta bacteria y pudimos evaluar el fenotipo generados por algunos mutantes en el sistema del flagelo subpolar

obtenidos previamente por el laboratorio. En este punto, comparamos la capacidad de adhesión a tubo de vidrio y formación a biofilm de los mutantes flagelares $\Delta fliC$ y $\Delta flIBD$ respecto de la cepa salvaje, y observamos una disminución en la adhesión para dichos mutantes. Sin embargo, el análisis estadístico de estos resultados mediante ANOVA no arroja una diferencia significativa lo que refleja la alta variabilidad que se observa en cada ensayo. Para poder obtener resultados más confiables se deberán repetir estos experimentos, modificando las condiciones y/o aumentando el número de repeticiones por condición.

Como perspectivas de trabajo a futuro queda la finalización de las construcciones y movilización de las mismas a la cepa de *B. diazoefficiens* para obtener los mutantes en los genes propuestos. Posteriormente se realizará una caracterización fenotípica de los mismos respecto a la adhesión y capacidad de formar *biofilms*. En caso de observarse diferencias fenotípicas con la cepa salvaje, se las validará mediante la complementación en *trans* de los genes mutados. Debido al contexto mundial en el marco de la pandemia por COVID-19, estos últimos pasos, así como la obtención de la construcción para el mutante del *cluster 4*, no pudieron ser concretados antes de finalizar el presente trabajo.

Más allá de que no hayamos podido concluir con todas las tareas experimentales planteadas, este trabajo me permitió adquirir experiencia tanto desde el punto de vista experimental como en el análisis bioinformático y de revisión bibliográfica. Todo esto ha contribuido notablemente a que adquiriera más experiencia, información y herramientas relacionada a la investigación científica.

Bibliografía

- Althabegoiti et al.**, 2008. Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean, FEMS Microbiology Letters, Volume 282, Issue 1, May 2008, Pages 115–123
- Altschul et al.**, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- Bergo et al.**, 2002. Targeted inactivation of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase gene causes mislocalization of K-Ras in mammalian cells. Journal of Biological Chemistry, 275(23), 17605-17610.
- Bernard et al.**, 2009. Organization and PprB-Dependent Control of the *Pseudomonas aeruginosa* tad Locus, Involved in Flp Pilus Biology. Journal of Bacteriology 191.6 (2009): 1961-1973.
- Berrada H, et al.**, 2014. Taxonomy of the rhizobia: current perspectives. Br. Microbiol. Res. J. 4:616–639
- Berry et al.**, 2015. Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives. FEMS Microbiol Rev 39:134 –154.
- Bhattacharjee MK et al.**, 2001. Nonspecific adherence and fibril biogenesis by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: TadA protein is an ATPase. J Bacteriol 2001, 183:5927-5936.
- Bradley, D.E. et al.**, 1980. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. Can J Microbiol 26: 146– 154.
- Burrows et al.**, 2012. Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. Microbiol Mol Biol Rev 76:740 –772.
- Caserta, R. et al.**, 2010. Expression of *Xylella fastidiosa* Fimbrial and Afimbrial Proteins during Biofilm Formation." Applied and Environmental Microbiology 76.13 (2010): 4250-4259.
- Chlebek et al.**, 2019. PilT and PilU are homohexameric ATPases that coordinate to retract type IVa pili. PLoS genetics 15(10), e1008448.
- Christen M. et al.**, 2015. Quantitative selection analysis of bacteriophage CbK susceptibility in *Caulobacter crescentus*. J Mol Biol 2015, 428(Part B):419-430.
- Clock, S. et al.**, 2008. Outer Membrane Components of the Tad (Tight Adherence) Secretion of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Journal of Bacteriology 190.3 (2008): 980-990.
- Cogo et al.**, 2018. Induction by *Bradyrhizobium diazoefficiens* of Different Pathways for Growth in D-mannitol or L-arabinose Leading to Pronounced Differences in CO₂ Fixation, O₂ Consumption, and Lateral-Flagellum Production. Front. Microbiol. 9:1189.
- Costerton et al.**, 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284(5418), 1318-1322.
- Covelli et al.**, 2013. Biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum* para la agricultura sustentable en soja: aspectos ecofisiológicos del problema de la competición para la nodulación. Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Exactas 2013. Universidad Nacional de La Plata.

