

## Tesis de Posgrado

# Estudio bioquímicos y fisiológicos de la interacción bacteria-planta

Lepek, Viviana Claudia

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

**Cita tipo APA:**

Lepek, Viviana Claudia. (1989). Estudio bioquímicos y fisiológicos de la interacción bacteria-planta. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2181\\_Lepek.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2181_Lepek.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Lepek, Viviana Claudia. "Estudio bioquímicos y fisiológicos de la interacción bacteria-planta". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2181\\_Lepek.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2181_Lepek.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS BIOQUIMICOS Y FISIOLOGICOS DE LA INTERACCION  
BACTERIA-PLANTA

Autor: Viviana Claudia Lepek

Director: Luis Ramón Maréchal

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones  
Bioquímicas "Fundación Campomar"

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

Año 1989

2181  
Ej: 2.

A mis padres,  
a Ricardo,  
a Fernando y a Jana

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas e instituciones que han colaborado de un modo u otro para la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Luis R. Maréchal, quien dirigió esta tesis y junto a quien me inicié en la investigación científica, por sus enseñanzas y por haberme brindado un constante apoyo e independencia en la realización de los experimentos.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" que me permitieron trabajar en esta institución.

Al Dr. Luis F. Leloir, mi consejero de estudios, por sus valiosos consejos y su atención a mi trabajo.

Al Dr. Rodolfo Ugalde por sus sugerencias, comentarios críticos y generosa transmisión de experiencia e ideas.

Al Dr. Alberto Fossatti, por su excelente disposición para enseñarme a realizar la técnica de fusión.

A todos mis compañeros del IIB (tanto los chicos "de cultivo" como los "del segundo") con quienes compartí muchos momentos gratos y de los otros, especialmente a Daniel Boscoboinik, Angeles Zorreguieta, Diana Tolmasky y Roberto Geremía.

A los Dres. Clara Krisman, Luis Quesada, Manuel García Patrone, Juana Tandecarz, Estela Medrano y Oscar Burrone por su orientación, confianza y el trato afectivo que me brindaron.

A Norberto Malarini por su dedicación y eficiencia en la confección de las figuras e ilustraciones de esta tesis.

Al CONICET por el otorgamiento de las becas.

Por último quiero agradecer muy especialmente a mis padres y a mi esposo por su comprensión, apoyo y estímulo para seguir adelante superando todas las dificultades.

Abreviaturas

Ac Mc	anticuerpo monoclonal
Ac.	ácido
Acs Mcs	anticuerpos monoclonales
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
DO	densidad óptica
E.	Escherichia
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
ELISA	ensayo enzimático de inmunoabsorción
EPS	exopolisacárido
FITC	isotiocianato conjugado con fluoresceína
HAT	medio con hipoxantina, aminopterina y timidina
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
Igs	inmunoglobulinas
kD	kilo Dalton
KDO	2-ceto-3-deoxioctonato
LPS	lipopolisacárido
MM	medio mínimo
MSH	mercaptoetanol
nm	nanómetros
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	buffer fosfato salino
PEG	polietilenglicol
pI	punto isoeléctrico
PM	peso molecular
pol	polisacárido
PVP	polivinilpirrolidona
SDS	sodio dodecil sulfato
SFB	suero fetal bovino
T.amb.	temperatura ambiente
TCA	ácido tricloroacético
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propano-diol
YEM	medio con extracto de levadura-manitol
μCi	micro Curie

Indice

	página
RESUMEN	1
Capítulo 1. INTRODUCCION.	2
1.1. La fijación de nitrógeno.	3
1.2. Establecimiento de la simbiosis leguminosa- <u>Rhizobium</u> .	6
1.3. Mecanismo de adherencia e hipótesis del reconocimiento por lectina.	11
1.4. Polisacáridos bacterianos que posiblemente cumplen un papel en la unión con las raíces de las leguminosas.	16
1.5. Rol de los distintos polisacáridos en la determinación de la especificidad del proceso de nodulación.	19
1.5.1. Exopolisacárido y polisacárido capsular.	19
1.5.2. Lipopolisacárido.	21
1.5.3. Glucanos.	23
1.5.4. Polisacáridos del tipo del ácido teicurónico.	24
1.6. Obtención de anticuerpos monoclonales.	26
1.6.1. Porque anticuerpos monoclonales.	28
1.6.2. Antecedentes de la utilización de Acs Mcs contra <u>Rhizobium</u> .	30
1.7. Objetivos de esta tesis.	32

Capítulo 2. AGLUTININA DE ALFALFA	33
2.1. <u>Materiales y Métodos.</u>	34
2.1.1. Microorganismos utilizados.	34
2.1.2. Semillas.	34
2.1.3. Condiciones de cultivo.	34
2.1.4. Obtención de las bacterias para los ensayos de aglutinación.	34
2.1.5. Preparación de las aglutininas.	35
2.1.6. Ensayo de aglutinación.	35
2.1.7. Obtención del lipopolisacárido.	36
2.1.8. Obtención del exopolisacárido.	36
2.1.9. Inhibición de la aglutinación.	37
2.1.10. Electroforesis.	37
2.1.11. Efecto de proteasas.	38
2.1.12. Métodos.	38
2.2. <u>Resultados y discusión.</u>	39
2.2.1. Caracterización de las aglutininas.	39
2.2.1.1. Especificidad.	39
2.2.1.2. Características generales de la aglutinación.	40
2.2.1.3. Variación del título de aglutinación con el tiempo de cultivo.	42
2.2.1.4. Comparación de las aglutininas de alfalfa y lotus por electroforesis.	46
2.2.1.5. Efecto de proteasas.	46
2.2.1.6. Mayor purificación de la aglutinina de alfalfa.	48
2.2.2. Estudio de la naturaleza química de la interacción a pH 4,0.	54

2.2.2.1. Estudio de la aglutinación de las bacterias con otras proteínas.	54
2.2.2.2. Estudio de la inhibición de la aglutinación.	57
2.2.2.2.1. Inhibición con compuestos poliméricos.	57
2.2.2.2.2. Inhibición con sales.	57
2.2.2.2.3. Inhibición con azúcares.	60
2.2.2.3. Porque <u>R.meliloti</u> LA da menor título de aglutinación que HA.	60
2.3. <u>Discusión general y comentarios.</u>	63
Capítulo 3. ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA SUPERFICIE DE <u>RHIZOBIUM MELILOTI</u> .	67
3.1. <u>Materiales y Métodos.</u>	68
3.1.1. Obtención de los anticuerpos monoclonales.	68
3.1.1.1. Cepas bacterianas.	68
3.1.1.2. Condiciones de cultivo.	68
3.1.1.3. Líneas de células de mieloma.	68
3.1.1.3.1. Medio de cultivo.	68
3.1.1.3.2. Almacenamiento.	68
3.1.1.3.3. Descongelamiento.	69
3.1.1.4. Preparación del antígeno.	69
3.1.1.4.1. Preparación del exudado de alfalfa.	69
3.1.1.5. Inmunización.	70
3.1.1.6. Fusión.	70
3.1.1.7. Clonado por dilución limitante.	71
3.1.2. Ensayo de detección de anticuerpos.	73
3.1.3. Tratamiento de bacterias y obtención de polisacáridos.	74
3.1.3.1. Tratamiento con periodato de sodio.	74
3.1.3.2. Tratamiento con calor.	74
3.1.3.3. Tratamiento con pronasa.	74

3.1.3.4. Obtención de membranas externas.	74
3.1.3.5. Obtención del exopolisacárido.	74
3.1.3.6. Obtención del lipopolisacárido.	74
3.1.3.6.1. Hidrólisis del lipopolisacárido.	75
3.1.4. Estudios realizados con los anticuerpos monoclonales obtenidos.	76
3.1.4.1. Determinación del grado de unión de las distintas bacterias a las placas de poliestireno.	76
3.1.4.2. Calibración de los anticuerpos monoclonales.	76
3.1.4.3. Ensayo de adsorción.	76
3.1.4.4. Ensayo de inhibición.	77
3.1.5. Experimentos adicionales.	78
3.1.5.1. Determinación de la clase de inmunoglobulina.	78
3.1.5.2. Purificación del Ac Mc H <sub>104</sub> por HPLC.	78
3.2. <u>Resultados y discusión.</u>	79
3.2.1. Antígeno, inmunización y puesta a punto del ELISA.	79
3.2.2. Fusión.	81
3.2.3. Especificidad.	85
3.2.3.1. Grado de unión de las distintas bacterias a la placa de poliestireno.	85
3.2.3.2. Calibración de los anticuerpos.	86
3.2.3.3. Comparación con otro Ac Mc no relacionado.	88
3.2.3.4. Ensayo de adsorción.	88
3.2.4. Estudio de los antígenos bacterianos involucrados.	95
3.2.4.1. Ubicación: adsorción con membranas externas.	95

3.2.4.2. Efecto de la fijación con la solución salina de formaldehído.	97
3.2.4.3. Propiedades bioquímicas.	97
3.2.4.3.1. Tratamiento con periodato de sodio.	97
3.2.4.3.2. Tratamiento con calor.	97
3.2.4.3.3. Tratamiento con pronasa.	100
3.2.4.4. Ensayos de inhibición.	100
3.2.4.4.1. EPS y LPS de <u>R.meliloti</u> 102F51 HA.	100
3.2.4.4.2. LPS de <u>R.meliloti</u> 102F51 HA y de <u>E.coli</u> K12.	102
3.2.4.4.3. LPS hidrolizados.	105
3.2.4.4.4. Monosacáridos y KDO.	105
3.2.4.5. Efecto de la mutación del receptor al fago F20.	108
3.2.4.6. Efecto del medio de cultivo.	108
3.2.5. <u>Miscelánea</u> : determinación de la clase de inmunoglobulina.	114
3.3. <u>Discusión general y comentarios.</u>	116
BIBLIOGRAFIA.	120

## RESUMEN

Se estudiaron las características de una proteína extraída de semillas de alfalfa (aglutinina). Se encontró que, contrariamente a lo postulado (127), esta proteína no cumpliría ningún papel en la determinación de la especificidad de la interacción Rhizobium meliloti-alfalfa ya que aglutina tanto con R.meliloti como con otras bacterias y además una proteína con características similares se extrajo de otra leguminosa (lotus) que no es nodulada por R.meliloti. Se propone que la interacción entre las bacterias y la aglutinina se debe a fuerzas electrostáticas entre la proteína cargada positivamente a pH 4,0 y los grupos cargados negativamente sobre la superficie de las bacterias.

Por otro lado se puso a punto la técnica de fusión y obtención de anticuerpos monoclonales contra la superficie de R.meliloti 102F51 HA. Se cuenta con una serie de Acs Mcs que por los resultados obtenidos parecieran estar dirigidos hacia algún epítopo sobre el lipopolisacárido de la bacteria. En base a la reactividad con 3 de estos anticuerpos monoclonales se pudo diferenciar distintas cepas de R.meliloti.

Capítulo 1.

INTRODUCCION

### 1.1. La fijación de nitrógeno

Todos los organismos conocidos reciclan continuamente los elementos químicos que los forman. Uno de sus principales constituyentes es el elemento nitrógeno. Los compuestos nitrogenados por excelencia son las proteínas y los ácidos nucleicos pero la mayoría de los otros materiales biológicos contienen algún átomo de nitrógeno. Por esto uno de los ciclos más importantes desde el punto de vista ecológico y económico es el del nitrógeno (Figura 1).

La pérdida de nitrógeno a la atmósfera es compensada por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno y en la mayoría de las áreas fértiles del planeta la velocidad de fijación del  $N_2$  es la etapa limitante, la que determina la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en el suelo y por lo tanto la productividad biológica (133).

La habilidad de fijar  $N_2$  está restringida a los procariotes y dentro de este grupo a diversos organismos. Estos pueden ser autotróficos o heterotróficos, aeróbicos o anaeróbicos, de vida libre o simbióticos (Cianobacterias, Chromatium, Rhodospirillum, Azotobacter, Clostridium, algunas Klebsiella, Bacillus y Mycobacterium, Desulfovibrio, Beijerinckia spp., Alnus y Rhizobium).

Desde el punto de vista agrícola las más importantes bacterias fijadoras de  $N_2$  son aquellas que lo hacen en asociación con la planta ya que el nitrógeno fijado está justo donde se necesita: cerca de las raíces de la planta. En un sistema simbiótico en el cual las bacterias fijadoras de  $N_2$  están íntimamente asociadas con la planta, la transferencia de nitrógeno fijado del microbio al huésped es muy rápida y eficiente comparándola con la que se obtiene por amonificación del suelo (retorno al ciclo de la materia orgánica en la forma de amonio por autólisis, decaimiento y putrefacción del material biológico) o a través de fertilizaciones artificiales (133).

La existencia de sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno fue sostenida por Sir Humphry Davy ya a principios del siglo XIX pero fue confirmada solo en 1886-8 por H. Hillreigel y H. Wilfarth (75). Las asociaciones formadas por plantas leguminosas con bacterias

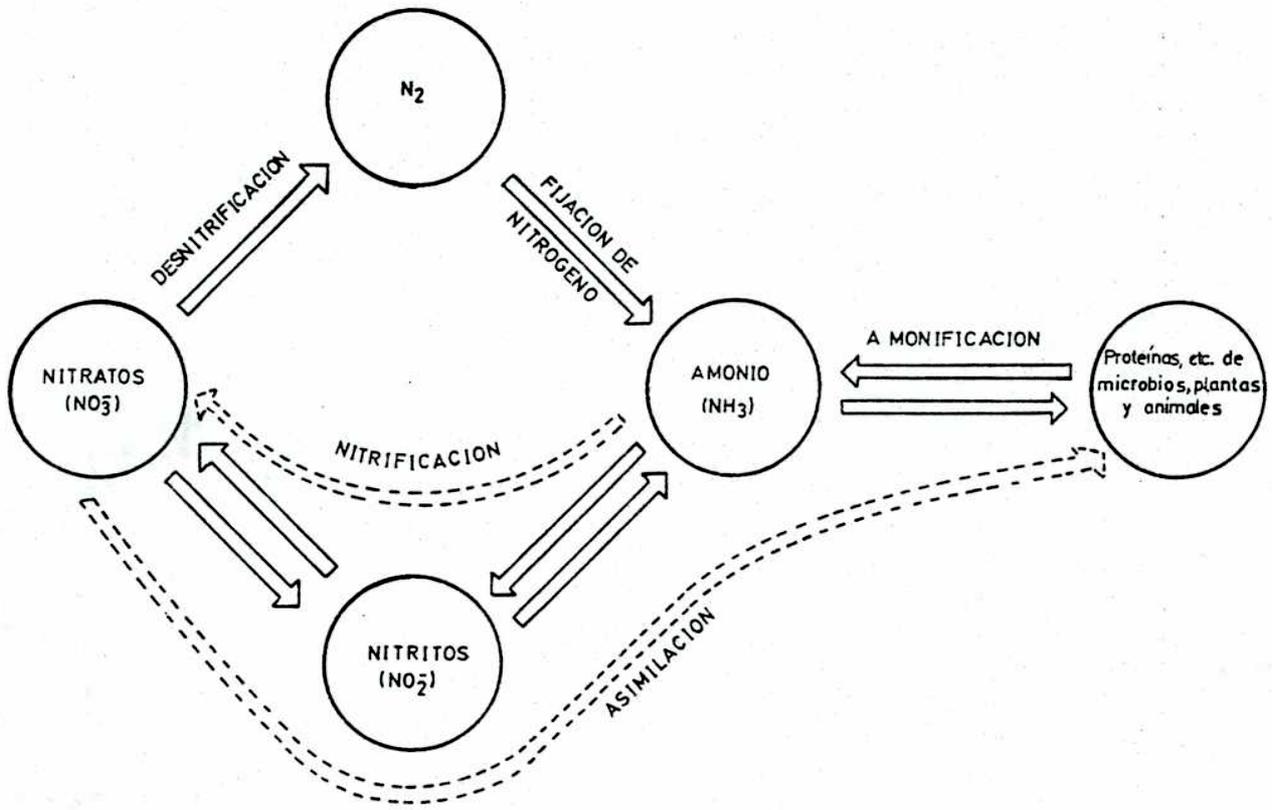


Figura 1: Ciclo del nitrógeno (133)

del suelo de los géneros Rhizobium (de crecimiento rápido) y Bradyrhizobium (de crecimiento lento) son las más conocidas. Estos 2 géneros junto con Agrobacterium están agrupados dentro de la familia Rhizobiaceae. Las leguminosas involucradas son, entre otras, plantas tales como trébol, alfalfa, arveja, soja y poroto, las cuales son muy importantes tanto desde un punto de vista agrícola como económico ya que sirven como alimento, forraje o como fertilizantes verdes.

## 1.2. Establecimiento de la simbiosis leguminosa-Rhizobium

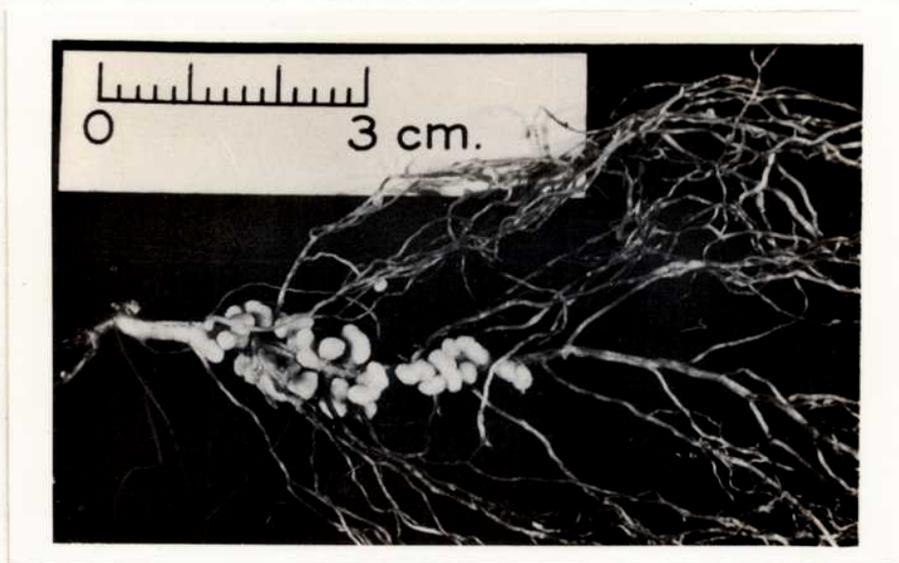
La asociación entre leguminosas y Rhizobium (con este término se abarca de aquí en mas a los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium) se caracteriza por la formación de unas estructuras especializadas llamadas nódulos en cuyo interior se realiza la fijación del nitrógeno (Figura 2).

El desarrollo del nódulo es un proceso complejo. Rhizobium reconoce y se adhiere a los pelos radiculares del huésped o a células que genéticamente están predispuestas a transformarse en pelos radiculares. Seguido a la etapa de adherencia, Rhizobium induce deformación, enrulamiento y ramificación de los pelos radiculares quedando las bacterias atrapadas en los rulos formados. En este sitio Rhizobium penetra la pared celular de la planta. El huésped deposita material de pared celular nuevo que se utiliza para formar una estructura tubular llamada hilo de infección. Rhizobium circula por este hilo de infección, este sigue creciendo hacia la base de la célula del pelo radicular siguiendo al núcleo celular. Las células corticales de la raíz son inducidas a dividirse y diferenciarse en el tejido del nódulo. El hilo de infección pasa a través de la pared celular del pelo radicular y comienza a ramificarse en las adyacentes células corticales recientemente divididas. Luego Rhizobium es liberado en el citoplasma de estas células y es rodeado por una membrana peribacteroide derivada del huésped. Las bacterias se diferencian así en bacteroides. Los bacteroides maduros son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico en amonio el cual es asimilado por la planta para crecer y desarrollarse (Figura 3) (70).

El proceso descrito tiene un alto grado de especificidad: cierto tipo de planta es colonizada por cierto tipo de bacteria. En base a esto se clasifica a los rhizobia en los llamados "grupos de inoculación cruzada" (Tabla 1).

La especificidad de esta interacción implica un mecanismo de reconocimiento el cual es la consecuencia final de un complejo intercambio de señales moleculares entre el huésped y el microbio. El reconocimiento por parte del microbio de la superficie celular del huésped o de

Figura 2



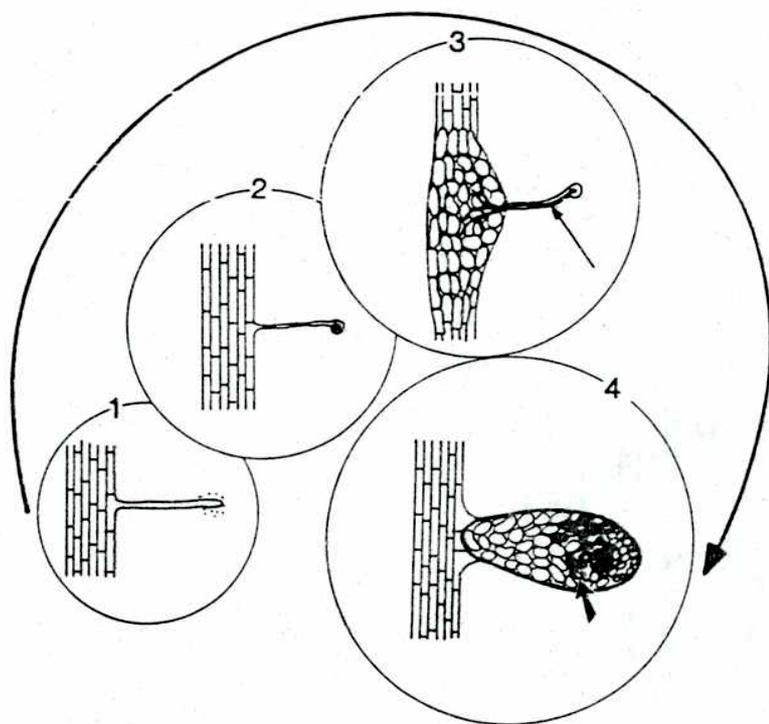


Figura 3: Desarrollo del nódulo (Kondorosi, E. and Kondorosi, A. (1986) TIBS 11, 296).

- 1) Adherencia de la bacteria al pelo radicular
- 2) Enrulamiento del pelo radicular y atrapamiento de la bacteria
- 3) Crecimiento del hilo de infección
- 4) Nódulo maduro. La flecha señala empaquetamientos de células vegetales con bacteroides fijadores de nitrógeno

Grupo	Organismo	Ejemplos de plantas huésped
Alfalfa	<u>Rhizobium meliloti</u>	Variedades de alfalfa
Trébol	<u>Rhizobium trifolii</u>	Trébol
Arveja	<u>Rhizobium leguminosarum</u>	Arveja, lenteja, algunos porotos ( <u>Vicia</u> )
Poroto	<u>Rhizobium phaseoli</u>	Porotos ( <u>Phaseolus</u> )
Lupino	<u>Bradyrhizobium lupini</u>	Lupines
Soja	<u>Bradyrhizobium japonicum</u>	Poroto de soja
Caupí	<u>Rhizobium spp. (Caupí)</u>	Caupí, maní, acacia

Tabla 1: Grupos de inoculación cruzada de Rhizobium (133)

un componente sobre la misma o de algún factor liberado por el mismo podría inducir la respuesta fisiológica necesaria para esa interacción. A la vez el reconocimiento del microbio por el huésped podría inducir la expresión de genes necesarios para defenderse o incrementar tal interacción.

Un área de intensivo estudio es el de la determinación de las señales moleculares envueltas en el reconocimiento huésped-simbionte. La aplicación de los conocimientos adquiridos en este campo abriría la posibilidad de manipular especies de bacterias y plantas para incrementar el rango de huéspedes capaces de entrar en una eficiente simbiosis para la fijación de nitrógeno.

### 1.3. Mecanismo de adherencia e hipótesis del reconocimiento por lectinas

Un modelo para explicar la especificidad de huésped, el cual está bajo intensiva investigación pero aún no ha sido debidamente comprobado, es el que se conoce como la hipótesis del reconocimiento por lectinas. Según esta hipótesis la especificidad de la infección involucra la unión de lectinas de leguminosas específicas para determinadas estructuras de carbohidratos que se hallan exclusivamente sobre la superficie del apropiado simbionte. Este modelo fue primero propuesto por Albersheim y Anderson-Prouty (2). Bohlool y Schmidt (15) fueron los primeros en brindar evidencia experimental que demostraba que las lectinas pueden funcionar como determinantes de la especificidad del huésped. Ellos observaron que la lectina de poroto de soja (SBL) conjugada con FITC se unía específicamente a 22 de 25 cepas de Bradyrhizobium japonicum (15). Esta lectina conjugada sin embargo no se unió a las 23 cepas de Rhizobium heterólogas ensayadas que no son capaces de nodular soja (15).

Subsecuentes estudios (34, 95) informaron que la lectina de soja se unía a varias cepas heterólogas y fallaba en unirse a varias cepas homólogas. Ya empezaban las contradicciones en los resultados obtenidos al investigar este modelo de reconocimiento.

Sin embargo Bhuvaneswari y colab. (14) confirmaron los resultados obtenidos por Bohlool y Schmidt (15) indicando además que la unión de la lectina a B.japonicum era específica y reversible ya que era inhibida por los probables haptenes: D-galactosa y N-acetil-D-galactosamina. También encontraron que las propiedades relacionadas con la unión de la lectina de B.japonicum cambiaban con la edad del cultivo siendo mayor la unión durante la fase temprana del crecimiento logarítmico (14). Mas tarde los mismos autores (12) encontraron que cepas de B.japonicum que no unían FITC-SBL adquirían esa capacidad cuando las bacterias se cultivaban en presencia del exudado de la raíz de soja.

Una fuerte correlación entre la unión a lectina y la infectividad de Rhizobium trifolii fue demostrada por Dazzo y colab (42). La lectina encontrada en trébol y que se unía y aglutinaba específicamente el simbionte bacteriano se denominó trifolina A (51). Se encontró que cepas

infectivas de R.trifolii contienen un polisacárido que tiene reactividad antigénica cruzada con la superficie de los pelos radiculares de trébol (42). Según Dazzo y colab. (46, 48) la trifolina A interactúa específicamente con el lipopolisacárido y con el polisacárido capsular (CPS) de R.trifolii. La interacción entre trifolina A y R.trifolii fue inhibida por 2-deoxi-D-glucosa y 2-amino-2,6-dideoxiglucosa (40, 81).

Según Dazzo y Hubbel (42) la lectina de trébol funcionaría como un puente entre R.trifolii y la superficie del pelo radicular.

Así como se encontró trifolina A en las semillas de trébol efectivamente, también se encontró que esta lectina se acumula sobre la superficie de los pelos radiculares de la raíz, estando en mayor proporción en el extremo de los pelos radiculares en crecimiento (51). La cantidad de trifolina A que se eluye de las raíces de trébol es mayor cuando se incluye en el buffer de lavado de la raíz 2-deoxi-D-glucosa (40). También en soja se demostró la existencia en raíz de una lectina que interacciona específicamente con B.japonicum (150).

Una importante demostración de la existencia de sitios receptores sobre la raíz de la leguminosa (trébol) que específicamente reconocen el correspondiente simbiote se hizo examinando el sitio donde se unían los polisacáridos que interaccionaban con la lectina. Estos estudios demostraron que los sitios receptores estaban exactamente localizados donde la lectina se encontraba acumulada (40, 64).

En semillas y raíces de alfalfa se encontró una aglutinina que se unía específicamente a Rhizobium meliloti (127). No se le pudo llamar lectina pues no se encontró ningún haptene azúcar inhibidor de la aglutinación que produce, con el simbiote de alfalfa. Cepas incapaces de aglutinar con la misma eran a la vez incapaces de nodular (127). Es por estos resultados que a esta aglutinina se le adjudicó un papel importante en la determinación de la especificidad de la nodulación de alfalfa (127).

A pesar de todos estos estudios hay otros resultados que no encajan con la hipótesis de la lectina. Así varias especies de Rhizobium se unen a lectinas de plantas que ellos no infectan o nodulan (43, 95, 171) e incluso se unen a las raíces de leguminosas que no son su huésped en

forma no específica y en alta proporción (34, 46). Un pretratamiento de B.japonicum con la lectina no incrementó su adhesión a raíces de soja (135) lo cual sería lo esperado de acuerdo a la hipótesis mencionada. Se aislaron líneas de soja que tienen bloqueada la expresión del gen que codifica para la lectina de semilla de 12 kD (124, 136, 152, 166, 68) y sin embargo estas variedades de soja son noduladas por varias cepas de B.japonicum (136).

Los sostenedores de la hipótesis de la lectina sin embargo atribuyen las inconsistencias a: i) que los polisacáridos que unen las lectinas pueden cambiar su composición con la edad del cultivo por lo tanto cambios en la habilidad de unir lectina por parte de los Rhizobium puede ser debido a las alteraciones en estos polisacáridos. Esto se encontró en el caso de B.japonicum (14, 13, 118); R.trifolii (148, 81, 50) y en Rhizobium leguminosarum (101), ii) que la lectina no estaría accesible sobre la superficie de la raíz sino solo durante un período transitorio del desarrollo (127, 147) y iii) a que está demostrado que el microambiente del huésped afecta la expresión del receptor de lectina sobre la bacteria (12, 45, 49). Ultimamente sobre este punto es mucho lo que se ha avanzado en el sentido de que se encontró que los genes bacterianos involucrados en el proceso de nodulación son inducidos por compuestos que secretan las plantas (83, 129, 53, 80).

Además hay que mencionar que en aquellas líneas de soja que no tenían la lectina y que eran igualmente noduladas por B.japonicum se pudieron detectar pequeñas cantidades de lectina en las semillas y de mRNA de lectina en raicillas (157).

A pesar entonces de las pruebas en contra y de no haber sido totalmente comprobada, la hipótesis de la lectina permanece como una posible explicación para las interacciones específicas de leguminosas y Rhizobium.

Además de la interacción lectina-polisacárido se encontraron otros elementos que contribuirían a la unión de las bacterias a las raíces. Los "pili" sintetizados por B.japonicum tendrían un papel en la unión de estas bacterias a las raíces de soja ya que un tratamiento con anticuerpo anti "pili" redujo la unión en un 90% (70).