Crowther L.J. et al., 2005. The ATPase activity of BfpD is greatly enhanced by zinc and allosteric interactions with other Bfp proteins. *J Biol Chem* 2005, 280:24839-24848.

Dardis C., 2019. Caracterización genómico-funcional del flagelo subpolar de *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Delamuta et al., 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:3342---51.

Denise et al., 2019. Diversification of the type IV filament superfamily into machines for adhesion, protein secretion, DNA uptake, and motility. *PLOS Biol.* 17, e3000390 (2019)

Duan et al., 2013. Flagella and bacterial pathogenicity. *J. Basic Microbiol.* 53, 1–8.

Ellison et al., 2015. Mechanosensing: a regulation sensation. *Current Biology*, 25(3), R113-R115.

Ellison et al., 2017. Obstruction of pilus retraction stimulates bacterial surface sensing. *Science* 358, 535–538

Ellison et al., 2019. A bifunctional ATPase drives tad pilus extension and retraction. *Science Advances*, 5(12), eaay2591.

European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey ARN., Potter SC., Finn RD., Lopez R. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, April 12, 2019; doi: 10.1093/nar/gkz268. Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>

Fronzes et al., 2008. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *The EMBO journal*, 27(17), 2271-2280.

Galperin et al., 2006. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* 22:3– 6.

Giles E.D. et al., 2008. Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes

Haase et al., 1999. Identification and molecular analysis of rough-colony-specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1999, 67:2901-2908.

Hermodson et al., 1978. Neisseria pili proteins: amino terminal amino acid sequence and identification of an unusual amino acid. *Biochemistry* 17:442-445.

Horiuchi et al., 2005. Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and Rhizobium bacteria. *Planta.* 222:848---57

Hubbell, D. H. y Kidder, G., et al., 2009. Biological Nitrogen Fixation. University of Florida IFAS Extension Publication SL16. 1-4.

Hug et al., 2017. Second messenger-mediated tactile response by a bacterial rotary motor. *Science* 358:531–534.

Integrated Microbial Genomes (IMG). Chen et al., 2020: Joint Genome Institute (JGI). Disponible en: <https://www.img.jgi.doe.gov>

- Itakura et al.**, 2009. Genomic comparison of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic nitrogen-fixing capabilities and other *Bradyrhizobiaceae* members
- Jayasinghearachchi H. S. y Sereviratne G. et al.**, 2004. A bradyrhizobial-Penicillium spp. biofilm with nitrogenase activity improves N₂ fixing symbiosis of soybean. *Biol Fertil Soils* 40, 432–434 (2004).
- Jordan D.C. et al.**, 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, pp. 234–235
- Josenhans et al.**, 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 605–614. doi:10.1078/1438-4221-00173
- Kachlany S. C., et al.**, 2001b. Nonspecific adherence and fibril biogenesis by *Actinobacillus actinomycescomitans*: TadA protein is an ATPase. *J Bacteriol* 2001, 183:5927-5936.
- Kachlany S.C., et al.**, 2001a. Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycescomitans*: from plaque to plague to pond scum. *Trends Microbiol.* 2001 Sep;9(9):429-37.
- Kaneko et al.**, 2002. Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *DNA Research*, Volume 9, Issue 6, 2002, Pages 189–197
- Kirov et al.**, 2004. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect. Immun.* 2004, 72, 1939–1945.
- Klausen M. et al.**, 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48: 1511-1524
- Kolter et al.**, 2007. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 4418–4424.
- Laganenka et al.**, 2020. Flagellum-Mediated Mechanosensing and RfIP Control Motility State of Pathogenic *Escherichia coli*. *Mbio*, 11(2).
- Lawrence, J.R et al.**, 1987. Behavior of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microb Ecol* 14: 1–14
- Li et al.**, 2007. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell–cell aggregation. *Microbiology*, 153(3), 719-726.
- Lopez García et al.**, 2009, In-Furrow Inoculation and Selection for Higher Motility Enhances the Efficacy of Nodulation. *Agron. J.*
- Mattick et al.**, 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology.* 56: 289--314.
- McCarter et al.**, 1988. Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*. *Cell* 54, 345–351.
- Mengucci et al.**, 2020. Characterization of FliL Proteins in *Bradyrhizobium diazoefficiens*: Lateral FliL Supports Swimming Motility, and Subpolar FliL Modulates the Lateral Flagellar System. *Journal of Bacteriology*, 202(5).