En el caso de la unión de R.trifolii a las raíces de trébol se puede separar este

fenómeno en 2 fases: fase I: consistiría en la adhesión de R.trifolij a la trifolina A que se encuentra sobre las raíces y fase II; involucra la adhesión a la raíz a través de microfibrillas extracelulares de origen desconocido (44, 48). Para Agrobacterium, que es una bacteria taxonómicamente relacionada con Rhizobium y que además tiene también la capacidad de asociarse con las plantas con la consiguiente formación de agallas, se encontró que en su adhesión a la planta participarían microfibrillas de celulosa (adhesinas) sintetizadas por la bacteria (111). Se cree que esto mismo podría suceder entonces con Rhizobium.

Muchos trabajos contradicen la hipótesis de la lectina en cuanto encuentran, como se mencionó anteriormente, que la unión del Rhizobium a su huésped no es específica (34, 135, 164). En ninguno de estos 3 trabajos se encontró una mayor proporción de bacterias homólogas unidas respecto de las heterólogas. En cambio Dazzo y colab (46) encontraron en el caso de R.trifolij-trébol que un mecanismo de unión no específico permitía a todas las especies de Rhizobium unirse en un bajo número (2-4 células por 200  $\mu\text{m}$  de longitud de pelo radicular) mientras que la unión específica permitía que mayor número (22-27 bacterias por 200  $\mu\text{m}$  de longitud de pelo radicular) del Rhizobium específico se uniera a la raíz bajo idénticas condiciones.

Caetano-Anollés y Favelukes (25) encontraron también que a pesar de que existía una unión a raíces de alfalfa de bacterias distintas al simbiote, la unión de R.meliloti expresaba una especificidad que lo diferenciaba marcadamente de otros Rhizobium y bacterias de otras familias. En base a esto sugirieron la existencia de sitios de unión en las raíces altamente selectivos para el microsimbionte específico los cuales podrían discriminar R.meliloti de otras bacterias.

Teniendo en cuenta todos estos hechos se podría sintetizar, de acuerdo a Halverson y Stacey (70), que el contacto inicial de un microbio con la superficie de la raíz podría ser un evento al azar. La adsorción que seguiría a este contacto probablemente dependería de las propiedades de superficie de huésped y microbio. Esta sería una etapa reversible y tal vez las lectinas sean las responsables del mismo. Luego la síntesis de adhesinas extracelulares (tal vez

"pili" o microfibrillas de celulosa) serían las reponsables de una unión mas fuerte e irreversible. Obviamente todo esto iría acompañado, sería consecuencia y a la vez originaría el intercambio de señales moleculares necesario para una efectiva simbiosis.

#### 1.4. Polisacáridos bacterianos que posiblemente cumplen un papel en la unión con las raíces de las leguminosas.

Los polisacáridos que producen Rhizobium son: exopolisacáridos, polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos, glucanos y polisacáridos del tipo del ácido teicurónico encontrados en algunas cepas de R.meliloti.

Muy probablemente estos polisacáridos que se encuentran en la superficie de Rhizobium tienen un importante papel en el establecimiento de la simbiosis. Mucho es lo que se investiga sobre los polisacáridos que estarían involucrados en cada sistema leguminosa-Rhizobium específico, que función tendrían y como estaría regulada su actividad.

Los EPS se excretan al medio de cultivo. La composición del EPS de Rhizobium de crecimiento rápido indica que no hay mucha variedad en la misma (176, 177, 67). En cambio en el grupo de crecimiento lento se halla mas heterogeneidad en su composición química variando aún entre distintas cepas de una misma especie (55, 118).

El EPS puede quedarse formando parte del material capsular (CPS) de la célula. El EPS de Rhizobium de crecimiento lento se adhiere mas fuertemente a la célula que el de los de crecimiento rápido (55). Las especies de Rhizobium difieren en el tipo de encapsulamiento. Algunas cepas de B.japonicum exhiben una cápsula polar (158) mientras que R.trifolij, R.leguminosarum y Rhizobium phaseoli forman una cápsula completa (50, 54). También B.japonicum cepa USDA.138 posee una cápsula completa (26). R.meliloti no presenta cápsula aunque algunas fibrillas polares pueden ser vistas (54, 121). La orientación de la cápsula puede variar al cultivar las bacterias en presencia del exudado de raíz que contiene enzimas degradantes de la misma (49).

El EPS se divide en cuanto a la composición química en 2 clases:

Clase I: polisacárido que carece de ácidos urónicos y que tienen D-glucosa, D-galactosa y ácido pirúvico; tal es el caso del EPS producido por R.meliloti (176).

Clase II: polisacárido que está compuesto por D-glucosa, D-galactosa, ácido D-

glucurónico y ácido pirúvico en distintas proporciones a las de la clase I y que es el caso de R.leguminosarum, R.phaseoli y R.trifolii (177, 140).

El LPS también se encuentra sobre la superficie de la bacteria, es parte de la membrana externa de la misma. Este compuesto presenta una gran variabilidad en composición y estructura entre diferentes especies de bacterias y aún entre cepas de una misma especie por lo que constituye el determinante antigénico primario de las bacterias Gram negativas (108, 125). También el LPS sirve como receptor de fagos (19, 166).

La composición en azúcares de algunas cepas de R.trifolii, R.faseoli, R.leguminosarum y de R.meliloti está determinada (30, 179, 27, 29, 28). Se encontró así que en Rhizobium existía también una gran variabilidad en la misma aún entre diferentes cepas de una misma especie.

El LPS de Rhizobium posee lípido A, un core (pequeño núcleo de oligosacárido) y una cadena polisacáridica (cadena O) que está constituida por unidades repetitivas de distintos azúcares (28). Recientemente Chen y Carlson (36) determinaron la estructura de la cadena O del LPS de R.leguminosarum. El LPS de una determinada bacteria es altamente heterogéneo (28, 93). Todo esto lo asemeja al LPS de E.coli y Salmonella pero sin embargo existen algunos hechos que los distinguen (28).

El análisis de carbohidratos de la porción sacarídica del LPS reveló que está formado por azúcares neutros, hexosaminas, 2-ceto 3-deoxioctonato y ácidos urónicos (179). Entre los azúcares neutros se encontraron glucosa, galactosa, manosa, ramnosa, fucosa y una pequeña cantidad de azúcares O-metilados.

En cuanto al lípido A algunos investigadores encontraron al examinar distintas cepas de R.leguminosarum, R.phaseoli, R.trifolii y R.meliloti que todas tenían los mismos ácidos grasos ( $\beta$ -OH-C<sub>14:0</sub>,  $\beta$ -OH-C<sub>15:0</sub>,  $\beta$ -OH-C<sub>16:0</sub> y  $\beta$ -OH-C<sub>18:0</sub>) con pequeñas variaciones en las proporciones relativas (179). El perfil de ácidos grasos de LPS de Rhizobium es diferente al de las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (132). Recientemente se encontraron similitudes entre los lípidos A de las 2 familias (Rhizobiaceae y Enterobacteriaceae) pero peculiaridades en cuanto a los sustituyentes (141).

Los glucanos  $\beta$  1-2 cíclicos constituyen un oligosacárido de 17 a 23 residuos de glucosa (52, 175, 76, 181) y que se encuentran en el periplasma aunque también se halla en el sobrenadante de cultivo de algunas cepas (5, 178). Recientemente también se informó sobre formas ácidas del mismo (8, 78, 115).

También en R.trifolii se describió la síntesis de otro glucano ( $\beta$  1-4) del tipo celulosa (122).

Algunas cepas de Rhizobium son capaces de producir glucano  $\beta$  1-3 pero la producción de este polisacárido es genéticamente inestable (77, 67). Aún no se conoce la función biológica del mismo.

Por último los polisacáridos de tipo del ácido teicurónico (tal vez un tipo mas de EPS) se encontraron hasta el momento en determinadas cepas de R.meliloti. El encontrado en R.meliloti 102F51 LA (161) está formado por ácido galacturónico y galactosa (38), el encontrado en R.meliloti GR4 (155) está formado por ácido glucurónico y galactosa (Coira, manuscrito en preparación ).

## 1.5. Rol de los distintos polisacáridos en la determinación de la especificidad del proceso de nodulación

### 1.5.1. Exopolisacárido y polisacárido capsular

El EPS y CPS fueron muy investigados en cuanto a su estructura (84, 140) y al papel que jugarían en el proceso de infección (40, 173, 82, 104, 149). Sin embargo los resultados obtenidos no permiten extraer conclusiones definitivas ya que cuando se purificó el EPS y se estudió su estructura no se lo utilizó para estudiar su actividad biológica, ubicación celular ni variación en el tiempo (84, 140). En cambio los estudios hechos sobre actividad biológica del EPS no se hicieron con preparaciones purificadas del mismo (82, 104, 149, 173, 46).

A partir únicamente de los estudios estructurales en los cuales se estudiaron los polisacáridos ácidos secretados por distintas cepas de Rhizobium se encontró que tanto distintas cepas de una misma especie de Rhizobium como es el R.phaseoli sintetizaban EPS de distintas estructuras (113) así como que distintas cepas de R.leguminosarum, R.trifolij y R.phaseoli secretaban polisacáridos ácidos de igual estructura e idénticos sustituyentes ubicados en lugares similares (pirúvico y O-acilos) (113, 57, 140).

Mc Neil y colab. (113) demostraron también que R.trifolij LPR5045, una cepa no nodulante preparada por eliminación del plásmido sym (plásmido que controla la síntesis de las moléculas necesarias para la determinación de la especificidad del huésped) secretaban un polisacárido de idéntica estructura al de la cepa parental.

Todos estos hallazgos son incompatibles con la hipótesis de que el EPS sea el determinante de la especificidad del huésped. Sin embargo queda la posibilidad que algún componente minoritario y no detectado hasta el momento fuese el responsable de la especificidad bacteria-leguminosa o que existiesen variaciones en las estructuras estudiadas, dependiendo de la fase de crecimiento, las cuales podrían ser las responsables de la especificidad (162).

Recientemente se observó tanto en R.trifolii, Rhizobium sp. cepa NGR234 y en R.meliloti (33, 35, 61, 97, 120) que mutantes deficientes en la producción de EPS o que producen EPS con alteraciones en los sustituyentes, forman en sus huéspedes específicos nódulos vacíos. Con estas pruebas ellos descartan un papel del EPS en el reconocimiento específico, pero sí le atribuyen un papel en el proceso de invasión del nódulo.

Para el caso de B.japonicum, sin embargo, hay pruebas mas confiables sobre el papel del EPS en la interacción de la bacteria con la leguminosa. EPS ácido de 2 cepas de B.japonicum (110 y 138) fueron reactivas con la lectina de soja de una manera específica (14, 26, 159). La lectina de soja marcada con ferritina se unió a las cápsulas de distintas cepas de B.japonicum (26). También en el medio de cultivo de B.japonicum se encontraron polisacáridos que unen la lectina de soja (14, 118, 159). Esta lectina se une específicamente a galactosa y azúcares relacionados (galactosamina, N-acetilgalactosamina, fucosa) (14, 102). Se encontró (118) que el contenido de galactosa del polisacárido decreció a medida que los cultivos alcanzaron la fase logarítmica tardía y la cantidad de 4-O-metilgalactosa se incrementó correspondientemente. Tal vez esto esté relacionado con la regulación de la reactividad del EPS y CPS. Si bien en otras cepas de B.japonicum como las 61A76, 46 y 71a (55, 56) se encontró un EPS distinto al de las cepas 110 y 138 y que no contiene galactosa, Bauer (9) especula con que tal vez las primeras posean el EPS del tipo de las segundas pero en muy pequeñas cantidades.

### 1.5.2. Lipopolisacárido

Estos compuestos ofrecen una variación grande en la composición química y estructura tanto entre distintas cepas de una misma especie como entre distintas especies de Rhizobium. Esta diversidad sugeriría que el LPS no puede contribuir a determinar la especificidad del huésped.

Si bien hay muchos trabajos que demuestran una interacción específica entre el LPS de distintas especies y las lectinas de la semilla del huésped correspondiente (11, 41, 86, 87, 88, 131, 170), como sucedía con el EPS, estos no son del todo confiables ya que está cuestionada la pureza del LPS utilizado y no se hicieron controles con azúcares como haptenes inhibidores para descartar uniones inespecíficas.

Más recientemente se demostró que el LPS de R.trifolii servía como receptor de la trifolina A (la lectina de trébol) (81). En el mismo trabajo se describen 2 formas de LPS apareciendo una de ellas, el receptor principal, en la fase exponencial tardía. Dazzo y colab. (47) encontraron que a concentraciones de 1  $\mu\text{g}$ /raicilla el LPS se unía a los extremos de los pelos radiculares incrementando la formación del hilo de infección por el simbionte del cual se obtuvo o sea R.trifolii. A 10  $\mu\text{g}$ /raicilla el LPS suprimía la infección por la bacteria.

Se encontraron diferencias en la composición de azúcares entre LPS de cepas nodulantes y no nodulantes de R.trifolii (142, 143). También (141) se encontraron diferencias en el lípido A entre cepas de R.trifolii  $\text{nod}^+$  y  $\text{nod}^-$ . La diferencia correspondía a la naturaleza y el tipo de unión de los ácidos grasos. Bellogin y colab. (10) encontraron diferencias en el patrón electroforético del LPS entre cepas infectivas y no infectivas. Sin embargo la mutación en todos estos casos se debía a la pérdida de un plásmido lo cual implica que no son pruebas suficientes como para atribuirle un rol al LPS en la simbiosis.

Recientemente Carlson y colab. (31) compararon el LPS de R.trifolii ANU843 con el de mutantes obtenidas por mutagénesis con el transposón Tn5 que estaban afectadas en la

infección de la raíz y encontraron diferencias en la cantidad de glucosa y grupos acilo entre unas y otras.

En el caso de soja Bal y Shantharan (6) encontraron que además de los sitios receptores de lectina en la cápsula existen sitios receptores de la misma en el lipopolisacárido de la pared celular.

### 1.5.3. Glucanos

Los glucanos  $\beta$  1-2 cíclicos son característicos de las bacterias de la familia Rhizobiaceae: Rhizobium y Agrobacterium. También están descritos algunos casos de producción de glucanos  $\beta$  1-2, generalmente lineales en Xanthomonas, E.coli y Klebsiella pneumoniae (4)

Recientemente se publicaron evidencias sobre un posible rol del glucano  $\beta$  1-2 en las infecciones dadas por Agrobacterium. Mutantes avirulentas eran defectivas en la síntesis de este polisacárido y no se adherían a las células de la planta (137). Estas mutantes habían perdido la proteína de 235 kD de la membrana interna requerida para la síntesis del glucano (180). En Rhizobium hay estudios que demuestran la participación de estos glucanos en las primeras etapas de la nodulación tales como la formación de hilos de infección (1). Hace poco se describió por primera vez mutantes de Rhizobium que tenían afectada en un caso la síntesis del glucano  $\beta$  1-2 (155, 65) y en otro caso posiblemente su transporte (151). La primera produce nódulos inefectivos y es defectiva en la invasión de células corticales (65).

Otro tipo de glucano, del tipo celulósico (glucano  $\beta$  1-4 ), como ya se mencionó anteriormente, podría participar en una unión de tipo irreversible y no específica por analogía a lo que sucede con Agrobacterium (111).

#### 1.5.4. Polisacáridos del tipo del ácido teicurónico

Este polisacárido fue hallado por primera vez en R.meliloti 102F51 (72). En realidad en un mismo cultivo original de R.meliloti 102F51 se encontraron colonias pertenecientes a 2 distintos fenotipos(72). Una que producía este polisacárido (161, 38) y que se llamó 102F51 LA (de "low agglutination") ya que era aglutinada solo por bajas diluciones de la aglutinina extraída de semillas de alfalfa (127) y otra que se llamó 102F51 HA (de "high agglutination") ya que era aglutinada por altas diluciones de la misma (72).

A la vez R.meliloti 102F51 HA es sensible al fago F20 y resistente al 16B (F20<sup>S</sup> 16B<sup>I</sup>) ocurriendo exactamente lo contrario con R.meliloti 102F51 LA que es F20<sup>I</sup> 16B<sup>S</sup> (72).

Las cepas de R.meliloti que producen este polisacárido aniónico son más competitivas en la nodulación y nodulan mas rápido que aquellas que no lo producen (72). A partir de estos trabajos se cree que el responsable de las propiedades de superficie tales como reactividad a la aglutinina y sensibilidad al fago, así como de la mayor competitividad en la nodulación, sería este polisacárido y en consecuencia se le atribuye un rol en la interacción con la superficie de la raíz (161).

Recientemente se encontró en otra cepa de R.meliloti la GR4 (155) un polisacárido similar al de R.meliloti 102F51 LA y cuya presencia también le confiere a las bacterias mayor competitividad en la nodulación (Coira, manuscrito en preparación; 156).

Confirmando la idea que este polisacárido es el responsable de todas las propiedades mencionadas, Cavaignac (32) obtuvo a partir de un banco genómico de R.meliloti 102F51 LA (F20<sup>I</sup> 16B<sup>S</sup> pol<sup>+</sup>) un cósmido con el que complementó las bacterias R.meliloti 102F51 HA (F20<sup>S</sup> 16B<sup>I</sup> pol<sup>-</sup>). En estas bacterias se restituyó así la síntesis del polisacárido de tipo teicurónico, la sensibilidad al fago 16B y se aumentó la competitividad de nodulación (32).

Lo que sugieren Ugalde y colab. (161) es que este polisacárido es el receptor para el fago 16B y que éste se encontraría enmascarando, en aquellas bacterias que son HA, el receptor para el fago F20. A la vez como el receptor para el fago F20 sería el receptor que

interacciona con la aglutinina, como consecuencia las bacterias LA estarían impedidas de interactuar con la misma (161).

### 1.6. Obtención de anticuerpos monoclonales

Cuando se inyecta un material extraño en un animal se estimulan los linfocitos productores de anticuerpos que tienen especificidad hacia los distintos determinantes antigénicos del mismo, de manera que se produce una gran variedad de inmunoglobulinas. Una forma de obtener un solo tipo de anticuerpo sería aislando el linfocito que los produce y obteniendo por cultivo la proliferación de un clon de células productoras del anticuerpo. Lamentablemente estas células secretoras de anticuerpos no pueden mantenerse en un medio de cultivo más de un cierto tiempo.

Por otro lado existe un tipo de células que forman parte de lo que se denomina mieloma (tumor maligno de linfocitos) y que tienen la ventaja que pueden cultivarse indefinidamente.

Kohler y Milstein en 1975 (92) lograron fusionar las células de mieloma con las células de bazo de un animal inmunizado con un determinado antígeno obteniendo de esta forma células híbridas que poseen tanto la capacidad de producir anticuerpos con una determinada especificidad así como la de poder ser cultivadas indefinidamente. Estas células se pueden separar y obtener a partir de cada una un clon productor de grandes cantidades de un solo tipo de anticuerpo.

Para incrementar la fusión de las distintas células se pueden utilizar distintos agentes; el más usado es el polietilenglicol (PEG).

Luego de realizada la fusión hay que seleccionar las células híbridas de las células parentales; esto se realiza cultivándolas en un medio que solo permite el crecimiento de las primeras. El medio selectivo contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) (103). Las células de mieloma que se utilizan para la fusión en realidad son mutantes que poseen un defecto en la enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT) de manera que son incapaces de utilizar hipoxantina y guanina exógena y dependen por lo tanto de precursores simples y de la enzima ácido fólico reductasa para sintetizar purinas. La actividad

de la ácido fólico reductasa es bloqueada por antagonistas tales como la aminopterina. Por lo tanto la adición de aminopterina a un medio con células HGPRT<sup>-</sup> las destruye. Por otro lado las células de bazo mueren en corto tiempo. Por lo tanto las únicas que permanecen con vida son los híbridos heterólogos que poseen la HGPRT proveniente de las células de bazo y la inmortalidad de las células de mieloma.

De esta manera la producción de cualquier anticuerpo sintetizado por un animal inmunizado puede ser inmortalizada por el método de fusión celular.

### 1.6.1. Porque anticuerpos monoclonales

El reconocimiento entre leguminosa y Rhizobium o sea el mecanismo que determina que tal Rhizobium puede infectar una dada leguminosa sin duda pertenece a las primeras etapas del proceso de nodulación. Si bien la unión puede realizarse en forma inespecífica y al azar (34, 135, 164) existen pruebas que además de esta unión inespecífica existe otra específica (simultánea o siguiente) (46, 25) que es la que determinará que se continúe con los demás pasos que llevan al desarrollo de un nódulo eficiente.

Esta interacción específica seguramente resulta de la unión de componentes que se encuentran sobre la superficie de las células participantes. Como ya se mencionó antes estos serían tal vez las lectinas por parte de las plantas y algún polisacárido por parte de las bacterias.

Los polisacáridos que participan en la determinación de la especificidad deberían poseer las siguientes propiedades: i) ser idénticos o llevar alguna estructura idéntica a todas las cepas de una misma especie de Rhizobium. ii) ser distintos en las diferentes especies de Rhizobium.

En base a los estudios de estructura realizados ningún polisacárido hasta el momento tendría estas propiedades.

Una forma de detectar tal estructura sería contando con un anticuerpo que interaccione específicamente con la misma. Una vez que se cuenta con este anticuerpo se lo podría utilizar para dilucidar la función biológica de la estructura en cuestión.

Para obtener anticuerpos contra una determinada estructura que forma parte de una población compleja como es el caso de la superficie de la célula y que obviamente como se desconoce su naturaleza tampoco se la puede tener en forma purificada, lo mas apropiado es la obtención de anticuerpos monoclonales. Si uno en cambio obtuviese un suero policlonal, la fracción de anticuerpos con la especificidad deseada podría ser un porcentaje mínimo del total, difícil de separar del resto y tal vez difícil de detectar.

Otra ventaja de los anticuerpos monoclonales es que pueden ser producidos en un cantidad ilimitada y al trabajar siempre con el mismo hibridoma productor del anticuerpo se aseguran resultados reproducibles. En cambio un suero policlonal se obtiene en cantidad limitada y varían sus características entre uno y otro animal inmunizado.

Sin duda la homogeneidad molecular de la preparación del anticuerpo monoclonal asegura que solo 1 epítope es investigado a la vez lo cual permite estudiar esa estructura en forma mas definida y reproducible.

Los anticuerpos monoclonales también tendrían utilidad para diferenciar distintas cepas de una misma especie de Rhizobium. Muchas cepas se diferencian por marcadores de superficie ya que varían en cuanto a resistencia a fagos (72) e incluso serológicamente mediante el uso de sueros policlonales (110, 109). Teniendo en cuenta las ventajas mencionadas anteriormente de los Acs Mcs sobre un suero policlonal su utilización sin duda sería la forma mas fácil y adecuada de tipificación.

### 1.6.2. Antecedentes de la utilización de Acs Mcs contra Rhizobium

En los últimos años son numerosos los trabajos en los que se utilizan Acs Mcs para estudiar los factores involucrados en el proceso de nodulación.

El primer trabajo que apareció fue el de Johansen y colab. (85) los cuales obtuvieron Acs Mcs hacia la superficie de Rhizobium meliloti. La utilidad que le dieron era algo que ya se venía utilizando en virus (58, 66, 174) y fue la de seleccionar con los mismos mutantes afectadas en la estructura que interaccionaba con dichos anticuerpos. Es así que seleccionaron mutantes de R.meliloti SU47 deficientes en la producción de exopolisacárido (61). Estas mutantes no producían enrulamiento de los pelos radiculares, no formaban hilos de infección y los nódulos que se desarrollaban no contenían bacteroides (61). A partir de estos resultados se sugiere que el exopolisacárido tiene una función en el proceso de invasión del nódulo.

Un poco después Brewin y colab. (20) obtuvieron anticuerpos monoclonales contra la membrana peribacteroide en nódulos inducidos por R.leguminosarum en arveja. El antígeno que reaccionaba con estos anticuerpos se encontraba también en la membrana plasmática y el Golgi de la planta (20).

En ese mismo laboratorio se obtuvieron Acs Mcs contra componentes de la pared celular del bacteroide de R.leguminosarum. La mayoría de los mismos reaccionó con el LPS del bacteroide. Mediante la utilización de estos Acs Mcs se detectaron diferencias entre el LPS de bacteroides y el de las bacterias de vida libre (21). Asimismo pudieron demostrar que existía una asociación física entre el LPS del bacteroide y la membrana peribacteroide (de origen de la planta) (17). Recientemente (18) se aisló otra serie de Acs Mcs que reaccionaron contra la membrana peribacteroide y otros componentes del nódulo formado en arveja. Si bien ninguno de los epitopes reconocidos por estos anticuerpos fue específico de nódulo, algunos de ellos se encontraban en forma más abundante en extractos de tejido de nódulo que en el de raíces no infectadas (18). A la vez aislaron 2 Acs Mcs que reaccionaron con antígenos bacteriales que se expresaban en la infección pero no en bacterias de vida libre (18).

También se aislaron y utilizaron Acs Mcs para la identificación de distintas cepas de Rhizobium. Tal es el caso para R.trifolii (172) donde utilizaron Acs Mcs contra el R.trifolii 162X95 para diferenciarlo de cepas naturales de la región de los Apalaches. También se obtuvieron Acs Mcs contra B.japonicum y se utilizaron para identificar distintas cepas (163). En base a la reactividad con un set de 13 Acs Mcs, 20 cepas de B.japonicum pudieron ser divididas en 5 grupos (siendo que todas reaccionaban igual con un suero policlonal).

### 1.7. Objetivos de esta tesis

La intención fue investigar y dilucidar los mecanismos que participan en la determinación de la especificidad del proceso de nodulación.

Se abordó este tema por 2 caminos:

1) Basándose en la hipótesis del reconocimiento por lectinas, se decidió comenzar estudiando las características de una aglutinina extraída de semillas de alfalfa que según Paau y colab. (127) aglutinaba específicamente con R.meliloti y a la que se proponía como determinante de la especificidad R.meliloti-alfalfa.

2) Se decidió desarrollar la técnica de obtención de anticuerpos monoclonales contra estructuras de la superficie de Rhizobium pensando de esta manera contar con un método efectivo para encontrar, estudiar y aislar los componentes que caracterizan las distintas bacterias y dentro de estos aquellos que participan en la interacción con la planta.

Capítulo 2.

AGLUTININA DE ALFALFA

## 2.1. Materiales y Métodos

### 2.1.1. Microorganismos utilizados:

R.meliloti 102F51 fenotipos HA (F20<sup>S</sup> 16B<sup>r</sup>) y LA (F20<sup>r</sup> 16B<sup>S</sup>) (72) fueron obtenidos del Dr. R. Ugalde. R.meliloti B-310 y R.lotus LL-22 fueron obtenidos de la Dra R. Dieguez de Inta, Castelar. R.japonicum 110 y E.coli K12 pertenecían al stock del laboratorio.

### 2.1.2. Semillas:

Semillas de Alfalfa (Medicago sativa, c.v. Dawson) y de lotus (Lotus corniculatus c.v. San Gabriel) fueron donados por la Estación Experimental de Agricultura Hilario Ascasubi, Inta, Bs.As. y la Estación Experimental Regional Agropecuaria Paraná, Inta, Entre Ríos, respectivamente.

### 2.1.3. Condiciones de cultivo:

Las cepas de Rhizobium fueron cultivadas con agitación a 28°-30°C en medio rico (YEM) (165) que contiene K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g/l; MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l; NaCl, 0,1 g/l; extracto de levadura, 1 g/l y manitol 10 g/l. E.coli K12 fue cultivado en medio LB (114) que contiene bactotripton, 10 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; NaCl, 10 g/l y al que se le agrega glucosa 10 g/l.

### 2.1.4. Obtención de las bacterias para los ensayos de aglutinación:

Se cosecharon las bacterias al final de la fase logarítmica (0,4-0,7 de DO, 1 cm de espesor, medida a 660 nm en espectrofotómetro Beckman D.U.) y se centrifugaron a 10.000 rpm por 5' a 5°C. Se lavaron 1 vez con buffer fosfato salino (PBS) que contiene 10 mM de fosfato de potasio pH 7,0 y 140 mM de NaCl y 2 veces con buffer acetato de sodio 100 mM, pH 4,0 (buffer A). Finalmente se resuspendieron en este último buffer a una DO de 2, a menos que se indiquen otras condiciones.

#### 2.1.5. Preparación de las aglutininas:

Las aglutininas de las semillas de alfalfa y lotus se obtuvieron siguiendo el esquema de Paaú y colab. (127) con ligeras modificaciones. Se molieron las semillas con molinillo eléctrico y se pasaron por un tamiz de 20 mesh. Luego se delipidizaron por extracción con el doble de su volumen de hexano a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Luego se filtró por Buchner con papel Whatman N° 1 y se secaron en desecador al vacío. Luego se hizo una extracción a  $0^{\circ}\text{C}$  con PBS que además contenía 1mM de  $\text{MgSO}_4$  y 8,8 g/l de Ac. Ascórbico y que fue llevado a pH 7,2 (15 ml de buffer/g de polvo de semilla). Se filtró por lienzo y el percolado se centrifugó 60' a 15.000 rpm descartándose el sedimento. El sobrenadante se llevó a pH 4,0 con Ac. acético glacial. Se centrifugó a 10.000 rpm 10' y el precipitado se descartó. El sobrenadante se llevó a 60% de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm 10' y el precipitado se disolvió en buffer A y se pasó por un Biogel P-6 para desalificar. Luego se concentraron las fracciones con capacidad aglutinante de bacterias R.meliloti por ultrafiltración por una membrana de Amicon PM-10 y el retentado se sembró en una columna de Biogel P-30 equilibrada con el mismo buffer A. Las fracciones activas se juntaron y concentraron nuevamente por ultrafiltración. La mayoría de los ensayos se hicieron con esta fracción.

Para una mayor purificación de la aglutinina de alfalfa, esta se pasó por una columna de Biogel A 1,5 m equilibrada con el buffer A. Este mismo buffer se utilizó para el sembrado y elución de las proteínas, luego se utilizó un segundo buffer de elución (fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0) para sacar parte de las proteínas que quedaron pegadas. Las fracciones que contenían actividad aglutinante nuevamente se concentraron por ultrafiltración por la membrana de Amicon PM-10.