- Merighi M et al.,** 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 65:876–895.
- Merrit et al.,** 2007. Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 8005–8014.
- Mersereau et al.,** 1990. Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene* 90:149–151
- Microbes Online.** Alm, E. J., Huang, K. H., Price, M. N., Koche, R. P., Keller, K., Dubchak, I. L., & Arkin, A. P. (2005). The MicrobesOnline Web site for comparative genomics. *Genome research*, 15(7), 1015-1022. Disponible en: <https://www.microbesonline.org/>
- Miflin B. J. et al.,** 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* Volume 15, Issue 6, 1976, Pages 873-885.
- Miller et al.,** 2012. The response threshold of Salmonella PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Mol Microbiol* 86: 1424–1440
- Mills, A.L. et al.,** 1996. Bacterial interactions with surfaces in soil. In *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. Fletcher, M. (ed.). New York: John Wiley & Sons, pp. 25–57
- Moawad H. A. et al., 1984.** Rhizosphere Response as a Factor in Competition Among Three Serogroups of Indigenous *Rhizobium japonicum* for Nodulation of Field-Grown Soybeans.
- Mongiardini et al.,** 2016. The tight-adhesion proteins TadGEF of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 are involved in cell adhesion and infectivity on soybean roots. *Microbiological Research*, 182, 80-88.
- Mongiardini et al.,** 2017. Transcriptional control of the lateral-flagellar genes of *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *J. Bacteriol.* 199:e00253-17.
- Mongiardini,** 2008. Estudio del rol de las lectinas bacterianas en la simbiosis rizobio-leguminosa. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI)** [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; (1988). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nika, J. R. et al.,** 2002. *Haemophilus ducreyi* requires the flp gene cluster for microcolony formation in vitro. *Infect. Immun.* 70, 2965–2975 (2002).
- O'Toole y Kolter et al.,** 1998a. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis
- O'Toole y Kolter et al.,** 1998b. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295–304
- O'Toole y Kolter et al.,** 2000. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology* 2000 54:1, 49-79
- Pelicic V.,** 2008. Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* 68:827–837

- Pérez B.A. et al.** 2006. Genetic Analysis of the Requirement for *flp-2*, *tadV*, and *rcpB* in *Actinobacillus actinomycescomitans* Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology* 188.17 (2006): 6361-6375.
- Pérez B.A. et al.**, 2012. The product of *tadZ*, a new member of the *parA/minD* superfamily, localizes to a pole in *Aggregatibacter actinomycescomitans*. *Mol Microbiol* 2012, 83:694-711.
- Pérez Giménez J. et al.**, 2008. Soybean Lectin Enhances Biofilm Formation by *Bradyrhizobium japonicum* in the Absence of Plants. *Int. J. Microbiol.* 2009:719367.
- Planet et al.**, 2003. The widespread colonization island of *Actinobacillus actinomycescomitans*. *Nat. Genet.* 34, 193–198 (2003).
- Provorov y Vorobyov et al.**, 2000. Population Genetics of Rhizobia: Construction and Analysis of an “Infection and Release” Model. *Science Direct*
- Pu et al.**, 2002. A Tad pilus promotes the establishment and resistance of *Vibrio vulnificus* biofilms to mechanical clearance. *npj Biofilms and Microbiomes*, 4(1), 1-8.
- Quelas et al.**, 2010. Lack of galactose or galacturonic acid in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 exopolysaccharide leads to different symbiotic responses in soybean. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(12), 1592-1604.
- Quelas et al.**, 2016. Swimming performance of *Bradyrhizobium diazoefficiens* is an emergent property of its two flagellar systems. *Sci. Rep.* 6, 23841
- Raina et al.**, 2010. Do the organic sulfur compounds DMSP and DMS drive coral microbial associations?. *Trends in microbiology*, 18(3), 101-108.
- Reyes V. G. y Schmidt E. L. et al.**, 1979. Population Densities of *Rhizobium japonicum* Strain 123 Estimated Directly in Soil and Rhizospheres
- Rinaudi et al.**, 2009. An integrated view of biofilm formation in Rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*
- Sambrook et al.** 1989 *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schembri et al.**, 2002. An attractive surface: gram-negative bacterial biofilms. *Sci. STKE*
- Scott et al.**, 2003. Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear Nose Throat J* 2003; 82 (suppl): 18-20.
- Skerker y Berg et al.**, 2001. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6901–6904 (2001)
- Solanki et al.**, 2018. Structural insights into the mechanism of Type IVa pilus extension and retraction ATPase motors. *FEBS J.* 2018 Sep;285(18):3402-3421.
- Terpolilli et al.**, 2012. What determines the efficiency of N₂-fixing Rhizobium-legume symbioses? *Advances in microbial physiology*. Vol. 60. Academic Press, 2012. 325-389.
- Tolker-Nielsen et al.**, 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 2003, 50:61-68.

- Tomich M. et al.,** 2006. TadV protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a novel aspartic acid prepilin peptidase required for maturation of the Flp1 pilin and TadE and TadF pseudopilins. *J Bacteriol* 2006, 188:6899-6914.
- Tung y Chow,** 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends in genetics* (Regular ed.), 11(4), 128-129.
- Verma D.P.S. et al.,** 1984. *Genes Involved in Microbe-Plant Interactions*. ISBN-13:978-3-7091-8741-8 (U.S.)
- Vesper, S. J. y Bauer W.D. et al.,** 1986. Role of Pili (Fimbriae) in Attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to Soybean Roots. *Applied and Environmental Microbiology* 52.1 (1986): 134-141.
- Viollier H. et al.,** 2002a. A dynamically localized histidine kinase controls the asymmetric distribution of polar pili proteins. *EMBO J* 2002, 21:4420-4428.
- Viollier H. et al.,** 2002b. Identification of a localization factor for the polar positioning of bacterial structural and regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:13831-13836
- Viollier H. et al.,** 2018. More than a Tad: spatiotemporal control of *Caulobacter* Pili. *Apr*;42:79-86.
- Viollier H. et al.,** 2019. A bifunctional ATPase drives tad pilus extension and retraction. *Sci. Adv.* 5, eaay2591 (2019).
- Vvadstrom et al.,** 1983. Bacterial surface lectins, p. 479-494. In R. BOg-Hansen and L. Spengler (ed.). *Lectins*, vol. 3. Walter de Gruyter and Co.. Berlin.
- Wairuri C.K. et al.,** 2011. *Ralstonia solanacearum* needs Flp pili for virulence on potato. *Mol Plant Microbe Interact.* 2012 Apr;25(4):546-56
- Wang Yi et al.,** 2005. Mutation analysis of the flp operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene* 2005, 351:61-71.
- Wang Yi et al.,** 2014. The Ctp Type IVb Pilus Locus of *Agrobacterium tumefaciens* Directs Formation of the Common Pili and Contributes to Reversible Surface Attachment. *Journal of Bacteriology* 196.16 (2014): 2979-2988.
- Wolfe et al.,** 2008. "Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility". *Journal of Bacteriology.* 190 (2): 463-475.
- Wong et al.,** 2011. Bacteria use type-IV pili to slingshot on surfaces. *Proc Natl Acad SciUSA* 108:12617–12622.
- Wong et al.,** 2015. How bacteria use type IV pili machinery on surfaces. *Trends Microbiol* 23:775–788.