#### 2.1.6. Ensayo de aglutinación:

Se prepararon diluciones seriadas de 1:2 de la aglutinina en tubos de 10x75 usando como diluyente el buffer A. Se agregó a cada tubo igual volumen (50 ul) de la suspensión bacteriana. Los tubos se dejaron a T.amb. por 2-5' y luego se examinó la aparición de grumos.

Los controles consistieron en la suspensión bacteriana mezclada con igual volumen del buffer en lugar de la aglutinina. En ocasiones, como por ejemplo para seguir la purificación de las aglutininas, en lugar de utilizar suspensiones frescas de bacterias se utilizaron "bacterias secas"(ver mas adelante).

El título de la aglutinina con respecto a una determinada bacteria consistió en la inversa de la máxima dilución de la misma que presentaba aglutinación con la suspensión bacteriana, preparada como se indicó anteriormente, a DO 2.

#### 2.1.7. Obtención del lipopolisacárido:

Se cosecharon las bacterias en fase estacionaria centrifugando (entre 5-10°C) a 10.000 rpm 5'. Luego se lavaron 2 veces con NaCl 0,5 M frío y 2 veces con acetona y luego se secaron al aire ("bacterias secas"). El LPS fue aislado usando el método del fenol-H<sub>2</sub>O (30, 169). La fase acuosa fue dializada contra H<sub>2</sub>O destilada, concentrado en rotavapor y dializado durante toda la noche con buffer Tris-HCl 50 mM a pH 7,0 que contiene 10 mM de MgSO<sub>4</sub>. Se le agregó a la solución una pizca de RNAsa y DNAsa y se mantuvo a 4°C durante toda la noche con agitación. La preparación luego se liofilizó, se resuspendió en buffer Imidazol 20 mM pH 7,0 que contenía 100 mM de NaCl y se centrifugó a 100.000 x g por 3 hs. El pellet se redisolvió en el mismo buffer y se sembró en una columna de Biogel A 1,5 m equilibrada con esta solución salina. Las fracciones conteniendo LPS, medida por el método del KDO (168) fueron juntadas y nuevamente liofilizadas. Para disminuir la presencia de otros polisacáridos, la preparación se redisolvió en H<sub>2</sub>O y se dializó contra el buffer Trietilendiamina -EDTA 10 mM, a pH 7,0 (30) y se pasó nuevamente por una columna de Biogel A 1,5 m equilibrada con el mismo buffer. Las fracciones positivas por el método del KDO se juntaron y se liofilizaron.

#### 2.1.8. Obtención del exopolisacárido:

Se centrifugaron cultivos de bacterias en fase estacionaria y del sobrenadante se precipitó el EPS agregando 3 volúmenes de isopropanol. El precipitado se redisolvió en H<sub>2</sub>O y

se volvió a reprecipitar como se indicó arriba. Luego de centrifugar se lavó el precipitado con acetona y se dejó secar al aire.

#### 2.1.9. Inhibición de la aglutinación:

Se preincubaron por 30' a T.amb. las distintas diluciones de aglutinina con distintas diluciones del inhibidor (LPS, EPS, azúcares, urea, sales). Luego se mezclaron con igual volúmenes de la suspensión bacteriana y se examinó la presencia de aglutinación .

#### 2.1.10. Electroforesis:

##### 1) SDS-PAGE

##### 2) Isoelectroenfoque

1) Se hicieron 2 tipos de electroforesis. Una en un gel de 10% (p/v) de poliacrilamida con 0,1% (p/v) de SDS y 3 M de urea, usando como buffer de corrida 0,1 M de Tris-Bicina pH 8,3 con 0,1% (p/v) de SDS. Se corrió por 4 hs. a 30 mA.

También se hicieron corridas en un gel de 18% (p/v) de poliacrilamida con 0,1% (p/v) de SDS y 3 M de Urea, usando como buffer de corrida 0,75 M de Tris-HCl pH 8,8 con 0,1% (p/v) de SDS. La corrida se hizo en este caso por 18 hs. a 9 mA. Se detectaron las proteínas por tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250.

En ambos casos las muestras a correr se calentaron previamente a 100°C 5', en un buffer que contenía 10 mM del buffer de corrida, 5% de glicerol, 2% de SDS, 1% de MSH y 0,04% de azul de bromofenol (buffer de sembrado). Después de centrifugar se sembraron los sobrenadantes.

2) Se sometieron las aglutininas de alfalfa y de lotus a isoelectroenfoque en Sephadex G-200 superfino. El rango de pH de los anfolitos fue de 3-10.

#### 2.1.11. Efecto de proteasas:

Se ensayó el efecto de subtilisina y de tripsina. Se incubaron 200  $\mu$ l de la aglutinina de alfalfa o de lotus con 20  $\mu$ l de una solución de proteasa de 10 mg/ml, a pH 7,0, 60' a 37°C. Los controles llevaron H<sub>2</sub>O destilada en lugar de enzima. Otro control que se hizo es el de la enzima sola en buffer sometida a los mismos tratamientos que las demás mezclas. Luego se calentó a 80°C 10' (la aglutinina resiste este tratamiento). Después se centrifugó y se descartó el precipitado. Se llevó el sobrenadante a pH 4,0, se agregó igual volumen de una suspensión de R.meliloti 102F51 HA a DO 2 (660 nm) y se examinó la existencia de aglutinación.

#### 2.1.12. Métodos:

Se determinaron proteínas por el método de Lowry (107). Se midió KDO de acuerdo a (168), hidrolizando previamente el LPS con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 100°C por 10'(100  $\mu$ l de muestra, 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N y 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O). Se midió glucosa por el método del Fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (24).

## 2.2. Resultados y discusión

### 2.2.1. Caracterización de las aglutininas

#### 2.2.1.1. Especificidad:

La intención fue estudiar la interacción Rhizobium-leguminosas para lo cual una de las teorías indicaba que la especificidad estaba dada por una interacción lectina-polisacárido. Como no había experiencia previa en el laboratorio con respecto a este tema se decidió utilizar un sistema ya conocido para aprender las técnicas que se usaban en este caso y para usarlo como un control y así compararlo con otro sistema que se quisiera abordar.

Por lo tanto se decidió utilizar como sistema el de alfalfa, ya que en el laboratorio se contaba con semillas de ésta. Recientemente se había encontrado en esta leguminosa una proteína que aglutinaba únicamente con cepas de R.meliloti (127). Además, mediante un antisuero preparado contra la aglutinina purificada, estos autores demostraron su presencia en distintas variedades de alfalfa y no en otras leguminosas. Por estas razones se le atribuyó el papel determinante de la especificidad de la interacción (127).

Al mismo tiempo que se purificó la aglutinina de semilla de alfalfa se decidió aplicar el mismo procedimiento a semillas de lotus con las que también se contaba para usarlas como control negativo. La purificación se siguió midiendo aglutinación con bacterias R.meliloti B-310 secas (ver 2.1.7.). Se había observado por ensayos preliminares 1ª) que las bacterias R.meliloti B-310 aglutinaban con la aglutinina de alfalfa con un título razonable y 2ª) que la aglutinina de alfalfa presentaba con "bacterias secas", resuspendidas en el buffer A en el momento del ensayo, el mismo título de aglutinación que el que tenía con las bacterias frescas (cosechadas en el mismo día).

Después de aplicar un sistema de purificación similar al utilizado por Paau y colab. (127) en semillas de alfalfa y de lotus se observó con sorpresa que ambas eran capaces de aglutinar R.meliloti

Tanto para estudiar la especificidad de la aglutinina de alfalfa así como para compararla mas detalladamente con la aglutinina de lotus se decidió estudiar los títulos de aglutinación que presentaban cada una con las distintas bacterias (Tabla 2).

En primer término cabe mencionar que efectivamente con la aglutinina de alfalfa se obtuvo un alto título con 102F51 HA y un bajo título con 102F51 LA tal como lo describió Handelsman (72) pero sorpresivamente con otro R.meliloti, el B-310, con R.lotus LL-22 y con E.coli K12 se obtuvo un título de aglutinación intermedio entre esas 2.

El hecho que con este método semicuantitativo se observara solo una diferencia del doble entre el título obtenido para R.meliloti 102F51 HA y el obtenido para las demás bacterias puso en duda que la interacción fuese específica. Pero lo que descartó aún con más fuerza la importancia de esta aglutinina en la determinación de la especificidad R.meliloti-alfalfa fue que de semillas de otra leguminosa (no nodulada por R.meliloti) se obtuviera por el mismo método una fracción con similares propiedades de aglutinación a la extraída de alfalfa.

Desde luego no se puede descartar que las bacterias puedan adherirse a las raíces de cualquier leguminosa a través de esta aglutinina y que lo que determine la especificidad del proceso de nodulación sea otra etapa. Esto fue en parte la justificación del porque se siguiera experimentando en este tema y se intentara conocer la naturaleza química de la interacción observada.

#### 2.2.1.2. Características generales de la aglutinación:

Hay algunas particularidades de la aglutinación sobre las que se desea llamar la atención:

- a) La aglutinación solo ocurre a pH 4,0 (y no a pH 7,0).

Cepa	Aglut. de alfalfa		Aglut. de lotus	
	Título	Razón (α)	Título	Razón (α)
<u>R.meliloti</u> 102F51 HA	128	8	128	8
102F51 LA	16	1	16	1
B-310	64	4	64	4
<u>R.japonicum</u> 110	0		0	
<u>R.lotus</u> LL22	64	4	64	4
<u>E.coli</u> K12	64	4	64	4

Tabla 2: Títulos de aglutinación dados por las aglutininas provenientes de semillas de alfalfa y lotus con diferentes bacterias.

Se mezclaron 50  $\mu$ l de diluciones seriadas (1:2) de la aglutinina con 50  $\mu$ l de la suspensión bacteriana a DO 2 y al cabo de 2' a T.amb. se examinó la presencia de aglutinación.

a) Razón: indica la relación entre los distintos títulos dados por una misma aglutinina tomando el que presenta con R.meliloti 102F51 LA como la unidad.

La concentración inicial de aglutinina de alfalfa fue de 5 mg de proteína /ml y la de aglutinina de lotus de 3 mg de proteína /ml.

b) El tiempo de incubación entre bacterias y aglutininas era de 2'-5'; por mas que se dejara mas tiempo los resultados no variaban.

c) Cada especie o cepa de bacteria diferente presentaba un determinado título de aglutinación.

d) Con algunas bacterias (R.meliloti HA y B-310, E.coli) se observó un fenómeno de inhibición de la aglutinación por exceso de aglutinina (Figura 4). En cambio este fenómeno no se pudo detectar con la variante LA. Esto sugiere que hay un punto de equivalencia (como en las reacciones Ag-Ac) en el que ambos componentes están en la concentración óptima para dar aglutinación. Por debajo de este valor la concentración de aglutinina no sería suficiente como para producir la suficiente cantidad de puentes entre las bacterias para ver macroscópicamente el fenómeno de aglutinación. Por encima de esta concentración hay tanta aglutinina que no quedarían sitios libres sobre las bacterias como para que una misma molécula de aglutinina sea compartida por 2 bacterias y por lo tanto no se forman puentes (Fig. 5)

#### 2.2.1.3. Variación del título de aglutinación con el tiempo de cultivo:

Por analogía con lo que ocurre en otros sistemas lectinas de leguminosa-Rhizobium (70), se pensó que estas aglutininas deberían unirse a carbohidratos presentes en la superficie de las bacterias. También se describió (50, 148) la naturaleza transitoria de los azúcares, reactivos a la lectina, en la cápsula bacteriana. Es por esto que se estudió como variaba la superficie de las bacterias respecto a la unión con la aglutinina del sistema aquí descrito, utilizando como variable la edad del cultivo.

En la Figura 6 se observa que el título de aglutinación no cambió en función de la edad del cultivo ni para R.meliloti 102F51 HA ni para R.meliloti B-310. En cambio para R.meliloti 102F51 LA se observa que en las primeras etapas del crecimiento (principio de la fase logarítmica) los títulos son mayores que los que tiene al final de la fase logarítmica. Esto sugiere que esta bacteria sufre un cambio en su superficie con el transcurso de la edad de

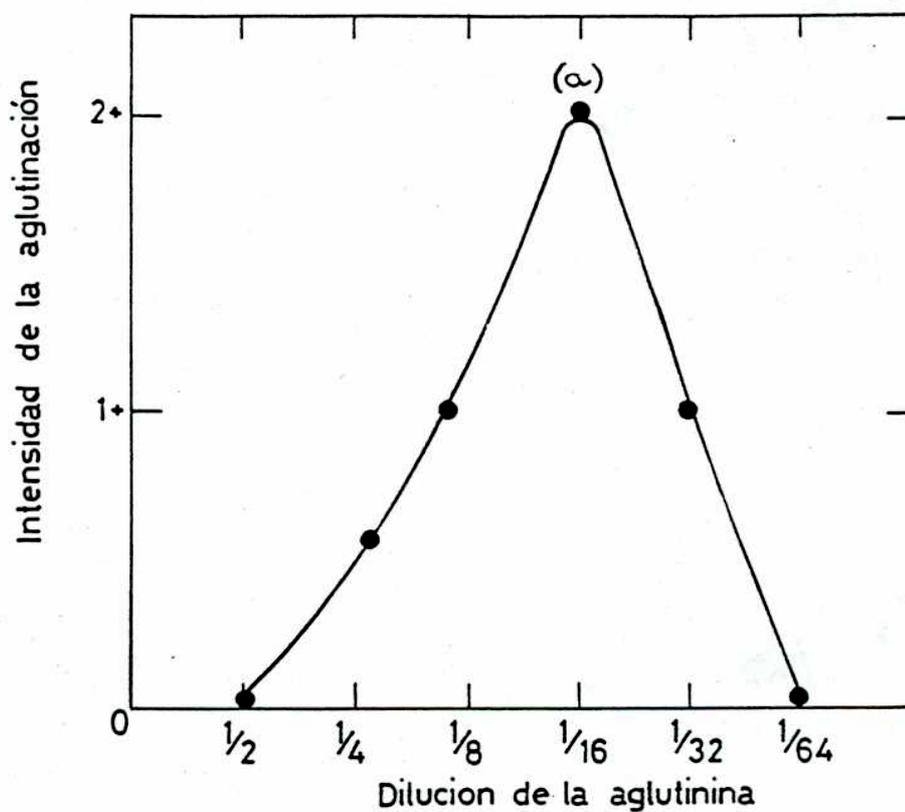


Figura 4: Efecto de inhibición por exceso de aglutinina.

Se utilizó el mismo ensayo descrito en Tabla 2.

En este caso se utilizó aglutinina de alfalfa y su concentración inicial fue 1,25 mg de proteína/ml.

(a) punto de equivalencia.

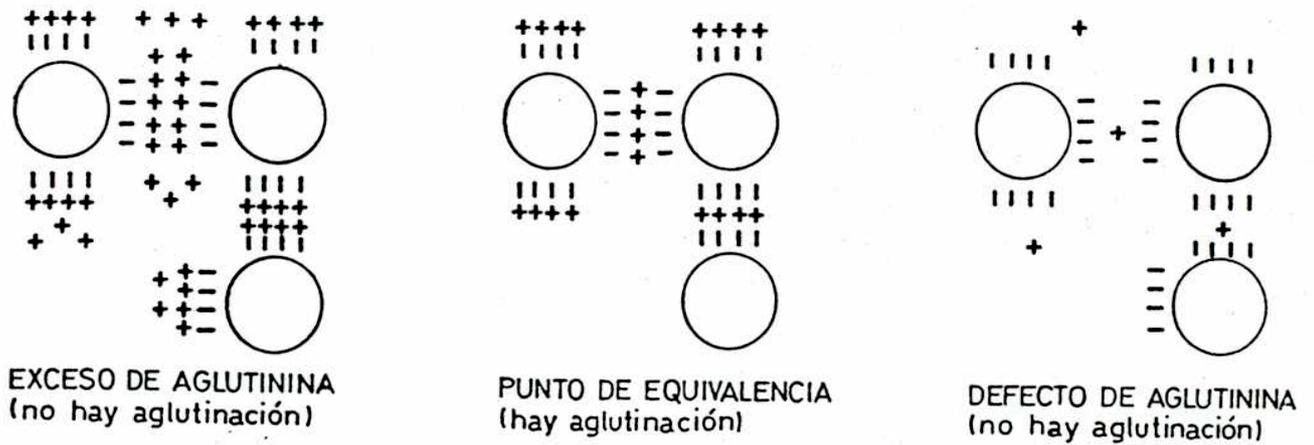


Figura 5: Esquematización de las distintas relaciones que pueden existir entre las cantidades de aglutinina y bacterias.

)≡: Sitios sobre las bacterias donde puede unirse la aglutinina.  
 +: Aglutinina.

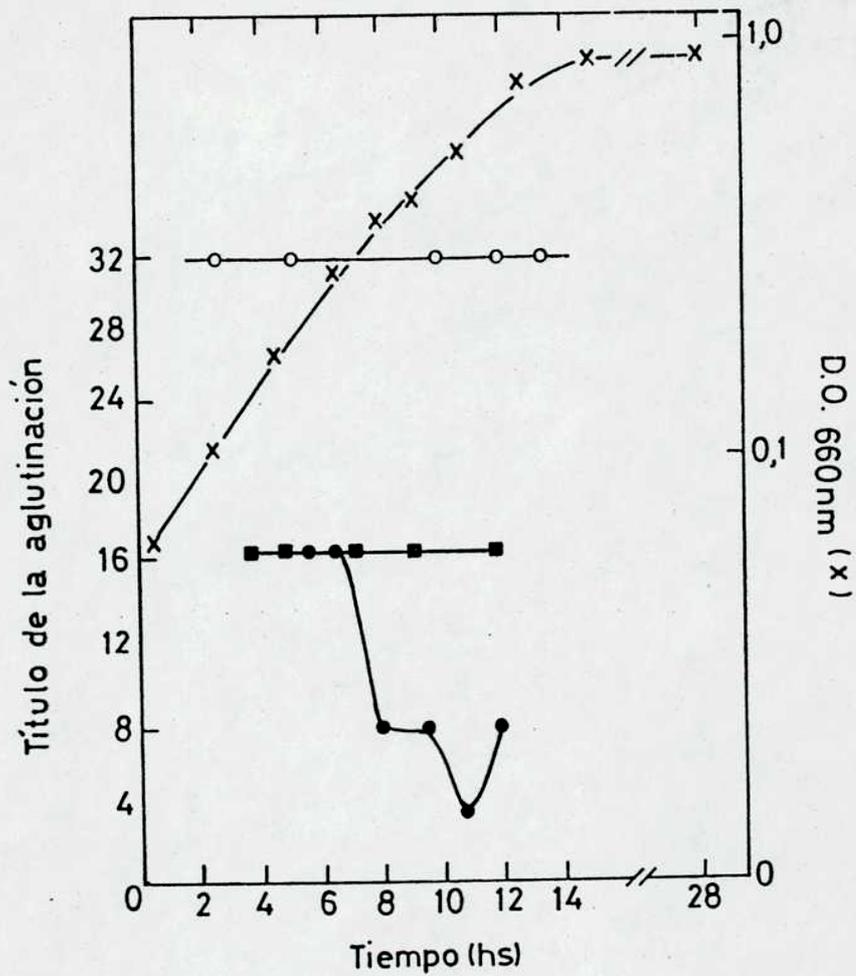


Figura 6: Variación del título de aglutinación con la edad del cultivo.

Se utiliza el mismo ensayo descrito en Tabla 2 en distintos puntos de la curva de crecimiento.

La concentración inicial de aglutinina de alfalfa es de 1,25 mg de proteína / ml.

La misma curva de crecimiento se obtiene tanto para R.meliloti 102F51 HA, como LA y R.meliloti B-310.

(o--o): Título de aglutinación para R.meliloti 102F51 HA.

(●--●): Título de aglutinación para R.meliloti 102F51 LA.

(■--■): Título de aglutinación para R.meliloti B-310.

cultivo. Se sabe que la diferencia entre las variantes LA de HA es debida a la capacidad de la primera de formar un polisacárido del tipo del ácido teicurónico y que estaría en su superficie (160, 161). No se estudió su aparición con el tiempo de cultivo.

#### 2.2.1.4. Comparación de las aglutininas de alfalfa y lotus por electroforesis:

Al someter ambas fracciones a una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se observan los resultados de la Figura 7.

En la preparación de semilla de alfalfa el mayor componente (50-60%) fue una proteína con una movilidad correspondiente a 14.3 kD como la descrita por Paau y colab. (127). También aparecen otras 2-3 bandas menores cuya movilidad oscila entre los 20-23 kD (Fig.7 carril 1).

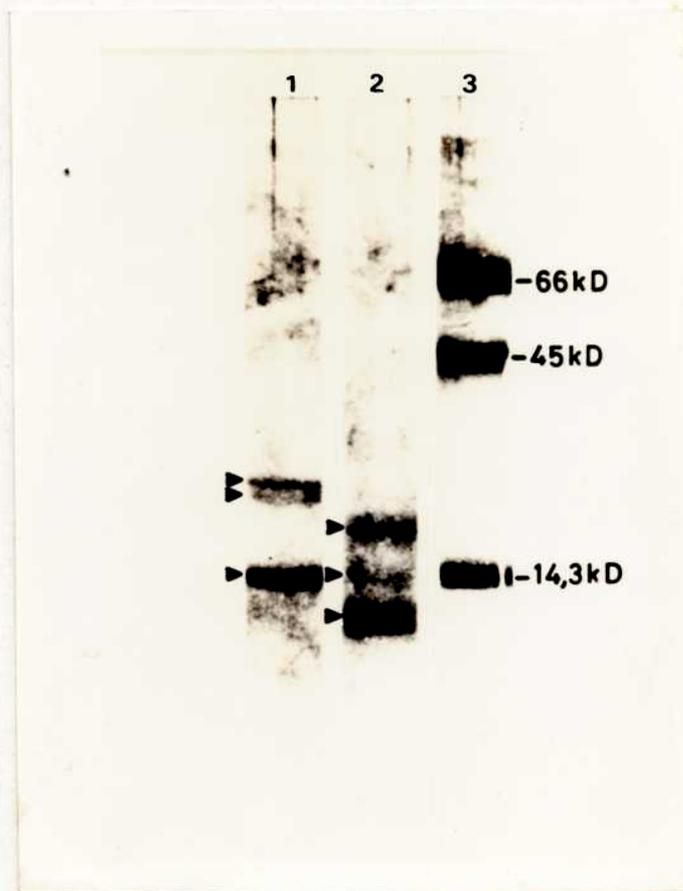
En la preparación obtenida de semilla de lotus la banda principal (70-80%) exhibió una movilidad correspondiente a una proteína de 12 kD y también aparecieron otras 2 bandas con una movilidad correspondiente a proteínas con PM que oscila entre los 14-18 kD (Fig.7 carril 2).

Se presupuso que, en el caso de alfalfa, la proteína de aproximadamente 14 kD, que estaba en mayor proporción y que coincidía con la postulada por Paau y colab. (127) era la aglutinina.

#### 2.2.1.5. Efecto de proteasas:

Paau y colab. (127) habían propuesto que la actividad de aglutinación correspondía a un proteína. Para corroborar esto tratamos las preparaciones con subtilisina o con tripsina.

Se observó una disminución total de la capacidad de aglutinación al tratar con subtilisina y una disminución a la mitad al tratar con tripsina (este efecto incrementaba en función del tiempo de incubación) comparándolo con el control que llevaba aglutinina pero no enzima. Otro tubo control que llevaba enzima pero no aglutinina no presentó aglutinación. Quedó así corroborado que las aglutininas eran proteínas (datos no mostrados).



**Figura 7: Electroforesis en PAGE-SDS de las aglutininas obtenidas de semillas de alfalfa y de lotus.**

Se someten 100 ug de las distintas preparaciones, obtenidas según se indicó en Mat. y Mét.(2.1.5.) a una PAGE-SDS al 10% (2.1.10.).

Carril 1: aglutinina de alfalfa; carril 2: aglutinina de lotus; carril 3: marcadores de PM (lisoizima: 14,3 kD; ovoalbúmina: 45 kD y albúmina bovina: 66 kD).

Las flechas indican las distintas bandas de proteínas.

Al analizar los productos del tratamiento con tripsina en una PAGE-SDS se observan los resultados de la Figura 8.

En el lotus desaparecen las bandas de mayor PM y disminuye también la de 12 kD. En la preparación proveniente de alfalfa desaparecen también las de mayor PM y disminuye muy poco la de 14 kD. Al ver estos resultados, pareció dudoso que tan poca disminución en la de 14 kD fuese responsable que el título de aglutinación decayese a la mitad. A la luz de los experimentos que siguen tal vez se justifique esta discrepancia.

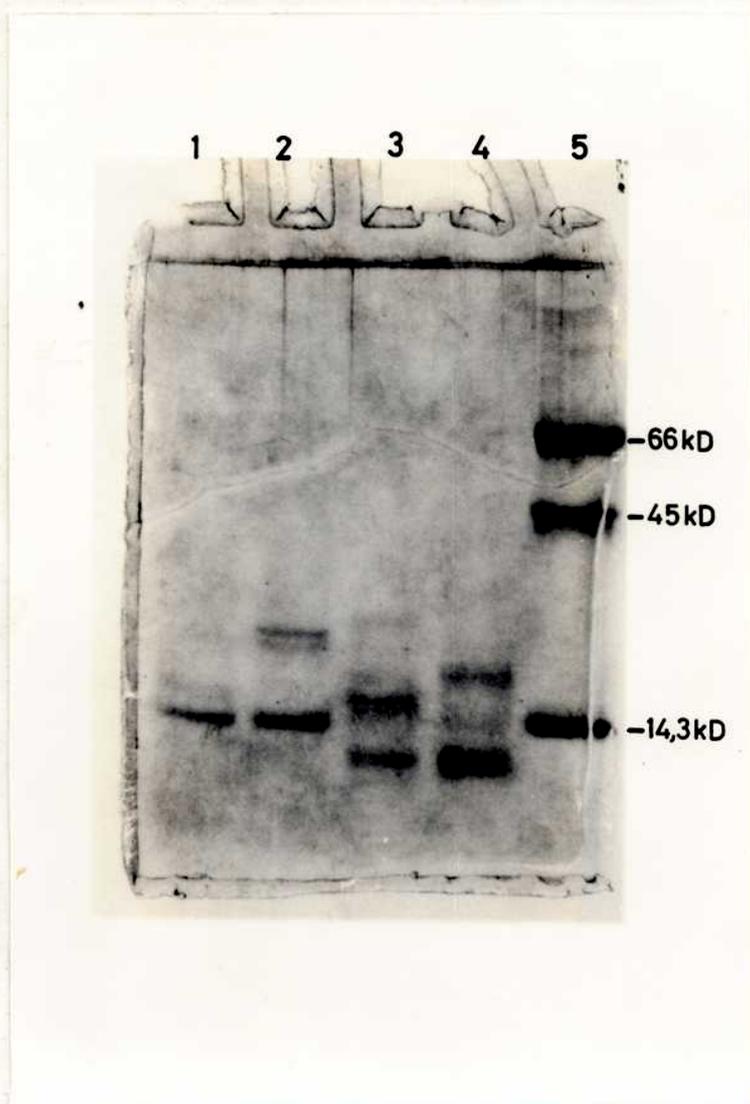
#### 2.2.1.6. Mayor purificación de la aglutinina de alfalfa:

Como la aglutinina de alfalfa estaba contaminada con otras proteínas se trató de purificarla un poco más. Esto se hizo sembrando la preparación parcialmente purificada en una columna de Biogel A 1,5 m (12x15 cm) y eluyendo con el buffer A que es el mismo buffer con el que la columna estaba equilibrada. Todas las proteínas se incluyeron. Un pico de actividad aglutinante salió en el volumen esperado de acuerdo al PM, pero este representaba solo parte de la aglutinina sembrada (50%) ya que en cantidad de unidades totales (título x volumen) era menos de lo sembrado, el resto había quedado retenido por la columna. Cuando se cambió el buffer de elución por fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,0 otro pico de actividad aglutinante fue recuperado (25%) (Fig. 9). Esto estaría indicando cierto tipo de interacción entre estas proteínas y el gel de agarosa.

Cuando se sometieron las distintas fracciones así obtenidas a una PAGE-SDS se observó que la proteína eluída con el buffer A era la de 14 kD mientras que las de mayor PM eluyeron con el segundo buffer usado (Fig. 10 carriles 1 y 2 respectivamente).

De esta manera descubrimos que la proteína de 14 kD no era la única responsable de la aglutinación sino que también tenían esta capacidad las proteínas de mayor PM que supuestamente la estaban contaminando. Esto explicaría porque a pesar de que no se ve una pronunciada disminución de la proteína de 14 kD (Fig. 8) al tratarla con tripsina, baja el título a la mitad y es seguramente debido a que las restantes proteínas desaparecieron.

---



**Figura 8: PAGE-SDS de las aglutininas de alfalfa y de lotus después del tratamiento con tripsina.**

El ensayo ya fue descrito en Mat. y Mét.(2.1.11.).

La condiciones de la electroforesis son las mismas que las utilizadas en la Figura 7. Carril 2: aglutinina de alfalfa; carril 1: aglutinina de alfalfa + tripsina; carril 4: aglutinina de lotus; carril 3: aglutinina de lotus + tripsina; carril 5: marcadores de PM.

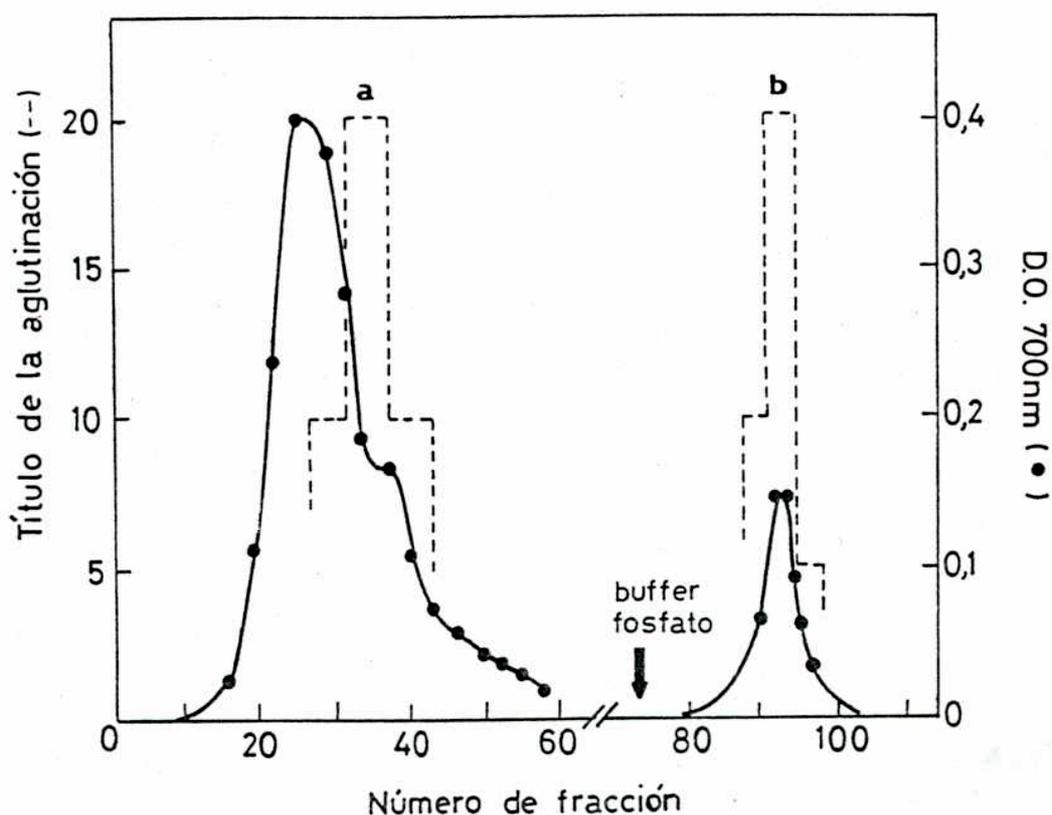


Figura 9: Elución de la aglutinina de alfalfa por una columna de Biogel A 1,5 m.

Se pasó la aglutinina de alfalfa parcialmente purificada por una columna de Biogel A 1,5 m cuyo volumen muerto fue de 8,5 ml y el volumen de exclusión de 4 ml. Primero se eluyó con buffer A con el cual estaba equilibrada la columna apareciendo un pico con capacidad aglutinante a los 19 ml después del volumen de exclusión (pico a).

Una vez que dejaron de salir proteínas, se empezó a pasar buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 apareciendo otro pico con capacidad aglutinante ni bien el pH del buffer que salía de la columna fue 7,0 (pico b).

La capacidad aglutinante se midió según lo descrito en Mat. y Mét. con *R. meliloti* 102F51 HA.

Proteínas se midieron según Lowry y colab. (107) a 700 nm. Se recogieron fracciones de 0,5 ml cada una.

En la Tabla 3 se observan los títulos de aglutinación con las distintas bacterias de las fracciones obtenidas al eluir con pH 4,0 y con pH 7,0. Ambas se comportan de manera similar a la fracción original. Mayor título y semejante entre sí para R.meliloti B-310, R.lotus LL-22 y E.coli K12 que para R.meliloti 102F51 LA.

En otro experimento se observa que ambas presentan actividad específica semejante con respecto a R.meliloti 102F51 HA (24 U/mg para la fracción obtenida el eluir con pH 4,0 y 30 U/mg para para la obtenida con pH 7,0). La actividad específica la definimos como la razón entre el título de una determinada fracción y la concentración proteica (mg/ml) de la misma.

Cepa	Pico pH 4,0		Pico pH 7,0	
	Título	Ae	Título	Ae
<u>R.meliloti</u> B-310	16	5	32	8
<u>R.lotus</u> LL22	16	5	32	8
<u>E.coli</u> K12	16	5	32	8
<u>R.meliloti</u> 102F51 LA	8	3	16	4

Tabla 3: Títulos de aglutinación y actividad específica de los picos eluidos de la columna de Biogel A 1,5 m.

La fracción correspondiente al pico eluido a pH 4 tenía 3 mg de proteína/ml. La eluida a pH 7 tenía 4 mg de proteína/ml.

## 2.2.2. Estudio de la naturaleza química de la interacción a pH 4,0:

### 2.2.2.1. Estudio de la aglutinación de las bacterias con otras proteínas:

Ante la sorpresa que la proteína de 14 kD no era la única capaz de aglutinar las bacterias a pH 4,0 se pensó si no sería éste un fenómeno más general. Se quiso ver entonces como se comportaban las bacterias ante otras proteínas no vegetales.

Se determinó que tanto albúmina bovina como lisozima de huevo fueron capaces de aglutinar con R.meliloti a pH 4,0 en cambio pepsina bovina no mostró tal actividad.

Para el caso de la aglutinina de alfalfa se había observado que ésta aglutinaba a pH 4,0 pero no lo hacía a pH 7,0.

Se hizo un estudio más detallado para ver que pasaba con la aglutinación dada por la aglutinina de alfalfa y por las otras proteínas al variar el pH de la reacción y las concentraciones de las mismas.

En la Tabla 4 se indica la concentración mínima de proteína con la cual se ve aglutinación a un determinado pH. Con la aglutinina de alfalfa se observa que a medida que se aumenta el pH se puede seguir obteniendo aglutinación pero para esto hay que aumentar la concentración de la proteína en el ensayo. Esto ocurre hasta llegar a pH 5,7. Por encima del mismo por mas que se aumente la concentración no se observó aglutinación.

Un fenómeno parecido ocurrió con la albúmina bovina, salvo que el pH máximo al que se observó aglutinación fue de 4,0.

La lisozima aglutinó aún a pH 7,0 (máximo pH ensayado), en cambio la pepsina bovina no aglutinó ni siquiera a pH 4,0.

Tanto la albúmina bovina como la lisozima fueron capaces de diferenciar, así como lo hace la aglutinina de alfalfa entre R.meliloti 102F51 HA y R.meliloti 102F51 LA (datos no mostrados).

Una explicación plausible para estos hechos surge al comparar los distintos pI de las proteínas estudiadas, y es la siguiente: la albúmina, la lisozima y presumiblemente la aglutinina

Proteína μg/ml	pI	pH del ensayo	Aglutinación
Albúmina bovina	4,71 (106)		
9		4,0	+
9 a 300		4,3-7,0	-
Aglutinina de alfalfa			
30		4,0	+
60		4,3	+
160		4,6	+
260		5,2	+
300		5,7	+
300 a 2000		6,5	-
Pepsina bovina	1,7 (128)		
30 a 2500		4,0	-
Lisozima de huevo	10,5-11,0 (3)		
30		4,0	+
"		4,3	+
"		4,6	+
"		5,2	+
80		5,7	+
130		6,5	+
230		7,0	+

Tabla 4: Relación entre el pI de las proteínas, el pH en el ensayo y la mínima concentración de las mismas para obtener aglutinación.

Se utilizaron como bacterias R.meliloti 102F51 HA.

de alfalfa (no pudimos determinar su pI, ver más adelante ) tienen a pH 4,0 caracter catiónico por estar a un pH debajo de su pI. Por otro lado la bacteria tendría propiedades aniónicas debido a la disociación de moléculas cargadas presentes sobre su superficie tales como lipopolisacáridos y peptidoglicanos. Lo que ocurriría sería una interacción electrostática que lleva a una aglutinación ya sea porque: a) se forma una red con las proteínas actuando como puentes entre las bacterias, ó b) las bacterias normalmente se repelen por las cargas de su superficie y en presencia de las proteínas que neutralizan estas cargas se produce la aglutinación.

Esta propiedad explicaría porque parte de la proteína queda retenida en la columna de Biogel A 1,5 m al eluir a pH 4,0. A este pH pequeñas cantidades de grupos sulfato o carboxilato presentes en el gel (139) podrían interactuar electrostáticamente con la proteína y esta interacción podría dejar de ocurrir a pH 7,0 debido a cambios en las cargas de la proteína.

Se debe también mencionar en apoyo a esta hipótesis que poli-L-lisina, que es un compuesto policationico, fue también capaz de aglutinar la bacterias a pH 4,0.

Al hacer un isoelectroenfoco tanto para la aglutinina de alfalfa como para la de lotus se vió que las fracciones que contenían anfólitos con pH de aproximadamente 5,5 para arriba, presentaban aglutinación con las bacterias. Al dializar cada fracción dejaron de dar aglutinación. Luego se confirmó que la solución de anfólitos por sí sola a pH 4,0 aglutinaba las bacterias. Por otro lado Oliva y Daleo (123) informaron que extrajeron de semillas de alfalfa una proteína con similares características a la descrita por Paau y colab. (127) y que tenía un pI de 8,5. No es claro cual es el motivo de esta discrepancia.

### 2.2.2.2. Estudio de la inhibición de la aglutinación:

#### 2.2.2.2.1. Inhibición con compuestos poliméricos:

En vista de que los candidatos portadores de carga negativa por parte de las bacterias eran los polisacáridos se decidió ensayar la capacidad de los mismos para inhibir la aglutinación.

Se ensayó el efecto inhibidor de EPS y de LPS de R.meliloti (Tabla 5) observándose que ambos inhibían en la misma proporción; por debajo de las concentraciones que figuran en la tabla no se observó inhibición. Por otro lado también DNA fue capaz de inhibir la aglutinación. Una cosa que tendrían en común estas moléculas es la de ser compuestos polianiónicos y su viscosidad. Para descartar que el efecto inhibitorio se deba a este último hecho, se ensayó como posible inhibidor PVP al 3% final y PEG al 5% final no observándose inhibición con ninguno de los dos. Ello descartaría a la viscosidad como efecto inhibitorio .

Al calentar el EPS a 100° C, pH 2 deja de tener capacidad inhibitoria aún a concentraciones 5 veces mayores que el EPS sin calentar. Está descrito (154) que bajo aquellas condiciones los grupos piruvilos unidos al EPS son parcialmente hidrolizados. Esto estaría apoyando la idea de que son importantes las cargas negativas del polisacárido para la interacción.

Se ensayó si el LPS tenía efecto inhibidor sobre la reacción de aglutinación entre bacterias y albúmina observándose efectivamente el mismo fenómeno que para alfalfa (datos no mostrados). Por lo tanto se confirmaría con esto que la interacción de ambas proteínas con las bacterias es de la misma naturaleza.

#### 2.2.2.2.2. Inhibición con sales:

En la Tabla 6 se observa la concentración mínima para inhibición dada por distintas sales. Las divalentes ( $MgCl_2$ ) inhiben a menores concentraciones que las monovalentes.

Compuesto	Concentración final	Aglutinación
Ninguno	-	+
LPS <u>R.meliloti</u> 102F51 HA	0,38 $\mu\text{mol/ml}$ glucosa	
EPS <u>R.meliloti</u> R41	0,34 $\mu\text{mol/ml}$ glucosa	
EPS <u>R.meliloti</u> R41 $\phi^a$	0,34 $\mu\text{mol/ml}$ glucosa	+
DNA de timo	50 $\mu\text{g/ml}$	
PEG 4000	50 $\mu\text{g/ml}$	+
PVP	30 $\mu\text{g/ml}$	+

Tabla 5: Inhibición con compuestos poliméricos

a) EPS  $\phi$ : se calentó el exopolisacárido a pH 2 a 100° C por 10'. Se mezclaron 50  $\mu\text{l}$  de la aglutinina con 20  $\mu\text{l}$  del compuesto inhibidor, después de incubar 30' a T.amb. se centrifugó y 50  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se mezclaron con igual volumen de la suspensión bacteriana (R.meliloti 102F51 HA). La concentración final de aglutinina fue de 140  $\mu\text{g}$  de proteína /ml.

R.meliloti R41 fue obtenido del Dr. G. Favelukes.

Bacterias Sales	<u>R.meliloti</u> 102F51 HA	<u>R.meliloti</u> B-310 secas
LiCl	n.d.	200mM
NaCl	250 mM	200 mM
KCl	n.d.	150 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200 mM	n.d.
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	n.d.

Tabla 6: Inhibición con sales

El ensayo es el mismo que el descrito en Tabla 5.  
La concentración final de aglutinina de alfalfa fue de 100 µg de proteína /ml.  
n.d.: no determinado

Por otro lado urea hasta 0,8 M no fue capaz de inhibir, lo cual descartaría que la unión se deba a interacciones hidrofóbicas o de tipo de puente hidrógeno.

#### 2.2.2.2.3. Inhibición con azúcares:

Se estudió la capacidad de distintos azúcares de inhibir la aglutinación de R.meliloti 102F51 HA. El ensayo se hizo tal como se describió en Tabla 5. Todos los azúcares que se mencionan a continuación se utilizaron a una concentración final de 20 mM pero ninguno fue capaz de inhibir: D-glucosa (incluso hasta 200 mM), D-galactosa, D-galactosamina, L-ramnosa, L-fucosa,  $\alpha$ -D-metil-glucósido, maltosa, lactosa, celobiosa, gentobiosa, trealosa, D-glucosa 6-P,  $\beta$ -D-glucosa 1-P, fenil  $\alpha$ - o  $\beta$ -D-galactosa (incluso hasta 200 mM), Ac. D-glucurónico, Ac. D-galacturónico y Ac. pirúvico. Cuando se incrementó la concentración del Ac. galacturónico a 100 mM si se observó inhibición.

Todos los datos de inhibición tomados en conjunto apoyan la hipótesis de que la aglutinación entre las bacterias y la aglutinina resulta de una interacción electrostática e inespecífica.

El hecho que tanto LPS como EPS sean capaces de inhibir indicaría que cualesquiera de estos compuestos podría ser la molécula que sobre la superficie de la bacteria, interaccionaría con la aglutinina.

#### 2.2.2.3. Porque R.meliloti LA da menor título de aglutinación que HA:

Como ya se mencionó, la variedad LA posee en su superficie un polisacárido de tipo teicurónico formado por galactosa y Ac. galacturónico (160). Este es un polisacárido cargado negativamente lo que implicaría, según la hipótesis de interacción electrostática, que debe interaccionar fuertemente con la proteína de alfalfa (o las otras). Sin embargo esta bacteria es la que menor título dió.

Por otro lado se vió que todas las bacterias ensayadas salvo LA presentaron el fenómeno de inhibición de la aglutinación por exceso de aglutinina.

Una explicación de aquella discordancia sería que LA posee el punto de equivalencia a concentraciones de aglutinina mayores que HA y que a las concentraciones en que nosotros trabajamos no lo pudimos detectar. La Figura 11 muestra cual sería la respuesta teórica a este fenómeno.

Los siguientes resultados apoyan esta idea:

1) Con una preparación de aglutinina concentrada varias veces por ultrafiltración, diluyéndola 50 veces daba aglutinación con R.meliloti 102F51 HA y no con LA. En cambio cuando se la diluía 2 veces daba aglutinación con LA y no con HA. O sea que en este último caso no aglutina con HA porque está en exceso respecto del número de receptores que esta bacteria tiene, entonces si LA tuviese menos receptores que HA también la aglutinina debería estar en exceso respecto a éstos y no dar aglutinación; en cambio se observa lo contrario.

2) Se incubó la aglutinina de alfalfa, a una determinada dilución, con R.meliloti LA o HA a distintas DO y luego de centrifugar, con el sobrenadante se ensayó aglutinación con HA. Se observó que cuando en la primer reacción se utilizaron las bacterias a DO de 8,4 o 2, el sobrenadante de ninguna de las 2 bacterias tenía capacidad de aglutinar con HA. En cambio cuando en la primer reacción se usaron bacterias a una DO de 1, mientras que el sobrenadante que provenía de una primer reacción con LA siguió sin aglutinar, el sobrenadante que provino de una primer reacción con HA sí aglutinó. Esto indicaría que HA tiene menos receptores que LA.

3) Se incubó aglutinina de alfalfa a una determinada concentración (mayor que en el caso anterior) con bacterias LA ó HA a DO 8 o 4 y luego en una segunda reacción se incubó el sobrenadante con bacterias LA. Solo se dejó de ver aglutinación con el sobrenadante proveniente de una primer reacción con bacterias LA a DO 8 o sea que estas captaron mas aglutinina que bacterias HA en igualdad de condiciones.

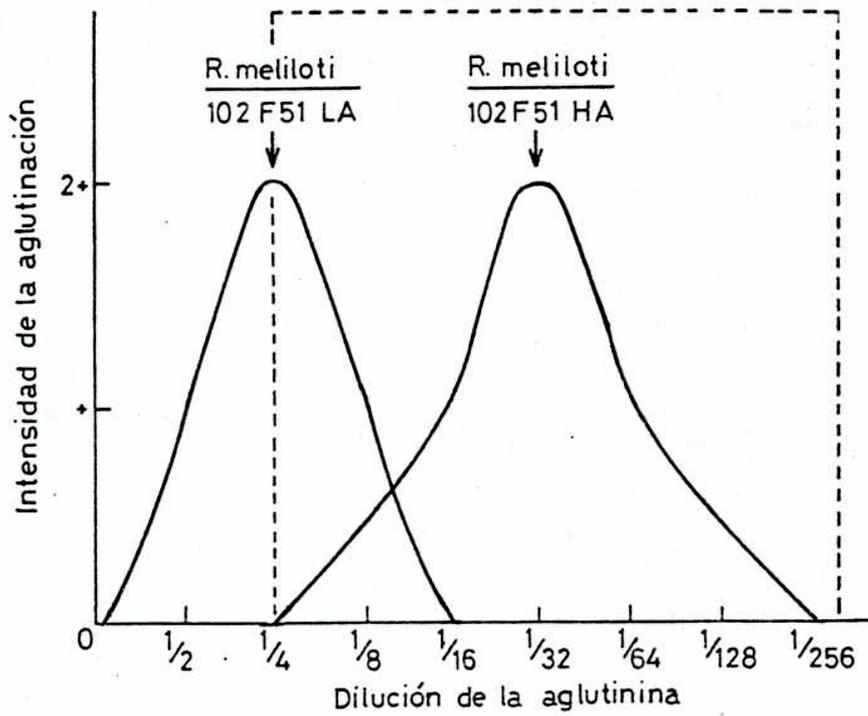


Figura 11: Posible explicación de la baja aglutinabilidad de *R. meliloti* 102F51 LA con respecto a la variante HA.

Se piensa que las concentraciones de aglutinina con las que se trabajó son las que se encuentran dentro del recuadro.

### 2.3. Discusión general y comentarios

Los resultados expuestos se pueden resumir de la siguiente manera:

a) Se confirmó la existencia en semillas de alfalfa de una proteína de aproximadamente 14 kD que tiene capacidad de aglutinar R.meliloti 102F51 HA a pH 4,0 con alto título y R.meliloti 102F51 LA con bajo título (72).

b) Se pudo aislar de semillas de lotus una fracción proteica que tiene las mismas propiedades en cuanto a capacidad de aglutinación que la aglutinina de alfalfa.

c) Ambas aglutininas además de aglutinar HA y LA como se indicó en a), aglutinan con un título intermedio otro R.meliloti, el B-310 así como R.lotus LL22 y E.coli K12.

La aglutinación es un ensayo semicuantitativo, depende de la práctica visual. Además lo que se determina es si hay o no aglutinación; es muy difícil determinar los distintos grados de intensidad de la aglutinación. Teniendo esto en cuenta no podemos discutir si una diferencia del doble en el título de aglutinación esté indicando una mayor especificidad para R.meliloti 102F51 que para las restantes bacterias.

d) Otras proteínas de origen animal presentaron la capacidad de aglutinar bacterias a pH 4,0 (albúmina bovina y lisozima de huevo).

e) El máximo pH al cual se puede obtener aglutinación con cualesquiera de las proteínas mencionadas depende de su pI. A medida que se incrementa el pH del ensayo, hay que incrementar la concentración de la proteína para poder ver aglutinación. Para algunas proteínas se encontró un pH máximo (siempre menor que su pI) por encima del cual por mas que se incremente la concentración no se ve aglutinación.

f) La aglutinación puede ser inhibida por cualquier compuesto que es o tiene potencialmente la capacidad de ser polianiónico como ser LPS, EPS o DNA. En el LPS los grupos negativos podrían ser los fosfatos o carboxilatos. En el EPS los sustituyentes piruvato, acetato etc.

También puede ser inhibida la aglutinación por distintas sales con concentraciones que van desde 50 a 200 mM. En cambio no se pudo inhibir con ninguno de los azúcares ensayados que formarían parte de los polisacáridos que se encuentran sobre la superficie de las bacterias: LPS, EPS, ácido teicurónico de LA. Con el único que se vió inhibición pero a una concentración muy alta (100 mM) fue con el Ac. galacturónico.

De todo se concluyó que la interacción hallada entre una proteína extraída de semillas de alfalfa (aglutinina) (127) y las bacterias R.meliloti, a pH 4,0 es en realidad un fenómeno electrostático e inespecífico. Ocurre entre cualquier proteína cuyo pI permite que a pH 4,0 esté cargada positivamente y cualquier bacteria que presenta en su superficie polímeros con capacidad de presentar cargas negativas.

Sequeira (146), que estudia los factores involucrados en el reconocimiento planta-patógeno, explican de una forma similar la adhesión de Pseudomonas solaracearum a células de tubérculo de papa. Ellos sugieren que la aglutinación de las bacterias dada por una proteína rica en hidroxiprolina ( $pI \geq 11$ ), hallada tanto en papa como en tabaco y tomate, se debe a una interacción iónica entre la misma y componentes cargados negativamente sobre la pared celular tales como el LPS o el EPS.

Este tipo de interacción electrostática también explica, por ejemplo, el incremento de la permeabilidad de Pseudomonas aeruginosa por un antibiótico catiónico (130). Los autores proponen que las cargas positivas del antibiótico policatiónico son atraídas por los grupos cargados negativamente del LPS y una vez que ocurre la unión se produce una ruptura de las uniones LPS-LPS y LPS-proteína que existen en la membrana, llevando esto como consecuencia a la permeabilización de la bacteria.

También en la SAIB de 1985 Morero y colab. (117) y Farías y colab.(60), comunicaron la fusión de liposomas cargados negativamente por lisozima e insulina y que esto era función del pH.

Paralelamente a este trabajo de tesis (99, 100), Handelsman notificaba (71) algunos

resultados semejantes a los descritos aquí. Por ejemplo extrajo de semillas de otras leguminosas (arveja, maíz) proteínas con capacidad de aglutinar Rhizobium. En cambio sus resultados en cuanto a inhibición de la aglutinación (no fue inhibida por NaCl 1 M y si por urea 0,2 M) no son coincidentes con los aquí expuestos.

Por la misma época apareció publicado un trabajo de Seegers y LaRue (145) en el que también demuestran la inespecificidad de esta interacción. Estos, además de trébol, soja, arveja y poroto encontraron una proteína con capacidad de aglutinar Rhizobium, aunque con menor título, en tomate.

Paau y Brill (127) habían comunicado que 2 mutantes no nodulantes WL 131 y WL 113 no aglutinaban con la aglutinina; esta fue una de las razones para atribuirle un papel en el reconocimiento. Sin embargo luego en (72) y (145) se demostró que podían aglutinar aunque a mayores concentraciones de aglutinina y que además la WL 131 en lugar de nodular alfalfa nodulaba trébol que poseía una aglutinina similar a la de alfalfa por lo que la mutación involucraba el reconocimiento de la planta y esto era independiente de la pérdida de habilidad de unir la aglutinina.

En este sistema aglutinina -bacteria, la interacción se ve en el tubo de ensayo como una aglutinación. In vivo, para que esta interacción ocurra, la proteína tendría que exponerse en la superficie de las raíces de la leguminosa. Paau y colab. (127) demostraron la presencia de la aglutinina sobre la superficie de la raíz utilizando un antisero anti-aglutinina. Además encontraron que la aparición de esta aglutinina sobre las raíces fue transitoria.

Otro factor a tener en cuenta es el pH del microambiente el cual debería ser el óptimo para que la proteína esté en forma policatiónica pero a la vez debería ser compatible con un buen crecimiento de la leguminosa (62) y con una efectiva nodulación (62, 59, 79, 153). Hay ejemplos en literatura muy variados también en cuanto a la influencia del pH sobre la sobrevivencia de Rhizobium (73, 22, 105, 70). En el caso de alfalfa se informó (138) que la nodulación se encontraba reducida a pHs del suelo por debajo de 4.9 y que pocas cepas de R.meliloti se pudieron hallar en suelo de pH 4,0.

Para muchas cepas de Rhizobium se vió que a bajos pHs aglutinaban por sí solas (145, 73), problema que se planteaba ocasionalmente durante el presente estudio ya que las bacterias presentaban autoaglutinación a pH 4,0.

No se puede descartar, si se dan las condiciones mencionadas, que éste sea un mecanismo por el cual las bacterias del suelo se unen a las raíces de las plantas, pero decididamente éste sería un mecanismo inespecífico y no sería ni siquiera particular del proceso de nodulación por cuanto otras proteínas no vegetales lo pueden manifestar.

Capítulo 3.

ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA SUPERFICIE  
DE RHIZOBIUM MELILOTI

### 3.1. Materiales y Métodos

#### 3.1.1. Obtención de los anticuerpos monoclonales

##### 3.1.1.1. Cepas bacterianas:

Se utilizaron las cepas ya descritas en el Capítulo 2 de esta tesis.

##### 3.1.1.2. Condiciones de cultivo:

Para la mayoría de los ensayos las bacterias se cultivaron en medio mínimo definido para Rhizobium de Brown y Dilworth (23) a 28°C con agitación (200 rpm). Ocasionalmente (indicado en el ensayo) se los cultivó en medio YEM (165). E.coli se cultivó como se indicó anteriormente (114).

##### 3.1.1.3. Líneas de células de mieloma:

Se utilizaron para las fusiones células de mieloma de ratón de las líneas NSO (63) y X63 Ag 8.653 (89) obtenidas del Dr. A. Fossatti, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA y del Dr. C.Devaux del Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, Francia, respectivamente.

##### 3.1.1.3.1. Medio de cultivo:

Ambas líneas se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Tissue Culture Medium, GIBCO Cat. N° 430-1600) con 1 mM de piruvato de sodio, 0,37% (p/v) de bicarbonato de sodio y 10 % (v/v) de suero fetal bovino. La línea X63 requirió además 0,45 % de glucosa (Devaux, comunicación personal).

##### 3.1.1.3.2. Almacenamiento:

Cultivos de  $1-3 \times 10^6$  células se centrifugaron y se resuspendieron en 4 ml de SFB que

contenía 5 % de DMSO. Alícuotas de 1 ml se colocaron en viales de plástico y se congelaron primero a  $-70^{\circ}\text{C}$  (1-7 días) y luego se guardaron en tanques de  $\text{N}_2$  líquido.

#### 3.1.1.3.3. Descongelamiento:

El contenido de los viales descongelados a  $37^{\circ}\text{C}$  se diluyeron en el medio de cultivo, se centrifugaron y luego de resuspenderlos nuevamente en el medio de cultivo que contenía 20% de SFB se repartieron en 2 o 3 pocillos de una placa de 24 pocillos. Gradualmente, con los cambios de medio y expansión se fue bajando el contenido de SFB a 10 %.

#### 3.1.1.4. Preparación del antígeno:

Se cosecharon bacterias cultivadas en MM en fase logarítmica tardía (0,4-0,7 de DO a 660 nm en espectrofotómetro Beckman D.U.), se lavaron 2 veces con PBS y luego se resuspendieron en una solución acuosa 0,85 % en NaCl y 1,6 % (p/v) en formaldehído a una DO de 0,5 (39). De esta manera se conservaron por 1-2 meses a  $4^{\circ}\text{C}$ .

En el momento de usar, ya sea para la inmunización de los ratones o en los ensayos de detección y estudio de los anticuerpos monoclonales obtenidos, se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en este mismo buffer a la DO final indicada en cada ensayo.

En una de las fusiones realizadas se usaron como antígenos bacterias que previamente se cultivaron en presencia del exudado de raíces de alfalfa. De un cultivo de bacterias en medio mínimo, a DO de 0,6, se tomó una alícuota y se diluyó 10 veces en el exudado de la planta (83) al que previamente se le agregó  $\text{KNO}_3$ , microelementos y manitol a la concentración final del MM. A las 24 hs, cuando la DO llegó a aproximadamente 0,4, se cosecharon y luego se los lavó y fijó con la solución salina de formaldehído descripta mas arriba.

##### 3.1.1.4.1. Preparación del exudado de alfalfa:

Se esterilizaron semillas de alfalfa (119) (pertenecientes al mismo stock utilizado en el

Capítulo 2) y se dejaron germinar toda la noche en agua bidestilada esteril. Luego se colocaron sobre una gasa que cubría un vial que contenía medio Jensen (165) (todo previamente esterilizado) (10-20 semillas/vial). Se dejaron entre 2-6 días (83) a T.amb.; al cabo de este tiempo se observó crecimiento de las raíces dentro del medio. El exudado obtenido de esta manera se esterilizó por filtración y se utilizó para algunas preparaciones de antígenos.

#### 3.1.1.5. Inmunización:

Ratones Balb/c hembras de 6-8 semanas de edad, obtenidas de la CONEA, se inyectaron intraperitonealmente, con las suspensiones de bacterias obtenidas como se indicó anteriormente, a una DO final a 660 nm de 0,5 (0,2 ml por inyección, 2-3 inyecciones por ratón) y a intervalos de 1 a 2 meses. La última inyección se dió 3-4 días antes de la extracción del bazo para la fusión.

Únicamente la primer inoculación se realizó con la suspensión bacteriana emulsionada con adyuvante de Freund tanto completo como incompleto, dependiendo del experimento.

#### 3.1.1.6. Fusión:

Esta se realizó según la técnica de Galfre y Milstein (63) con ligeras modificaciones, algunas de las cuales fueron sugeridas por el Dr. A. Fossatti.