Agradecimientos

El día que me tomé el colectivo para venir a la ciudad de La Plata por primera vez hace 6 años estaba muerto de miedo. No sabía bien de qué trataba la carrera, en una ciudad lejos de mi casa y mi familia y amigos en Mar del Plata. Era todo desconocido, pero tardé poco en darme cuenta que mi decisión fue la correcta: me choqué con una ciudad hermosa, que me sigue enamorando y sorprendiendo todos los días, conocí muchas personas que marcaron mi vida y descubrí la pasión y amor por la ciencia que a ese día de hace 6 años todavía no lo terminaba de convencer.

Agradezco profundamente a la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas por guiarme y darme la oportunidad de aprender y formarme no solo como profesional sino desde el lado humano. Seguiré velando siempre en defensa de una universidad pública, gratuita y de calidad para todos y todas.

Agradezco a Elías, por darme un espacio para realizar el trabajo, enseñarme constantemente y bancarme en todas las macanas que me mandaba. Muchas gracias, Cachito.

Agradezco además a Ro, por aconsejarme y ayudarme siempre en el laboratorio y en la escritura, charlar conmigo de cualquier cosa en los tiempos muertos y bancarme los experimentos cuando no podía ir al instituto.

También agradezco:

A la gente de R3, que siempre me dieron una mano y me ayudaban cuando tenía dudas (aunque alguna que otra cagada a pedos me comí).

A mi familia, mis viejos y mis hermanos. Me bancaron siempre en absolutamente todo, los quiero mucho y estaré eternamente agradecido.

A mis amigos de Mar del Plata, que me enviaban fuerzas siempre que estaba por rendir algún parcial, aunque me puteaban por no visitarlos por muchos meses y cuando finalmente iba era como si no me hubiese ido nunca. Agradezco especialmente a los que se vinieron conmigo a La Plata, Alan y Nano (acá también entras vos, Gabi), por las juntadas, los viajes, las risas, los partidos de fútbol 5 y todos los buenos momentos en todos estos años.

A Joaquina, Ampí, Adri y Víctor por incluirme en la familia y darme tanto amor.

A mis amigues de la facu, que sin ellos todo hubiese sido mil veces más difícil. Son un grupo de gente con mucho amor por lo que estudian y tan dispuestos a compartir y ayudarte. Infinitas tardes de

estudio, mateadas en el bosque, vinos (guarda Tincho con la remera), cenas, charlas nerds, recitales, fiestas en la facu... Siempre con una sonrisa y con mucha buena onda, los adoro!

A mis primos: Maru, Paula y Gastón. Desde el primer día que puse un pie en la ciudad ya se estaban preocupando por mí, gracias!

A los hermanos Miller y al Rudo Roncaglia, siempre predispuestos a juntarse cuando necesitaba despejarme un poco

A Martín, Migue, Lucas y Vicki, que me acompañaron sin saberlo durante 4 años en mis tardes de estudio

Finalmente, un especial agradecimiento a mi abuela Eva. Te quiero, viejita.