Entre  $30-50 \times 10^6$  células de mieloma con más del 80 % de viabilidad, determinado por el método de exclusión con Azul Tripan y lavados con medio de cultivo (sin SFB), se mezclaron con  $100 \times 10^6$  de linfocitos provenientes del bazo de un ratón previamente disgregado en un homogeinizador de vidrio esteril y también lavados con el mismo medio. Una vez centrifugada la mezcla a 1000 rpm por 7' se descartó el sobranadante y al sedimento de células se les agregó entre 0,8 y 1 ml de PEG (1500 de BDH) durante 1' con agitación constante. Luego de agitar por 1' mas se diluyó la mezcla con medio de cultivo que contenía 5 % de DMSO (2 ml en 2') y por último, agitando, se agregaron 20 ml del mismo medio en 3'. Todo esto se realizó a 37°C

Después de una centrifugación a 1000 rpm por 7', se resuspendieron las células en el medio de cultivo descrito pero con un 20 % de SFB y con el agregado de hipoxantina, timidina y aminopterina (HAT) (103). Esta suspensión de células, en lo que se llama medio condicionado, se distribuyó en 4 placas de cultivo de 24 pocillos cada una, 1 ml por pocillo.

Para la fusión realizada con células de mieloma X63, estas placas contenían desde el día anterior unos  $2 \times 10^4$  macrófagos por pocillo resuspendidos en el medio condicionado. Los hibridomas obtenidos con células de mieloma NSO no necesitaron esta capa de macrófagos para crecer.

A los 3 días de mantener las placas a 37°C en las estufas de cultivo (5% de CO<sub>2</sub>) se hizo un cambio de medio (se siguió con HAT) y a los 7 días se cambió por un medio de cultivo que ya no contenía aminopterina. Luego se realizaron cambios cada 3 días, se dejó de agregar hipoxantina y timidina y gradualmente se fue bajando el porcentaje de SFB hasta llegar a 10 %.

Las colonias de hibridomas se comenzaron a ver 5 días después de la fusión y a los 15 días ya alcanzaron un tamaño que se podía ver a simple vista. En ese momento se ensayó la presencia de anticuerpos en los sobrenadantes como se describe mas adelante. De aquellos pocillos con crecimiento de células de hibridomas que resultaron positivos se tomó una alícuota de células para congelar y otra alícuota se destinó a clonado.

#### 3.1.1.7. Clonado por dilución limitante (Devaux, comunicación personal):

Se prepararon suspensiones de células de cada hibridoma positivo de 100, 10 y 1 célula /ml en el medio de cultivo. Se sembraron 0,1 ml de cada dilución en los distintos pocillos de una placa de 96 pocillos (NUNC T.C.). Para cada dilución se utilizaron 32 pocillos. Estos contenían ya sea un colchón de macrófagos ( $10^4$ /pocillo) colocado desde el día anterior o de timocitos ( $10^5$ /pocillo) colocado en el mismo día del clonado. A los 5 días ya se vio crecimiento de colonias en los pocillos sembrados con la suspensión de 100 células/ml y a los 15 días se vio crecimiento casi en la totalidad de la placa.

El ensayo de detección de Acs en los sobrenadantes se realizó en el momento en que se podían ver las colonias sin necesidad del microscopio. Aquellos pocillos positivos y que contenían 1 sola colonia se expandieron primero a 1 ml y luego a 5 ml. De estos se tomó una alícuota de células que se destinó para congelamiento y otra alícuota se tomó para realizar un segundo clonado. Se siguieron los mismos pasos que en el primero, una vez que los clones productores de anticuerpos se expandieron a 5 ml se volvió a destinar una alícuota de células para congelamiento y el resto se mantuvo en cultivo con sucesivos cambios de medio cada 2-3 días por el lapso de 2-3 meses.

En los ensayos descritos más adelante para el estudio de los anticuerpos, los sobrenadantes se cosecharon después de 3 días de cultivo sin cambio de medio. Se conservaron en pequeñas alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 15-30 días.

### 3.1.2. Ensayo de detección de anticuerpos:

Se utilizó el método inmunoenzimático de ELISA en placas de poliestireno de 96 pocillos (NUNC T.C.). La técnica se basó en la descrita por Cobbold y Waldman (37) y Kennett (90) con algunas modificaciones.

Se colocaron 50  $\mu$ l/pocillo de una solución al 0,1 % de poli-L-lisina y se incubó 30' a 37°C; después de retirar ésta, se colocaron por pocillo 50  $\mu$ l de la suspensión bacteriana hecha en a una DO de 2 preparada como se indicó anteriormente. Se mantuvo así la placa 1 hora a 4°C, luego a cada pocillo se agregaron 50  $\mu$ l de una solución 0,25 % en glutaraldehído en PBS. Después de 10' a T.amb, se volcó el contenido de la placa y se lavaron los pocillos 4 veces con PBS. Luego se colocaron 100  $\mu$ l por pocillo de una solución bloqueadora de sitios inespecíficos que consistió en 1 % de albúmina bovina y 1 % de SFB en PBS. Se mantuvo la placa 1 hora a T.amb. y luego se lavó 1 vez con PBS. A continuación se colocaron por pocillo 50  $\mu$ l del sobrenadante de los hibridoma tal cual en el caso de la detección de hibridomas productores de anticuerpos hecha después de la fusión o diluido en la solución bloqueadora en otros ensayos descritos más adelante. Como control positivo se utilizó suero policlonal de un ratón inmunizado con las mismas bacterias y extraído a los 20 días de la inyección. Como control negativo se utilizó el sobrenadante de cultivo de la células de mieloma utilizadas para la fusión. Se mantuvo la placa 2 hs a T.amb. y luego toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó 2-5 veces con PBS y se colocaron por pocillo 50  $\mu$ l del segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (anti IgG de ratón hecho en conejo, Sigma) diluido 1:250 en PBS. Después de 2 hs a T.amb. se lavó nuevamente la placa 4-5 veces con PBS y finalmente se agregó a cada pocillo 50  $\mu$ l de la solución de sustrato que consistió en o-fenilendiamina (90). Después de 15' a T.amb. se paró la reacción agregando 200  $\mu$ l de una solución 5 N en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a cada pocillo. Se diluyó luego cada uno 3 veces con agua destilada y se leyó absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro Unicam..

### 3.1.3. Tratamiento de bacterias y obtención de polisacáridos:

#### 3.1.3.1. Tratamiento con periodato de sodio:

Se utilizó el método descrito por Brewin y colab. (20). La suspensión de células en PBS a DO de 1 se centrifugó y resuspendió en igual volumen de una solución de periodato de sodio (12,5%) y se dejó 15' a T.amb. Luego se centrifugó y se resuspendió en igual volumen de una solución 0,5 M en HCl, dejándose 5' a T.amb.. A continuación se centrifugó y se lavó varias veces con PBS llevándola finalmente a DO 2 con el mismo buffer.

#### 3.1.3.2. Tratamiento con calor:

Se calentaron bacterias en PBS a DO 2 por 5' a 100°C, luego se volvió a ajustar la suspensión a la misma DO por los efectos de la evaporación.

#### 3.1.3.3. Tratamiento con pronasa:

Se trataron bacterias no fijadas a DO 2 con pronasa (proteasa Tipo XIV) (1mg/ml) a 28°C durante 1 hora en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 (20). Luego se lavaron 2 veces con PBS y se volvieron a llevar a DO 2 con el mismo buffer.

#### 3.1.3.4. Obtención de membranas externas:

La técnica se basó en los métodos de Osborn y Munson (126) y de Schnaitman (144).

#### 3.1.3.5. Obtención del exopolisacárido:

Ver Mat.y Mét.del Capítulo 2 (2.1.8.).

#### 3.1.3.6. Obtención del lipopolisacárido:

Ver Mat.y Mét.del Capítulo 2 (2.1.7.).

#### 3.1.3.6.1. Hidrólisis del lipopolisacárido:

Se resuspendió el LPS de R.meliloti 102F51 HA en una solución 1% en ácido acético y se calentó a 100°C durante 1 hora (28). Se formó así un precipitado que se separó por centrifugación y que consistió en el lípido A. Este se lavó con PBS y luego de centrifugar se resuspendió en el volumen original con el mismo buffer y se sonicó como se indicó anteriormente para las bacterias. El sobrenadante de la hidrólisis, que contenía el polisacárido se extrajo con cloroformo y la fase acuosa se liofilizó y luego se llevo al volumen original con PBS.

### 3.1.4. Estudios realizados con los anticuerpos monoclonales obtenidos:

#### 3.1.4.1. Determinación del grado de unión de distintas bacterias a las placas de poliestireno:

La técnica utilizada se basó en lo publicado por Hazlewood y colab. (74), con algunas modificaciones. Se fijaron suspensiones de distintas especies y cepas de bacterias a distintas densidades ópticas a los pocillos de la placa de poliestireno según se indicó en 3.1.2. mediante poli-L-lisina y glutaraldehído. Después de lavar varias veces con PBS se agregó a cada pocillo 100  $\mu$ l de una solución 0,05% de Coomassie Blue R-250, 25% (v/v) de isopropanol y 10 % de ácido acético glacial (7 ). Se mantuvo la placa a 2 hs a T.amb. y luego de volcar se lavó 3 veces con la solución de desteñido que contenía 10% de metanol y 10% de ácido acético glacial. Luego se dejó la placa inmersa en esta solución 18 hs a T.amb. con constante agitación. A continuación se volcó el contenido de los pocillos y se colocó en cada uno 200  $\mu$ l de la solución de elución que consistió en 3% de SDS y 50% de isopropanol en agua destilada. Se mantuvo la placa cubierta a 37°C por 24 hs sin agitación y finalmente se diluyó el contenido de cada pocillo 3 veces y se leyó absorbancia a 595 nm.

#### 3.1.4.2. Calibración de los anticuerpos monoclonales:

Diluciones seriadas (1:2) de cada anticuerpo en el buffer de bloqueo se ensayaron por ELISA (3.1.2.) como se describió anteriormente utilizando como antígeno fijado a la placa R.meliloti 102F51 HA. Se determinó la dilución óptima de trabajo para cada anticuerpo como aquella que pertenecía al rango de diluciones que presentaban una correlación lineal con la absorbancia.

#### 3.1.4.3. Ensayo de adsorción:

Se incubaron alícuotas (100  $\mu$ l) de los Acs Mcs a la dilución de trabajo elegida con igual volumen de las suspensiones de bacterias, preparadas como se indicó anteriormente (3.1.1.4.). Después de incubar 2 hs a T.amb. y toda la noche a 4°C se centrifugaron en una

microcentrífuga por 2' y luego se ensayó la actividad del anticuerpo que quedaba en el sobrenadante mediante el ensayo de ELISA ya descrito (3.1.2.) utilizando siempre como antígeno fijado a la placa bacterias R.meliloti 102F51 HA.

De esta manera se comparó la capacidad de adsorción que tenían distintas especies y cepas de bacterias a distintas DO, bacterias que sufrieron distintos tratamientos y bacterias crecidas en distintos medios.

#### 3.1.4.4. Ensayo de inhibición:

Este ensayo fue similar al anterior, solo que como inhibidores de la actividad del anticuerpo se utilizaron soluciones de monosacáridos, polisacáridos, etc. En otras palabras, compuestos que dependiendo de su concentración o naturaleza, podrían haber formado redes con los anticuerpos y precipitarlos o podrían permanecer en el sobrenadante unidos al anticuerpo e inhibir la unión de estos al antígeno en el ensayo de ELISA.

### 3.1.5. Experimentos adicionales:

#### 3.1.5.1. Determinación de la clase de inmunoglobulina:

La técnica utilizada se basó en el método de Ledbetter (96). En un pocillo, de una placa de cultivo de 24 pocillos, que contenía células del hibridoma productoras del Ac Mc creciendo en DMEM con 10% de SFB dializado se colocaron 50  $\mu\text{Ci}$  por ml de  $^{35}\text{S}$ -Metionina y se dejó incubando a 37°C por 3 hs en la estufa de cultivo (5% de  $\text{CO}_2$ ). Luego se centrifugó la mezcla de incubación a 1000 rpm por 7' y del sobrenadante (2 ml) se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 10% final. El precipitado se lavó con TCA 10% (2 ml) y luego se resuspendió en el buffer de sembrado (100  $\mu\text{l}$ ) (ver Capítulo 2 (2.1.10.)) y se calentó 5' a 100°C. Luego de centrifugar por 10' en una centrifuga clínica a 3000 rpm se analizó el sobrenadante por electroforesis en gel de poliacrilamida (10% con urea, ver Capítulo 2 (2.1.10.)).

Los marcadores de PM se revelaron con Coomassie Blue R-250 y las muestras por autoradiografía.

#### 3.1.5.2. Purificación del Ac Mc H<sub>104</sub> por HPLC:

Se pasó por una columna de Mono Q (aniónica) el sobrenadante del hibridoma (45 ml) concentrado (a 2 ml) por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 45% y dializado contra 50 mM de buffer Tris-HCl pH 7,6.

Después de lavar la columna con el buffer Tris-HCL pH 7,6 50 mM, las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal formado por 15 ml de Tris-HCL pH 7,6 50 mM y 15 ml del mismo buffer conteniendo 1 M de NaCL (gradiente de 0-0,5 M NaCL). La velocidad de flujo fue de 1 ml/min

### 3.2. Resultados y discusión

#### 3.2.1. Antígeno, inmunización y puesta a punto del ELISA:

Se decidió inyectar los ratones con bacterias R.meliloti cultivadas en medio mínimo definido (23) y cosechadas en fase logarítmica tardía. En la Figura 12 se muestra la curva de crecimiento de R.meliloti 102F51 HA en MM. Se tomó como fase logarítmica tardía aquella comprendida entre 0,4-0,7 de DO a 660 nm medida como ya se indicó.

Como se querían obtener anticuerpos contra estructuras que se encuentran en la superficie de la bacteria, se inyectaron éstas en forma entera. Para evitar una rápida degradación en el organismo, las células se fijaron con la solución salina de formaldehído; en estas condiciones además las células se pueden conservar por varios meses a 4°C sin que sufran alteraciones (39).

Con las condiciones de inmunización adoptadas se vió que a los 20 días después de la primer inmunización se obtenía un suero con capacidad de aglutinar las bacterias. De todas formas se dieron una segunda y una tercer inyección para intensificar la respuesta.

Con el suero policlonal obtenido a los 20 días se puso a punto la técnica de detección de los anticuerpos. Se estudiaron en que condiciones se obtenía mayor actividad del antisuero en cuanto a la forma de pegar las bacterias a la placa, a los tiempos de incubación y a la dilución del segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa llegándose de esta forma a adoptar el procedimiento descrito en Mat.y Mét.(3.1.2.) con el cual este suero daba un título de 1/2000 lo que parecía razonable y suficiente como para para intentar realizar la fusión.

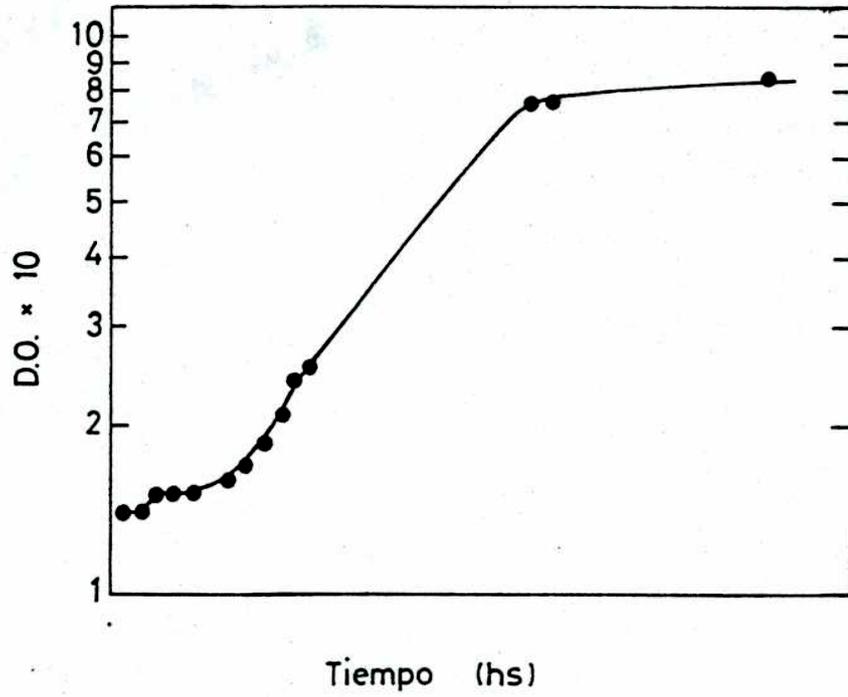


Figura 12: Curva de crecimiento de *R. meliloti*:

Se cultivaron bacterias *R. meliloti* 102F51 HA en medio mínimo a 28°C con agitación constante a 200 rpm. Se midió la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman D.U. en alícuotas tomadas a distintos tiempos.

### 3.2.2. Fusión:

Muchos fueron los intentos en la puesta a punto de la técnica de fusión. Sin entrar a detallar todos los obstáculos habría que hacer hincapié en el hecho que el punto crítico fueron las células de mieloma utilizadas. En el transcurso de un año aproximadamente se intentaron fusiones con células provenientes de distintos laboratorios, sin embargo solo cuando se consiguieron las células de mieloma NSO del Dr A. Fossatti se empezaron a obtener resultados positivos.

Con estas células y las X63 obtenidas mas adelante se pudieron realizar distintas fusiones exitosas. En cada fusión se obtuvo crecimiento de células de hibridoma en aproximadamente un 70% de los pocillos sembrados. A la vez un 4-10% de este 70% resultó positivo para la presencia de anticuerpos en los sobrenadantes mediante el ensayo de ELISA descrito en Mat.y Mét. (3.1.2.). Como antígeno fijado a la placa se utilizó R.meliloti 102F51 HA (Figura 13).

En Tabla 7 se detallan las inmunizaciones a que se sometieron los ratones cuyos bazos se utilizaron en cada fusión. Como en principio se buscaba utilizar los anticuerpos para estudiar las estructuras que participaban en la interacción, se decidió en la segunda y tercer fusión inmunizar con 2 cepas distintas de R.meliloti para obtener Acs Mcs que reconociesen algo común a las mismas y distintas a otras especies.

Los genes nod de las bacterias Rhizobium se inducen en presencia de compuestos secretados por las plantas (83, 129, 53). Por ejemplo se encontró que en el caso de R.meliloti (129), el gen nod D se induce por acción de la luteolina que se encuentra presente en el exudado de semillas de alfalfa (también en otras plantas). Pensando entonces que tal vez las estructuras sobre la superficie de la bacteria que participan en la interacción con las raíces de las leguminosas se induzcan de esta manera, se decidió utilizar como antígeno para la tercer fusión bacterias que fueron cultivadas en presencia de exudado.

Como se explicó anteriormente los hibridomas productores de anticuerpos contra R.meliloti 102F51 HA se sometieron por 2 veces consecutivas a un clonado por dilución

Figura 13

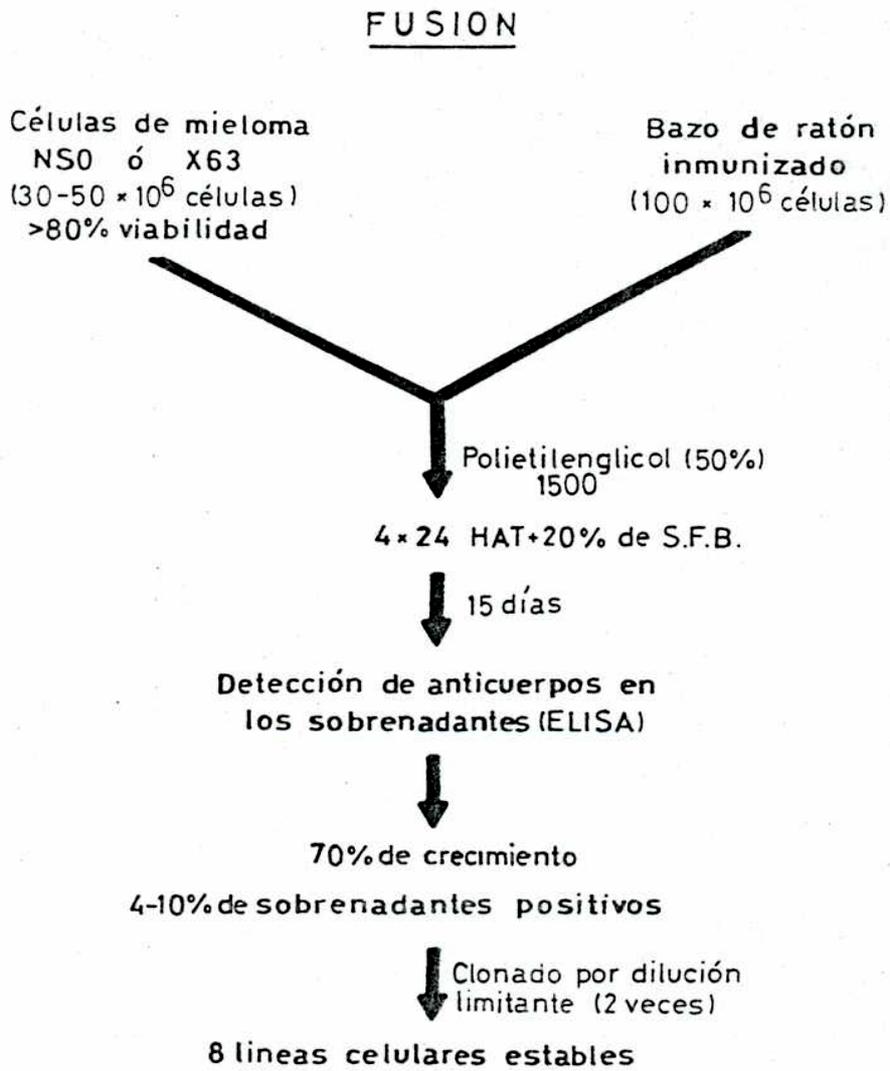


Tabla 7

Fusión	Esquema de inmunización	Anticuerpos Monoclonales obtenidos
A (NS0)	1 <sup>ra</sup> inoculación: <u>R. meliloti</u> R41 (sin fijar) 2 <sup>da</sup> : Idem 1 <sup>ra</sup>	D9
B (NS0)	1 <sup>ra</sup> inoculación: <u>R. meliloti</u> R41 (fijadas) 2 <sup>da</sup> : Idem 1 <sup>ra</sup> 3 <sup>ra</sup> : <u>R. meliloti</u> 102F51 HA (fijadas)	G113; H104; C7; H12; D7
C (X63)	1 <sup>ra</sup> inoculación: <u>R. meliloti</u> R41 crecidas en exudado de alfalfa (fijadas) 2 <sup>da</sup> : Idem 1 <sup>ra</sup> 3 <sup>ra</sup> : <u>R. meliloti</u> 102F51 HA crecidas en exudado de alfalfa (fijadas)	442; 625

limitante, llegandose a establecer así 8 líneas celulares estables. En la misma tabla se detallan también los distintos anticuerpos monoclonales provenientes de cada fusión.

### 3.2.3. Especificidad:

#### 3.2.3.1. Grado de unión de las distintas bacterias a la placa de poliestireno:

Para estudiar la especificidad de los distintos anticuerpos, se comenzó utilizando el ensayo de ELISA directo descrito en Mat. y Mét. (3.1.2.). La idea fue determinar para cada anticuerpo su unión a distintas bacterias fijadas a la placa.

El primer Ac Mc que se ensayó fue D<sub>9</sub> y se comparó su unión tanto a R.meliloti R41 como a R.lotus LL22. Resultó sorprendente que la unión de D<sub>9</sub> así como del suero de ratón policlonal diluido 1:1000 (control positivo) a R.lotus fue mucho mayor que a R.meliloti R41 (la cepa inmunizante). Pero a la vez se observó que a simple vista había una diferencia en la cantidad de bacterias que se fijaban a la placa; el R.lotus se fijaba mucho más que R.meliloti R41.

Se hizo el mismo tipo de ensayo utilizando distintas cepas de R.meliloti y E.coli K12. Nuevamente se observó a simple vista un distinto grado de fijación de las distintas bacterias a la placa. Este orden de fijación coincidía con el orden de actividad del Ac Mc D<sub>9</sub> con las distintas bacterias.

Orden de actividad del anticuerpo: R.meliloti 102F51 HA cosechado en fase logarítmica > E.coli K12 (fase log.) > R.meliloti 102F51 HA cosechado en fase estacionaria > R.meliloti R41 (fase estac.) > R.meliloti 102F51 HA crecido en medio sólido > R.meliloti R41 (fase log.) > R.meliloti 102F51 LA.

Debido al hecho que había una variación en la cantidad de bacterias de cada especie o cepa que se fijaban a la placa mediante el método utilizado (poli-L-lisina y glutaraldehído), para estudiar la especificidad de cada anticuerpo (o sea comparar su unión a las distintas bacterias), había que encontrar primero la forma de tener la misma cantidad de bacterias de cada tipo fijadas a las placas. Para esto hubo que determinar la correspondencia que había

entre la DO de la suspensión de bacterias colocada en el pocillo y la cantidad de bacterias que finalmente quedaba unida al mismo.

Siguiendo el procedimiento descrito en Mat. y Mét.(3.1.4.1.) y que se basó en la afinidad del Coomassie Brilliant Blue R-250 por las proteínas, se ensayó la unión de R.meliloti 102F51 HA, R.meliloti R41 y E.coli K12. Se fijaron en distintos pocillos, suspensiones de cada tipo de bacteria a distintas DO y la cantidad de colorante eluída, que se correlacionaba con la cantidad de proteínas fijada en cada pocillo, se determinó por absorbancia a 595 nm.

En la Figura 14, se observa que las distintas bacterias se comportaron de manera bastante diferente en cuanto a su capacidad de unirse a la placa por el método de fijación utilizado. Por ejemplo a la DO de 2 (que fue la DO que se encontró óptima al poner a punto el ensayo de ELISA) R.meliloti 102F51 HA se fijó unas 4 veces más que R.meliloti R41. En la misma figura se observa que se fijaba igual cantidad de bacterias (en base a que se liberó igual cantidad de Coomassie Blue) cuando se colocaron R.meliloti 102F51 HA y E.coli K12 ambas a DO de 0,6. Al ensayar la actividad del Ac Mc D<sub>9</sub> con las 2 bacterias fijadas a esta DO se observó que con R.meliloti daba positivo diluyéndolo hasta 50 veces mientras que con E.coli K12 se obtuvo un resultado positivo solo mientras no se diluyera más de 20 veces.

Si bien se encontró una mayor afinidad del anticuerpo por la bacteria inmunizante, este método no pareció del todo confiable ya que muy probablemente, como se indica en (74), bacterias distintas tienen distinta cantidad de unidades fijadoras del colorante por unidad de peso seco por lo tanto que liberen igual cantidad del mismo no sería un indicio seguro que consistan en el mismo número de bacterias. Es por esto que para determinar la especificidad de los anticuerpos se optó por utilizar el método de adsorción descrito en Mat. y Mét.(3.1.4.3.).

### 3.2.3.2. Calibración de los anticuerpos:

Antes de hacer los distintos ensayos descritos más adelante, había que titular los sobrenadantes de los distintos hibridomas y determinar la dilución óptima de trabajo para cada

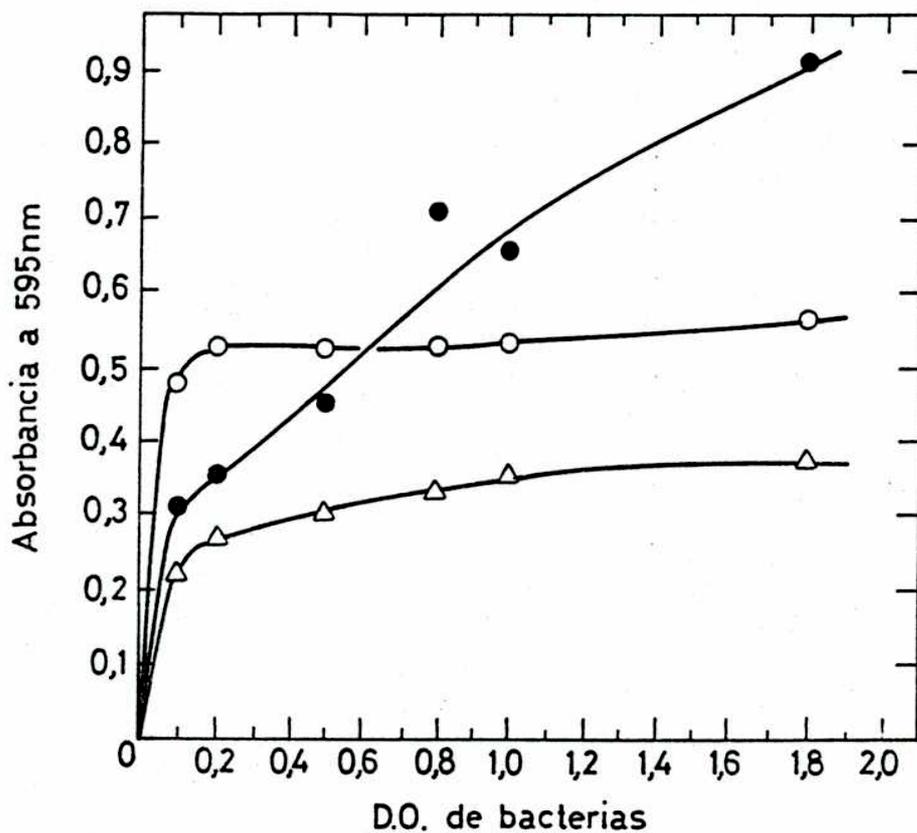


Figura 14: Estudio comparativo de la cantidad de bacterias fijadas a la placa de poliestireno:

Suspensiones de distinta DO de cada tipo de bacteria se fijaron a distintos pocillos de la placa de poliestireno mediante el método descrito en (3.1.2.) utilizando poli-L-lisina y glutaraldehído. Luego de teñir con Coomassie Blue R-250 se midió la absorbancia a 595 nm que se obtenía en cada pocillo al eluir con la solución 3% en SDS y 50% en isopropanol (3.1.4.1.).

(●-●): *R.meliloti* 102F51 HA; (▲-▲): *R.meliloti* R41; (○-○): *E.coli* K12

uno. O sea una dilución que perteneciese al rango de diluciones que presentara una correlación lineal con la absorbancia. De esta forma cualquier leve cambio en la concentración de anticuerpo se vería reflejada en un cambio en la absorbancia.

En la Figura 15 se observan las curvas de calibración obtenidas para los distintos anticuerpos. Como dilución de trabajo se tomó generalmente aquella que daba una absorbancia entre 0,2-0,4 a 492 nm. Este tipo de calibración se hacía con cada batch de anticuerpos que se cosechaba.

En ensayos anteriores se había visto que los Acs Mcs 625 (tercer fusión) y H<sub>12</sub> y D<sub>7</sub> (2da fusión) presentaban absorbancias muy bajas aún sin diluir. No se siguió investigando si esto se debía a una menor concentración de anticuerpos en el sobrenadante del hibridoma o a una menor afinidad de los mismos por los antígenos.

#### 3.2.3.3. Comparación con otro Ac Mc no relacionado:

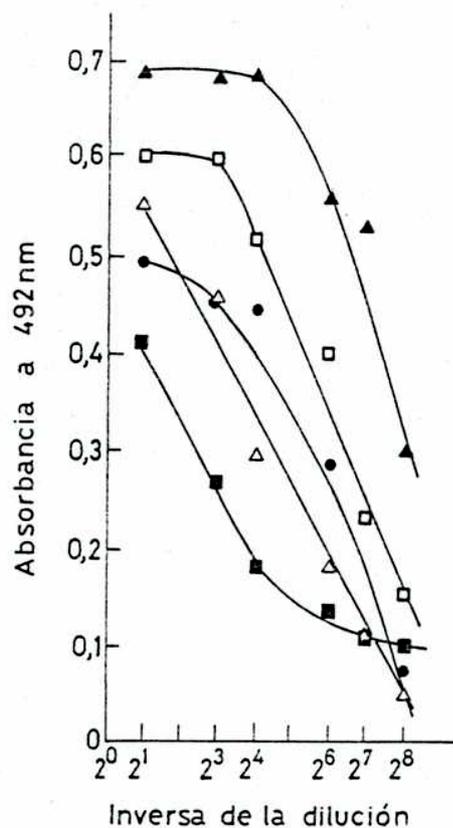
Para corroborar que la interacción de los Acs del sobrenadante del hibridoma con las bacterias no se debía a un fenómeno inespecífico, se compararon mediante el ELISA (3.1.2.) la unión del Ac Mc H<sub>104</sub> purificado por HPLC (según se indicó en 3.1.5.2. de Mat. y Mét.) y de un Ac Mc, cedido por el Dr. O. Podhaizer, dirigido hacia un antígeno tumoral. Este también estaba purificado pero por tamiz molecular. Los 2 anticuerpos pertenecían a la clase IgM (ver más adelante, 3.2.5.).

En la Figura 16 se observan los resultados. Si bien a altas concentraciones de anticuerpo hay cierta unión inespecífica del Ac Mc dirigido hacia el Ag tumoral, la actividad presentada por el Ac Mc H<sub>104</sub> fue mucho mayor.

#### 3.2.3.4. Ensayo de adsorción:

En la Figura 17 se comparan los porcentajes de inhibición dados por distintas suspensiones bacterianas. Estos valores resultan de hacer  $\frac{(A-X)}{X} \times 100$  donde X es la actividad

X

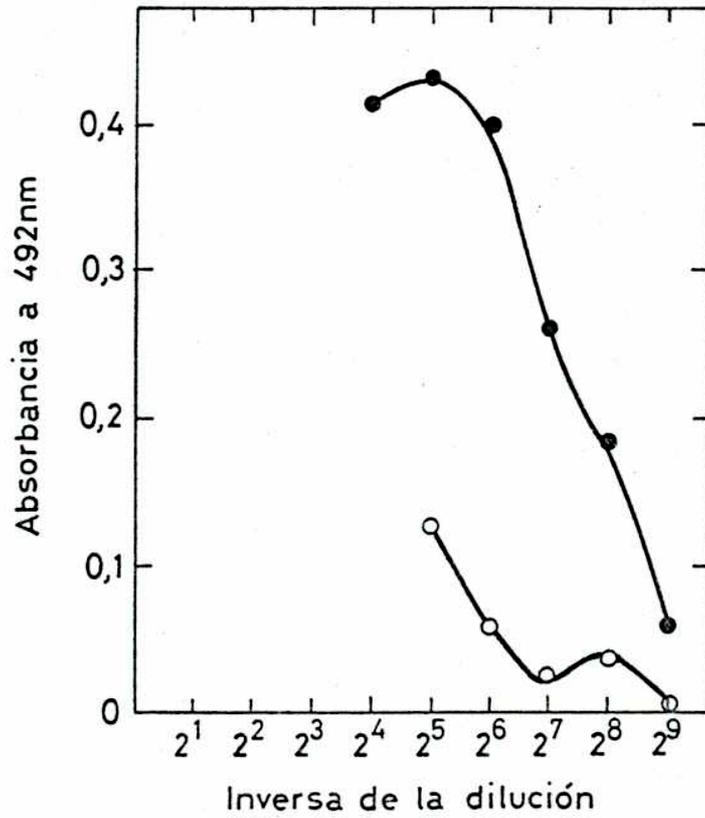


**Figura 15: Calibración de los anticuerpos monoclonales:**

Se ensayaron por ELISA (3.1.2.) diluciones seriadas (1:2) de cada Ac Mc utilizando como antígeno fijado a la placa *R.meliloti* 102F51 HA.

Se tomó como dilución de trabajo aquella que daba una absorbancia a 492 nm que caía en el rango de absorbancias que presentaban una correlación lineal con la dilución.

(▲-▲): Ac Mc H<sub>104</sub>; (□-□): Ac Mc G<sub>113</sub>; (●-●): Ac Mc C<sub>7</sub>; (△-△): Ac Mc D<sub>9</sub>; (■-■): Ac Mc 442.



**Figura 16: Especificidad I:**

Se comparó la actividad del Ac Mc H<sub>104</sub> (IgM) con otro Ac Mc no relacionado dirigido contra un antígeno tumoral (también IgM). Para esto diluciones seriadas (1:2) de cada Ac Mc se ensayaron por ELISA (3.1.2.) utilizando como antígeno fijado a la placa de poliestireno *R.meliloti* 102F51 HA.

(●-●): Ac Mc H<sub>104</sub> (400 μg/ml); (o-o): Ac Mc no relacionado (500 μg/ml).

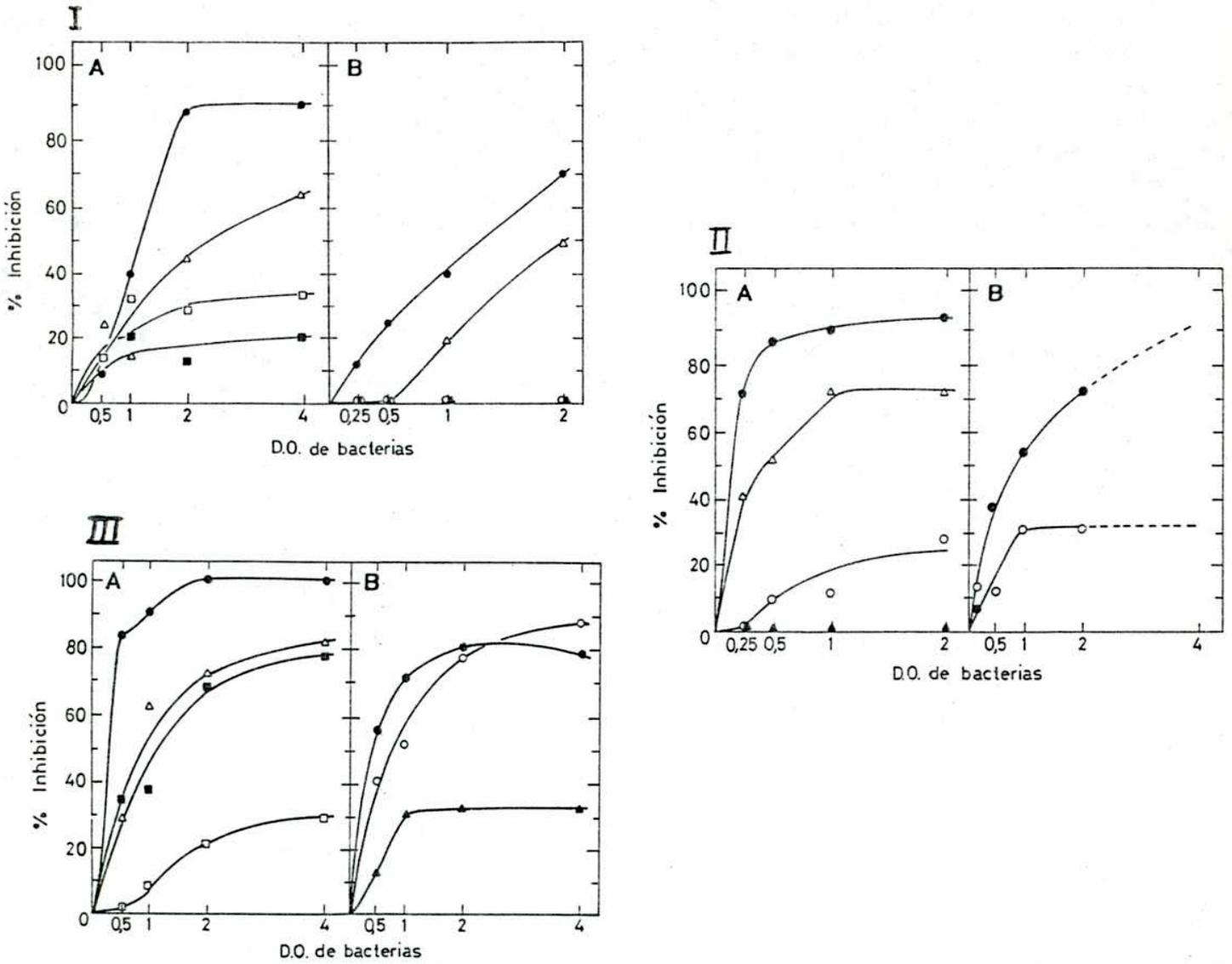


Figura 17: Especificidad II:

Mediante el ensayo de adsorción descrito en Mat. y Mét.(3.1.4.3.) se estudió la capacidad que tenían distintas bacterias de unir los distintos Acs Mcs obtenidos. Para esto cada Ac Mc a la dilución de trabajo elegida (3.1.4.2.) se incubó con suspensiones de distinta DO de cada tipo de bacteria y luego de centrifugar se ensayó por ELISA (3.1.2.) cada sobrenadante. Se determinó el porcentaje de inhibición (ver 3.2.3.4.) y se graficó en función de la DO.

Acs Mcs ensayados: I) G<sub>113</sub>; II) H<sub>104</sub>; III) C<sub>7</sub>. A y B son 2 experimentos distintos.

Bacterias ensayadas: (●--●): *R.meliloti* 102F51 HA; (▲--▲): *R.meliloti* 102F51 LA; (○--○): *R.meliloti* R41; (□--□): *R.meliloti* GR4 (155); (■--■): *R.meliloti* GRT3 (155); (▲--▲): *E.coli* HB101 (16).

del anticuerpo remanente después de adsorber con un determinado tipo de bacteria , medida por ELISA como se describió en Mat. y Mét. (3.1.2.), y A es el control del 100% de actividad o sea el anticuerpo incubado con buffer en lugar de bacterias.

En la Figura 17 se muestran algunos ejemplos de la curvas obtenidas. No siempre se alcanzó el mismo porcentaje de inhibición para un determinado par bacteria-anticuerpo ya que este valor dependía de las condiciones del ensayo en particular como, por ejemplo, la concentración del anticuerpo. Lo que sí se observó es que tomando la inhibición dada por R.meliloti 102F51 HA (que fue la bacteria que siempre mas adsorbió) como el 100% se pudo confeccionar el esquema de la Figura 18 en el que vemos las bacterias que adsorben tanto anticuerpo como ésta, las que adsorben un 75-80% de lo que la primera adsorbe y las que solo adsorben por debajo del 35% respecto a la misma. Este esquema se confeccionó solo con aquellos anticuerpos y bacterias con los que este tipo de ensayo se hizo por lo menos 2 veces.

A partir de este esquema se observa que en base a su reactividad con 3 Acs Mcs se pudo diferenciar algunas cepas de R.meliloti.

Es interesante el hecho que a pesar de haber inmunizado el ratón primero con R.meliloti R41 y luego con R.meliloti 102F51 HA, los anticuerpos G<sub>113</sub> y H<sub>104</sub> solo reconocieron la segunda bacteria.

La idea al inmunizar con 2 cepas distintas fue la de obtener anticuerpos contra estructuras comunes a la mayor parte de los R.meliloti. El Ac Mc C<sub>7</sub> pareció dar mayores reacciones cruzadas que los otros dos. Esto se podría deber tanto a reacciones cruzadas por la presencia de un epitope común a las distintas bacterias o simplemente a reacciones totalmente inespecíficas (69).

R.meliloti 102F51 HA y R.meliloti 102F51 LA son 2 cepas que provienen de un mismo cultivo original de R.meliloti 102F51 (72). La diferencia consiste en que la segunda produce un polisacárido del tipo del ácido teicurónico (38) que no se encuentra en la primera. Esto está relacionado, como ya se mencionó en la introducción, con diferente sensibilidad a fagos (72), a una mayor competitividad de la LA en la nodulación (72) y a diferencias, como se vió en la

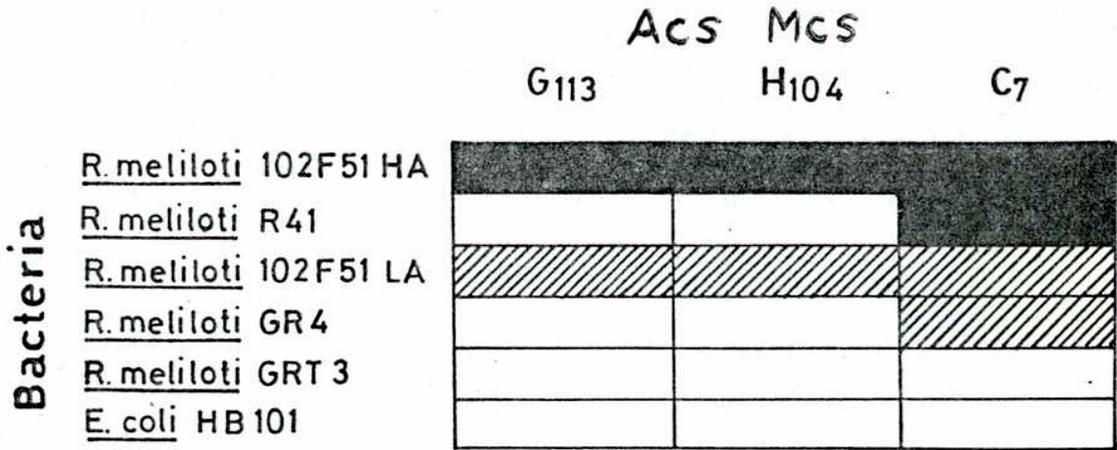


Figura 18: Especificidad III:

Este esquema se confeccionó en base a los resultados obtenidos de la Figura 17. Teniendo en cuenta que R. meliloti 102F51 HA fue siempre la que presentaba mayor capacidad de unir los anticuerpos y tomando el valor de inhibición dado por la misma como el 100%, se designó: ■, a aquellas bacterias que presentaban igual capacidad de adsorción que R. meliloti 102F51 HA; ▨, a aquellas bacterias que presentaban un 75-80% de la capacidad de adsorción de HA y □, a aquellas bacterias que presentaban una capacidad de adsorción por debajo del 35% de la que presentaba HA.

primer parte de esta tesis, en cuanto a la cantidad de aglutinina de alfalfa necesaria para producir aglutinación con cada una de ellas (72). Con respecto a su reactividad con los anticuerpos. Se observó que LA presentó con los 3 un 75-80% de la capacidad de adsorción que presentó la HA. Una explicación razonable sería que el polisacárido de tipo del ácido teicurónico que se encuentra en la superficie estaría bloqueando en alguna medida el antígeno que reacciona con los anticuerpos.

### 3.2.4. Estudio de los antígenos bacterianos involucrados

#### 3.2.4.1. Ubicación: Adsorción con membranas externas:

Como se buscaba obtener anticuerpos contra estructuras que estuviesen expuestas en la superficie de la bacteria, las inmunizaciones se hicieron con las bacterias enteras y fijadas con formaldehído. De todas formas aún así no podía descartarse que se formasen anticuerpos contra estructuras internas de la bacteria.

En el ensayo de ELISA como antígeno fijado a la placa con poli-L-lisina y glutaraldehído también se utilizaban las bacterias enteras y sin embargo había la posibilidad que en este procedimiento las bacterias sufrieran rupturas y de esta forma quedasen expuestas estructuras internas.

A pesar de esto se tuvieron indicios del hecho que los anticuerpos que se obtuvieron estaban dirigidos hacia la superficie:

I) En los ensayos de adsorción ya descritos, se incubaron los anticuerpos con bacterias enteras en suspensión y se observó que distintas bacterias tenían distinta capacidad de unir los anticuerpos. Esto descartaría el hecho que los anticuerpos estudiados tuviesen capacidad de unirse a estructuras internas de las bacterias expuestas al fijar a éstas a la placa.

II) Se prepararon membranas externas de R.meliloti 102F51 HA y se estudió su capacidad de unir los anticuerpos mediante un ensayo de adsorción. La preparación original de membranas tenía 12,5 mg de proteínas / ml, y se ensayaron diluciones de 1:2, 1:20 y 1:50 (final). Después de realizar el ELISA, se determinó en forma cualitativa la intensidad de color obtenida en cada caso respecto al control positivo que consistió en el anticuerpo incubado con buffer el lugar de membranas.

En la Figura 19 se observa que en el caso de los 5 Acs Mcs estudiados se produjo una gran adsorción de los mismos por parte de las membranas externas de la bacteria.

Tal vez para confirmar esta idea faltaría haber ensayado como control negativo membranas internas.

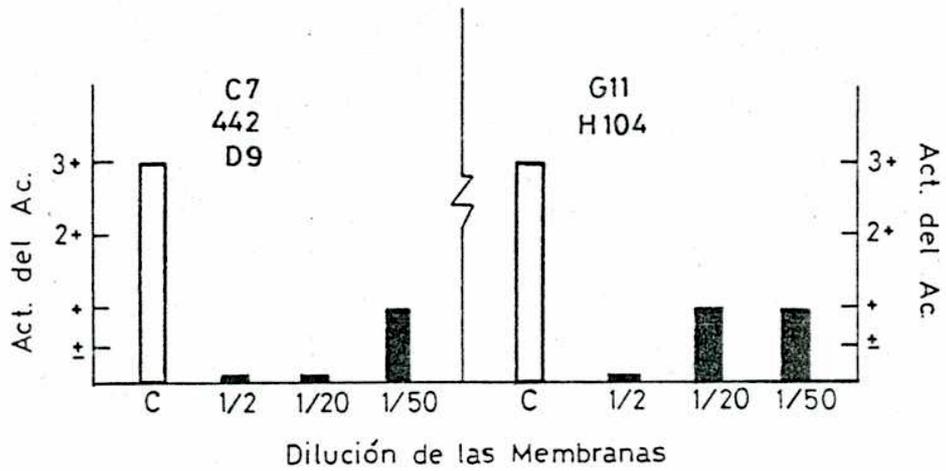


Figura 19: Capacidad de adsorción de membranas externas:

Se ensayó la capacidad de membranas externas de *R.meliloti* 102F51 HA de adsorber los distintos Acs Mcs. Para esto cada Ac Mc a la dilución de trabajo óptima (3.1.4.2.) se incubó con suspensiones de membranas externas a distinta concentración proteica según (3.1.4.3.). Luego de centrifugar se ensayó por ELISA (3.1.2.) la actividad de anticuerpo remanente en cada sobrenadante. La cuantificación se hizo en forma visual asignándole distinto número de cruces a las distintas intensidades de color observadas.

□: control, actividad del anticuerpo al incubar con buffer en lugar de membranas externas. ■: actividad remanente del Ac al incubar con las membranas externas.

#### 3.2.4.2. Efecto de la fijación con la solución salina de folrmaldehído:

Al utilizar tanto para la inmunización como en el ensayo de ELISA bacterias fijadas quedaba la duda que los Acs Mcs obtenidos estuviesen dirigidos hacia estructuras nuevas que se formaban a partir de este tratamiento y que no se encontraban naturalmente en la bacteria.

Para dilucidar esto se comparó mediante un ensayo de adsorción la capacidad de unir los anticuerpos de bacterias tratadas de esta forma con aquellas cosechadas en el mismo día del ensayo y que no sufrieron tal tratamiento.

En la Figura 20 se observa que los 2 tipos de bacterias presentaron similares valores de inhibición por lo que se concluyó que el tratamiento no afectaba a los antígenos involucrados en este estudio.

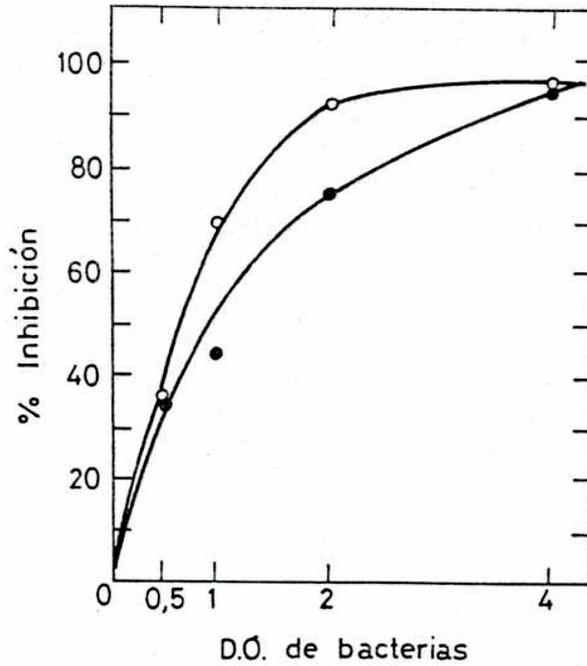
#### 3.2.4.3. Propiedades bioquímicas:

##### 3.2.4.3.1. Tratamiento con periodato de sodio:

Al someter las bacterias R.meliloti 102F51 HA a un tratamiento con periodato de sodio según se indicó en Mat. y Mét. (3.1.3.1.), se observó (Tabla 8) que ello disminuyó los valores de inhibición de los Acs Mcs G<sub>113</sub>, C<sub>7</sub> y H<sub>104</sub> a un 0-25% de los que presentaban las bacterias sin tratamiento. Para los Acs Mcs D<sub>9</sub> y 442 los resultados tienden a ser similares a los de los otros anticuerpos mencionados; sin embargo estos se tomaron como dudosos ya que el porcentaje de inhibición que presentaban inicialmente las bacterias no tratadas ( $\approx$  20%) era demasiado bajo.

##### 3.2.4.3.2. Tratamiento con calor:

Al someter bacterias R.meliloti 102F51 HA a un tratamiento con calor según se indicó en Mat. y Mét. (3.1.3.2.) se observó (Tabla 8) que esto no afectó su capacidad de adsorción de los distintos anticuerpos, lo que hace poco probable que sea una proteína de superficie parte del epitope.



**Figura 20: Efecto de la fijación con la solución salina de formaldehído:**

Se incubó el Ac Mc G<sub>113</sub> a la dilución óptima de trabajo (3.1.4.2.) con suspensiones de distinta DO tanto de bacterias tratadas como de no tratadas con la solución salina de formaldehído según se indicó al describir el ensayo de adsorción (3.1.4.3.). Luego de centrifugar se ensayó la actividad de Ac remanente en el sobrenadante por ELISA (3.1.2.) utilizando como antígeno fijado a la placa bacterias *R.meliloti* 102F51 HA que si sufrieron el proceso habitual de fijación.

(●--●): *R.meliloti* 102F51 HA fijadas; (o--o): *R.meliloti* 102F51 HA no fijadas.

Bacterias	Porcentaje de inhibición de la actividad de los anticuerpos monoclonales					
	DO	G <sub>113</sub>	H <sub>104</sub>	C <sub>7</sub>	D <sub>9</sub>	442
Sin tratamiento	1	60	52	58	16	20
	0,5	44	34	52	n.d	0
Tratadas con periodato de sodio	1	0	0	16	0	0
	0,5	0	0	0	0	0
Calentadas 5'100°C	1	85	52	60	18	10
	0,5	50	31	48	10	0

Tabla 8: Efecto del periodato de sodio y del calor sobre la capacidad de adsorción de las bacterias:

En un ensayo de adsorción similar al descrito en la leyenda de la Figura 20 se comparó la capacidad de unir anticuerpo de tanto bacterias tratadas con periodato de sodio (3.1.3.1.) como con calor (3.1.3.2.) con aquellas que no sufrieron ningún tratamiento.  
n.d.: no determinado

Unicamente para el caso del Ac Mc 442 se observó una disminución del porcentaje de inhibición a la mitad pero como se mencionó mas arriba este resultado no era confiable ya que el control positivo de inhibición (bacterias sin tratamiento) dió valores demasiado bajos.

#### 3.2.4.3.3 Tratamiento con pronasa:

Se ensayó el efecto de un tratamiento con pronasa de las bacterias respecto de su capacidad de adsorción del Ac Mc C<sub>7</sub>. En la Figura 21 se observa que tanto bacterias que fueron sometidas a este tratamiento como aquellas que no lo fueron presentaron similares porcentajes de inhibición.

En este experimento faltó ver si efectivamente un tratamiento con pronasa en las condiciones ensayadas afectaba las proteínas de las bacterias. La metodología usada fue la aplicada por Brewin y colab. (20), los cuales la utilizaron con exito para digerir las proteínas de la membrana peribacteroide de R.leguminosarum.

Sin tener en cuenta entonces los resultados del tratamiento con pronasa, los efectos del tratamiento con periodato y del calentamiento llevan a pensar que los antígenos no serían proteicos sino que probablemente tendrían naturaleza sacarídica.

#### 3.2.4.4. Ensayos de inhibición:

##### 3.2.4.4.1. EPS y LPS de R.meliloti 102F51 HA:

Como ya se mencionó en la introducción, los polisacáridos que se encuentran en la superficie de la bacteria y que actuarían como probables antígenos, hacia los cuales estarían dirigidos los Acs Mcs aquí estudiados, serían: el exopolisacárido, el lipopolisacárido y el glucano  $\beta$  1-2 .

Por lo tanto se aisló por un lado el exopolisacárido y por el otro el lipopolisacárido de R.meliloti 102F51 HA y se comparó la capacidad que tenían los mismos (en igualdad de mg de peso seco /ml) de inhibir la actividad de los distintos Acs Mcs según el ensayo de inhibición

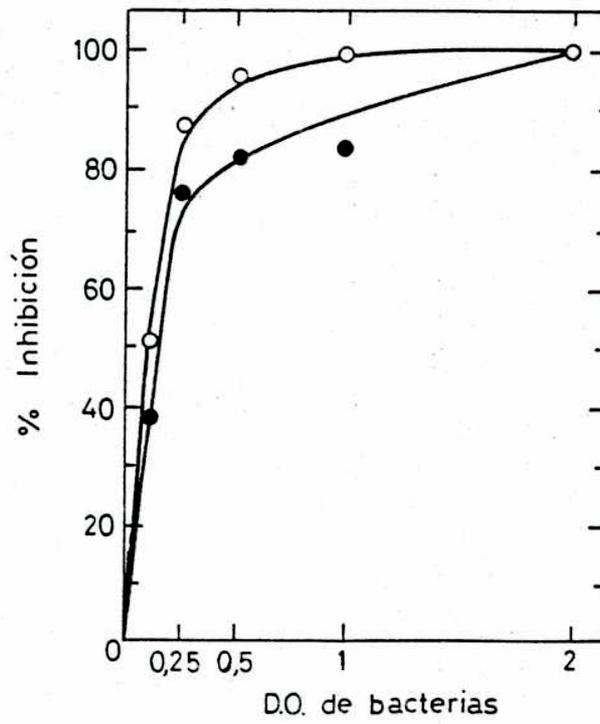


Figura 21: Tratamiento de las bacterias con pronasa:

Se comparó la capacidad de adsorber el Ac Mc C<sub>7</sub> de tanto bacterias *R.meliloti* 102F51 HA tratadas (3.1.3.3.) como no tratadas con pronasa. El procedimiento fue similar al descrito en la leyenda de la Figura 20.

(●--●): bacterias sin tratar; (o--o): bacterias tratadas con pronasa.

descrito en Mat. y Mét. (3.1.4.4.). El LPS siempre se sonicaba antes de usar para así disgregar los aglomerados formados, observables a simple vista. Como se observa en la Figura 22, para los 3 Acs Mcs ensayados se encontró una considerable inhibición por parte del lipopolisacárido mientras que el exopolisacárido no fue capaz de inhibir a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Como el LPS estaba libre de glucanos, (un posible contaminante) ya que el último paso de purificación consistió en resuspenderlo en buffer Trietilamina-EDTA pH 7.0 y correrlo en una columna de Biogel A 1,5 m (30), se descartó la posibilidad de que estos últimos fuesen los responsables de la inhibición.

Muy probablemente el exopolisacárido se pierda después de los lavados y centrifugaciones a los que se someten las bacterias en su preparación tanto para la inmunización como para el ensayo de ELISA. Además no se formaría mucho EPS en MM en la fase logarítmica (esta es la razón por la que el EPS fue aislado de fase estacionaria) por lo que es razonable suponer que la estructura polisacáridica inmunogénica que queda expuesta sobre la superficie sea el lipopolisacárido.

#### 3.2.4.4.2. LPS de R.meliloti 102F51 HA y de E.coli K12:

Se comparó la capacidad de inhibir la actividad de los anticuerpos del LPS obtenido de R.meliloti 102F51 HA así como del obtenido de E.coli K12.

En la Figura 23 se observan los resultados obtenidos para los Acs Mcs G<sub>113</sub>, H<sub>104</sub> C<sub>7</sub> y D<sub>9</sub>.

Los 2 tipos de LPS se colocaron en igualdad de concentración en KDO; sin embargo no se determinó que porcentaje representa el KDO de la totalidad de azúcares de la molécula.