Anexo

Tabla 3.1: Parálogos de los genes del cluster blr1433-bsl1442

Locus	<i>A. Fabrum</i> (id./positivos)	<i>C. crescentus</i> (id./positivos)	<i>E. meliloti</i> (id./positivos)	<i>A. Actinomycescomitans</i> (id./positivos)
blr1433	Atu0215 (115/155)	CCNA_03033x (78/107)	-	-
blI1434	Atu0216 (171/223)	CCNA_03035 (146/194)	SM2011_c02822 (176/226)	-
blI1435	Atu0217 (141/216)	CCNA_03036 (138/190)	WP_010967818 (147/217)	-
blr1436	Atu0218 (355/412) WP_144621911 (354/409)	CCNA_03037 (329/386)	SM2011_c02820 (355/409) SM2011_a1568 (346/397)	CF65_00874 (199/285)
blI1437	Atu0219 (201/285)	CCNA_03038 (200/281)	SM2011_c04109 (196/274) SM2011_a1573 (169/258)	-
blI1438	WP_144621909 (76/106) Atu0220 (74/101)	CCNA_03039 (56/82)		-
blI1439	WP_144621907 (199/287) Atu0221 (204/305)	CCNA_03040 (194/288)	SM2011_a0163 (141/231)	-
blI1440	WP_144621905 (105/159)	CCNA_03041 (90/133)	SM2011_a1576 (99/149)	-
blI1441	Atu0223 (65/97)	CCNA_03042 (71/91)	SM2011_a1578 (70/92)	CF65_00869 (34/64)

bsl1442	WP_144621901 (31/39) Atu0224 (31/35) Atu3514 (22/31)	CCNA_03043 (29/33) CCNA_00875 (17/29)	WP_003526943 (33/45)	CF65_00867 (20/32)
----------------	---	--	-------------------------	-----------------------

Tabla 3.2: Parálogos de los genes del cluster blr3490-blr3502

Locus	<i>A. Fabrum</i> (id./positivos)	<i>C. crescentus</i> (id./positivos)	<i>E. meliloti</i> (id./positivos)	<i>A. Actinomycetemcomitans</i> (id./positivos)
blr3490	-	-	-	-
blr3491	WP_144621903 (44/60)	CCNA_03042 (45/64)	-	-
blr3492	WP_144621905 (94/144) Atu0222 (83/136)	CCNA_03041 (67/99)	SM2011_a1576 (79/114)	-
blr3493	Atu0219 (92/156)	CCNA_03038 (100/162)	SM2011_a1573 (80/151) SM2011_c04109 (73/123)	-
blr3494	Atu0218 (225/309) WP_144621911 (209/296)	CCNA_03037 (214/286)	SM2011_c02820 (223/310) SM2011_a1568 (213/297)	CF65_00874 (188/278)
blr3495	-	CCNA_03036 (55/94)	WP_010967818 (51/94)	-
blr3496	Atu0216 (70/122) WP_144621915 (76/132)	CCNA_03035 (55/101)	SM2011_c02822 (74/120) WP_010967817 (56/91)	CF65_00876 (38/72)
blr3497	-	-	-	-
blr3498	-	-	SM2011_a1579 (110/186)	-
blr3499	-	CCNA_03045 (14/19)	-	-
blr3500	WP_144621907 (152/234) Atu0221 (154/229)	CCNA_03040 (169/243)	SM2011_a0163 (182/258)	CF65_00871 (55/101)
blr3501	-	-	WP_010967088 (27/37)	-
blr3502	-	-	SM2011_a0166 (47/68)	-

Tabla 3.3: Parálogos de los genes del cluster blr3941-blr3943

Locus	<i>A. Fabrum</i> (id./positivos)	<i>C. crescentus</i> (id./positivos)	<i>E. meliloti</i> (id./positivos)	<i>A.Actinomycescomitans</i> (id./positivos)
blr3941	WP_144621093 (152/227)	-	-	-
blr3942	WP_144621813 (49/94) Atu0148 (50/98)	CCNA_03045 (70/100) CCNA_03046 (39/53)	-	-
blr3943	WP_006309970 (39/65)	CCNA_03046 (52/91)	-	-