Para el Ac Mc G<sub>113</sub> si bien hubo cierta inespecificidad con el LPS de E.coli, nunca se alcanzaron los valores de inhibición dados por el LPS de R.meliloti. Para el Ac Mc C<sub>7</sub> si bien hasta 50 µg de KDO /ml casi no hubo reacción con LPS de E.coli, a 100 µg de KDO /ml (concentración bastante elevada) se alcanzó la misma inhibición que con el de R.meliloti. El

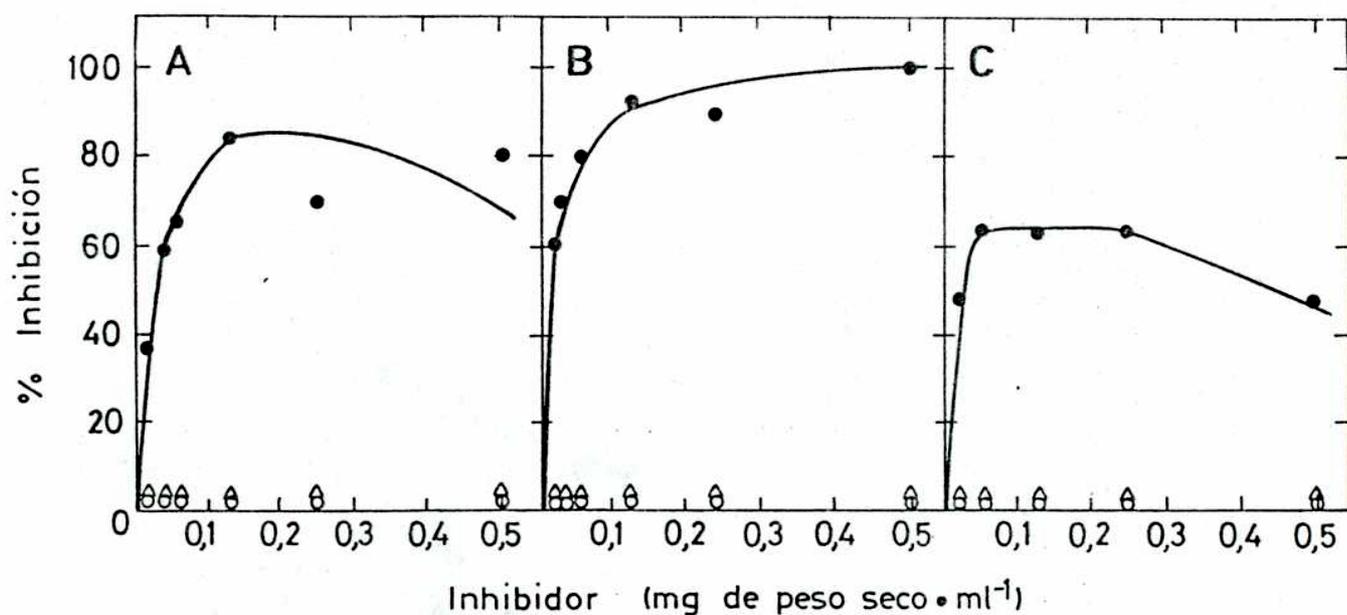


Figura 22: Capacidad inhibitoria comparativa del EPS, LPS y de la porción polisacáridica del LPS:

Se incubaron según (3.1.4.4.) soluciones de diferente concentración de cada uno de estos polisacáridos con cada Ac Mc (A: H<sub>104</sub>; B: C<sub>7</sub>; C: G<sub>113</sub>) a la dilución óptima de trabajo (3.1.4.2.). Luego de una centrifugación se ensayó por ELISA (3.1.2.) la actividad de anticuerpo remanente en el sobrenadante. El LPS se obtuvo de bacterias cultivadas en YEM y cosechadas en fase estacionaria. El EPS se obtuvo de bacterias cultivadas en MM y cosechadas también en fase estacionaria.

(●-●): LPS de *R.meliloti* 102F51 HA; (○-○): EPS de *R.meliloti* 102F51 HA, (△-△): la porción polisacáridica obtenida del LPS de *R.meliloti* 102F51 HA por hidrólisis con AcOH 1%.

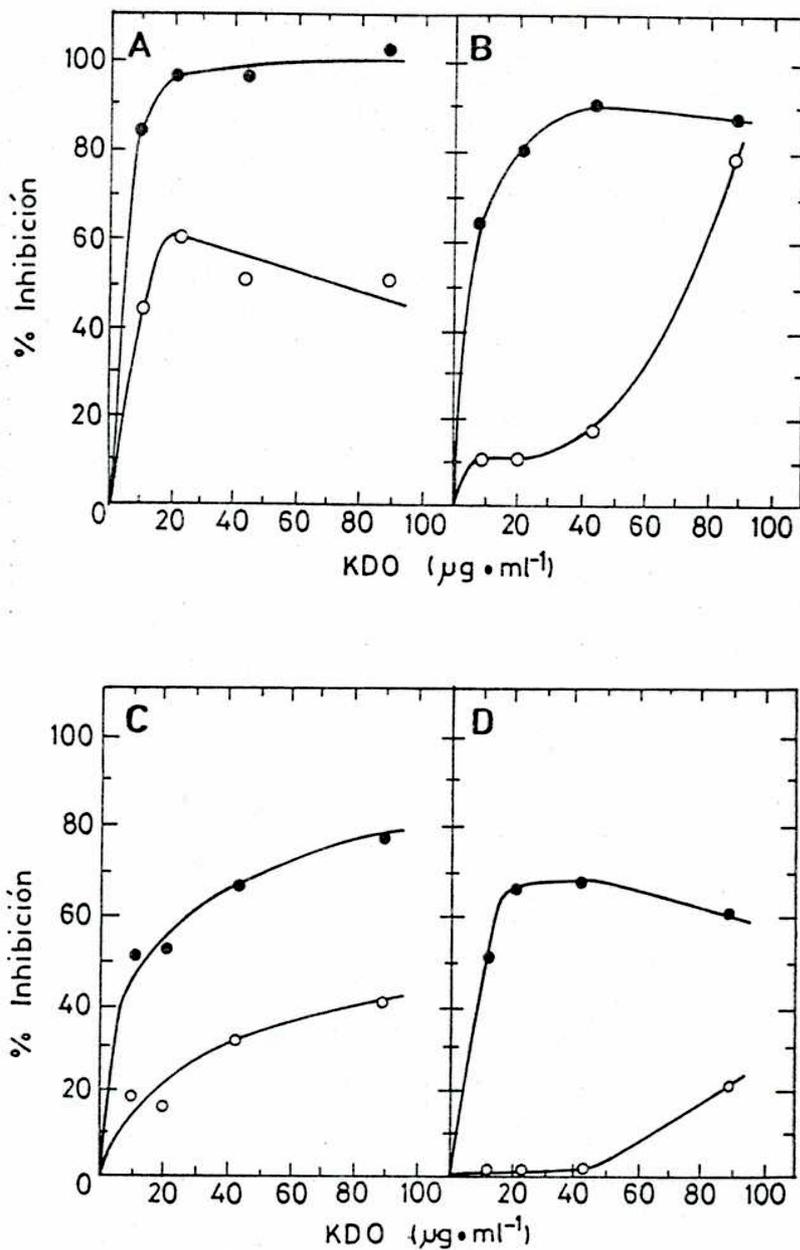


Figura 23: Capacidad de inhibición comparativa de los LPS de *R. meliloti* y de *E. coli*:

En un ensayo similar al descrito en la leyenda de la Figura 22 se estudió la capacidad de inhibir la actividad de los Acs Mcs: G<sub>113</sub> (A); C<sub>7</sub> (B); H<sub>104</sub> (C) y D<sub>9</sub> (D) de tanto LPS obtenido de *R. meliloti* 102F51 HA (YEM, fase estacionaria) (●-●) como del LPS obtenido de *E. coli* K12 (YEM, fase estacionaria) (o-o).

Ac Mc H<sub>104</sub> se comportó como el G<sub>113</sub> y el Ac Mc D<sub>9</sub> tendía a comportarse como el C<sub>7</sub>.

Posiblemente sea diferente el LPS en solución que el LPS sobre la superficie de la bacteria ya que en solución este puede formar agregados (a pesar que antes de usar siempre fue sonificado) que contribuirían a una mayor unión inespecífica. Tal vez esto explica las pequeñas diferencias obtenidas entre los resultados con el LPS puro y las bacterias enteras.

De todas formas en los 4 casos estudiados se observó una mayor especificidad para el LPS de R.meliloti.

En la Figura 24 se observan los resultados determinados en forma cualitativa para el caso de los Acs Mcs 442 y 625 (tercera fusión). En ambos casos parecería que el LPS no tiene capacidad inhibitoria. No se siguió investigando la naturaleza del antígeno que reaccionaría con los mismos.

#### 3.2.4.4.3. LPS hidrolizado:

Se ensayaron como bloqueadores o inhibidores de la actividad de los Acs Mcs estudiados, los productos de hidrólisis del LPS de R.meliloti 102F51 HA con ácido acético al 1%. Esta hidrólisis rompe la unión entre el lípido A y la porción polisacáridica. Ninguno de los 2 productos (Figuras 22 y 25) tuvo capacidad de inhibición.

#### 3.2.4.4.4. Monosacáridos y KDO:

Se ensayó la capacidad inhibitoria de distintos monosacáridos a una concentración final de 10 mM. Estos fueron: glucosa, galactosa, glucosamina, galactosamina, Ac. galacturónico y ramnosa. Los primeros 3 además del Ac. glucurónico (no ensayado) forman parte del LPS de las cepas de R.meliloti BPe y A148 (179). Ninguno presentó capacidad inhibitoria. Tampoco fue inhibidor el KDO a una concentración final de 5 mM.

De estos 2 últimos puntos se podría concluir que ninguno de los azúcares por sí solo sería el epítopo en la reacción antígeno-anticuerpo y para que el antígeno se mantenga como tal es necesario que se conserve una determinada estructura tridimensional o que esté intacto

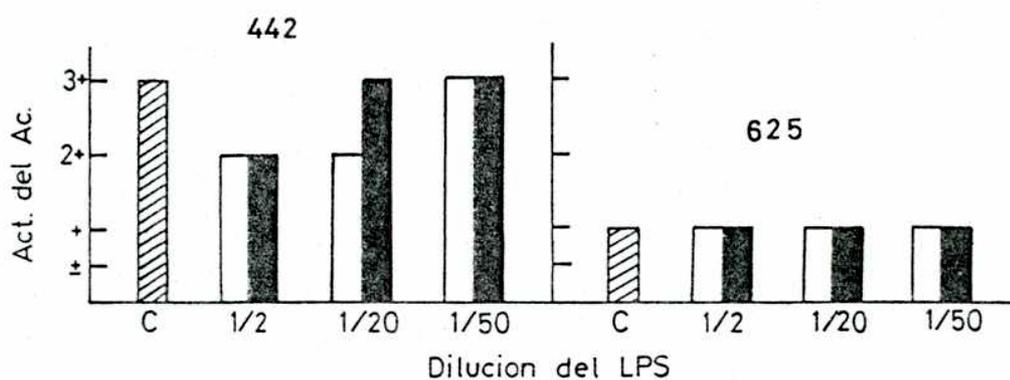


Figura 24: Capacidad de inhibición comparativa de los LPS de *R. meliloti* y de *E. coli* de los Acs Mcs 442 y 625:

En un ensayo similar al descrito en la Figura 22 se comparó la inhibición obtenida con los LPS de *R. meliloti* 102F51 HA y de *E. coli* K12 de la actividad de los Acs Mcs 442 y 625. En este caso el resultado se determinó en forma semicuantitativa, asignándole determinado número de cruces a determinada intensidad de color.

▨: Control, actividad del anticuerpo incubado previamente con buffer en lugar de LPS. □: actividad del anticuerpo remanente después de incubar con el LPS del *R. meliloti*, ■: actividad del anticuerpo remanente después de incubar con el LPS de *E. coli*.

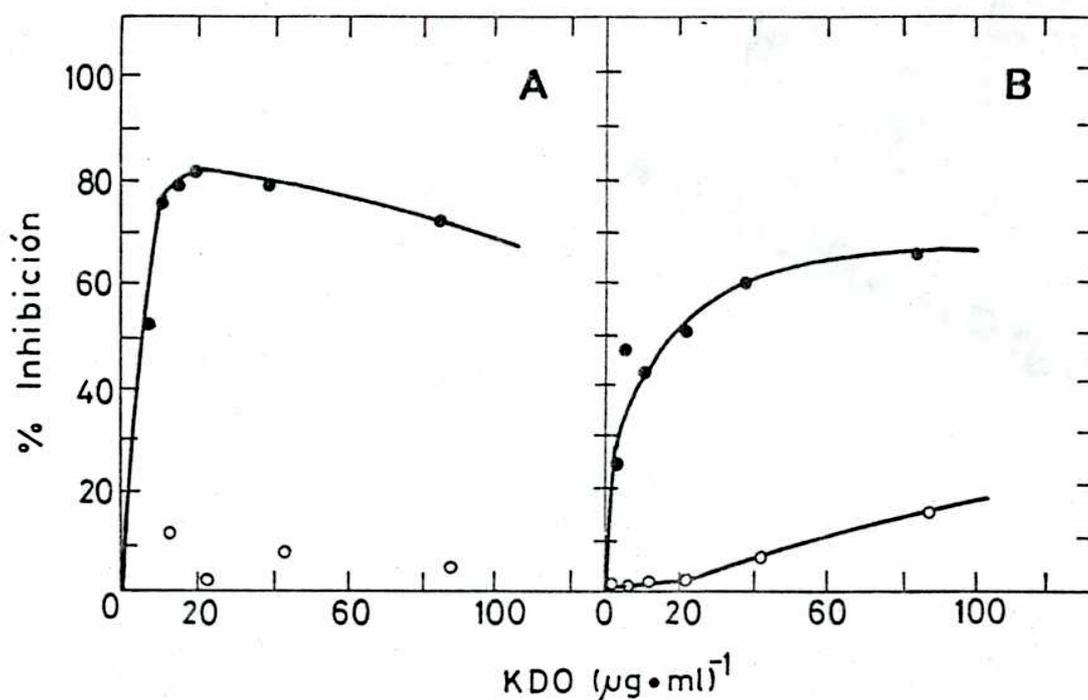


Figura 25: Capacidad inhibitoria comparativa del LPS y del lípido A liberado del mismo después de la hidrólisis con Ac. acético:

En un ensayo similar al descrito en la leyenda de la Figura 22 se determinó la capacidad de inhibición del LPS de *R.meliloti* 102F51 HA y del lípido A que es el precipitado formado después de la hidrólisis con Ac. acético al 1% (3.1.3.6.1). Los Ac. Mcs ensayados fueron A) G<sub>113</sub> y B) H<sub>104</sub>. (●--●): LPS; (○--○): lípido A.

el punto de unión entre el lípido A y el polisacárido.

#### 3.2.4.5. Efecto de la mutación del receptor al fago F20:

Cuando R.meliloti 102F51 HA (F20<sup>S</sup> 16B<sup>F</sup>) (72) se somete a una gran concentración del fago F20 se pueden aislar colonias que son R.meliloti 102F51 (F20<sup>F</sup> 16B<sup>F</sup>) (71); estas últimas son fenotípicamente LA en cuanto a su capacidad de aglutinación y además mantienen la capacidad de nodular.

Handelsman (71) informó que este tipo de mutantes presentan un LPS alterado en la composición de azúcares. Por ello se decidió comparar la capacidad de adsorción de este tipo de mutante (R.meliloti F20<sup>F</sup> 16B<sup>F</sup>, obtenida por la Dra S. Cavaignac) con el de la cepa original ya que al tener alterado el LPS pudiera ser que también estuviera afectada su capacidad de interacción con el anticuerpo.

En la Figura 26 se observan los resultados de dos experimentos. Hay una tendencia de la mutante, en un caso (Figura 26 A) más pronunciado que en otro, de adsorber menos cantidad de Ac que la cepa original y en consecuencia dar menores valores de inhibición. Esto apoyaría la idea que este Ac Mc está dirigido hacia el lipopolisacárido de la bacteria. En la figura 26 B se observa que los valores de inhibición para ambos tipos de bacterias disminuyen cuando los mismos se cosechan en fase estacionaria. Este fenómeno no se siguió investigando.

#### 3.2.4.6. Efecto del medio de cultivo:

Las bacterias utilizadas para las inmunizaciones así como para todas las reacciones de ELISA y de adsorción siempre fueron cultivadas en medio mínimo definido. Cuando se los comparó en su capacidad de adsorción con aquellas bacterias crecidas en medio YEM se observó (Figura 27) que estas últimas tenían menor o ninguna capacidad de unir los Acs.

Sin embargo el LPS ensayado anteriormente y que tenía capacidad de inhibición de la actividad de los Acs había sido obtenido de bacterias justamente cultivadas en este medio YEM.

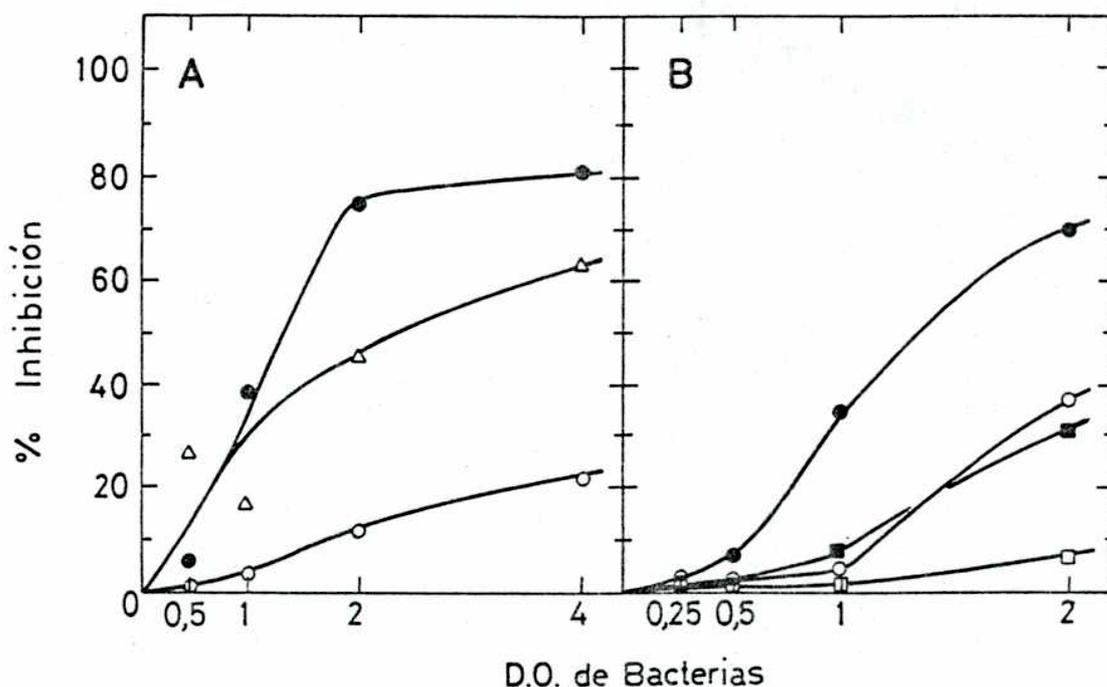


Figura 26: Capacidad de adsorción de una mutante *R.meliloti* 102F51 ( $F20^I$   $16B^I$ ):

Mediante un ensayo como el descrito en la leyenda de la Figura 20 se comparó la capacidad de adsorción del  $\text{Ac Mc G}_{113}$  tanto por parte de bacterias *R.meliloti* 102F51 HA ( $F20^S$   $16B^I$ ) (cepa original) como de la mutante ( $F20^I$   $16B^I$ ). A y B son 2 experimentos distintos.

Bacterias utilizadas: (●--●), *R.meliloti* 102F51 HA ( $F20^S$   $16B^I$ ) (fase logarítmica); (o--o), *R.meliloti* 102F51 ( $F20^I$   $16B^I$ ) (fase logarítmica); (■--■), *R.meliloti* 102F51 HA ( $F20^S$   $16B^I$ ) (fase estacionaria); (□--□), *R.meliloti* 102F51 ( $F20^I$   $16B^I$ ) (fase estacionaria); (Δ--Δ), *R.meliloti* 102F51 LA (fase logarítmica).

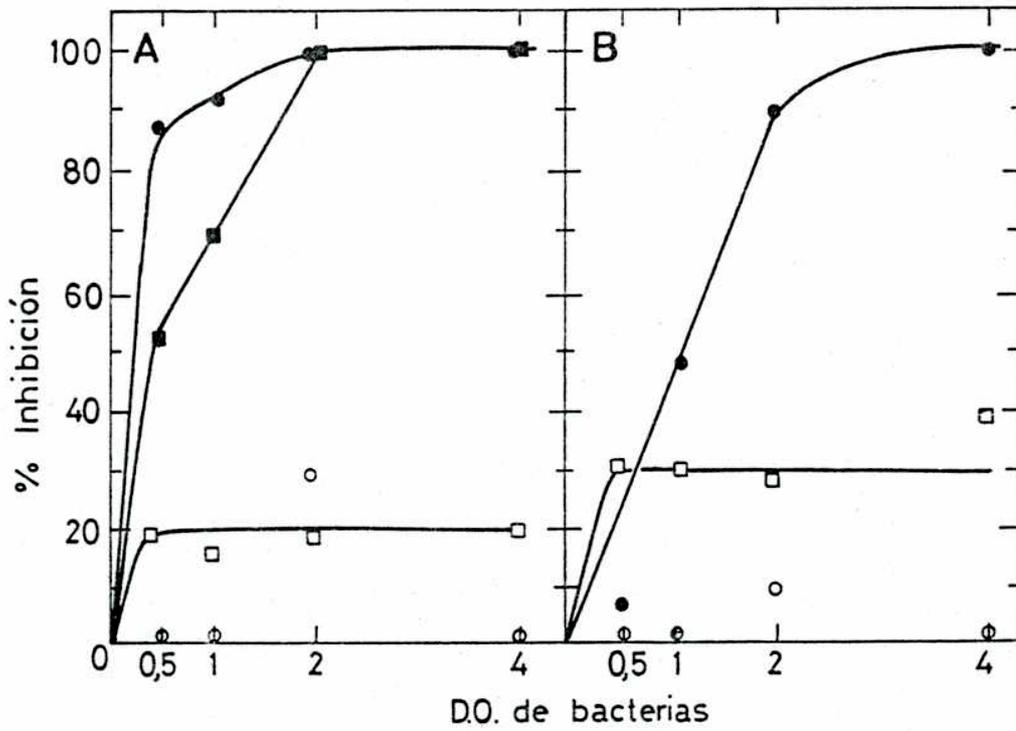


Figura 27: Efecto del medio de cultivo sobre bacterias enteras:

Mediante un ensayo de adsorción similar al descrito en la leyenda de la Figura 20 se compararon la capacidad de unir anticuerpo de tanto *R. meliloti* 102F51 HA cultivado en MM como de las mismas bacterias cultivadas en YEM.

(●-●): MM, DO 0,4; (■-■): MM, DO 0,75; (○-○): YEM, DO 0,3; (□-□): YEM, DO 0,6.

Se obtuvo entonces nuevamente y en forma paralela LPS de R.meliloti 102F51 HA tanto del cultivado en medio mínimo como del cultivado en medio YEM y ambos cosechados en la fase logarítmica tardía y se comparó su capacidad inhibitoria de la reacción antígeno-anticuerpo.

Los resultados de la Figura 28 indican que los 2 LPS se comportaron de la misma manera. En el mismo experimento se ensayó la capacidad de adsorción de bacterias cultivadas en MM (control positivo) y la de bacterias cultivadas en medio YEM (control negativo).

Por lo tanto si bien había una diferencia, posiblemente en la superficie, entre las bacterias crecidas en los 2 medios, esta no se debía a una diferencia en la molécula de LPS en sí.

Cabrían entonces 2 posibilidades:

a) que en medio YEM se formen menos moléculas de LPS por bacteria. Esto parece poco probable ya que en las curvas observadas en la Figura 27 no parece que a mayores DO de bacterias se produzca un aumento en la cantidad de Ac adsorbido a las bacterias cultivadas en medio YEM.

b) Que en medio YEM se forme alguna estructura que no se forma o que está en mucha menor concentración en MM y que esté impidiendo la interacción de los anticuerpos con el LPS.

Esta sería una estructura fuertemente unida a la superficie ya que al utilizar para el ensayo de adsorción bacterias crecidas en medio YEM y lavadas 3 veces con NaCl 0,5 M, no se observó (Figura 29) un restablecimiento de la adsorción comparando con la que presentaban las bacterias crecidas en medio mínimo.

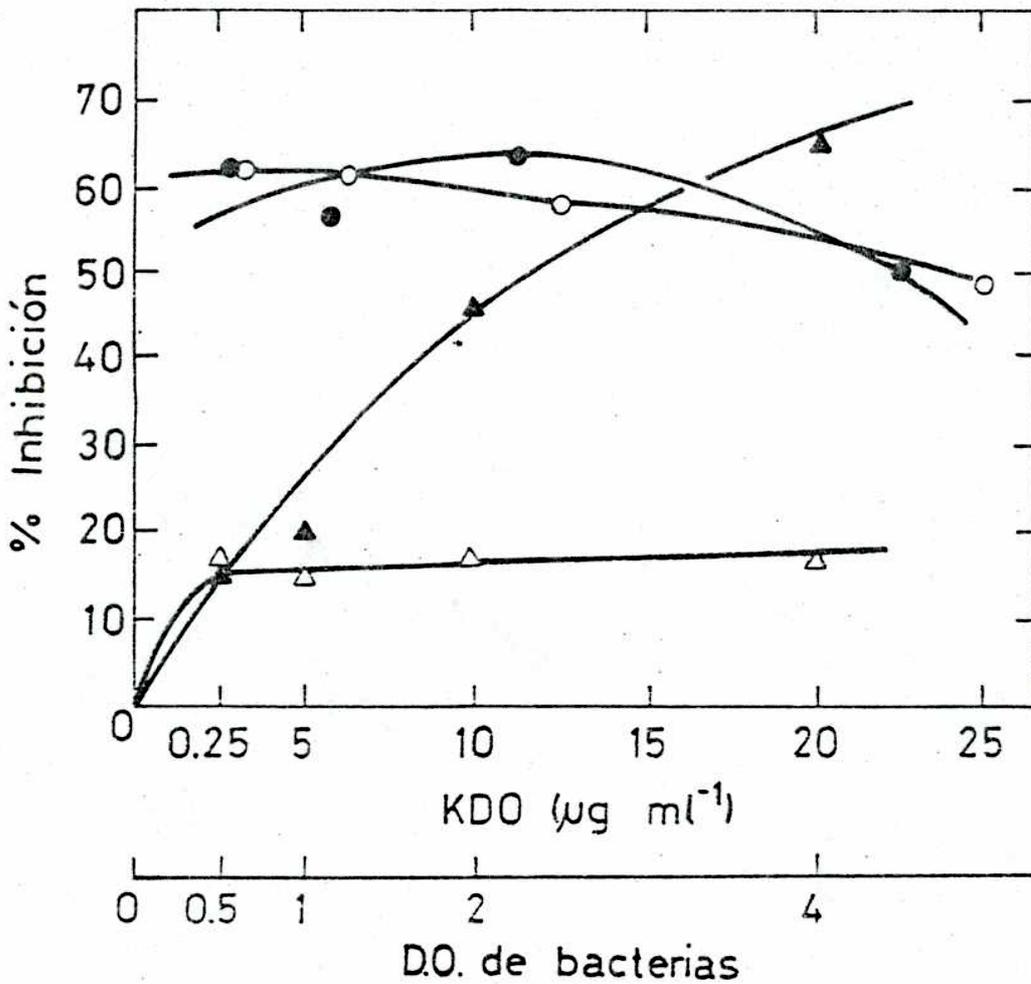


Figura 28: Efecto del medio de cultivo sobre el LPS:

Por un ensayo de inhibición similar al descrito en la leyenda de la Figura 22 se comparó la capacidad de inhibir la actividad del Ac Mc G<sub>113</sub> de: (●-●), LPS de *R. meliloti* 102F51 HA cultivado en MM y de (○-○), LPS de *R. meliloti* 102F51 HA cultivado en YEM.

En el mismo experimento se ensayaron como control positivo de la capacidad de unir anticuerpo, (▲-▲): *R. meliloti* (bacterias enteras) cultivado en MM y como control negativo de la capacidad de unir el anticuerpo, (△-△): *R. meliloti* (bacterias enteras) cultivadas en YEM.

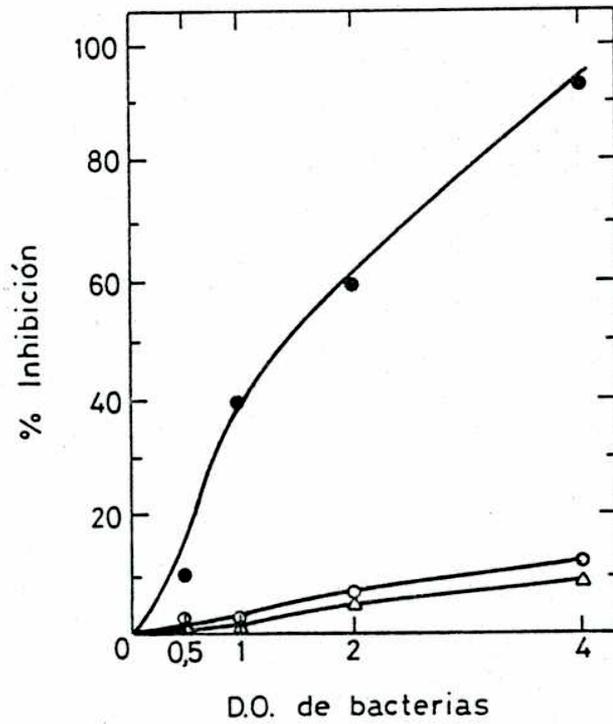


Figura 29: Efecto del lavado de *R. meliloti* cultivado en YEM con NaCl 0,5 M:

En un ensayo de adsorción similar al descrito en la leyenda de la Figura 20 se comparó la capacidad de unir el Ac Mc G<sub>113</sub> de: (●-●), *R. meliloti* 102F51 HA cultivado en MM; (○-○), *R. meliloti* 102F51 HA cultivada en YEM; (△-△), *R. meliloti* 102F51 HA cultivada en YEM y lavada 3 veces con NaCl 0,5 M.