Tabla 3.4: Asignación de función para los genes del cluster blr1433-bsl1442

Locus	Nombre	Función	Bibliografía
blr1433	TadD/CpaO	Media la asociación de subunidades de RcpA y actúa como un factor de ensamblaje para la inserción de RcpA en la membrana externa	Clock S., <i>et al.</i> , 2008.
bll1434	TadC/CpaH	Factores andamio en la membrana interna	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Kachlany, S. C., <i>et al.</i> , 2001a. Crowther L.J., <i>et al.</i> , 2005.
bll1435	TadB/CpaG	Factores andamio en la membrana interna	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Kachlany, S. C., <i>et al.</i> , 2001a. Crowther L.J., <i>et al.</i> , 2005.
blr1436	TadA/CpaF/ctpG	ATPasa, hidrólisis de ATP para la secreción de componentes del pilus	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018.
bll1437	TadZ/CpaE/CtpF	Proteína citoplasmática asociada periféricamente con la maquinaria anclada a membrana. Participa en el ensamblaje del canal de secreción CpaC y en la localización polar de CpaF	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Viollier H., <i>et al.</i> , 2002a. Perez B.A., <i>et al.</i> , 2012.
bll1438	RcpB/CpaD/CtpE	Proteína estabilizadora de secretinas	Perez B.A., <i>et al.</i> , 2006
bll1439	RcpA/CpaC/CtpD	Canal de secreción	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Viollier H., <i>et al.</i> , 2002a.
bll1440	RcpC/CpaB/CtpC	Modificación de la proteína Flp	Bernard C.S., <i>et al.</i> , 2009. Wairuri C.K., <i>et al.</i> , 2011.
bll1441	TadV/CpaA/CtpB	Prepilina peptidasa, procesa la prepilina a su forma madura, cortando los residuos conservados de glicina en el extremo N-terminal	Wang Yi, <i>et al.</i> , 2014.
bsl1442	pilA/CtpA	Subunidad mayor de pilina	Wang Yi, <i>et al.</i> , 2014. Kachlany S.C., <i>et al.</i> , 2001a.

Tabla 3.5: Asignación de función de los genes del cluster blr3490-blr3502

Locus	Nombre	Función	Bibliografía
blr3490	Proteína hipotética	-	-
blr3491	TadV/CpaA	Prepilina peptidasa	Tomich M., <i>et al.</i> , 2006
blr3492	RcpC/CpaB/CtpC	Modificación de la proteína Flp	Bernard <i>et al.</i> , 2008 Wairuri <i>et al.</i> , 2008
blr3493	TadZ/CpaE	Proteína citoplasmática asociada periféricamente con la maquinaria anclada a membrana. Participa en el ensamblaje del canal de secreción cpaC y en la localización polar de cpaF	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Viollier H., <i>et al.</i> , 2002a. Perez B.A., <i>et al.</i> , 2012.
blr3494	TadA/VirB11/CpaF	ATPasa, hidrólisis de ATP para la secreción de componentes del pilus	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018.
blr3495	TadB/CpaG	Factores andamio en la membrana interna	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Kachlany, S. C., <i>et al.</i> , 2001a. Crowther L.J., <i>et al.</i> , 2005.
blr3496	TadC/CtpI/CpaH	Factores andamio en la membrana interna	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Kachlany, S. C., <i>et al.</i> , 2001a. Crowther L.J., <i>et al.</i> , 2005.
blr3497	Proteína-S-isoprenilcisteína metiltransferasa	-	-
blr3498	TadG/CpaL	Media la interacción proteína-proteína entre la fibra de pilina polimerizada y un componente de la envoltura celular	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018.
blr3499	TadE/CpaJ	Pseudopilinas procesadas por TadV/CpaA. Son requeridas para la extrusión de pilina a la superficie celular	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Christen M., <i>et al.</i> , 2015.
blr3500	RcpA/CpaC/CtpD	Canal de secreción	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Viollier H., <i>et al.</i> , 2002a.

Tabla 3.6: Asignación de función de los genes del cluster blr3941-blr3943

Locus	Nombre	Función	Bibliografía
blr3941	TadG/CpaL	Lectina (antes BJ38), participa en el proceso de adhesión	Mongiardini <i>et al.</i> , 2015
blr3942	TadE/CpaJ	Pseudopilinas procesadas por TadV/CpaA. Son requeridas para la extrusión de pilina a la superficie celular	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Christen M., <i>et al.</i> , 2015.
blr3943	TadF/CpaK	Pseudopilinas procesadas por TadV/CpaA. Son requeridas para la extrusión de pilina a la superficie celular	Viollier H., <i>et al.</i> , 2018. Christen M., <i>et al.</i> , 2015.

Tabla 3.7: Parálogos de los genes del cluster bsr0662-bll0667

Locus	<i>A. Fabrum</i> (id./positivos)	<i>C. crescentus</i> (id./positivos)	<i>E. meliloti</i> (id./positivos)	<i>A. Actinomycetemcomitans</i> (id./positivos)
bsr0662	Atu8163 (14/25)	CCNA_01671 (16/29)	SM2011_a1509 (10/15)	-
blr0663	WP_062443301 (96/141) AAK86033 (105/175)	-	-	-
bll0664	Atu0219 (185/267)	CCNA_03038 (193/277)	SM2011_c04109 (178/255) SM2011_a1573 (156/247)	-
bll0665	WP_144621909 (80/108)	-	-	-
bll0666	WP_144621907 (202/308) Atu0221 (184/282)	CCNA_03040 (193/290)	SM2011_a0163 (143/241)	CF65_00871 (105/185)
bll0667	Atu0222 (112/167) WP_144621905 (100/154)	CCNA_03041 (91/138)	SM2011_a1576 (101/154)	-

Tabla 3.8: Asignación de función para los genes del cluster bsr0662-bII0667

Locus	Nombre	Función	Bibliografía
bsr0662	pilZ	Regulación de la expresión del sistema de pili	Galperin <i>et al.</i> , 2020
blr0663	TadD/CpaO	Media la asociación de subunidades de RcpA y actúa como un factor de ensamblaje para la inserción de RcpA en la membrana externa	Clock <i>et al.</i> , 2008
bII0664	CtpF/TadZ/CpaE	Proteína citoplasmática asociada periféricamente con la maquinaria anclada a membrana. Participa en el ensamblaje del canal de secreción cpaC y en la localización polar de cpaF	Viollier <i>et al.</i> , 2002a Viollier <i>et al.</i> , 2018
bII0665	PilV/CpaD	Proteína estabilizadora de secretinas	Pérez <i>et al.</i> , 2006
bII0666	RcpA/CpaC	Canal de secreción	Viollier <i>et al.</i> , 2002a Viollier <i>et al.</i> , 2018
bII0667	RcpC/CpaB/CtpC	Modificación de la proteína Flp	Bernard <i>et al.</i> , 2008 Wairuri <i>et al.</i> , 2008

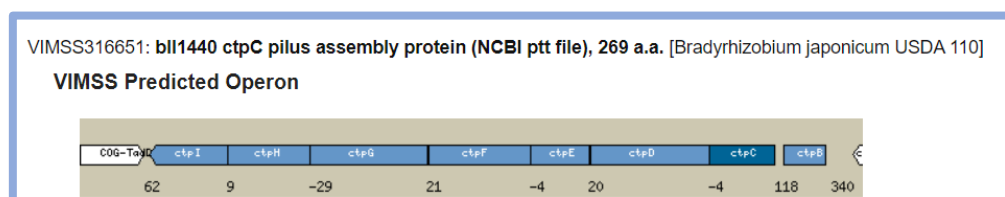
Figura A1: Predicción de operón calculada en el servidor en Microbes Online a partir de bII1440

Figura A2: Predicción de operón calculada en el servidor en Microbes Online a partir de blr3500