### 3.2.5. Miscelánea: Determinación de la clase de inmunoglobulina:

En la Figura 30 se observa la autoradiografía resultante de correr los sobrenadantes de los hibridomas marcados con  $^{35}\text{S}$ -Metionina en electroforesis con SDS. Para los 4 Acs Mcs ensayados se observa una banda de  $\approx 21$  kD que podría representar la cadena liviana de las Igs cuyo PM es de 25 kD. En el caso del Ac Mc H<sub>104</sub> se observa una banda de  $\approx 72.5$  kD por lo que sería una IgM ya que la cadena pesada de esta inmunoglobulina es de 70 kD. Lo mismo parecería ocurrir para el Ac Mc 442. En cambio el Ac Mc C<sub>7</sub> es una IgG ya que la otra banda observable corresponde a un PM de  $\approx 45$  kD siendo el PM de la cadena pesada de la IgG de 50 kD. Otro de los anticuerpos estudiados fue el G<sub>113</sub> pero no se pudo determinar la clase de inmunoglobulina a la que pertenece ya que parece haberse degradado en el procedimiento.



**Figura 30: Determinación de la clase de Inmunoglobulina:**

Se marcaron las células de los hibridomas en cultivo con  $^{35}\text{S}$ -Metionina por 3 hs y luego de centrifugar se precipitaron las proteínas del sobrenadante con TCA. Se calentó el precipitado en buffer de sembrado y después de centrifugar se corrió en una PAGE-SDS al 10% con urea 3 M (2.1.10.). Se reveló por autoradiografía.

Carril A: Ac Mc G<sub>113</sub>; carril B: Ac Mc H<sub>104</sub>; carril C: Ac Mc C<sub>7</sub>, carril D: Ac Mc 442.  
 Marcadores de PM: lisozima (14,3 kD);  $\beta$  lactoglobulina (18,4 kD); tripsinógeno (24 kD); albúmina bovina (66 kD) y fosforilasa b (97,4 kD).

### 3.3. Discusión general y comentarios

A partir de los resultados obtenidos en la segunda parte de esta tesis se pueden realizar los siguientes comentarios:

1) Se logró poner a punto las técnicas de inmunización, fusión y detección de Acs Mcs contra R.meliloti. Esta metodología no estaba previamente desarrollada en el laboratorio y tampoco en el Instituto.

La técnica de inmunización utilizada fue simple y efectiva. Suero policlonal extraído a los 20 días dió un título de 1:2000. Se obtuvieron tanto Acs Mcs de la clase IgG como de la IgM.

Se tardó mucho en poner a punto la técnica de fusión. Si bien son muchos los factores que hay que cuidar y que pueden malograr la misma, en nuestro caso se puede afirmar que el factor limitante fue fundamentalmente el tipo de células de mieloma.

En cuanto a las técnicas de detección y titulación de los Acs Mcs, se utilizó un ensayo de ELISA que resultó reproducible, fácil y relativamente económico con posibilidades de ser cuantificado de acuerdo a los aparatos con los que se contaba en el instituto. La única desventaja fue su duración (2 días)

2) Se encontró que distintas cepas de R.meliloti así como otra bacteria no relacionada como es E.coli tenían distinta capacidad de unirse a la placa de poliestireno por el método de fijación utilizado. Esto sin duda se debe a la distinta naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de la superficie de las distintas bacterias (134, 116). Esto hacía complicado el uso de un ensayo de ELISA directo para determinar la especificidad de los Acs Mcs obtenidos por lo que se optó por el ensayo de adsorción descripto.

3) Se determinó la especificidad de distintos Acs Mcs por las bacterias inmunizantes.

Los 3 Acs Mcs estudiados provenían de una fusión en la cual la bacteria con que se realizaron las 2 primeras inyecciones fue R.meliloti R41 y aquella con la que se realizó la tercer y última inyección, R.meliloti 102F51 HA. La razón de esto fue la de obtener Acs Mcs hacia epitopes comunes a distintos R.meliloti (descartándose todos aquellos que fueran comunes a otros tipos de bacterias). Sorprendentemente 2 de los Acs Mcs ( $G_{113}$  y  $H_{104}$ ) fueron mas específicos para la segunda cepa inmunizante, en cambio el Ac Mc  $C_7$  presentó mayor reacción cruzada ya que reaccionó tanto con R.meliloti 102F51 HA, R41 y GR4.

Una consecuencia de estos resultados fue que en base a su reactividad con estos 3 Acs Mcs se pudieron diferenciar distintas cepas de R.meliloti. Por ejemplo R.meliloti 102F51 HA reaccionó muy bien con los 3 Acs, R.meliloti R41 no reaccionó con 2 de ellos mientras que R.meliloti 102F51 LA lo hizo medianamente con los 3.

Tal vez ampliando el panel de Acs Mcs se puedan utilizar estos como una herramienta de tipificación de las distintas cepas de R.meliloti. Asimismo encontrando el ensayo adecuado se podrían utilizar estos Acs para estudios de competitividad en suelos, etc.

4) Por las distintas pruebas descritas a continuación, algunas mas contundentes que otras, se llegó a la conclusión que el antígeno sobre el que se encuentra el epitope que reacciona con los Acs Mcs ( $G_{113}$ ,  $H_{104}$ ,  $C_7$  y  $D_9$ ) sería el LPS.

a) El antígeno en cuestión se encuentra expuesto en la superficie de la bacteria.

b) debido a los resultados obtenidos con el tratamiento con periodato de sodio y calentamiento parecería tratarse de una estructura que contiene azúcares más que de una proteína.

c) Los polisacáridos que se encuentran en la superficie de la bacteria y que podrían servir de antígenos serían el exopolisacárido, los glucanos o el lipopolisacárido. Un primer indicio de que el EPS no sería el antígeno involucrado es el hecho que la bacteria antes de la inmunización se sometió a lavados y centrifugaciones que la harían perder la mayor parte de éste. Además en MM y en fase logarítmica tardía, que es la fase en que se cosecharon las

bacterias, no se forma mucho EPS.

d) El LPS inhibió la actividad de los Acs Mcs ( $G_{113}$ ,  $H_{104}$  y  $C_7$ ) mientras que el EPS no fue capaz de hacerlo. Si bien no se ensayaron los glucanos como inhibidores estos también quedarían descartados ya que el LPS utilizado estaba libre de los mismos (179, 30).

e) Los Acs Mcs ( $G_{113}$ ,  $H_{104}$ ,  $C_7$  y  $D_9$ ) reaccionaron en mucho mayor grado con el lipopolisacárido de R.meliloti que con el de E.coli, lo cual estaría de acuerdo con la especificidad observada con las bacterias enteras.

f) Mutantes de R.meliloti 102F51 ( $F20^S$   $16B^r$ ) que son  $F20^r$   $16B^r$  reaccionaron en menor grado con el Ac Mc  $G_{113}$  (único ensayado). Esto describe que este tipo de mutantes tendría alterada la composición del lipopolisacárido (71).

5) Utilizando estos Acs Mcs se encontraron diferencias en la superficie de bacterias cultivadas en medio YEM con respecto de aquellas cultivadas en medio mínimo definido. La diferencia no se debería al LPS en sí sino a alguna estructura que se formaría en medio rico, tal vez en mucha mayor cantidad y que impediría la interacción entre los anticuerpos y el lipopolisacárido. Esto sería un indicio más (91, 112) de los cambios que puede sufrir una misma bacteria al cultivarla en distintos medios y el cuidado que hay que tener entonces al extrapolar los resultados que se obtienen en el laboratorio con lo que sucede en realidad en el suelo.

6) Uno de los objetivos que se había fijado al obtener Acs Mcs contra la superficie de R.meliloti fue el de contar con una herramienta para detectar las estructuras que intervienen en la interacción específica. En el trabajo descrito se obtuvieron Acs Mcs contra el LPS el cual sería la estructura más antigénica expuesta en la superficie de las bacterias utilizadas. Si bien hay evidencias que demuestran la participación del LPS de R.meliloti en el reconocimiento temprano (94), pueden haber otras moléculas importantes para esta etapa que por ser menos antigénicas o tal vez por ser inducidas bajo determinadas condiciones son más

difíciles de detectar. Es por eso que de la experiencia adquirida en este sentido se concluye que el camino utilizado sería el apropiado pero que es necesario contar con un banco con mayor número de anticuerpos monoclonales utilizando distintos esquemas de inmunización y bacterias tratadas o cultivadas de distintas maneras.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abe, M.; Amemura, A. and Higashi, S. (1982) *Plant Soil* 64, 315
2. Albersheim, A. and Anderson-Prouty, J. (1975) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 31
3. Alderton, G.; Ward, W.H. and Tenold, H.L.; (1945) *J. Biol. Chem.* 157, 43
4. Amemura, A. and Cabrera Crespo, J. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 2443
5. Amemura, A.; Hysamatsu, M.; Mitani, H. and Harada, T. (1983) *Carbohydr. Res.* 114, 277
6. Bal, A.K and Shantharan, S. (1981) *Microbios Lett.* 16, 141
7. Ball, E. (1986) *Analytical Biochem.* 155, 23
8. Batley, M.; Redmon, J.W.; Djordjewic, J.P. and Rolfe, B.G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 901, 119
9. Bauer, W.D. (1981) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32, 407
10. Bellogin, R.A.; Espuny, M.R.; Ruiz-Sainz, J.E.; Jimenez-Díaz, R. y Perez-Silva, J. (1986) *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* 1, 57
11. Bhagwat, A.A. and Thomas, J. (1980) *J. Gen. Microbiol.* 117, 119
12. Bhuvanewari, T.V. and Bauer, W.D. (1978) *Plant Physiol.* 62, 71
13. Bhuvanewari, T.V.; Mills, K.K.; Crist, D.K.; Evans, W.R. and Bauer, W.D. (1983) *J. Bacteriol.* 153, 443
14. Bhuvanewari, T.V.; Pueppke, S.G. and Bauer, W. D. (1977) *Plant Physiol.* 60, 486
15. Bohlool, B.B. and Schmidt, E.L. (1974) *Science* 185, 269
16. Boyer, H.N. and Toulland-Dussoix, D. (1969) *J. Mol. Biol.* 41, 459
17. Bradley, D.J.; Butcher, G.W.; Galfré, G. Wood, E.A. and Brewin, N.J. (1986) *J. Cell Sci.* 85, 47
18. Bradley, D.J.; Wood, E.A.; Larkins, A.P.; Galfré, G.; Butcher, G.W. and Brewin, N.J. (1988) *Planta (Berl.)* 173, 149
19. Bray, D.; Robbins P.W. (1967) *J. Mol. Biol.* 30, 457
20. Brewin, N.J.; Robertson, J.G.; Wood, E.A.; Well, B.; Galfré, G. and Butcher, G.W. (1985) *EMBO J.* 4, 605

21. Brewin, N.J.; Wood, E.A.; Larkins, A.P.; Galfré, G. and Butcher, G.W. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 1959
22. Bromfield, E.S.P. and Jones, D.G. (1980) *J. Appl. Bacteriol.* 48, 259
23. Brown, C.M. and Dilworth, M.J. (1975) *J. Gen. Microbiol.* 86, 39
24. Buboiss, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. and Smith, E. (1951) *Nature (London)* 168, 167
25. Caetano-Anollés, G. and Favelukes, G. (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 377
26. Calvert, H.E.; Lahonde, M.; Bhuvanewari, T.V. and Bauer, W.D. (1978), *Can. J. Microbiol.* 24, 785
27. Carlson, R.W. (1982) *Nitrogen Fixation, Vol 2, Rhizobium*, Broughton, W.J., ed. Clarendon Press, Oxford, pp. 199.
28. Carlson, R.W. (1984) *J. Bacteriol.* 158, 1012
29. Carlson, R.W.; Lee, R.P. (1983) *Plant Physiol.* 71, 223
30. Carlson, R.W.; Sanders, R.E.; Napoli, C. and Albersheim, P. (1978) *Plant Physiol.* 62, 912
31. Carlson, R.W.; Shatters, R.; Duh, J.L.; Turnbull, E.; Hanley, B.; Rolfe, B.G. and Djordjelic, A. (1987) *Plant Physiol.* 84, 421
32. Cavaignac, S. Tesis. (1988) Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
33. Chakranorty, A.K.; Zurkwoski, W.; Shine, J. and Rolfe, B.G. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 585
34. Chen, A.P.T. and Philips, D.A. (1976) *Physiol. Plant.* 38, 83
35. Chen, H.; Batley, M.; Redmond, J. and Rolfe, B.G. (1985) *J. Plant Physiol.* 120, 331
36. Chen, T.B. and Carlson, R.W. (1987) *Plant Physiol.* 83, 138
37. Cobbold, S. and Waldman, H. (1981) *J. Immunol. Methods* 44, 125
38. Coira, J.A.; Cavaignac, S. and Ugalde, R.A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 10601
39. Conway de Macario, E.; Macario, A.J L and Wolin, M.J. (1982) *J. Bacteriol.* 149, 320
40. Dazzo, F.B. and Brill, W.J. (1977) *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 132
41. Dazzo, F.B. and Brill, W.J. (1979) *J. Bacteriol* 137, 1362
42. Dazzo, F.B. and Hubbell, D.H. (1975) *Appl. Microbiol.* 30, 1017

43. Dazzo, F.B. and Hubbell, D.H. (1976) *Plant Soil* 43, 713
44. Dazzo, F.B. and Truchet, G.L. (1983) *J. Membrane Biol.* 73, 1
45. Dazzo, F.B.; Hrabak, E.M.; Urbano, M.R.; Sherwood, J.E. and Truchet, G.L. (1981) *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, Newton, W and Gibson, A. (eds.), Australian Academy of Science, Canberra, Australia, pp. 292.
46. Dazzo, F.B.; Napoli, C.H. and Hubbell, D.H. (1976) *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 166
47. Dazzo, F.B.; Truchet, G.L. and Hrabak, E.M. (1984) *Adv. in Nitrogen Fixation Res.* Veeger, C. and Newton, W.E. (eds.) Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands. p.413.
48. Dazzo, F.B.; Truchet, G.L.; Sherwood, J.E.; Hrabak, E. M.; Abe, M. and Pankratz, S.H. (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1140
49. Dazzo, F.B.; Truchet, G.L.; Sherwood, J.E.; Hrabak, E.M. and Gardiol, A. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 478
50. Dazzo, F.B.; Urbano, M.R. and Brill, W.J. (1979) *Curr. Microbiol.* 2, 15
51. Dazzo, F.B.; Yanke, W.E. and Brill, W.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 539, 276
52. Dell, A. York, W.S.; Mc Niel, M.; Darwill, A.G. and Albersheim, P. (1983) *Carbohydr. Res.* 117, 185
53. Djordjewic, M.A.; Redmond, J.W. Batley, M. and Rolfe, B.G. (1987) *EMBO J.* 6, 1173
54. Dudman, W.F. (1968) *J. Bacteriol.* 95, 1200
55. Dudman, W.F. (1976) *Carbohydr. Res.* 46, 97
56. Dudman, W.F. (1978) *Carbohydr. Res.* 66, 9
57. Dudman, W.F.; Franz, L.E. Mc Niel, M.; Darwill, A.G. and Albersheim, P. (1983) *Carbohydr. Res.* 117, 168
58. Emini, E.A.; Jameson, B.A.; Lewis, A.J; Larsen, G.R. and Wimmer, E. (1982) *J. Virol.* 43, 997
59. Evans, L.S; Lewin, K.F. and Vella, F.A.; (1980) *Plant Soil* 56, 71
60. Fariás, R.N.; Lopez Viñals, A. y Morero, R.D. (1985) *XXI Reu. Nac. Soc. Invest. Bioq. (SAIB).* c 36.
61. Finan, T.M.; Hirsch, A.M.; Leigh, J.A.; Johansen, E.; Kuldau, G.A.; Deegan, S.; Walker, G.C. and Signer, E.R. (1985) *Cell* 40, 869
62. Franco, A.A. and Munns, D.N. (1982) *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 296

63. Galfré, G. and Milstein, C. (1981) *Methods Enzymol.* 73, 1
64. Gatehouse, J. and Boulter, D. (1980) *Physiol. Plant.* 49, 437
65. Geremía, R.A.; Cavaignac, S.; Zorreguieta, A.; Toro, N.; Olivares, J. and Ugalde, R.A. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 880
66. Gerhard, W.U. and Webster, R.G. (1978) *J. Exp. Med.* 148, 352
67. Ghai, S.K.; Hisamatsu, M.; Amemura, A. and Harada, T. (1981) *J. Gen. Microbiol.* 122, 33
68. Goldberg, R.B.; Hoschek, G. and Vodkin, L.O. (1983) *Cell* 33, 465
69. Gosh, S. and Campbell, A.M. (1986) *Immunol. Today* 7, 217
70. Halverson, L.J. and Stacey, G. (1986) *Microbiol. Rev.* 50, 193
71. Handelsman, J.E. (1984) Thesis. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.
72. Handelsman, J.; Ugalde, R.A. and Brill, W.J. (1984) *J. Bacteriol.* 157, 703
73. Hartel, P.G. and Alexander, M. (1983) *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 502
74. Hazlewood, G.P.; Theodorou, M.K.; Hutchings, A.; Jordan, D.J. and Galfré, G. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 43
75. Hillreigel, H. and Wilfarth, H. (1888) *Beilage Z. Vers Rubenzuckerind* pp. 1.
76. Hisamatsu, M.; Amemura, A.; Koizumi, K., Utamira, T. and Okada, Y. (1983) *Carbohydr. Res.* 121, 31
77. Hisamatsu, M.; Yamada, T.; Akaki, M.; Nashimoki, H.; Takai, Y. and Amemura, A. (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49, 1447
78. Hisamatsu, M.; Yamada, T.; Higashiura, T. and Ikeda, M. (1987) *Carbohydr. Res.* 163, 115
79. Hohenberg, J.S and Munns, D.N. (1984) *Agron. J.* 76, 477
80. Horvath, B.; Bachem, C.W.B.; Schell, J. and Kondorosi, A. (1987) *EMBO J.* 6, 841
81. Hrabak, E.M.; Urbano, M.R. and Dazzo, F.B. (1981) *J. Bacteriol.* 148, 697
82. Hubbell, D.H. (1970) *Bot. Gaz.* 131, 337
83. Innes, R.W.; Kuempel, P.L.; Plazinski, J.; Canter-Cremers, H.; Rolfe, B.G. and Djordjelic M.A. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 201, 426
84. Jansson, P.E.; Lindberg, B. and Ljunggren, H. (1979) *Carbohydr. Res.* 75, 207

85. Johansen, E.; Finan, T.M.; Geftter, M.L. and Signer, E.R. (1984) *J. Bacteriol.* 160, 454
86. Kamberger, W. (1979) *Arch. Microbiol.* 121, 83
87. Kamberger, W. (1979) *FEMS Microbiol. Lett.* 6, 361
88. Kato, G.; Marijyama, Y. and Nakamura, M. (1979) *Agric. Biol. Chem.* 43, 1085
89. Kearney, J.F.; Radbruch, A.; Liesegang, B. and Rajewsky, K. (1979) *J. Immunol.* 123, 1548
90. Kennett, R.H. (1980) *Monoclonal antibodies. Hybridoma: A New Dimension in Biological Assays.* Kennett, R.H.; McKearn, T.J and Becttol, K.B. (eds.). Plenum, New York, p. 376.
91. Kijne, J.W.; Smit, G.; Díaz, C.L. and Lugtenberg, B.J. (1988) *J Bacteriol.* 170, 2994
92. Köhler, G. and Milstein, C. (1975) *Nature (London)* 256, 495
93. Kovalevskaya, T.M.; Kosenko, L.V. Votselko, S.K. (1984) *Mikrobiol. Z. H. (Kiev)* 46, 14
94. Lagares, A. and Favelukes, G. (1988) 7th International Congress on Nitrogen Fixation, Cologne, Germany.
95. Law, I.J. and Strijdom, B.W. (1977) *Soil Biol. Chem.* 9, 79
96. Ledbetter, J.A.; Goding, J.W.; Tsu, T.T and Herzenberg, L.A. (1979) *Immunogenetics* 8, 347
97. Leigh, J.A.; Reed, J.W.; Hanks, J.F.; Hirsch, A.M. and Walker, G.C. (1987) *Cell* 51, 579
98. Leigh, J.A.; Signer, E.R. and Walker, G.C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6231
99. Lepek, V.C. y Maréchal, L.R. (1985) XXI Reu. Nac. Soc. Invest. Bioq. (SAIB). m 15.
100. Lepek, V.C.; Ugalde, R.A. y Maréchal, L.R. (1984) IV Congreso Panam. de Bioq. (PAABS), Buenos Aires, Argentina. p 409.
101. Lillich, T.T. and Elkan, G.H. (1968) *Can. J. Microbiol.* 17, 617
102. Lis, H.; Sela, B.; Sachs, L. and Sharon, N. (1970) *Biochim. biophys. Acta* 211, 582
103. Littlefield, J.W. (1964) *Science* 145, 709
104. Ljunggren, H. (1969) *Physiol. Plant. Suppl.* 5 pp. 84.

105. Lonendorf, H.S. and Alexander, M. (1983) *Soil Sce. Soc. Am. J.* 47, 935
106. Longworth, L.G. and Jacobson, C.F. (1949) *J. Phys. Colloid. Chem.* 53, 126
107. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265
108. Luderitz, O.; Jann, K. and Wheat, R. (1968) *Comp. Biochem.* 26, 105
109. Martensson, A.M. and Guestafsson, J.G. (1985) *J. Gen. Microbiol.* 131, 3077
110. Martensson, A.M.; Gustfsson, J.G. and Ljunggren, H.D.(1984) *J. Gen. Microbiol.* 130, 247
111. Matthyse, A.G. (1983) *J. Bacteriol.* 154, 906
112. McEldowney, S. and Fletcher, M. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 513
113. McNeil, M.; Darwill, J.; Darwill, A.G. and Albersheim, P. (1986) *Carbohydr. Res.* 146, 307
114. Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor laboratory (ed.). Cold Spring Harbor, New York.
115. Miller, K.J.; Reinhold, U.N.; Weissborn, A.C. and Kennedy, E.P. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 901, 112
116. Minagi, S.; Miyake, Y.; Fujioka, Y.; Tsuru, H. and Suginaka, H. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 1111
117. Morero, R.D. y Posse, E. (1985) *XXI Reu. Nac. Soc. Invest. Bioq. (SAIB)*. m 56.
118. Mort, A.J. and Bauer, W.D. (1980) *Plant Physiol.* 66, 1158
119. Mulligan, J. and Long, S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6609
120. Müller, P.; Hynes, M.; Kapp, D.; Niehaus, K. and Pühler, A. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 211, 17
121. Mutaftschiev, S.; Vasse, J. and Truchet, G.L. (1982) *FEMS Microbiol. Lett.* 13, 171
122. Napoli, C.A.; Dazzo, F.B.; Hubbell, D.H. (1975) *Appl. Microbiol.* 30, 123
123. Oliva, L.R. y Daleo, G.R. (1985) *XXI Reu. Nac. Soc. Argentina de Invest. Bioq. (SAIB)*. m 24.
124. Orf, J.H.; Hymowitz, T.; Pull, S.P. and Pueppke, J.G. (1978) *Crop. Sci.* 18, 899
125. Orskov, I.; Orskov, F.; Jann, B. and Jann, K. (1977) *Bacteriol. Rev.* 41, 667
126. Osborn, M. and Munson, R. (1984) *Methods Enzymol.* 31, 642

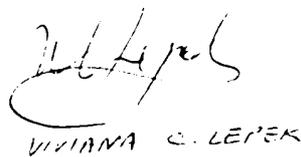
127. Paaú, A.S.; Leps, W.T. and Brill, W.J. (1981) *Science* 213, 1513
128. Perlman, G.E. (1955) *Advances in Protein Chemistry* 10, 1
129. Peters, N.K.; Frost, J.W. and Long, J.R. (1986) *Science* 233, 977
130. Peterson, A.A.; Hancock, R.W. and McGroarty, E.J. (1985) *J Bacteriol* 164, 1256
131. Planqué, K. and Kijne, J.W. (1977) *FEBS Lett.* 73, 64
132. Planqué, K.; van Nicrop, J.J.; Burgers, A. and Wilkinson, S.G. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 110, 151
133. Postgate, J. (1987, 2nd ed.) *New Studies in Biology. Nitrogen Fixation.* Edward Arnold (Publishers) Ltd.
134. Pringle, J.H. and Fletcher, M. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132, 743
135. Pueppke, S.G. (1984) *Plant Physiol.* 75, 924
136. Pull, S.P.; Pueppke, S.G.; Humowitz, T. and Orf, J.H. (1978) *Science* 200, 1277
137. Puvanesarajah, U.; Schell, F.M.; Stacey, G.; Douglas, C.J. and Nester, E.W. (1985) *J. Bacteriol.* 164, 102
138. Rice, W.A.; Penney, D.C. and Nyborg, M. (1977) *Can. J. Soil Sci.* 57, 197
139. Righetti, P.G. and Drysdale, J.W. (1976) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.* Work, T.S. (ed.). N.I.M.R., Mill Hill, London and Work, E. Imperial College, London.
140. Robertsen, B.; Aman, P.; Darwill, A.G.; Mc Neil, M. and Albersheim, P. (1981) *Plant Physiol.* 67, 389
141. Russa, R.; Luderitz, O. and Rietschel, E.T. (1985) *Arch. Microbiol.* 141, 284
142. Russa, R.; Urbanik, T. Koralczuk, E. and Lorkiewicz, Z. (1982) *FEMS Lett.* 13, 161
143. Russa, R.; Urbanik, T.; Zurkowsky, W. and Lorkiewicz, Z. (1981) *Plant Soil* 61, 81
144. Schnaitman, C. (1981) *Manual of Methods for General Bacteriology.* Gerhardt, B. (ed.). Amer. Soc. Microbiol. p. 52.
145. Seegers, R. and LaRue, T.A. (1985) *J. Bacteriol.* 162, 7841
146. Sequeira, L. (1984) *Biol. Cell* 51, 281
147. Sherwood, J.E.; Truchet, G.L. and Dazzo, F.B. (1984) *Advances in Nitrogen Fixation Research*, Veeger, C. and Newton W. E. (eds.), Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, p. 428.

148. Sherwood, J.E.; Vass, J.M.; Dazzo, F.B. and Truchet, G.L. (1984) *J. Bacteriol.* 159, 145
149. Solheim, B. and Raa, J. (1973) *J. Gen. Microbiol.* 77, 241
150. Stacey, G.; Paa, A.S. and Brill, W.J. (1980) *Plant Physiol.* 66, 609
151. Stanfield, S.W.; Ielpi, L.; O'Brochta, D.; Helinski, D.R. and Ditta, G.S. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 3523
152. Su, L.; Pueppke, J.G. and Friedman, H.P. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 292
153. Thornton, F.C. and Davey, C.B. (1983) *Agron. J.* 75, 557
154. Tolmasky, M.E. (1982) Tesis. Fac. Cs. Exact. y Nat., Buenos Aires.
155. Toro, N. and Olivares, J. (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1148
156. Toro, N. and Olivares, J. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202, 331
157. Tsien, H.; Jack, M.; Schmidt, E. and Wold, F. (1983) *Planta* 158, 128
158. Tsien, H.C. and Schmidt, E.L. (1977) *Can. J. Microbiol.* 23, 1274
159. Tsien, H.C. and Schmidt, E.L. (1980) *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 1100
160. Ugalde, R.A.; Coira, J.A. and Brill, W.J. (1986) *J. Bacteriol.* 168, 270
161. Ugalde, R.A.; Handelsman, J. and Brill, W.J. (1986) *J. Bacteriol.* 166, 148
162. Urbano, M.R. and Dazzo, F.B. (1980) *Abst. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.* p. 163.
163. Velez, D.; McMillan, J.D. and Miller, L. (1988) *Can. J. Microbiol.* 34, 88
164. Vesper, S.J. and Bauer, W.D. (1985) *Symbiosis* 1, 139
165. Vincent, J. (1970) *A Manual for the Practical Study of the Root Nodule -Bacteria.* Blackwell Scientific Publications, Oxford.
166. Vodkin, L.O.; Phodes, P.R. and Goldberg, R.B. (1983) *Cell* 34, 1023
167. Weidel, W. (1958) *Annu. Rev. Microbiol.* 12, 27
168. Weissbach, A. and Hurwitz, J. (1958) *J. Biol. Chem.* 234, 705
169. Westpal, O. and Jann, K. (1965) *Methods Carbohydr. Chem.* 5, 83
170. Wolpert, J.S. and Albersheim, P. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 729
171. Wong, P.P. (1980) *Plant Physiol.* 65, 1049

172. Wright, S.F.; Foster, J.G. and Bennett, O.L. (1986) Appl. Environ. Microbiol. 52, 119
173. Yao, P.Y.; Vincent, J.M. (1976) Plant Soil 45, 1
174. Yewdell, J.W.; Webster, R.G. and Gerhard, W.U. (1979) Nature (London) 279, 246
175. York, W.S.; Mc Neil, M.; Darwill, A.G. and Albersheim, P. (1980) J. Bacteriol. 142, 243
176. Zevenhizen, L.P.T.M. (1971) J. Gen. Microbiol. 68, 239
177. Zevenhizen, L.P.T.M. (1973) Carbohydr. Res. 26, 409
178. Zevenhizen, L.P.T.M. and van Neerven, A.R.W. (1983) Carbohydr. Res. 118, 127
179. Zevenhizen, L.P.T.M.; Scholten-Koerselman, J. and Posthumus, M.A. (1980) Arch. Microbiol. 125, 1
180. Zorreguieta, A.; Ugalde, R.A and Leloir, L.F. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 352
181. Zorreguieta, A.; Tolmasky, M.E. and Staneloni, R.J. (1985) Arch. Biochem. Biophys. 238, 368



LUIS R. PINAUD



VIVIANA C. LEPIK